

凡德他尼衍生物的抗肿瘤活性筛选研究

李晓园^{1,2}, 商倩², 周祥³, 张士俊², 徐为人^{2*}

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院 天津市新药设计与药物发现重点实验室, 天津 300193

3. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001

摘要: **目的** 对合成的一系列凡德他尼衍生物进行体内外抗肿瘤活性的筛选, 为寻找低毒高效的新型酪氨酸激酶抑制剂研究提供依据。 **方法** 体外筛选采用均相时间分辨荧光 (HTRF) 法和磺酰罗丹明 B (SRB) 法分别进行激酶和细胞的筛选; 采用经典的急性毒性实验方法, 并建立移植人非小细胞肺癌 H1975 裸鼠模型评价其抗肿瘤活性。 **结果** HTRF 结果显示有 6 个活性较好的化合物 (TY8115、TY8119、TY8122、TY8128、TY8129、TY8131), 其中 TY8115 对 VEGFR-2 和 EGFR 抑制作用均好于凡德他尼; SRB 结果显示这些活性化合物对选用的 3 种靶细胞 (A431、H1975、A549) 均有不同程度的抑制作用, 其中 TY8115 的肿瘤细胞增殖抑制作用最明显, 且对非靶细胞 (MDA-MB-231) 生长影响很小; 急性毒性实验结果显示 TY8115 没有表现出毒性反应; 体内抗肿瘤活性研究结果显示 TY8115 对肺癌 H1975 具有疗效, 75、150 mg/kg TY8115 对 H1975 的相对肿瘤增殖率分别为 54.44%、39.54%。 **结论** 化合物 TY8115 具有良好的抗肿瘤活性, 并且毒副作用小, 具有发展成为一种新型酪氨酸激酶抑制剂的潜力。

关键词: 凡德他尼; 衍生物; 抗肿瘤; 活性筛选; 酪氨酸激酶抑制剂

中图分类号: R914.2; R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2014)01 - 0016 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.01.004

Screening of anti-tumor activity of vandetanib derivatives

LI Xiao-yuan^{1,2}, SHANG Qian², ZHOU Xiang³, ZHANG Shi-jun², XU Wei-ren²

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Key Lab of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

Abstract: Objective To screen the antitumor activity *in vivo* and *in vitro* of the series of vandetanib derivatives, and to provide the basis for seeking new tyrosine kinase inhibitors with high efficiency and low toxicity. **Methods** Homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) and SRB method were used to screen kinases and cells *in vitro*; The acute toxicity experiment of classical methods was used, and nude mice model transplanted by non-small cell lung cancer H1975 cells was established to evaluate the antitumor activity. **Results** Six compounds (TY8115, TY8119, TY8122, TY8128, TY8129, and TY8131) with better activities were selected by HTRF method, where TY8115 had better inhibitory effect on VEGFR-2 and EGFR than vandetanib. The above active compounds showed different degrees of inhibition on three kinds of target cells (A431, H1975, and A549) by SRB method, and the inhibition of TY8115 was the most obvious. TY8115 had little impact on the non target cell (MDA-MB-231) growth. Results of acute toxicity test showed that TY8115 exhibited no toxicity. Antitumor activity *in vivo* showed that TY8115 with doses of 75 and 150 mg/kg had curative effect on lung cancer H1975 cells with relative tumor growth rates of 54.44% and 39.54%, respectively. **Conclusion** The compound TY8115 has good antitumor activity *in vitro* and *in vivo*, and has no previous toxicity, which will be a new tyrosine kinase inhibitor.

Key words: vandetanib; antitumor; activity screening; tyrosine kinase inhibitor

恶性肿瘤是一种常见病, 严重威胁着人类的生命健康。现代医学已经认识到肿瘤是一种基因病, 绝大多数肿瘤的发生都是一个多因素作用, 表现为多阶段的复杂过程。实体瘤的信号传导是一个复杂

收稿日期: 2013-06-05

作者简介: 李晓园 (1988—), 女, 天津医科大学 2011 级药理学硕士研究生。Tel: 15922253048 E-mail: lixiaoyuan1234@126.com

