

• 实验研究 •

头孢美法仑的合成及其体外抗肿瘤活性研究

李卫红, 王浩, 周晓靓, 施培基, 靳瑾, 周则卫*

中国医学科学院 北京协和医学院 放射医学研究所 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192

摘要: 目的 设计合成头孢美法仑, 并对其进行体外抗肿瘤活性研究。方法 以二苯甲酮、美法仑和 7-苯乙酰胺基-3-氯甲基头孢烷酸对甲氧基苄酯 (GCLE) 为原料, 经酯化、碘代、偶联、氧化、水解等反应得到目标化合物头孢美法仑, 并采用 MTT 法对其进行体外抗肿瘤活性研究。结果 设计并合成了目标产物头孢美法仑, 利用 MS 和 $^1\text{H-NMR}$ 确证了结构; 体外活性实验中, 头孢美法仑在体外基本无毒, 酶解后 IC_{50} 为 $(101.97 \pm 1.705) \mu\text{mol/L}$ 。结论 头孢美法仑酶解后能够充分发挥细胞毒作用, 而酶解前在体外基本无毒性, 为颇具前景的前药, 值得进一步研究。

关键词: 头孢美法仑; 二苯甲酮; 美法仑; 7-苯乙酰胺基-3-氯甲基头孢烷酸对甲氧基苄酯; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914.2; R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)05-0455-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.05.002

Synthesis of cephalosporin and its antitumor activity *in vitro*

LI Wei-hong, WANG Hao, ZHOU Xiao-liang, SHI Pei-ji, JIN Jin, ZHOU Ze-wei

Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Abstract: Objective To design and synthesize cephalosporin melphalan, and to evaluate its antitumor activity *in vitro*. **Methods** Benzophenone, melphalan, and 7-phenylacetamide-3-chloromethyl-3-cephem-4-carboxylic acid *p*-methyl-oxybenzyl ester (GCLE) were used as starting materials to synthesize the target compound cephalosporin melphalan by esterification, iodine, coupling, oxidation, and hydrolysis reactions. The antitumor activity *in vitro* was evaluated by MTT method. **Results** The target compound cephalosporin melphalan was synthesized and characterized by MS and $^1\text{H-NMR}$. The antitumor activity experiments showed that cephalosporin melphalan was nontoxic *in vitro*, while after enzymolysis, the IC_{50} value was $(101.97 \pm 1.705) \mu\text{mol/L}$. **Conclusion** After enzymolysis, cephalosporin melphalan has the cytotoxic effect. While before enzymolysis, cephalosporin melphalan has been found to be nontoxic *in vitro*, which could be a valuable candidate for further development.

Key words: cephalosporin melphalan; benzophenone; melphalan; 7-phenylacetamide-3-chloromethyl-3-cephem-4-carboxylic acid *p*-methyl-oxybenzyl ester; antitumor activity

抗体导向-酶前药疗法(antibody-directed enzyme prodrug therapy, ADEPT)利用肿瘤特异性抗体将活化酶导入到肿瘤靶标,而后前药则在靶标部位被活化酶特异性水解为细胞毒药物,从而实现靶向性治疗^[1]。该疗法大大提高肿瘤治疗特异性,降低不良反应发生率,是一种颇具前景的肿瘤免疫治疗方法。

美法仑半衰期短,细胞毒作用强,但是副作用较大^[2];头孢菌素类药物药动学性质良好,几乎无毒性,

而且是 β -内酰胺酶的良好底物,而 β -内酰胺酶在肿瘤组织内富集^[3],因此,笔者在此基础上设计合成了以 β -内酰胺酶与多肽 RGD4C 的新型融合蛋白系统作为导向系统的前药头孢美法仑,并对其体外抗肿瘤活性进行研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Mercury-300BB 型核磁共振仪(美国 Varian

收稿日期: 2014-03-14

作者简介: 李卫红(1988—),女,药物化学专业,研究方向为抗肿瘤药物的合成。Tel: (022)85683018 E-mail: sarry610@163.com

*通信作者 周则卫(1966—),男,天津人,研究员,研究方向为抗肿瘤药物的合成。Tel: (022)85683018 E-mail: zhouzewe@irm-cams.ac.cn

