

新型 4-苯胺基喹唑啉类酪氨酸激酶抑制剂的抗肿瘤活性研究

石玉^{1,2}, 胡倩倩³, 于冰², 李祎亮², 熊冬生^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 血液学研究所, 天津 300020

2. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

3. 天津医科大学, 天津 300070

摘要: 目的 对合成的新型 4-苯胺基喹唑啉类酪氨酸激酶抑制剂 TYIG1~TYIG9 进行抗肿瘤活性研究, 为寻找具有靶向抗肿瘤活性的候选化合物提供依据。方法 采用均相时间分辨荧光 (HTRF) 法对化合物进行 EGFR、VEGFR-2 两个靶点的体外活性筛选; 采用 MTS 法对化合物进行肿瘤细胞 (A431、A549、H1975、MDA-MB-231) 增殖抑制的体外活性评价; 采用人肺癌 H1975 细胞的移植瘤裸鼠模型评价其在动物体内抗肿瘤活性。结果 采用 HTRF 法从合成的一系列化合物中筛选出化合物 TYIG4~TYIG9 对 EGFR、VEGFR-2 激酶的活性较好。MTS 法检测得到这 6 个化合物对 4 种肿瘤细胞 (A431、A549、H1975、MDA-MB-231) 均有不同程度的抑制作用, 其中 TYIG6 的增殖抑制作用的选择性更为突出; 体内试验结果表明 TYIG6 能够剂量相关性地抑制肿瘤生长, 50、100 mg/kg TYIG6 对 H1975 的相对肿瘤抑制率分别为 42.59%、34.92%。结论 TYIG6 具有良好的体内外抗肿瘤活性, 具有成为新型双靶点酪氨酸激酶抑制剂的潜能, 有进一步的研究价值。

关键词: 4-苯胺基喹唑啉类酪氨酸激酶抑制剂; 抗肿瘤; 表皮生长因子受体; 血管内皮生长因子受体

中图分类号: R966; R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)09-0969-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.09.003

Anti-tumor activity of novel 4-aminobenzene quinazoline tyrosine kinase inhibitors

SHI Yu^{1,2}, HU Qian-qian³, YU Bing², LI Yi-liang², XIONG Dong-sheng¹

1. Institute of Hematology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China

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

3. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To study the antitumor activity of synthesized 4-aminobenzene quinazoline tyrosine kinase inhibitors TYIG1 — TYIG9, and provide the basis for seeking new targeting anti-tumor candidate compounds. **Methods** Homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) method was used to evaluate the inhibitory activity of the compounds against EGFR and VEGFR-2 *in vitro*. The activity study of cells (A431, A549, H1975, and MDA-MB-231) proliferation of the compounds was carried out by MTS method. Nude mice xenograft model of human NSCLC H1975 cells was used to evaluate the antitumor activity *in vivo*. **Results** In HTRF method, TYIG4 — TYIG9 showed better activity from screening, which also had varying degrees of inhibition on cells (A431, A549, H1975, and MDA-MB-231) in MTS method. Among these six compounds, TYIG6 showed more obvious selectivity of inhibitory effects of cell proliferation, which could well restrain the tumor growth with dose-dependent tumor growth rates of 42.59% and 34.92% on doses of 50 and 100 mg/kg *in vivo*. **Conclusion** TYIG6 has good antitumor activity *in vitro* and *in vivo*, and needs more tests to further verify whether it can become a novel targeting tyrosine kinase inhibitor.

Key words: 4-aminobenzene quinazoline tyrosine kinase inhibitors; antitumor; EGFR; VEGFR

收稿日期: 2014-07-20

基金项目: 天津市科技支撑计划重点项目 (13ZCZDSY00100)

作者简介: 石玉 (1984—), 女, 天津市人, 助理研究员, 从事新型靶向抗肿瘤药物的研发和开发工作。Tel: (022)23006023 E-mail: shiy@tjipr.com

*通信作者 熊冬生 (1961—), 男, 江西南昌人, 研究员, 博士生导师, 从事肿瘤细胞耐药机制及其逆转和基因工程抗体研究。

Tel: (022) 23909404 E-mail: dsxiong@ihcams.ac.cn

癌症是当前严重威胁人类健康的重要疾病之一，其治疗和预防长期以来也一直是人类所面临一大难题，也是医学界面临的一项挑战。近年来，科学家在分子水平上对肿瘤细胞内部的癌基因及抗癌基因的进行了深入的研究，使得针对肿瘤的特异性分子靶点设计新型药物成为当今抗肿瘤药物研发的主要方向。蛋白酪氨酸激酶在细胞信号转导过程中发挥着重要的作用，所以针对这一靶点的药物已成为研发热点^[1-2]。