*通信作者 徐为人, 研究员。Tel: (022)23006862 E-mail: xuwr@tjpir.com

的、多因素的蛋白网络系统,抑制单一信号传导往往不足以遏制肿瘤的进展。临床试验结果显示,多靶点抑制剂在疗效方面优于单靶点抑制剂^[1],因此,多靶点抑制剂是未来肿瘤治疗和药物开发的发展方向。

阿斯利康制药公司开发的凡德他尼即为一种多通道肿瘤信号传导抑制剂。凡德他尼是一种合成的苯胺喹唑啉化合物,为口服小分子酪氨酸激酶抑制剂^[2],可同时作用于肿瘤细胞表皮生长因子受体(EGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR2)^[3]和RET酪氨酸激酶,还可选择性地抑制其他的酪氨酸激酶,以及丝氨酸/苏氨酸激酶^[4]。目前研究发现,凡德他尼对非小细胞肺癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、髓样甲状腺癌、大肠癌等均具有明显疗效^[5],并且可有效对抗EGFR-TKI耐药的产生^[6],但其毒副作用较多,最常见药物不良反应(>20%)是腹泻、皮疹、痤疮、恶心、呕吐、高血压、头痛、疲乏、食欲减退、腹痛^[7]、皮肤瘙痒、感觉障碍、转氨酶波动^[8]以及无症状的QT间期延长^[9-10],最常见实验室异常(>20%)是钙减低,丙氨酸氨基转移酶升高和葡萄糖减低。并且,其毒副作用与剂量相关,在<300 mg/d时,病人耐受性良好,最大耐受剂量(MTD)为300 mg。由此,本实验对凡德他尼进行了结构改造和修饰,合成了一系列衍生物,以寻得毒副作用小、靶向性高、疗效好的新型化合物,并对这些化合物进行抗肿瘤活性的体内外筛选,为进一步的临床前研究提供了药效学基础。

1 材料

1.1 试剂与仪器

HTRF KinEASE-TK kit 试剂盒购自 Cisbio Bioassay,批号 62TKOPEB; ATP 和 HEPES 购自美国 Amresco,批号 20120118; EGFR 和 VEGFR-2 激酶购自 BPS Bioscience,批号 120226-D。

384 孔白板,购自丹麦 Nunclon 公司; DH5000II 型电热恒温培养箱,天津市泰新特仪器有限公司; RT-6100 型酶标分析仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司; LX-200 型迷你离心机,江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.2 动物及瘤株

昆明种小鼠,雌雄各半,健康适龄,体质量 18.0~20.0 g,购自中国医学科学院动物中心,合格证号 SCXK(军)2009-0003; BALB/c Nude 裸鼠,

体质量 18.0~22.0 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。

细胞瘤株 A549、A431、H1975、MDA-MB-231 购自北京协和医学院细胞中心,本实验室冻存使用。

1.3 受试化合物

凡德他尼、厄洛替尼、凡德他尼系列衍生物均由天津药物研究院药物创新中心 TY803 项目小组提供。

2 方法

2.1 EGFR 和 VEGFR-2 激酶抑制活性筛选

采用均相时间分辨荧光技术(HTRF)。精确计算各种试剂所需用量,依次配制 ATP、TK-底物生物素的工作液。按 ATP、TK-底物生物素、KB 体积比 1:1:1 取液混匀后,按 6 μ L/孔取混合液置 BP 管中。按 2 μ L/孔加入药物。无药孔用 2 μ L KB 补齐,混匀。配制酶工作液。按 2 μ L/孔加入酶。无酶孔用 2 μ L KB 补齐,混匀,3 复孔操作。将反应液转移至 384 孔板中,盖上盖子,置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。温育期间,配制链霉亲和素-XL665 的工作液,计算用量,按链霉亲和素-XL665、TK 抗体-穴状化合物体积比 1:1 混匀。温育结束后,按 10 μ L/孔取混合液加置反应体系中,混匀以终止反应。室温放置 30 min 后,于酶标仪 314 nm 激发检测 665、620 nm 荧光,计算激酶的抑制率。以抑制率为纵坐标,lg C 为横坐标,采用 GraphPad Prism 5.0 软件拟合曲线,计算 IC₅₀ 值。

$$\text{抑制率} = (F_{665/620 \text{ 对照孔}} - F_{665/620 \text{ 给药孔}}) / F_{665/620 \text{ 对照孔}}$$