公司); Agilent 1200/6520 Q-TOF-MS 高效液相色谱/质谱联用仪。

1.2 试药

薄层色谱硅胶 GF254、柱色谱硅胶 (100~200 目, 青岛海洋化工厂); 美法仑 (质量分数 98%, 苏州立德化学有限公司); 7-苯乙酰胺基-3-氯甲基头孢烷酸对甲氧基苄酯 (GCLE, 质量分数 97%, 石家庄制药集团); 二苯甲酮 (质量分数 99.5%, 湖北襄樊福润达化工有限公司); 所用试剂均为分析纯。

人肺癌细胞株 H460 细胞 (中国医学科学院基础医学研究所); RPMI-1640 培养基 (批号 NYC0827, 美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (批号 20130225, 北京索莱宝科技有限公司); 类标准胎牛血清 (批号 20121213, 兰州民海生物有限公司); 四甲基偶氮唑蓝 (MTT, 碧云天生物技术公司)。

2 方法与结果

2.1 合成部分

2.1.1 二苯基重氮甲烷 (1) 的制备^[4] 称取二苯甲酮 (20.50 g, 112 mmol) 于 250 mL 三口瓶中, 依次加入 80%水合肼 40 mL、乙二醇 60 mL, 搅拌加热回流 2 h, 停止反应。冷却反应液至室温, 待白色沉淀完全析出时, 滤过, 滤饼用 95%乙醇重结晶, 干燥, 得二苯甲酮脞白色针状结晶 (21.87 g, 111 mmol), 收率为 99%。mp 97~98 °C, 与文献报道值一致^[5]。

于 100 mL 圆底瓶中加入自制的二苯甲酮脞 (4.76 g, 24.5 mmol)、石油醚 (bp 30~60 °C) 45 mL、电解二氧化锰 (6.40 g, 73.6 mmol), 常温电磁搅拌, 30 min 后, 加入无水硫酸镁适量, 继续反应 1 h, 抽滤, 滤液减压旋蒸后得紫红色油状液体 4.66 g, 收率为 99%, 置 4 °C 冰箱中冷却固化为紫红色结晶, mp 29~31 °C, 与文献报道值一致^[4]。

2.1.2 美法仑二苯甲酯 (2) 的制备 将化合物 1 (2.41 g, 12.39 mmol) 用乙腈溶解后加入美法仑 (1.26 g, 4.13 mmol), 加热回流 4 h, 减压蒸去溶剂, 柱色谱分离, 环己烷-醋酸乙酯 (1:1~0:1) 洗脱得黄色油状液体 1.78 g, 收率为 92%。Rf 值为 0.40。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.028 (2H, d, J=10.5 Hz), 3.052 (2H, d, J=3.8 Hz), 3.563 (4H, t, J=5.1 Hz), 3.683 (4H, t, J=4.8 Hz), 4.099 (1H, m), 6.480 (2H, d, J=8.4 Hz), 6.924 (2H, d, J=9.0 Hz), 6.899 (1H, s), 7.324 (10H, m)。

2.1.3 7-苯乙酰胺-3-美法仑二苯甲酯头孢-4-对甲氧苄基酯 (3) 的制备 根据文献^[5], 将 GCLE (1.83 g,

3.89 mmol)、KI (3.75 g, 27.19 mmol) 搅拌溶解于丙酮 20 mL 中, -8 °C 反应 5 h 后, 直接向反应液中加入化合物 2 (1.78 g, 3.80 mmol) 和无水碳酸钾 (1.16 g, 8.38 mmol), 移至室温, 避光搅拌 4 h, 滤过, 滤液浓缩, 柱色谱分离, 环己烷-醋酸乙酯 (2:3) 分离得黄色油状物 2.59 g, 收率为 74%, Rf 值为 0.60, ESI-MS *m/z*: 920.291 1。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.992 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.318 (10H, m), 7.239 (5H, m), 7.114 (2H, d, J=7.6 Hz), 6.937 (2H, d, J=8.7 Hz), 6.872 (2H, d, J=6.9 Hz), 6.800 (1H, s), 6.505 (2H, d, J=9.0 Hz), 5.838 (1H, t, J=3.9 Hz), 5.815 (2H, s), 5.346 (1H, d, J=4.2 Hz), 4.123 (1H, m), 3.983 (3H, s), 3.809 (4H, t, J=9.9 Hz), 3.644 (4H, t, J=8.7 Hz), 3.542 (2H, s), 3.581 (2H, d, J=7.8 Hz), 3.228 (2H, s), 3.055 (2H, d, J=10.5 Hz)。