凡德他尼 (vandetanib、ZD6474) 是已上市的小分子喹唑啉类靶向蛋白酪氨酸激酶抑制剂，对表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 与血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 都具有显著的抑制作用^[3]。蛋白酪氨酸激酶与肿瘤的发生和发展有密切的关系，酪氨酸激酶的活性过高，导致其下游信号途径异常激活，从而导致细胞转化、增殖、对抗细胞凋亡、促进细胞生长，最终导致肿瘤的形成。临床试验结果表明凡德他尼对晚期非小

细胞肺癌、乳腺癌等均具有很好的治疗效果^[4]。本课题组对凡德他尼的结构进行优化改造，合成出一系列的新型 4-苯胺基喹唑啉类酪氨酸激酶抑制剂，并对这些化合物进行体外和体内的抗肿瘤活性研究，希望得到药理作用机制明确、治疗效果明显和安全性更好的候选化合物。

1 材料

1.1 化合物

凡德他尼、TYIG1~TYIG9 均由本实验室合成，结构式见图 1。以 DMSO 配制成 0.1 mol/L 的储备液，备用。

1.2 主要试剂

EGFR、VEGFR-2 激酶购自美国 BPS Bioscience 公司；Trisbase、ATP 和 HEPES 购自美国 Amresco 公司；生物素标记的蛋白酪氨酸激酶多肽底物 (poly-Glu-Ala-Tyr)、链激酶素标记的 XL-665 (一种经改良的别藻蓝蛋白)、结合生物素标记的抗磷酸化酪氨酸抗体的钜联穴状化合物 (EuK) 购自法国 Cisbio Bioassay 公司；DMEM 培养基、RPMI-1640