2.2 SRB 法检测肿瘤细胞的增殖抑制活性

取处于指数增长长期细胞种在 96 孔板里(细胞浓度为 1×10^4 /孔),37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 使细胞贴壁,吸出上清液,每孔加入 180 μ L 无血清培养基,以及 20 μ L 不同浓度的药液。每个浓度设 3 个复孔,并设空白对照孔(只加培养基)和阴性对照,同样设 3 个复孔。培养 48 h 后,吸出上清液,PBS 轻洗 1 遍,每孔加入 4 $^{\circ}$ C、50% TCA 50 μ L,将培养板置于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,吸去板内液体。用蒸馏水冲洗 5 遍,置于空气中风干至不见水痕。然后加入 0.4% SRB,50 μ L/孔,于室温下静置染色 20 min,吸去磺酰罗丹明 B(SRB)溶液,用 1%乙酸冲洗 5 遍。置于空气中风干至无水痕后,每孔加入 10 mmol/L Tris 缓冲液 150 μ L,振荡 5 min,于 560 nm 波长测定吸光度(A)值^[11],计算激酶的抑制率。以抑制率为纵坐标,lg C 为横坐标,采用 GraphPad

Prism 5.0 软件拟合曲线, 计算 IC₅₀ 值。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 小鼠体内急性毒性实验^[11]

取健康小鼠 50 只, 雌雄各半, 禁食不禁水 12 h 后, 按体质量随机分成 5 组, 分别为对照组, 凡德他尼高 (1 000 mg/kg)、低 (500 mg/kg) 剂量组和 TY8115 高 (1 000 mg/kg)、低 (500 mg/kg) 剂量组。给药组 ig 给药, 对照组 ig 等体积溶剂。给药后每笼 5 只, 正常饲养, 给药后 2 h 之内, 15 min 观察 1 次; 给药后 2~4 h, 30 min 观察 1 次; 给药后 4~8 h, 1 h 观察 1 次; 给药后 8~24 h, 4 h 观察 1 次; 给药后第 2 天起, 每天观察 1 次, 称取体质量, 密切观察各小鼠的活动情况。14 d 后剖检, 肉眼观察小鼠主要脏器的变化。

2.4 TY8115 体内抗肿瘤作用

取 H1975 肺癌裸鼠 (瘤株), 无菌条件下取局部生长良好的肿瘤组织。然后将瘤组织与生理盐水按 1:20 混合匀浆, 制备成约 1×10⁷ PBS 细胞悬液 (显微镜下观察), 皮下种植于 6 周大的裸鼠腹侧, 每只注射 0.2 mL。待体积增长到 100~150 mm³ 进行试验。按肿瘤体积 = 长径 × 短径 × 2 × 0.5 计算肿瘤体积。动物按肿瘤大小随机分组, 分别为模型组, TY8115 高 (150 mg/kg)、低 (75 mg/kg) 剂量组和凡德他尼 (75 mg/kg) 组, 灌胃给药, 1 次/d, 连续 14 d。从第 1 天开始, 每 3 天测定 1 次肿瘤体积, 称定体质量。根据相对肿瘤体积计算肿瘤增殖速率。

$$\text{相对肿瘤体积 (RTV)} = V_t / V_0$$

肿瘤增殖速率 = 给药组的 RTV 均值 / 对照组的 RTV 均值

V_t 为每次测量时的肿瘤体积, V₀ 为开始给药时的肿瘤体积

疗效评价标准^[6]: 肿瘤增殖速率 > 60% 为无效; 肿瘤增殖速率 ≤ 60% 并经统计学处理 P < 0.05 为有效。

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 17.0 统计软件处理, 采用 ANOVA 法检验。

3 结果

3.1 EGFR 和 VEGFR-2 激酶抑制活性筛选结果

采用 HTRF 法对合成的大量凡德他尼衍生物进行筛选, 得出 6 个活性较好的化合物。它们对 VEGFR-2 激酶抑制活性与凡德他尼作用相当, 并且对 EGFR 激酶的抑制活性要明显高于凡德他尼。其 IC₅₀ 值见表 1。

表 1 各化合物对激酶的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Inhibition of compounds for tyrosine kinase ($\bar{x} \pm s$)