2.1.4 7-苯乙酰胺-3-美法仑二苯甲酯氧化头孢-4-对甲氧苄基酯 (4) 的制备 取化合物 3 (0.79 g, 0.85 mmol), 用二氯甲烷 3 mL 润湿溶解, 加入间氯过氧苯甲酸 (MCPBA) 0.30 g, 再加入二氯甲烷 12 mL 搅拌溶解, 常温反应 3 h 后, 反应液用饱和碳酸氢钠 (5 mL×3) 洗涤, 将二氯甲烷层旋转蒸发浓缩得到红色油状液体粗品, 柱色谱分离, 醋酸乙酯-环己烷 (4:1) 洗脱浓缩得黄色油状液体 0.58 g, 收率为 68%。Rf 值为 0.45, ESI-MS *m/z*: 955.366 3。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.896 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.321 (10H, m), 7.229 (5H, m), 7.115 (2H, d, J=7.6 Hz), 6.941 (2H, d, J=8.7 Hz), 6.870 (2H, d, J=6.9 Hz), 6.800 (1H, s), 6.515 (2H, d, J=9.0 Hz), 5.838 (1H, t, J=3.9 Hz), 5.821 (2H, s), 5.339 (1H, d, J=4.2 Hz), 4.103 (1H, m), 3.979 (3H, s), 3.811 (4H, t, J=9.9 Hz), 3.654 (4H, t, J=8.7 Hz), 3.542 (2H, s), 3.590 (2H, d, J=7.8 Hz), 3.237 (2H, s), 3.045 (2H, d, J=10.5 Hz)。

2.1.5 头孢美法仑的制备 取化合物 4 (500 mg, 0.55 mmol) 溶解于二氯甲烷 5 mL 中, 依次加入苯甲醚、三氟乙酸各 1 mL, -5 °C 反应 30 min 后停止反应, 将反应液加入异丙醚 40 mL 中, 析出固体, 离心, 弃上清液, 干燥, 薄层色谱分离, 正丁醇-水-乙酸 (3:1:1) 洗脱得白色粉末 176 mg, 收率为 35%, Rf 值为 0.55, ESI-MS *m/z*: 783.217 8。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.485 (1H, m),

3.255 (2H, d, $J=4.2$ Hz), 3.348 (2H, s), 3.446 (1H, s), 3.589 (4H, t, $J=5.3$ Hz), 3.831 (4H, t, $J=4.8$ Hz), 4.278 (2H, d, $J=3.9$ Hz), 4.954 (1H, d, $J=5.2$ Hz), 5.644 (1H, m), 6.564 (2H,

d, $J=8.4$ Hz), 6.973 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 7.238 (5H, m), 7.672 (1H, d, $J=3.6$ Hz), 9.114 (2H, d, $J=7.8$ Hz)。