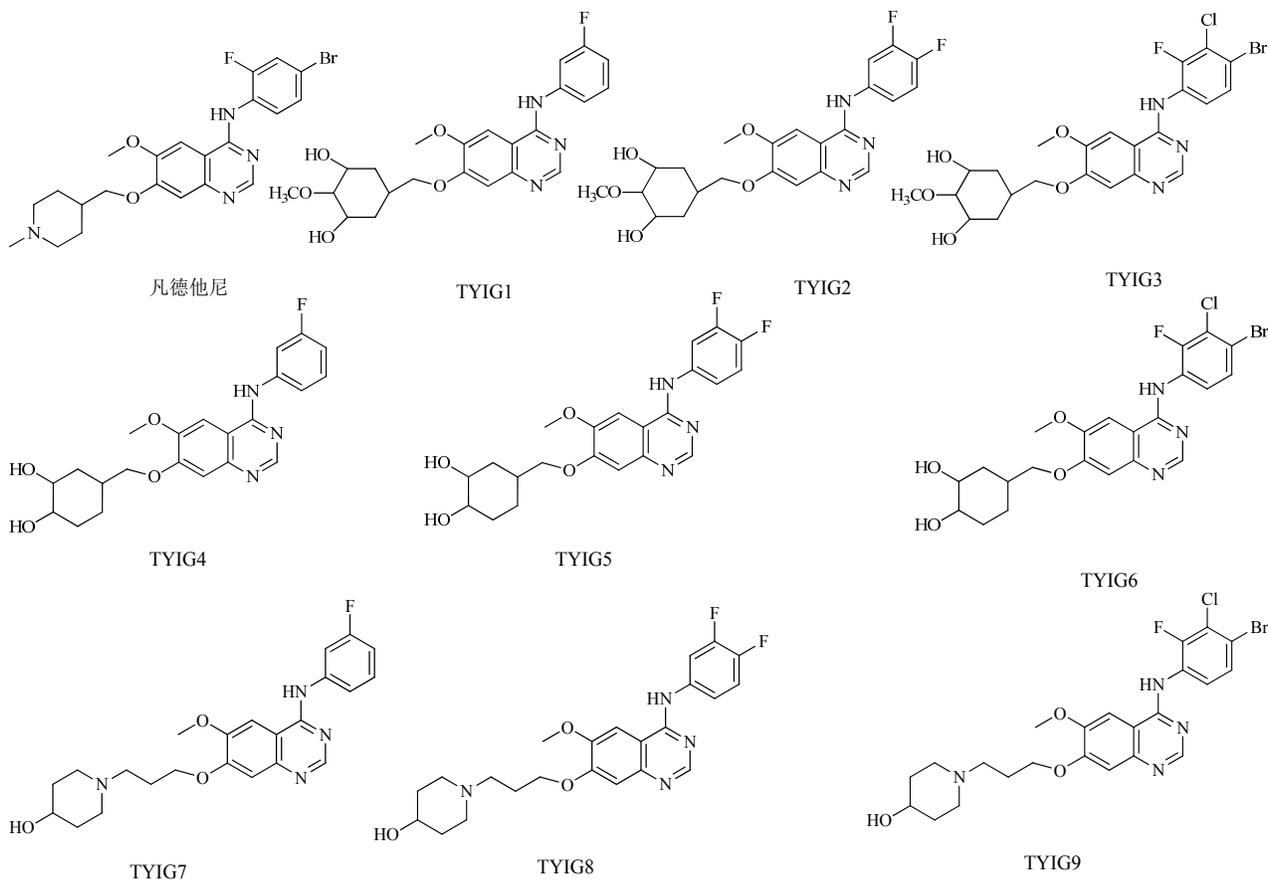


图 1 凡德他尼和 TYIG1~TYIG9 的结构式

Fig. 1 Structures of ZD6474 and TYIG4 — TYIG9

培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司；MTS 检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.3 细胞株及动物

人表皮鳞状细胞癌 A431、人肺腺癌 A549、人非小细胞肺癌 H1975、人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞购自北京协和细胞资源中心，本实验室冻存使用；SPF 级健康昆明种小鼠，体质量 18~20 g，由军事医学科学院卫生环境医学研究所动物实验中心提供，许可证号 SCXK（军）2009-0003。

2 方法与结果

2.1 EGFR 和 VEGFR-2 激酶的活性筛选

根据均相时间分辨荧光（HTRF）法以 EGFR、VEGFR-2 为检测靶点对化合物进行筛选。

配制所需浓度的 ATP、TK Substrate-biotin（TK-底物生物素）、Kinase buffer（激酶缓冲液）的工作液，ATP、TKSubstrate-biotin、Kinase buffer 按体积比例 2:2:2 取液混匀；用 Kinase buffer 稀释药物配制为所需浓度；配制 EGFR、VEGFR-2 的酶工作液。在白色 384 孔板中，每孔加入 6 μL 混匀液，2 μL 药物，2 μL 激酶，混匀，置 37 °C 温育反应 30 min。然后加入 5 μL 链激酶素标记的 XL-665 及 5 μL 结合了 Eu³⁺ 的穴状化合物抗体，混匀。室温放置 30 min 后于酶标仪 314 nm 激发，检测 665、620 nm 波长处的荧光，计算激酶抑制率^[5]。以抑制率为纵坐标，lg[M]为横坐标（M 为浓度），采用 Graphpad Prism 5.0 软件拟合曲线，计算 IC₅₀ 值。见表 1。

$$\text{抑制率} = (\text{Ratio}_{665/620 \text{ 对照孔}} - \text{Ratio}_{665/620 \text{ 给药孔}}) / \text{Ratio}_{665/620 \text{ 对照孔}} \times 100\%$$

表 1 化合物对受试激酶抑制作用

Table 1 Inhibition of compounds on tyrosine kinase

| 化合物 | IC ₅₀ /(nmol·L ⁻¹) | |
|-------|---|----------|
| | VEGFR-2 | EGFR |
| 凡德他尼 | 41±0.12 | >400 |
| TYIG1 | 165±0.56 | 143±5.21 |
| TYIG2 | 109±0.53 | 171±0.14 |
| TYIG3 | 96±0.81 | 102±2.06 |
| TYIG4 | 33±0.08 | 126±0.81 |
| TYIG5 | 48±0.47 | 32±0.05 |
| TYIG6 | 32±0.50 | 15±0.16 |
| TYIG7 | 49±0.16 | 27±0.08 |
| TYIG8 | 51±0.74 | 131±0.09 |
| TYIG9 | 44±0.15 | 48±0.11 |

以 EGFR 和 VEGFR-2 为筛选靶标，凡德他尼作为阳性对照药，采用 HTRF 法对目标化合物进行活性初筛。根据初筛结果，测定 IC₅₀ 值，结果 TYIG4~TYIG9 对 VEGFR-2 激酶抑制活性与凡德他尼相当，而 TYIG1~TYIG9 对 EGFR 激酶的抑制活性均高于凡德他尼。