化合物	IC ₅₀ /(nmol L ⁻¹)	
	VEGFR-2	EGFR
凡德他尼	37±0.05	>400
厄洛替尼	—	25±0.04
TY8115	33±0.03	126±0.04
TY8119	—	132±0.19
TY8122	—	17±0.03
TY8128	81±0.07	32±0.05
TY8129	—	34±0.22
TY8131	87±0.04	45±0.02

“—”表示其 IC₅₀ 值超出实验中最大给药浓度

“—”indicate beyond maximum concentration of IC₅₀

3.2 SRB 法检测肿瘤细胞的增殖抑制活性结果

这些苗头化合物均能不同程度地抑制 A431、H1975、A549 细胞。其中 TY8115 的效果最好, IC₅₀ 值分别为 0.79、4.08、6.09 μmol/L, 且对 A431、H1975 细胞的增殖抑制作用优于凡德他尼和厄洛替尼。各化合物的 IC₅₀ 值见表 2。

表 2 化合物对肿瘤细胞增殖抑制作用

Table 2 Inhibition of compounds on proliferation of tumor cells

化合物	IC ₅₀ /(μmol L ⁻¹)			
	A431	H1975	A549	MDA-MB-231
凡德他尼	0.86	4.14	4.39	21.29
厄洛替尼	2.80	12.63	—	—
TY8115	0.79	4.08	6.09	—
TY8119	3.05	15.95	—	—
TY8122	0.92	4.73	13.89	—
TY8128	1.54	3.22	44.46	25.88
TY8129	0.86	6.29	19.62	—
TY8131	0.61	11.32	37.16	7.48

“—”表示其 IC₅₀ 值超出实验中最大给药浓度

“—”indicate beyond maximum concentration of IC₅₀

3.3 TY8115 小鼠体内急性毒性实验结果

给药后, 凡德他尼组小鼠很快观察到不同程度的活动增多、反应过敏现象, 在 30~90 min 出现烦躁不安、往返跑动、惊厥、偶有打斗现象。进食饮水状况无异常。4~5 h 症状逐渐减轻, 隔天小鼠已恢复正常状态。继续观察 14 d, 小鼠无其他异常状况。

凡德他尼低剂量组给药后 1 d, 死亡 2 只, 高剂

量组给药后 1 d, 死亡 4 只, 给药后 2 d 又死亡 2 只。而 TY8115 给药后, 各剂量组小鼠均未见任何异常活动, 14 d 内进食、饮水和体质量增长速度均正常, 并且高、低剂量组均未出现死亡。小鼠体质量的变化见图 1。

3.4 TY8115 的体内抗肿瘤作用结果

结果显示, 高 (150 mg/kg)、低 (75 mg/kg) 剂量和凡德他尼 (75 mg/kg) 均能抑制肺癌 H1975 的生长, 且呈剂量相关, 肿瘤增殖速率分别为 54.44%、39.54%、39.96%。

根据疗效评价标准, TY8115 低剂量 (75 mg/kg) 组对裸鼠 H1975 肺癌有疗效; TY8115 高剂量 (150 mg/kg) 和凡德他尼 (75 mg/kg) 组对裸鼠 H1975 肺癌有疗效, 前者疗效略低于后者。

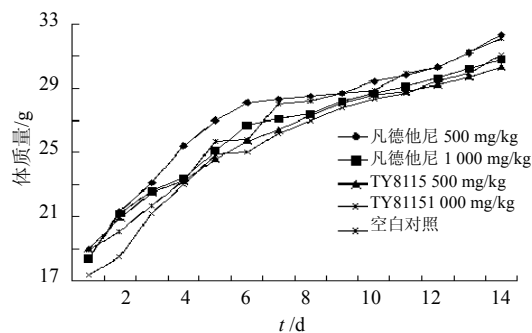


图 1 小鼠体质量的变化

Fig.1 Change of body weights of mice

给药后凡德他尼组出现死亡, 体质量呈下降趋势。结果见表 3。

表 3 TY8115 和凡德他尼对人肺癌 H1975 裸小鼠移植瘤的抑制作用

Table 3 Inhibition of TY8115 and ZD6474 on H1975 nude mice transplanted by human lung cancer H1975 cells