目标化合物的合成路线见图 1。

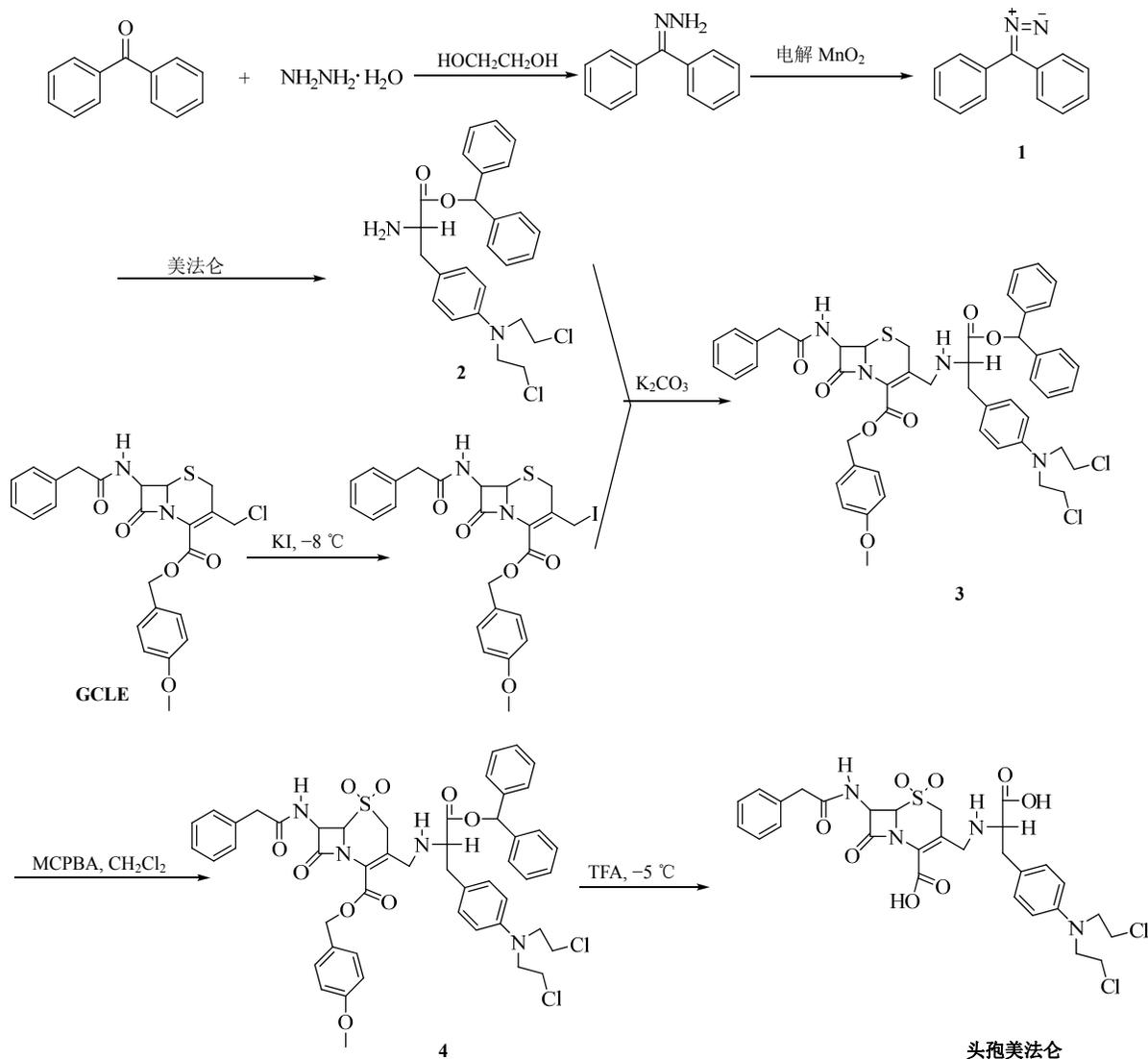


图 1 目标化合物的合成路线

Fig. 1 Synthetic routes of target compound

2.2 体外活性试验

人肺癌细胞株 H460 细胞用含 10% 类标准胎牛血清、100 U/mL 青霉素、链霉素的 RPMI-1640 培养液，置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养，取对数生长期细胞进行实验。

头孢美法仑先用 DMSO 溶解为 200 mmol/L 的母液，临用前用细胞培养液将母液稀释为 200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol/L}$ 6 个浓度。分别设头孢美法仑组、头孢美法仑 + β -内酰胺酶组、美法仑组，每组分别设空白对照，对照组为含 0.1% DMSO 的培养液，

头孢美法仑 + β -内酰胺酶组加设单 β -内酰胺酶组。

取对数生长期人肺癌细胞 H460，接种于 96 孔板中，每孔 100 μL ，于 37°C 、5% CO_2 孵箱中孵育，贴壁后，全部换用无血清培养基，头孢美法仑 + β -内酰胺酶组先加 15 μg β -内酰胺酶孵育 1 h 后，洗掉 β -内酰胺酶，全部换成含前药终浓度分别为 200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol/L}$ 的培养液继续培养，每一浓度设 4 个复孔，培养 24 h 后，加入 MTT 20 μL /孔，继续培养 4 h 后，加入 DMSO 150 μL /孔，震荡 10 min。在酶联免疫检测仪上测定 490 nm 波长处各孔的吸光

度 (A) 值, 计算抑制率以及半抑制浓度 (IC₅₀)。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