运用该分析方法从 TYIG1~TYIG9 目标化合物中筛选出 6 个活性较好的化合物进行细胞层面的活性研究，其中化合物 TYIG4、TYIG6 对 EGFR、VEGFR-2 抑制作用均优于凡德他尼，表现了突出的酪氨酸激酶的抑制活性。

2.2 MTS 法检测肿瘤细胞的增殖抑制活性

取含 10%胎牛血清的培养基，37 °C、5% CO₂ 条件下培养肿瘤细胞^[6]，2~3 d 传代 1 次。取生长态势优良的细胞接种于 96 孔培养板内，接种的细胞浓度为 1×10⁴/孔；待 24 h 细胞完全贴壁后，吸除原培养基，D-hanks 缓冲液冲洗，加入无胎牛血清的培养基配制的 TYIG4~TYIG9 药物溶液，终浓度依次为 0.3、1、3、10、30、100 μmol/L，对照组内加入 0.1% DMSO，每组设 3 个复孔，并设对应的空白组。37 °C、5% CO₂ 继续培养 48 h，每孔加入 20 μL MTS 检测液，培养箱中继续培养 30 min。放入酶标仪中，于 490 nm 波长处读取各孔吸光度（A）值，计算抑制率。以抑制率为纵坐标，lg[M]为横坐标（M 为浓度），采用 Graphpad Prism 5.0 软件拟合曲线，计算 IC₅₀ 值。见表 2。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$$

表 2 目标化合物对不同肿瘤细胞的 IC₅₀ 值

Table 2 IC₅₀ values of target compounds on different tumor cells

| 化合物 | IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹) | | | |
|-------|---|-------|-------|------------|
| | A431 | A549 | H1975 | MDA-MB-231 |
| 凡德他尼 | 0.85 | 4.37 | 4.81 | 21.29 |
| TYIG4 | 0.99 | 6.09 | 9.03 | — |
| TYIG5 | 0.54 | 6.46 | 10.62 | 12.88 |
| TYIG6 | 0.48 | 3.85 | 4.12 | 20.41 |
| TYIG7 | 0.83 | 5.37 | 12.78 | — |
| TYIG8 | 1.05 | 8.16 | 10.07 | 10.04 |
| TYIG9 | 0.91 | 10.20 | 15.39 | 9.35 |

— 表示其 IC₅₀ 值超出实验中最大给药浓度

— IC₅₀ value beyond maximum concentration

根据 HTRF 法对目标化合物的筛选结果, 挑选出对酪氨酸激酶抑制活性表现良好的 TYIG4~TYIG9 进行细胞活性评价。选用人表皮鳞状细胞癌 A431 细胞系 (EGFR 高表达)、人肺腺癌 A549 细胞系 (EGFR 正常表达)、人非小细胞肺腺癌 H1975 细胞系 (EGFR 正常表达) 为主要的活性化合物靶点检测细胞; 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系 (EGFR 低表达) 为对比评价细胞, 采用 MTS 法检测目标化合物对 4 种肿瘤细胞增殖抑制率^[7]。结果表明, 目标化合物中选用的 3 种 EGFR 表达的靶细胞 (A431、A549、H1975) 均有不同程度的细胞增殖抑制作用, 其中 TYIG4、TYIG7、TYIG8、TYIG9 对该细胞的增殖抑制作用与凡德他尼相当, TYIG5、TYIG6 对这 3 种细胞的增殖抑制作用强于凡德他尼, 但只有 TYIG6 对非靶细胞 (MDA-MB-231) 生长影响很小, 具有良好的靶向作用。

2.3 TYIG6 的体内抗肿瘤作用

人 H1975 肺癌移植瘤裸鼠, 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 的体积比例混合匀浆, 制备成 1×10^7 PBS 细胞悬液 (显微镜下观察), 皮下种植于 6 周龄的裸鼠腹侧, 每只约注射 0.2 mL。待体积增长到 $100 \sim 150 \text{ mm}^3$ 进行试验。按肿瘤体积 = 长径 \times 短径² $\times 0.5$ 计算肿瘤的体积。动物按肿瘤大小随机分组, 即模型组、TYIG6 (50、100 mg/kg) 组、凡德他尼 (50 mg/kg) 组^[8-9]。各给药组灌胃给药, 1 次/d, 连续 2 周, 模型组给予同体积溶媒。从第 1 天开始, 每 3 天测定 1 次肿瘤体积, 称定动物质量。计算相对肿瘤体积 (RTV), 根据 RTV 计算肿瘤增殖速率。