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	个数		体质量/g		RTV	肿瘤增殖速率/%
		0 d	15 d	0 d	15 d		
模型	—	6	6	20.0	21.6	3.49±0.85	
TY8115	75	6	6	20.1	21.4	1.90±0.50**	54.44
	150	6	6	20.0	21.0	1.38±0.40**	39.54
凡德他尼	75	6	5	19.1	18.3	1.29±0.21**	36.96

与模型组比较: **P<0.01

**P<0.01 vs model group

4 讨论

蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 是一类具有酪氨酸激酶活性的蛋白质, 在细胞内的信号传导通路中占据了重要的地位, 调节着细胞体内增殖、分化迁移和凋亡等一系列生理过程。PTK 是多种肿瘤最常见的生长因子受体, 抑制其活性可破坏肿瘤细胞的信号传导, 抑制肿瘤细胞增殖和新生血管形成, 而对正常细胞影响较小, 因此, 靶向抑制 PTK 的抗肿瘤药物极具发展前景。

实验对本课题组自主合成的 TY803 系列化合物 (PTKs 抑制剂) 进行抗肿瘤活性的体内外筛选, 并采用经典的阳性药凡德他尼进行对照试验, 其中体外筛选分别采用了 HTRF 法和 SRB 法进行了激酶和细胞的筛选, 综合两者结果, 得到有活性的苗头化合物 TY8115, 并对其进行了小鼠体内急性毒性和裸鼠抗肿瘤实验。体内结果表明, TY8115 高、低剂量 (75、150 mg/kg) 组的肿瘤增殖速率均小于 60%, 与模型组相比差异具有显著性, 说明 TY8115

对 NCI-H1975 人非小细胞肺腺癌有疗效, 且呈剂量相关性。TY8115 高剂量 (150 mg/kg) 对肿瘤的增殖速率与凡德他尼 (75 mg/kg) 疗效相当, 表明 TY8115 对该肿瘤疗效低于凡德他尼, 而在体外活性研究中, TY8115 与凡德他尼对 H1975 细胞的 IC₅₀ 值相当, 可推测 TY8115 体内吸收较差。凡德他尼给药组出现裸鼠死亡现象, 体质量呈下降趋势, 副作用明显, 而 TY8115 未表现出明显毒性。由此可知, TY8115 具有一定的体内抗肿瘤活性, 并且毒性小, 具有成为小分子酪氨酸激酶靶向抗肿瘤药物的潜力, 但其具体作用机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] 李 勇, 张湘茹, 孙 燕. 多靶点抗肿瘤药物: ZD6474 [J]. 癌症进展杂志, 2006, 4(3): 206-210.
- [2] 姜秋红, 高惠君, 姚树人. 肿瘤新生血管生成抑制剂的研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 18(3): 186-189.
- [3] Commander H, Whiteside G, Perry C. Vandetanib: first

- global approval [J]. *Drugs*, 2011, 71(10): 1355-1365.
- [4] Heymach J V. ZD6474--clinical experience to date [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(Suppl 1): S14-S20.
- [5] Meyerhardt J A, Ancukiewicz M, Abrams T A, *et al.* Phase I study of cetuximab, irinotecan, and vandetanib (ZD6474) as therapy for patients with previously treated metastatic colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38231.
- [6] 金 慧, 罗红鹤. EGFR-TKI 治疗非小细胞肺癌耐药机制的研究进展 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30(3S): 216-219.
- [7] AstraZeneca. Vandetanib (vandetanib) Tablets for Oral use [EB/OL]. (2011-04-06) [2011-04-19]. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/022405s001b1.pdf.
- [8] Son Y, Roh J, Cho E, *et al.* Photosensitivity Reactions to Vandetanib: Redevelopment after Sequential Treatment with Docetaxel [J]. *Ann Dermatol*, 2011, 23(Suppl 3): S314-S318.
- [9] 庞 若, 金 波. 凡德他尼在非小细胞肺癌治疗中的进展 [J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(24): 8264-8267.
- [10] Herbst R S, Sun Y, Eberhardt W E, *et al.* Vandetanib plus docetaxel versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer (ZODIAC): a double-blind, randomised, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(7): 619-626.
- [11] 周思朗, 屈艳妮, 张 健, 等. 一种新的细胞计数方法-磺基罗丹明 B 染色法 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005(5): 663-664.
- [12] 徐叔云. 药理试验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 201-206.