实验数据采用 SPSS 20 统计软件进行分析, 结

果见表 1。

表 1 各组对 H460 的细胞毒作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Cytotoxicity effect on H460 cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	抑制率/%						IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
头孢美法仑	0.81 ± 0.014	0.57 ± 0.021	0.44 ± 0.021	0.20 ± 0.007	0.13 ± 0.006	0.09 ± 0.007	
头孢美法仑 + β-内酰胺酶	67.2 ± 0.14**	52.3 ± 0.52**	42.0 ± 0.48**	38.6 ± 0.21**	33.3 ± 0.71**	25.3 ± 0.07**	101.97 ± 1.705
美法仑	83.4 ± 0.85**	81.5 ± 0.09**	81.2 ± 0.14**	27.2 ± 0.85**	13.3 ± 0.12**	6.1 ± 0.28**	66.694 ± 0.370
β-内酰胺酶	0.02 ± 0.005						

与头孢美法仑比较: **P < 0.01

**P < 0.01 vs cephalosporin group

3 讨论

本实验将头孢菌素母核与氮芥类细胞毒药物美法仑进行拼合, 设计出能够用于 ADEPT 治疗的前体化合物, 可以用于接下来的肿瘤免疫治疗研究。本研究以 GCLE 和美法仑为原料, 经过酯化、碘代、偶联、氧化和水解等反应完成目标化合物的合成。得到的目标化合物结构经过质谱、核磁等波谱数据得以确证。本实验设计的合成路线短, 合成步骤简单, 目标化合物的收率也较高, 合成工艺较为成熟稳定, 具有较好的应用前景。但由于目标化合物纯化使用薄层制备板, 纯度较难进一步提高, 且制备量有限, 仅够进行体外活性实验。因此, 产物纯化方法有待深入研究, 以为未来的体内实验研究提供足够的受试药物。

体外抗肿瘤活性试验结果表明, 不同浓度头孢美法仑作用 H460 细胞 24 h 后, 无明显的毒性作用, 在体外基本无毒; 而头孢美法仑在 β-内酰胺酶作用下可特异性水解释放出细胞毒化合物, 不同浓度的酶解头孢美法仑对 H460 细胞有明显的抑制作用, IC₅₀ 为 (101.97 ± 1.705) $\mu\text{mol/L}$, 与阳性对照药美法仑 [IC₅₀ 为 (66.694 ± 0.370) $\mu\text{mol/L}$] 相比, 虽在较高浓度下细胞毒作用较弱弱, 但由于其属于靶向性设计, 在低浓度时可有效的富集于肿瘤细胞, 细胞毒作用强于美法仑, 可大大降低其副作用, 初步表明符合药物设计的初衷。目前受合成前药量的限制

无法进行体内活性实验, 如果在后期体内抗肿瘤实验研究中证实其活性强于阳性对照药美法仑, 才能证明本研究设计的完美性。由此可见, 目标化合物与美法仑相比, 颇具优势, 是比较理想的前药设计^[6], 临床应用指日可待。

参考文献

- [1] Zawilska J B, Wojcieszak J, Olejniczak A B. Prodrugs: a challenge for the drug development [J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(1): 1-14.
- [2] Boschmans J, de Bruijn E, Van Schil P, et al. Analysis of novel melphalan hydrolysis products formed under isolated lung perfusion conditions using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27(7): 835-841.
- [3] 周晓靓, 施培基, 王浩. 一种重组 β-内酰胺酶的原核表达, 纯化及其活性检测 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(1): 1-3.
- [4] 吕茜茜, 周晓靓, 王荣先. 二苯基重氮甲烷的合成工艺改进 [J]. *化学试剂*, 2008, 30(2): 147.
- [5] 谢建伟, 周兆良, 许建帼, 等. 二苯甲酮脲的合成研究 [J]. *化工生产与技术*, 2003, 10(6): 16-17.
- [6] 马红梅, 王文梅, 鲍福刚, 等. 3-碘代甲基头孢菌素重要中间体 GIE 的合成 [J]. *中国药物化学杂志*, 2001, 11(3): 142-142.
- [7] Karaman R, Fattash B, Qtait A. The future of prodrugs-design by quantum mechanics methods [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10(5): 713-729.