$RTV = V_t / V_0$, V_t : 每次测量时的肿瘤体积, V_0 : 开始给药时的肿瘤体积。

肿瘤增殖速率 = 给药组的 RTV 均值 / 对照组的 RTV 均值 $\times 100$

疗效评价标准: 肿瘤增殖速率 $> 60\%$ 为无效; 肿瘤增殖速率 $\leq 60\%$ 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, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。结果见表 3。

表 3 TYIG 6 和凡德他尼对人肺癌细胞 H1975 裸鼠移植瘤的抑制作用

Table 3 Inhibition of TYIG 6 and ZD6474 on 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/% |
|-------|---------------------------|-------|----------|-------|----------|----------------------|----------|
| | | d_0 | d_{15} | d_0 | d_{15} | | |
| 模型 | — | 8 | 8 | 20.5 | 22.7 | 3.78 ± 0.19 | — |
| TYIG6 | 50 | 8 | 8 | 20.2 | 21.9 | $1.61 \pm 0.40^{**}$ | 42.59 |
| TYIG6 | 100 | 8 | 8 | 20.6 | 21.0 | $1.32 \pm 0.25^{**}$ | 34.92 |
| 凡德他尼 | 50 | 8 | 8 | 20.1 | 19.4 | $1.35 \pm 0.32^{**}$ | 35.71 |

d_0 : 分笼给药时间; d_{15} : 给药后 15 d; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$

d_0 -administration time of cage d_{15} -administration after 15 d $^{**}P < 0.01$ vs model group

根据体外药效筛选结果, 选取化合物 TYIG6 进行体内抗肿瘤作用, 并与对照凡德他尼进行比较。结果显示, 50、100mg/kg TYIG6 和凡德他尼 (50 mg/kg) 均能抑制肺癌细胞 H1975 的生长, 且呈剂量相关性, 肿瘤增殖速率分别为 42.59%、34.92%、35.71%。根据疗效评价标准, 50、100 mg/kg TYIG6 对裸鼠肺癌细胞 H1975 均有疗效; 50 mg/kg 凡德他尼对裸鼠肺癌细胞 H1975 有疗效, TYIG6 疗效略低于凡德他尼。给药后凡德他尼组均出现死亡, 体质量呈下降趋势。

3 讨论

实验建立 HTRF 分析方法用于 EGFR、VEGFR-2 激酶抑制剂的体外筛选。结果凡德他尼对

VEGFR-2 激酶活性抑制的 IC_{50} 为 41 nmol/L, 与文献报道的 IC_{50} 相当^[10]。该方法结果可靠、数据稳定, 且操作简便可用于酪氨酸激酶磷酸化抑制剂的高通量筛选。

在目标化合物的体外细胞活性筛选实验中, 实验采用了 MTS 法。此方法是建立在 MTT 法的基础上, 但在储存、敏感度、特异性等方面优于 MTT 法。

人肺癌 H1975 裸鼠模型对 TYIG6 进行体内抗肿瘤活性评价结果显示 TYIG6 不同剂量对肺癌 H1975 均具有很好的疗效, 与凡德他尼相当。因 H1975 是 EGFR-T790M 突变的细胞, 所以还需要进一步试验数据的支持。

综上所述, TYIG6 体内外抗肿瘤活性良好, 具有成为小分子靶向抗肿瘤药物的潜力, 但还需要进一步作用机制研究, 并为进一步的化合物结构修饰、改造和药理学研究提供参考数据^[11]。

参考文献

- [1] Malik A K, Gerber H. Targeting VEGF ligands and receptors in cancer [J]. *Targets*, 2003, 2(2): 48-57.
- [2] 代梅, 郭建辉. 靶向EGFR家族的抗肿瘤药物研究进展 [J]. *生命科学*, 2009, 21(3): 412-417.
- [3] Wu W1, Onn A, Isobe T, *et al.* Targeted therapy of orthotopic human lung cancer by combined vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor signaling blockade [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(2): 471-483.
- [4] Bai F, Liu H, Tong L, *et al.* Discovery of novel selective inhibitors for EGFR-T790M/L858 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(3): 1365-1370.
- [5] 周祥, 于冰, 侯文彬, 等. ZD6474 衍生物筛选和抗肿瘤活性研究 [J]. *中国医药生物技术*, 2013, 8(2): 114-118.
- [6] Ciardiello F, Caputo R, Damiano V, *et al.* Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(4): 1546-1556.
- [7] