

## 我和替莫唑胺二十年

王永峰<sup>1,2</sup>

1. 英国阿斯顿大学, 英国

2. 天津天士力集团, 天津 300402

**摘要:** 替莫唑胺 1999 年 1 月首在欧洲获批治疗胶质母细胞瘤(脑癌)上市后, 迅速得到全世界几十个国家的批准, 已经成为年销售额超 10 亿美元的重磅炸弹药物, 它与放疗结合是神经胶质瘤化疗的首选通用方案。通过记述参与研究替莫唑胺 20 年经历, 描述了发现替莫唑胺这个化合物的化学结构与活性关系交融发展的演变过程, 又揭示了将替莫唑胺内在的活性在临床上表现出来所经受的坎坷, 讲述了亲身开展替莫唑胺类产品深度开发研究工作的失败与成功。

**关键词:** 替莫唑胺; 神经胶质瘤; 咪唑并-1,2,3,5-四嗪系列化合物; 药物设计

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)04-0648-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.044

## Two decades I work with temozolomide

WANG Yong-feng<sup>1,2</sup>

1. Aston University, UK

2. Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300402, China

**Abstract:** Temozolomide (TMZ) was approved by EMA to market in EU in January 1999 for the treatment of glioblastoma multiforme (brain cancer). After that TMZ was approved by tens of medical regulation authorities worldwide and stepped up into the club of blockbuster drugs (annual sales exceeding \$1 000 000 000). Now TMZ combined with radiation is the standard treatment for brain cancer worldwide. The authors recalled his twenty years experiences of participation in the studies of TMZ and its analogous. First the record entertained us with persistent devoting research work of the structure activity relationship (SAR) of imidazo-1,2,3,5-tetrazin series compounds by Stevens for the thirty years. The luckily ending at TMZ was obtained; and then a hardship to bring TMZ on clinical application to realize TMZ intrinsic activity which could benefit the patients was recalled by a team of chemists and clinicians, finally the success and failure in the depth developments of TMZ and its analogous have been depicted.

**Key words:** temozolomide; glioblastoma multiforme; imidazo-1,2,3,5-tetrazin; drug design

1999 年 1 月 20 日, 欧洲药品管理局 (EMA) 批准先灵葆雅申报的替莫唑胺 (Temozolomide) 胶囊上市, 商品名 Temodal (泰道, 用于美国之外), 用于成年人新诊断的多形性胶质母细胞瘤 (脑癌); 同年 8 月 11 日美国食品和药品管理局 (FDA) 批准上市, 商品名 Temodar<sup>®</sup> (只用于美国), 成为全世界 20 年内首个获批的治疗脑癌的药物<sup>[1]</sup>。

2008 年替莫唑胺全球销售额达 10 亿美元, 成为重磅炸弹药物。2010 年替莫唑胺全球销售额达 11 亿美元<sup>[2]</sup>。重磅炸弹药物的价值已经超过名贵的宝石, 然而, 同名贵的宝石一样, 每一个重磅炸弹药物的发现和成功都伴随着耐人寻味的故事。替莫唑

胺是一个大学教师团队初始研究, 与企业和慈善基金联合开发新药的一个成功典范, 是科学家炽灼的追求、严谨的科学态度、高尚道德情操的结晶。

### 1 替莫唑胺的发现和开发

#### 1.1 替莫唑胺化合物的发现

替莫唑胺化合物的发现是 Stevens 教授<sup>[3]</sup>30 年从事杂环化学结构研究工作的沉积 (图 1)。

20 世纪 60 年代, Stevens 在诺丁汉大学做博士时即开始了五并六元二稠杂环化合物的合成, 当时得到的是一系列吡唑并-1,2,4-三嗪化合物 (1), 这组化合物显示出中等水平的抗癌活性。20 世纪 70 年代 Stevens 到阿斯顿大学任教开始独立研究的生

收稿日期: 2013-03-20

作者简介: 王永峰 (1956—), 男, 研究员, 博士, 研究领域横跨药物化学和特殊渠道给药制剂。E-mail: nauwqunctju@126.com

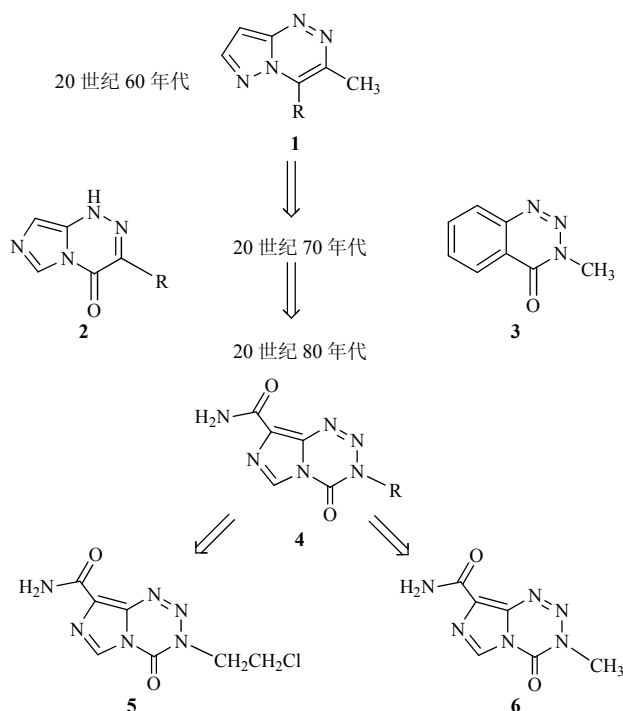


图 1 发现替莫唑胺五并六元二稠环杂环类化合物的化学结构演变史

Fig. 1 Progress in chemical structure evolution for discovering TMZ, a heterocyclic system of a five member ring fused a six member ring

涯,初期他合成了咪唑并-1,2,4-三嗪(2)和苯并-1,2,4-三嗪(3)两个系列化合物,很遗憾这两批化合物对从美国国家癌症研究所(national cancer institute, NCI)得到的白血病癌细胞没有表现出丝毫活性。

这些工作虽然没有产生候选药物,但是为替莫唑胺的诞生奠定了基础,同时吸引了制药企业的关注。70年代末期制药企业 May & Baker 开始资助 Stevens 的研究。1979 年德国化学家 Ege 发表了吡唑并-1,2,3,5-四嗪的合成(图 2)<sup>[4]</sup>,当时 Stevens 的在读博士 Stone 受这篇文章的启发,利用手中的咪唑衍生物合成了咪唑并-1,2,3,5-四嗪(4)<sup>[5]</sup>,化学结构上与先前合成的咪唑并-1,2,4-三嗪相比只是多 1 个氮原子的差别,但是却打开咪图唑胺(Mitozolamide, 5)和替莫唑胺(6)时代的大门<sup>[6]</sup>。

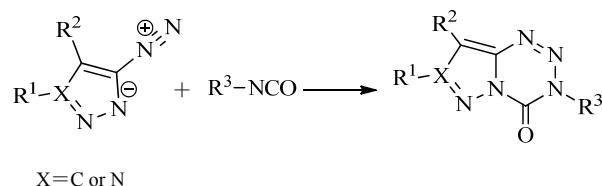


图 2 Ege 的吡唑并-1,2,3,5-四嗪的合成

Fig. 2 Synthesis of pyrazolo-1,2,3,5-tetrazine by Ege

Stevens 研究组合成出来的新型咪唑并-1,2,3,5-四嗪系列化合物在抗癌活性实验中显现出显著的活性,尤其是氯乙基衍生物咪图唑胺的活性最突出(表 1)<sup>[7]</sup>。值得注意的是这个时期甲基衍生物替莫唑胺,因为它的活性不突出,并没有引起人们的注意<sup>[8]</sup>。

抗癌活性结果令人兴奋,鼓舞着团队的士气,当时咪替唑胺非常被看好,视为即将到手的灵丹妙药。因此大家齐心努力迅速将临床前准备工作完成,1983 年咪图唑胺被推上了临床。从此开启了咪唑并-

表 1 咪唑并四嗪系列化合物抑制 TLX3 淋巴癌细胞活性

Table 1 Activity of imidazo-tetrazine series compounds inhibiting TLX3 lymphoma cell line

|  | R  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 疗效 <sup>a</sup> (T/C×100%) <sup>b</sup> |
|--|--|---------------------------|---|
|  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Cl               | 40                        | 5/5 cures                               |
|  | CH <sub>3</sub>                                  | 160                       | 157                                     |
|  | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                  | 640                       | 123                                     |
|  | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                  | 320                       | 103                                     |
|  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> | 80                        | 103                                     |
|  | CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>               | 80                        | 103                                     |
|  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Br               | 160                       | 137                                     |
|  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl               | 320                       | 108                                     |
|  | CH <sub>2</sub> CH(Cl)CH <sub>2</sub> Cl         | 160                       | 105                                     |
|  | benzyl   | 20                        | 107                                     |

a: 雌鼠 TLX5 淋巴细胞抗癌活性 b: T/C<125 为无效

a: anti-cancer activity of TLX5 lymphocytes in female rats b: T/C<125 means no effect

1,2,3,5-四嗪系列化合物九死一生的开发过程。

## 1.2 咪唑并-1,2,3,5-四嗪系列化合物曲折的开发过程和替莫唑胺的诞生

1983年,第1个咪唑并-1,2,3,5-四嗪化合物咪图唑胺进入I期临床,观察到明显的与剂量相关的小血小板减少的毒性。II期临床从初始建议的剂量 $115\text{ mg/m}^2$ 降到 $70\text{ mg/m}^2$ 。即使这样,仍然显示出严重的血小板减少毒性。虽然临床上观察到了咪图唑胺对肺小细胞和转移性黑色素瘤有一定的活性,但是不可预测的血小板减少毒性标志着咪图唑胺临床的失败,这时May & Baker公司决定放弃这个项目,终止同Stevens的研究合作,停止经费支持。

从此,Stevens的研究工作完全靠英国癌症征战(Cancer Research Campaign, CRC)慈善组织资助。

咪图唑胺临床上显示的血小板减少毒性的原因是什么?为什么它对骨髓抑制的毒性会这样的大?原来小鼠骨髓功能远强于人的,在小鼠身上没有观察到骨髓抑制的毒性,人身上却会显示出来,因此,小鼠毒理模型是不可靠的,不能完全反映人体。咪图唑胺结构上特殊的氯乙基片段在生理条件下释放出重氮氯乙烷,它是一个非常活泼的DNA交联剂。重氮氯乙烷既是咪图唑胺抗癌活性的要素,也是咪图唑胺剧烈的骨髓抑制毒性根源(图3)。

1980年英国CRC组织成立了I/II临床委员会,

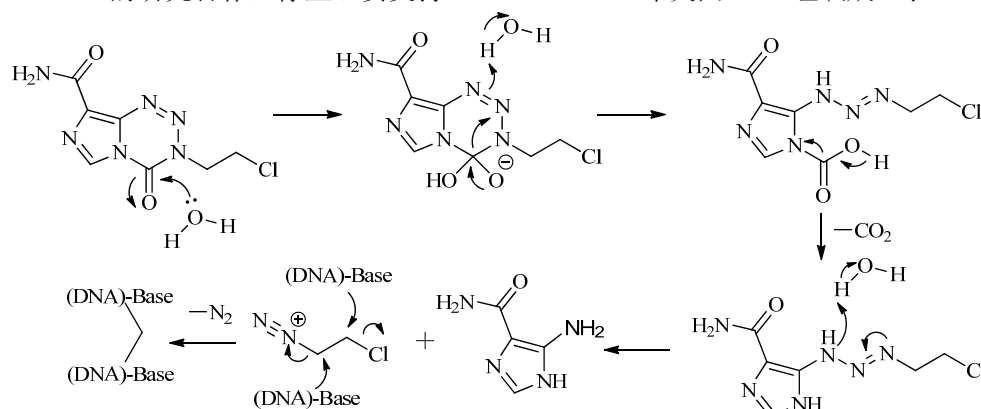


图3 咪图唑胺 DNA 交联机制

Fig. 3 DNA crosslinking mechanism of mitozolamide

旨在为新的抗癌药物迅速安全地引入临床试验开辟一条便捷的通路。对于一个新发现的有潜力成为抗癌药物的化合物,在考虑是否值得进行临床试验的时候,本质上只问以下4个问题:(1)这个新药的临床试验是否是研究探索临床上还没有试验过的抗癌生物概念(机制)?(2)这个新药是否可以大量合成制造?(3)这个新药是否可以制成适合病人使用的药物剂型?(4)对于这个新药的临床试验,有经验的临床医师是否有兴趣?如果回答都是肯定的,然后对这个新药进行毒性验证,建立起I期临床的安全起始剂量,临床工作就可以开展了。在历史上,这个委员会不仅对促进欧洲的新抗癌药的开发做出了巨大贡献,同时也影响了美国NCI抗癌新药研发的实践。咪图唑胺临床的失败并没有挫败Stevens等开发新抗癌药的热情,同时咪图唑胺的毒性来源机制的揭示成为指导他们选择第二代咪唑并-1,2,3,5-四嗪化合物进行临床试验的指导原则:凡是带有氯乙基片段的化合物即使活性优于咪图唑胺也不再考虑。这时咪图唑胺的甲基衍生物替莫唑胺进

入了人们的视野,因为它的活性虽然比咪图唑胺低,但是毒性也低,同时表现出良好的动物组织分布,甚至在鼠的脑组织中也能检测到替莫唑胺。从结构上看替莫唑胺不可能是DNA交联剂,那么它的抗癌机制应该与临床上使用DNA甲基化试剂达卡巴嗪(dacarbazine)抗癌机制有雷同之处(图4)。达卡巴嗪经肝脏酶系统代谢脱掉1个甲基生成DNA甲基化活性中间体5-(3-甲基三氮烯-1-基)咪唑-4-酰胺(MTIC),MTIC在生理条件下分解出重氮甲烷对DNA发生甲基化,显示抗癌作用。因为鼠的肝脏酶系统脱甲基能力远比人的强,因此达卡巴嗪在人体上表现的活性比在动物上的差很多。替莫唑胺转变成MTIC的过程应该不受体内复杂的肝脏酶系统生物代谢过程制约,是在水作用下的1个简单化学分解过程(图4),因此,替莫唑胺的生物活性应该远远好于达卡巴嗪。在当时基于这样一个简单推理,就建议开展进行替莫唑胺的临床试验,理由还是很牵强、脆弱的。但是,还有更好的选择吗?

1987年在CRC慈善组织的资助下,替莫唑胺

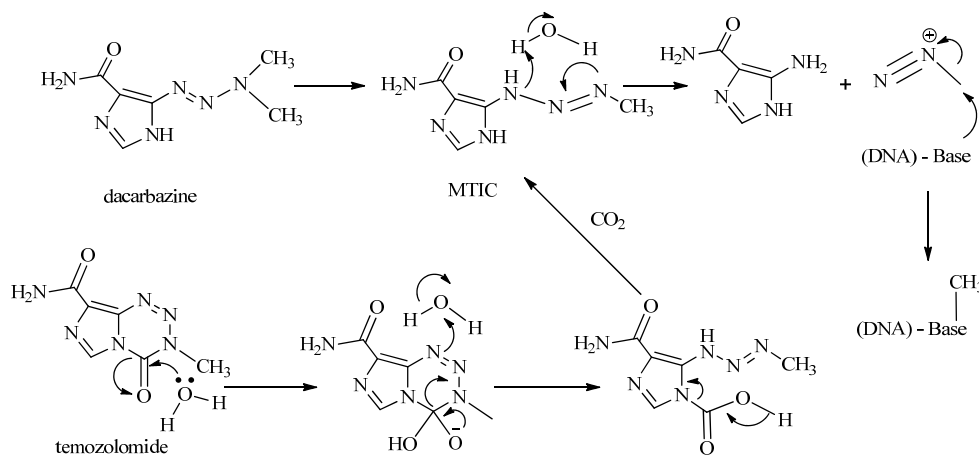


图4 达卡巴抗癌机制和假设的替莫唑胺的抗癌机制

Fig. 4 Anticancer mechanism of dacarbazine and hypothetical anticancer mechanism of TMZ

在伦敦和伯明翰两地同时开展 I 期临床试验。最初，替莫唑胺以  $50 \sim 200 \text{ mg/m}^2$  单剂量一次静脉注射给药。后来，当口服给药达到  $200 \text{ mg/m}^2$  时，替莫唑胺显现出优良的生物利用度 (98%)，随后的临床试验都采用了口服给药。当单剂量一次给药达  $1.2 \text{ g/m}^2$  时，出现骨髓抑制毒性。在这次单剂量一次给药模式的临床试验中，遗憾的是参加临床试验的 51 个病人没有一个对药物产生有临床意义的活性响应，同时病人的脑 CT 检查结果显示脑癌组织没有一点减小。替莫唑胺临床也失败了！

这个结果似乎标志着同咪图唑胺命运一样，替莫唑胺项目的终结。但是敬业的一线实验研究者的细心观察拯救了替莫唑胺。Langdon 在动物抗癌活性实验中，观察到替莫唑胺抗癌活性强弱明显的依赖于给药程序 (schedule-dependent)，即在 1 次/d 大剂量的给药情况下，观察不到显著的效果，但是若将 1 次/d 大剂量分成 5 等份，在 5 d 内 1 次/d 连续的给药则抗癌效果倍增。基于 Langdon 的观察，在不抱太多成功希望的情况下，替莫唑胺的 2 次临床试验开始了，这一次采用新的程序给药方案，即将替莫唑胺最大的耐受量  $1 \text{ g}$  分为 5 等份，每日服 1 份，5 d 为 1 个疗程，4 周重复 1 次。这一次替莫唑胺抗癌效果在病人身上明显地显现出来了，临床成功了！这个给药方式在临床上一度延续至今。

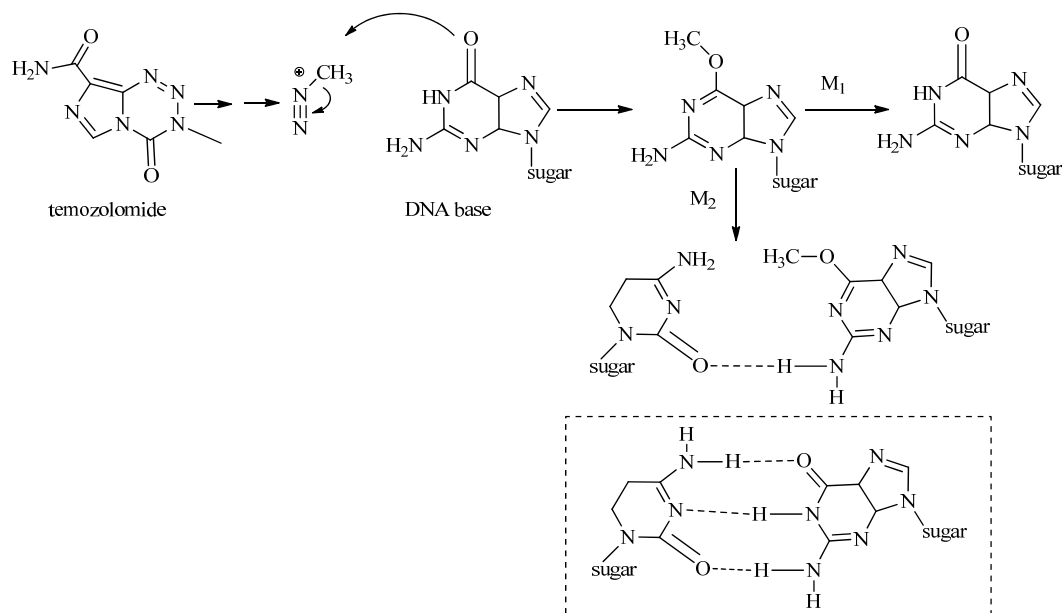
为什么第一次临床试验失败了？为什么要程序式给药才有效果呢？

作为 DNA 甲基化试剂，替莫唑胺的抗癌活性受多重生物机制制约，只有在正确的条件和方法的情况下使用，它的优良抗癌活性才能表现出来 (图 5)。

在生理条件下，首先替莫唑胺经历水分子亲核

反应分解成活性中间体 MTIC，然后 MTIC 进一步在水的作用下生成活泼的重氮甲烷，重氮甲烷对 DNA 实施甲基化反应。DNA 是具有自身修复能力的，其中 DNA 烷基转移酶负责脱去包括甲基在内的烷基化的任务。另外甲基化的 DNA 是否能进入下一步的生物过程还要看 DNA 错配修复机制的强弱。只有过了这两关，甲基化的 DNA 才可能对 DNA 的复制造成破坏，发挥细胞毒的活性。因此，一个烷基化试剂只能对一部分 DNA 修复机制弱或缺陷的癌细胞有活性。替莫唑胺程序式给药活性优于单剂量 1 次给药，因为在分次给药的情况下，先给的几批药发挥着酶抑制剂的作用，消耗掉 DNA 修复酶 O-6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶 (MGMT)，从而使后续跟进的药物发挥有效作用。

今天替莫唑胺成了重磅炸弹药物，解除了全世界大批脑癌病人的疾苦或改善了他们的生活质量。从它的发现和开发过程我们看到它经历了多少次夭折的险阻，它的成功确实不是钱和商业的运作，是科学家炽灼的追求、严谨的科学态度、高尚道德情操的结晶。虽然 Stevens 是这个项目的推动者，是项目的灵魂，但是在整个发明团队中没有人自称是项目的最高领导，Stevens 等做化学、Hickman 等做活性、Gesore 等做毒性、Slach 等做药剂，20 世纪八九十年代他们在英国阿斯顿大学药理学系完成这个了不起的发明。Stevens 是一个谦虚、严谨、宽容、执着、对生活充满无限热情的科学家。对内、外，Stevens 教授从来都讲团队中每个学科的负责人是平等的，替莫唑胺不是设计的，是实验室基础研究人员辛勤努力和临床医师通力合作支持偶然发现的。Stevens 酷爱体育活动，60 岁还和年轻人踢足



M<sub>1</sub>: DNA alkyl transferases, such as O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT, and alkylguanine alkyltransferase, AGT. M<sub>2</sub>: DNA mismatch repair, MMR

图5 替莫唑胺的抗癌活性机制和体内生物机制对它的制约

Fig. 5 Anticancer mechanism of TMZ and restrictions to its activities by enzymes *in vivo*

球，观赏写生野生禽鸟，闲暇种植菜蔬，是一个慈祥又普通的人。

### 1.3 我与替莫唑胺的结识

1991年夏，我在牛津大学有机化学系获得博士学位，因为是药化出身，还想搞新药研发的工作，经导师 George Fleet 推荐到 Stevens 化疗药物研究组工作，从此与替莫唑胺结下了不解之缘。

当时 Stevens 给我的主要工作内容是：（1）发掘替莫唑胺新的合成方法；因为当时替莫唑胺虽然在实验室已经合成出来近十年了，但是没有发现一个可以合成替莫唑胺的新化学方法，提供临床样品仍然采用最初的合成方法。两步反应，其中第二步环合反应需要 20~30 d 完成（图 6）。因为反应时间长，转化不完全，消耗大量的剧毒物异氰酸甲酯（当时试剂公司还出售此产品，后来停止出售了）。替莫唑胺以红色粉末沉淀出来，因为 <sup>1</sup>H-NMR 上无杂质显现，又是稠杂环化合物，因此当时大家认为替莫唑胺是红色也合理。替莫唑胺直接从反应液沉淀出

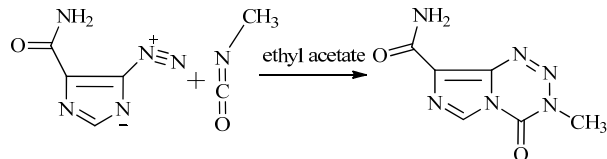


图6 替莫唑胺原始合成反应

Fig. 6 Initial synthetic reaction for TMZ

来，纯度能达到 98% 左右，当时也被大家接受了用于临床试验，没有开展精制方法的研究。（2）寻找替莫唑胺的新衍生物；因为从药物化学的角度出发需要回答是否这类化合物的结构研究走到了尽头。

### 1.4 我对替莫唑胺做的一些工作

因为异氰酸甲酯是受限制的剧毒化学试剂，因此设计、开发替莫唑胺的新合成方法的首要出发点设定为避免使用异氰酸甲酯。在这一时期的研究工作中，我先利用 Barton 自由基脱羧反应完成了替莫唑胺合成（图 7），虽然思路和化学反应都很简单，但是它成为替莫唑胺问世后第一条新的合成方法，因此 Stevens 很兴奋，迅速发表这个结果<sup>[9-10]</sup>。

随后，我又采用多途径先合成 N-甲基甲酰基咪唑中间体，再经重氮化环合完成了替莫唑胺合成（图 8）<sup>[11]</sup>。从化学合成的角度证明了替莫唑胺是可以由多种方法制备的。

通过对替莫唑胺原始合成工艺反应条件的精细研究和多因素交叉变换考察反应条件，实现了重大突破，将原来在 20~30 d 能完成的反应缩短到几小时内完成。一个偶然的的机会，我揭示了替莫唑胺不是红色而是白色物质的本来面目。一次做完核磁，我将样品管放在实验台试管架上，不知过了多长时间，我拿起这个核磁样品管，发现有固体沉淀出来。当时室温高于溶剂二甲基亚砜（DMSO）的凝固温

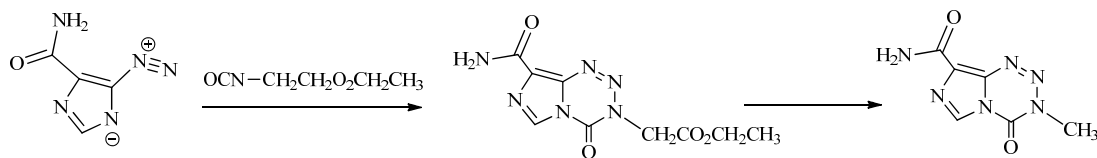
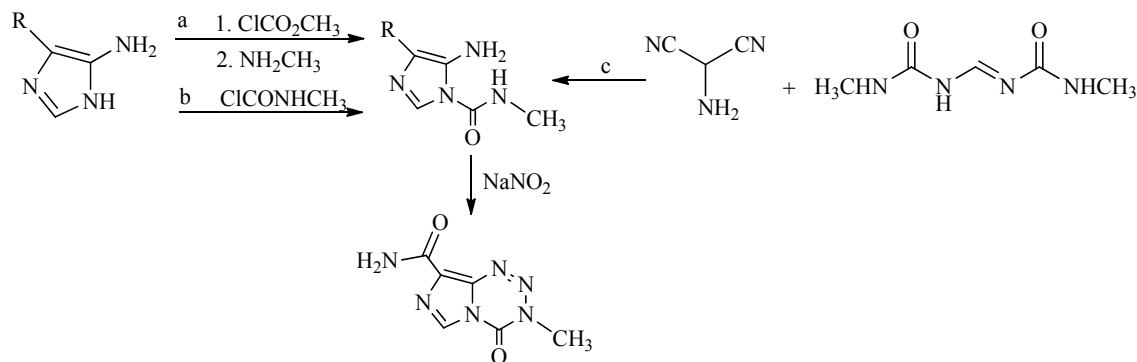


图 7 Barton 自由基脱羧反应合成替莫唑胺

Fig. 7 Barton radical decarboxylation to synthesize TMZ

图 8 通过 a、b、c 途径合成 *N*-甲基甲酰咪唑再环合制备替莫唑胺Fig. 8 Syntheses of *N*-methylformyl imidazole by a, b and c pathways, and then cyclization for TMZ

度,我想这不是凝固的 DMSO,那是什么呢?出于好奇我将沉淀的白色晶状固体滤出,重新溶解,又做一次核磁。核磁光谱与替莫唑胺光谱完全一致,是替莫唑胺!原来替莫唑胺不是红色的。基于这个发现,建立了替莫唑胺的纯化方法,产品纯度由 98% 提高到 99.9%,达到新药申报标准。

同期我还合成出了咪唑并-1,2,3,5-四嗪类化合物中的关键成员去甲基替莫唑胺<sup>[12]</sup>(图 9-A);设计并合成了一系列新的五并六元杂环化合物<sup>[13]</sup>(图 9-B)。

在试图合成硫代替莫唑胺衍生物的时候,没有获得希望的产物,却意外的获得了一个新的五并五元杂环化亚硝基硫脲类化合物(图 10)<sup>[14]</sup>。这个新化合

物在 NIC 癌细胞活性测试中显示出一定的抗癌活性。

替莫唑胺化合物是 20 世纪 80 年代在大学实验室里偶然发现的,同时成药性方面研发的道路反复

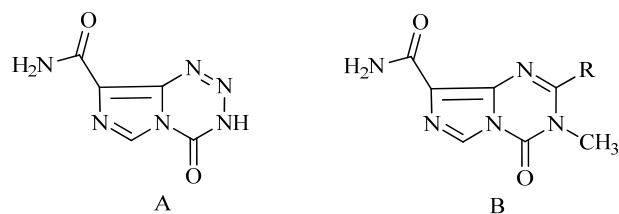


图 9 新的五并六元杂环化合物

Fig. 9 New five member ring fused six member ring heterocyclic compounds

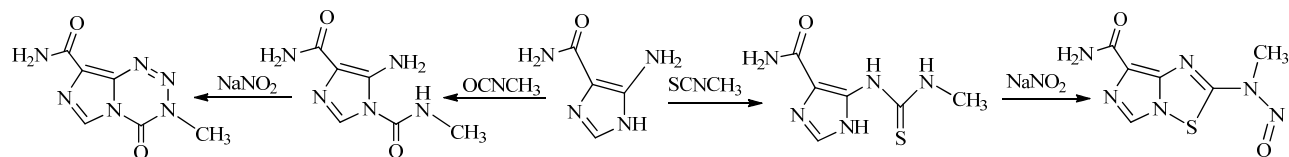


图 10 意外生成五并五元杂环化亚硝基硫脲化合物的反应

Fig. 10 Reaction producing an unexpected five member fused five member heterocyclic nitrosothiourea compounds

曲折,因此知识产权保护方面的工作不免比较混乱和迷茫。当人们意识到替莫唑胺应该是个药物的时候,保护它的知识产权只剩美国的专利申请还可以延续,受益于美国的特殊专利申请政策(US 5260291)。我于 1997 年将替莫唑胺介绍到国内,并在天津天士力集团 1998 年实现了立项。因为神经胶质瘤(脑癌)是个小病种,对这类药是否有市场一

直争论不休,不免影响研发速度,经过多方面的努力,天津天士力集团于 2004 年在国内首家将替莫唑胺推上市场。因为疗效确切,又是仅有的脑癌治疗药物,意外地受到了热烈欢迎,当年就见效益,随后销售额逐年剧增。2004—2011 年的年销售额分别为 385、2 878、3 520、6 281、9 000、11 500、14 700、20 000 万元,早已成为天津天士力集团化学药的支柱产品。

## 2 替莫唑胺类产品的深度开发

替莫唑胺是个奇特的化合物,尤其是它近于 100%口服生物利用度令人赞叹。它是一个相对分子质量仅为 194 的小分子,同时分子中的碳、氢、氮的数量竟是相同的 ( $C_6H_6N_6O_2$ ),由此决定它特殊的理化性质,如不溶解性、不稳定性等。它在水中、常用的有机溶剂中几乎不溶,在 DMSO 中达到饱和时的溶解度约 30 mg/mL,但是即使在 4 °C 的冰箱中保存 DMSO 溶液最长能稳定 14 周。这些都为它的制剂开发设立了障碍。由于对水的敏感性,它的半衰期相对的比较短,体外磷酸缓冲液 89.3 min,人血浆 32.2 min,人血浆超滤液 34.8 min,腹部注射 1.13 h,口服 1.29 h。因此虽然替莫唑胺在治疗黑色素瘤(皮肤癌)、肺癌、白血病、淋巴瘤、乳腺癌等的临床试验中显示了可观的效果<sup>[15]</sup>,但是,距离药审部门批准扩展临床适应症的要求还有一定的差距,它的临床适应症仍然只是神经胶质瘤。

### 2.1 脂溶性替莫唑胺衍生物替莫唑胺酸正己酯前体药物的设计、研究、开发

替莫唑胺在初期临床中对一些黑色素瘤病例显示出良好的活性,但是因为没有统计学意义,最后没获批准为适应症。为什么达不到统计学意义,这可能与替莫唑胺脂溶性低,半衰期又短,扩散到皮

肤局部的药量有限,因此显示出有限的治疗黑色素瘤的效果。如果能够实现表皮局部给药,实现病灶局部药物高浓度,治疗效果应该得到提高。如何实现局部给药确是一个严峻的挑战,因为替莫唑胺脂不溶,水不溶,无法制成局部给药剂型,即使制成局部给药剂型,替莫唑胺也无法通过皮肤表层进入组织。出路只能是在不破坏它的活性部位的情况下,对它进行结构修饰。文献中 Tsang 等<sup>[16]</sup>报道替莫唑胺的代谢物替莫唑胺酸(temozolomide acid, TMZA)对 TLX5 淋巴瘤细胞的活性与替莫唑胺相同给了我们启发。既然替莫唑胺酸有活性,我们可以合成替莫唑胺酸酯或取代酰胺来实现增加脂溶性的目的。酯或酰胺进入体内后可以经过体内酯酶或酰胺酶水解释放出酸发挥药效。如果替莫唑胺酸酯或酰胺的脂溶性足够好,体内酶代谢过程可靠,替莫唑胺酸酯或酰胺作为前体药物就可以实现局部给药用于常见的局部和黏膜癌症,如黑色素瘤、宫颈癌、乳腺癌等。

替莫唑胺酸酯和其酰胺类化合物合成比较简洁。在强酸的条件下,加入过量的亚硝酸钠,即可得到纯净的替莫唑胺酸,然后在常规的酰化条件与醇或胺反应既得到酯和酰胺(图 11)。

替莫唑胺酸酯和其酰胺类化合物设计的是前体

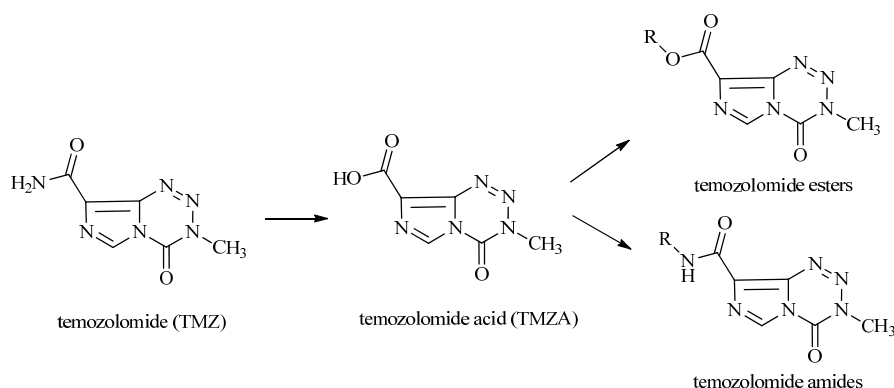


图 11 替莫唑胺酸酯和酰胺的合成

Fig. 11 Synthesis of temozolomide esters and temozolomide amides

药物,药物原型是与替莫唑胺活性相当的替莫唑胺酸,因此前体药物酯和酰胺是否可以简洁顺利地转化成药物原型酸是这个设计是否成功的关键。我们设计了简单的实验来验证这个设想,将替莫唑胺酸酯和其酰胺溶于氘代水和少量助溶剂氘代 DMSO 混合溶剂中,记录氢核磁图谱;然后加入适量的商品酯酶,在 37 °C 水浴槽保温 5 min,再测一次氢核磁图谱;5 min 后再重复 1 次。实验证明替莫唑胺酸

酯在酯酶的作用下水解得快和完全,是合适的前体药物<sup>[16]</sup>。酰胺的分解效果不好,因此被放弃。

替莫唑胺酸酯中来自于醇的烃链的长短决定着整体化合物的脂溶性,烃链的长短直接影响到设计药物的局部给药可行性。化合物的脂溶性是否适合局部给药有个衡量的度,脂溶性小了浸透不过表皮组织,脂溶性大了与表皮组织结合力过强将滞留在那里,不能进入抗癌部位。因此对合成的替莫唑胺

酯要通过透皮实验,找出既能浸透皮肤又不滞留在油脂层中的最佳候选。这个实验是采用新鲜剥离去掉毛的鼠皮完成的。因为新鲜鼠皮内的酯酶活性尚存,收集到透过鼠皮的物质以原形药物替莫唑胺酸为主。实验证明替莫唑胺酸正己酯(TMZA-He)明显具有穿透皮和在皮肤中滞留的最佳平衡(图 12)。

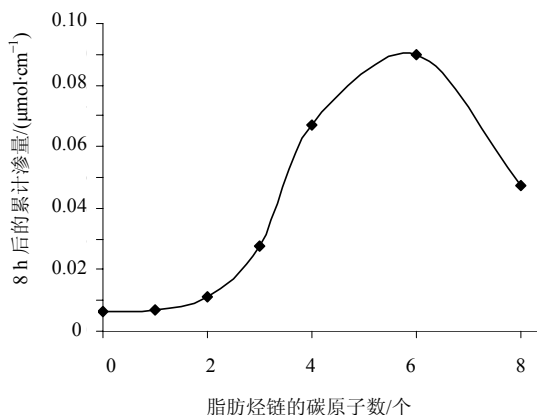


图 12 替莫唑胺酸酯衍生物透过鼠皮能力的检验

Fig. 12 Transdermal absorption of temozolamide ester derivative in mice

替莫唑胺酸正己酯在体外抗癌细胞活性实验中

表 2 替莫唑胺酸正己酯体外抗癌细胞活性

Table 2 Activity of TMZA-He *in vitro* against cancer cell-lines

| 化合物      | IC <sub>50</sub> / (μmol·L <sup>-1</sup> ) |         |        |         |         |        |         |
|----------|--|---------|--------|---------|---------|--------|---------|
|          | MV3  | M14     | B16    | B16-BL6 | TJ899   | SHG-44 | TJ905   |
| 替莫唑胺酸正己酯 | 89.51                                      | >358.00 | 101.18 | >358.00 | >358.00 | 33.87  | >358.00 |
| 替莫唑胺酸    | 184.72                                     | >500.00 | 185.35 | 222.92  | >500.00 | 36.21  | >500.00 |
| 替莫唑胺     | 40.48                                      | >500.00 | 318.51 | >500.00 | >500.00 | 46.58  | >500.00 |
| 达卡巴嗪     | 3.55                                       | 3.06    | 54.89  | 339.01  | 30.74   | 6.92   | 37.65   |
| 卡莫司汀     | 29.68                                      | 134.06  | 36.22  | 61.25   | 253.26  | 33.62  | 314.45  |

以上成药性实验研究证明替莫唑胺酸酯类化合物是可靠的前体药物,其中替莫唑胺酸正己酯具有最佳的皮肤透过能力和抗癌活性,可以作为局部给药的候选药物进入开发阶段。基于这些数据,天津天士力集团 2003 年立项,2011 年末完成临床前研究,向 CFDA 提出临床试验申请。

为什么临床前研究耗费了这样长的时间?主要有这样几个技术难点:

(1) 在制剂学方面 因为优秀的局部给药制剂中的药物要和介质混融均匀,总体积受给药部位的适应性限制。因此,寻找能够实现装载足够量替莫唑胺正己酯的介质成为了艰巨的任务,同时替莫唑胺类

显示出与替莫唑胺和替莫唑胺酸相当的活性(表 2),从而进一步奠定了它前体药物的地位。

在确定替莫唑胺酸正己酯作为候选药物进入开发阶段之前,为了进一步验证它的可靠性,在没有开展正式完整制剂开发研究情况下,我们先采用鼠能忍受的 DMSO 作溶剂,制成 5%替莫唑胺酸正己酯 DMSO 溶液,在荷瘤动物体上进行了抗癌活性实验。替莫唑胺酸正己酯 DMSO 溶液显示了强劲的抑制皮肤癌生长的活性(图 13)。

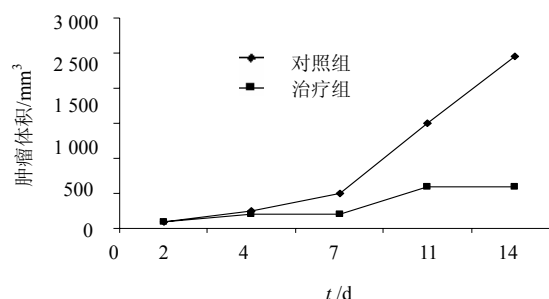


图 13 替莫唑胺酸正己酯 DMSO 溶液抑制荷瘤鼠皮肤癌生长的活性

Fig. 13 Inhibiting activity of 5% DMSO TMZA-He solution against skin cancer in mice

化合物母核对亲和性基团敏感将绝大多数常用的载药介质和增溶物质排出候选序列。几经周折筛选出能过实现需求载药量的 VETPGS - 油酸 - 水的微乳(图 14、15)。但是因为 VETPGS 上有一个自由羟基,尤其有水存在的情况下,它对替莫唑胺母核的亲核性成了制剂稳定性的致命杀手。为此我们对 VETPGS 进行了结构修饰,通过乙酰化掩盖羟基,制出对替莫唑胺正己酯稳定的新赋形剂。从而使制剂中药物半衰期达到设计要求。

(2) 药效学和适应症的选择 虽然在细胞和动物模型上替莫唑胺正己酯显示出良好的抗癌活性,但是做出适合申报需要的数据和选出有市场潜力的癌症



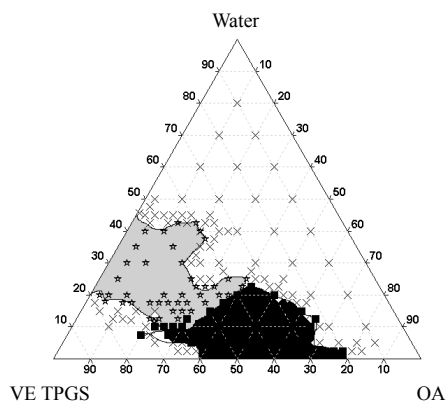


图 14 装载替莫唑胺酸正己酯的乙酰化 TPGS 微乳相图

Fig. 14 Diagram of Acc-VETPGS microemulsion of TMZA-He



图 15 Ac-VETPGS+油酸+水的微乳

Fig. 15 Photography of the microemulsion of Ac-VETPGS + oleic acid + water

适应症开发仍然是一个没有划完的句号，因为 CFDA 对一个新抗癌药的抗癌活性谱是有特定要求

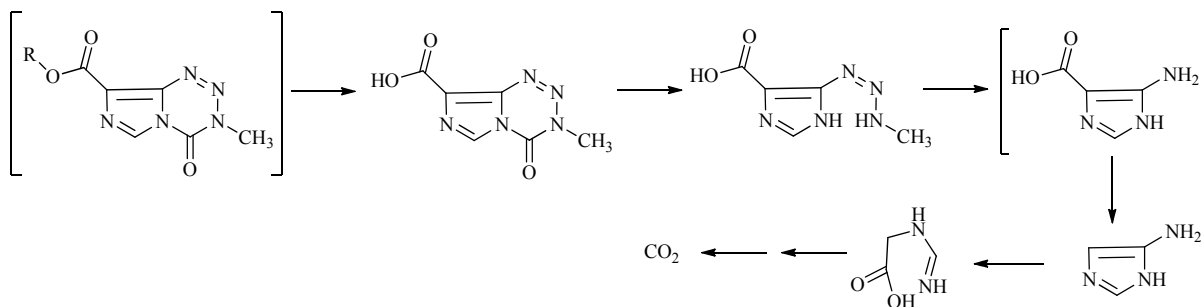


图 16 替莫唑胺酸正己酯可能的代谢分解途径

Fig. 16 Possible metabolic pathway of TMZA-He

## 2.2 概念仿制局部给药替莫唑胺颅内埋植片的设计和开发

卡莫司汀属于亚硝基脲类细胞毒药物，1977 年 FDA 批准卡莫司汀注射剂用于脑癌治疗，一直延续至今。卡莫司汀最大弱点是半衰期很短，只有 15 min。经过多年的努力，卡莫司汀颅内埋植片 (Gliadel) 于 1996 年 7 月 1 日获 FDA 批准上市<sup>[22]</sup>。治疗效果显著提高，效益很好。

的，同时对一种或几种癌症有活性，不一定能竞争过已经存在或开发中的药物。因此，必须开展全面彻底的活性研究，才能做出开发针对那种癌症适应症药物的决定。为此，我们收集和购买了大量的癌细胞株，开展了对替莫唑胺正己酯全面的药效学研究。研究结果表明替莫唑胺正己酯对皮肤癌、乳腺癌、宫颈癌的活性都很好。鉴于宫颈癌的发病率高和治疗手段缺少，尤其是化疗局部给药制剂的研究很有限，目前没有成型药物。我们决定先开发用于宫颈癌辅助治疗的栓剂。在此基础上我们建立了宫颈癌皮下模型，通过局部涂抹给药观察抗癌效果。结果证明替莫唑胺正己酯对宫颈癌有非常显著的量效关系。因此决定开展全临床前研究。

(3) 药动学研究 按现行 CFDA 规定，小分子化学药代谢物质收集的总量不低于 55%。文献报道 <sup>14</sup>C 标记替莫唑胺放射活性总收集量仅为 39%，尿中 38%、粪便中 0.8%。其中尿中替莫唑胺原形药物 5.6%、活性中间体 AIC 12%、替莫唑胺酸 2.3%，还有注意到呼吸气体有放射物质。替莫唑胺酸正己酯代谢分解更复杂 (图 16)，代谢物质收集的总物质质量与药政要求的 55% 有一点差距。因为是全新化合物，同时又是阴道局部给药，希望把工作做得尽可能完善，为此决定制造比文献上更难制造的咪唑啉上 <sup>14</sup>C 标记化合物。这个工作委托 CRO 公司来做，CRO 公司还在努力为我们拿到满意的结果。

受到卡莫司汀颅内埋植片的启发，我开始思考是否可以仿制这个概念，设计和制造替莫唑胺颅内埋植片。首先我问自己为什么要仿，必要性是什么？因为替莫唑胺生物利用度高达 98%，有透过血脑屏障的能力，制它的颅内埋植片有必要吗？最后确定还是有必要的，因为：(1) 虽然替莫唑胺生物利用度高，但是达到脑组织中药物还是有限的，同时大脑的保护机制很快将把部分药物排出脑外；(2) 替

莫唑胺半衰期也是比较短的,部分药物在达到作用部位之前已经分解了;(3)病人口服后胃肠刺激呕吐是替莫唑胺的主要不良反应,限制了它的使用范围;(4)部分脑癌病人手术一段时间后,肿瘤会突然复发,如果药物控制不利会产生危险。替莫唑胺脑组织局部缓控释给药对于以上这些问题都会有改善和帮助,因为在手术后缝合前将缓控释药片埋植,减少病人术后给药的痛苦,实现局部药物高浓度,增强治疗效果。为此自1997年便在实验室开始了仿 Gliadel 概念,制造替莫唑胺颅腔埋植片的研究。2003年天津天士力集团立项。

要把 Gliadel 概念用在替莫唑胺上首先要制造出 Gliadel 使用的辅料聚苯丙生 20,聚苯丙生 20 是一种新型的生物可降解的聚酸酐(图 17)。市场无商品,只能自制出达到药用要求的稳定规格批量产品。

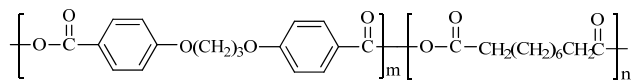


图 17 生物可降解药物载体聚酸酐聚苯丙生 20

Fig. 17 Biodegradable drug carrier polyanhydrides polieprosan 20

制造替莫唑胺颅腔埋植片的另外一个难题是如何把生物可降解的聚酸酐与替莫唑胺均匀地混融装载在一起。经过反复研究我们采用先通过喷雾干燥制出近于纳米的替莫唑胺微粒,然后悬浮在聚酸酐的二氯甲烷溶剂中进行二次喷雾,得到的颗粒再压成所需的埋植片。药效学和药动学的研究历尽了千辛万苦。首先是动模颅内癌症模型的建立,给药时间的控制,效果的评价。从事药动学研究的实验人员没有开颅手术的技艺,有开颅手术的技艺又没有研究药代的工具和经验,最后不得不将两组研究人员调到一起做实验。

替莫唑胺颅腔埋植片在体外(图 18)和动模颅内癌症模型上(图 19)显示出优于替莫唑胺的效果。经过十几年的努力终于在 2011 年末完成了临床前研究,向 CFDA 递交了临床申请。

### 2.3 水溶性注射替莫唑胺衍生物的设计和研发

1987 年替莫唑胺的初始临床试验时,采用的是静脉滴注 1 h 内 50~200 mg/m<sup>2</sup>,最高剂量达 1.2 g/m<sup>2</sup>病人没有响应,标志临床失败。然而做一个注射剂型的呼声一直不断,认为临床无吞咽能力的和胃肠敏感呕吐的病人不能受益于替莫唑胺,但是替莫唑胺的不溶性和不稳定使得它的注射剂开发成了

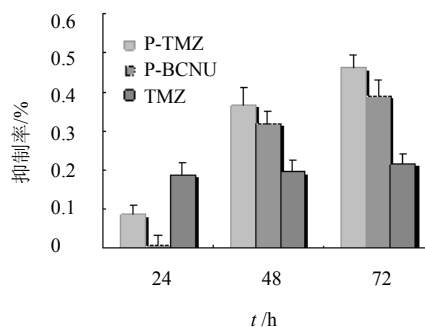


图 18 体外对 SHG-44 胶质瘤细胞的抑制率

Fig. 18 *In vitro* inhibition against SHG-44 glioma cell line

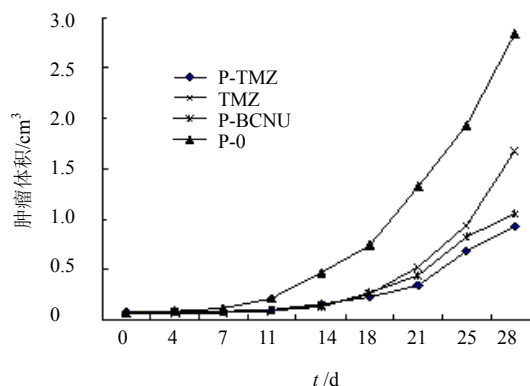


图 19 化疗期间肿瘤体积变化

Fig. 19 Tumor volume change of during chemotherapy

一个挑战。2009 年欧洲和美国同时批准了先灵葆雅公司注射用替莫唑胺混合物:每瓶含有 100 mg 静脉注射用无菌无热原的替莫唑胺冻干粉、600 mg 甘露醇、160 mg L-苏氨酸、120 mg 聚山梨醇酯 80、235 mg 柠檬酸钠二水化物、160 mg 盐酸。从处方就可以看到这个制剂制造的难度,更不要看它的使用说明上列述的注意事项了。

我们的思路很简单和直接,既然替莫唑胺酸的活性与替莫唑胺相当,我们可以用替莫唑胺酸与碱性物质成水溶性盐,然后冷冻干燥成粉末,使用时再溶于水即可以注射使用了。我们制成一系列的替莫唑胺酸与碱性物质形成的水溶性盐。其中替莫唑胺酸组氨酸盐(TMZA-His)、替莫唑胺酸精氨酸盐(TMZA-Arg)、替莫唑胺酸钠盐(TMZA-Na)、钾盐(TMZA-K)在 SHG-44 细胞实验中表现出与替莫唑胺相当的活性(表 3)。

另外通过替莫唑胺酸与水溶性增溶剂 PEG 缩合得到水溶性酯类衍生物,可以制成水性基质的注射剂。这组衍生物体外抑制 SHG-44 癌细胞生长活性随药物浓度增加逐渐升高;TMZ、2T-P400、2T-P600、

表 3 水溶性替莫唑胺酸盐的癌细胞杀伤活性与替莫唑胺和替莫唑胺酸的比较

Table 3 Comparison of activities of water-soluble TMZA salts, TMZ and TMZA against SHG-44 cell line

| 化合物      | IC <sub>50</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> ) |
|----------|---|
| PEG      | > 100                                     |
| TMZA-His | 49.667                                    |
| TMZA-Arg | 64.785                                    |
| TMZA-Na  | 82.667                                    |
| TMZA-K   | 48.362                                    |
| 替莫唑胺     | 46.764                                    |
| 替莫唑胺酸    | 60.583                                    |
| 甲氨喋啶     | < 1                                       |

PEG 400、PEG 600 组的 IC<sub>50</sub> 值分别为 9.73、12.9、15.7、150.8、171.6 μg/mL。2T-P400、2T-P600 对 SHG-44 胶质瘤细胞的杀伤效果与 TMZ 相近; TMZ、2T-P400、2T-P600 与 PEG400、PEG600 对胶质瘤抑制作用的差异有统计学意义<sup>[19]</sup> (图 20)。

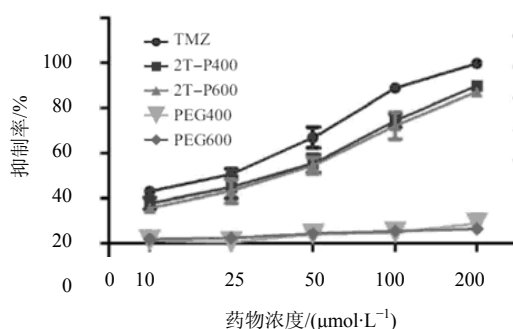


图 20 替莫唑胺酸 PEG 酯水溶性衍生物及抑制 SHG-44 癌细胞生长活性

Fig. 20 Inhibition activities of water soluble derivatives of TMZA-peg esters against SHG-44 cancer cell line

## 2.4 替莫唑胺复方

肿瘤是多因素参与、多步骤发展的疾病, 同时由于肿瘤的异质性, 即肿瘤患者的同一个肿瘤上不同部位的组织可能是由不同病理类型的肿瘤细胞构

成的, 单一作用机制和单一靶点的药物很难能完全阻止肿瘤生长, 实现理想治疗效果。因此临床上经常采用几个药联合使用, 或者交替使用, 实现多靶点和多通路的围攻。

替莫唑胺是 DNA 甲基化试剂, 它与作用在不同靶点和通路上的药物是否能发生协同作用, 制成复方制剂? 文献报道<sup>[20]</sup>替莫唑胺和不少药物有协同作用, 尤其是与维甲酸联合使用已开展了多个临床试验<sup>[21]</sup>。我们的实验验证了替莫唑胺与维 A 酸和异维 A 酸联合增加抑制癌细胞活性 (表 4)。这方面的研究正在深入进行, 拟开展与其他药物联合使用的探索。

表 4 替莫唑胺与维 A 酸和异维 A 酸联合抑制 M059K 肿瘤细胞株的协同作用

Table 4 Enhanced inhibition against cancer cell line M059K by combination of TMZ with retinoic acid and 13-cis-retinoic acid

| 药物         | IC <sub>50</sub> /(μg·mL <sup>-1</sup> ) |
|------------|--|
| TMZ        | 186.364                                  |
| 维 A 酸      | 11.463                                   |
| 异维 A 酸     | 17.857                                   |
| TMZ 维 A 酸  | < 1                                      |
| TMZ 异维 A 酸 | < 1                                      |

## 2.5 替莫唑胺新衍生物<sup>[14]</sup>

本意想合成替莫唑胺的硫代衍生物 (S-TMZ), 结果得到了一组新的咪唑并噻唑, 烃代隐形亚硝基硫脲化合物 (MSNU-Me) (图 21)。对这个化合物进行了衍生化制得一系列化合物, 细胞毒性活性试验结果显示, 这类化合物抑制 SHG-44、U251 癌细胞的活性同替莫唑胺相当 (表 5)。

表 5 MSNU-Me 抑制癌细胞的活性

Table 5 Inhibition against cancer cell lines of MSNU-Me

| 化合物     | IC <sub>50</sub> /(μg·mL <sup>-1</sup> ) |        |
|---------|--|--------|
|         | SHG-44                                   | U251   |
| MSNU-Me | 6.867                                    | 9.819  |
| TMZ     | 6.429                                    | 16.667 |

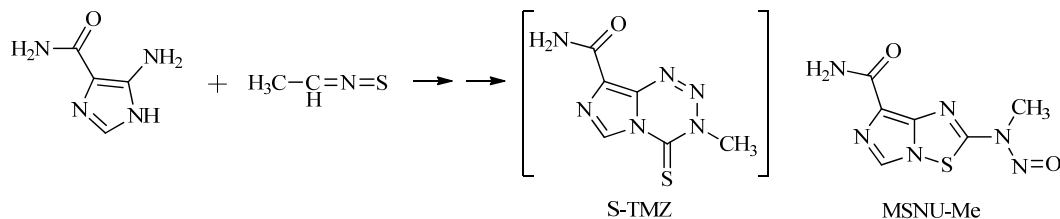


图 21 违背合成 S-TMZ 的本意而生成 MSNU-Me 的意外反应

Fig. 21 Unexpected reaction to give MSNU-Me rather than S-TMZ

### 3 结语

替莫唑胺从发现到上市历经了15个年头,它走过的历程给从事药物研究的人员留下很多启发。合成替莫唑胺的一步反应需要20 d才能完成,对这一点,作为一个受过长期正规训练的有机合成出身的我,必须承认我发现不了这样的反应,因为我没有这个耐性。替莫唑胺的抗癌活性只有在连续给药的模式下才能显现出来,是在替莫唑胺第一次临床试验失败后,从事活性研究的人自发自觉地反复地做、反复地观察细微的差别发现的。我们对临床失败的东西还会有兴趣吗?替莫唑胺在临床上对受试的癌症细胞显示的活性并不理想的情况下,临床医师能建议试一下神经胶质,才发现它的奇迹性功效。我们会有人这样建议吗?离开了这些在关键卡口上表现出的科学态度和作风,替莫唑胺是不会被开发出来的。

替莫唑胺已经上市14年了,拯救了一部分脑癌病人的生命,改善了一部分病人的生活质量。今天想起我曾参加过一部分它的开发历程,感到很荣幸,同时为真正的创始人和历尽千辛万苦把它推上临床的Stevens教授感到无比的骄傲。做为Stevens的一个学生(博士后)最让我震撼的是他的谦虚、严谨、平易、客观的品格,他在讲替莫唑胺时首先讲那些做过贡献的人,从不夸耀自己的作用。总是说这是偶然的发现,是在他人工作启发下做的。60岁的人有时还到实验室去做一些自己想验证的试验,还上场参加业余足球比赛。坚持参与一线实验工作和坚持锻炼体魄是我从他身上学到的人生的两个信条。替莫唑胺的深度开发虽然取得一些阶段性的结果,但是距离达到临床使用还有很大的距离。有了替莫唑胺艰苦的开发经历作样板,我们将会努力向前推动。

### 参考文献

- [1] <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/onctools/summary.cfm?ID=192>; [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2006/021029s012lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/021029s012lbl.pdf)
- [2] Wesolowski J R, Rajdev P, Mukherji S K. Temozolomide (Temadar) [J]. *Am J Neuroradiol*, 2010, 31(8): 1383-1384.
- [3] <http://www.nottingham.ac.uk/pharmacy/people/malcolm.stevens>.
- [4] Ege G, Gilbert K. [7+2]- and [11+2]-cycloaddition reactions of diazo-azoles with isocyanates to azolo[5,1-d][1,2,3,5] tetrazine-4-ones [J]. *Tetrahedron Lett*, 1979, 20(44): 4253-4256.
- [5] Stevens M F, Hickman J A, Stone R, et al. Antitumor imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent [J]. *J Med Chem*, 1984, 27(2): 196-201.
- [6] [http://info.cancerresearchuk.org/cancerandresearch/progress/cancer.drugs/drug\\_discovery/temozolomide/](http://info.cancerresearchuk.org/cancerandresearch/progress/cancer.drugs/drug_discovery/temozolomide/)
- [7] Hickman J A, Stevens M F, Gibson N W, et al. Experimental antitumor activity against murine tumor model systems of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (mitozolomide), a novel broad-spectrum agent [J]. *Cancer Res*, 1985, 45(7): 3008-3013.
- [8] Stevens M F, Hickman J A, Langdon S P, et al. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine [J]. *Cancer Res*, 1987, 47(22): 5846-5852.
- [9] Wang Y F, Stevens M F G, et al. Alternative syntheses to the antitumour drug temozolomide avoiding the use of methyl isocyanate [J]. *J Chem Soc Chem Commun*, 1994, 1687-1689.
- [10] Wang Y F, Stevens M F G, et al. Antitumour imidazotetrazines. Part 34. new syntheses of the antitumour drug temozolomide using "Masked" methyl isocyanates [J]. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1995, 2783-2787.
- [11] Wang Y, Stevens M F G, Chan Tm, et al. Antitumor imidazotetrazines. 35. new synthetic routes to the antitumor drug temozolomide [J]. *J Org Chem*, 1997, 62(21): 7288-7294.
- [12] Wang Y, Stevens M F G. Synthetic studies of 8-carbamoylimidazo-[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one: A key derivative of antitumour drug temozolomide [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1996, 6(2): 185-188.
- [13] Wang Y F, Wheelhouse R T, Zhao L X, et al. Antitumour imidazotetrazines. Part 36. Conversion of 5-aminoimidazole-4-carboxamide to imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-ones and imidazo[1,5-a]-1,3,5-triazin-4(3H)-ones related in structure to the antitumour agents temozolomide and mitozolomide [J]. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 1998, 1669-1675.
- [14] Wang Y F, Lowe P R, Thomson W T, et al. A new route to the antitumour drug temozolomide, but not thiotemozolomide [J]. *J Chem Soc Chem Comm*, 1997, 363-364.
- [15] Middleton M R, Grob J J, Aaronson N, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(1): 158-166.

- [16] Tsang L L, Quarterman C P, Gescher A, *et al.* Comparison of the cytotoxicity *in vitro* of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazene-1-yl) imidazole-4-carboxamide [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1991, 27(5): 342-346.
- [17] Suppasansatorn P, Wang G, Conway B R, *et al.* Skin delivery potency and antitumor activities of temozolomide ester prodrugs [J]. *Cancer Lett*, 2006, 244(1): 42-52.
- [18] Suppasansatorn P, Nimmannit U, Conway B R, *et al.* Microemulsions as topical delivery vehicles for the anti-melanoma prodrug, temozolomide hexyl ester (TMZA-HE) [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59(6): 787-794.
- [19] 唐东方, 董 军, 黄 强, 等. 替莫唑胺衍生物治疗人脑胶质瘤的实验研究 [J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2012, 17(3): 124-126.
- [20] Gilbert M R, Gonzalez J, Hunter K, *et al.* A phase I factorial design study of dose-dense temozolomide alone and in combination with thalidomide, isotretinoin, and/or celecoxib as postchemoradiation adjuvant therapy for newly diagnosed glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2010, 12(11): 1167-1172.
- [21] Jaeckle K A, Hess K R, Yung W K, *et al.* Phase II evaluation of temozolomide and 13-cis-retinoic acid for the treatment of recurrent and progressive malignant glioma: a north American brain tumor consortium study [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2305-2311.
- [22] <http://www.oneyao.net/article/2012/0309/28896.html>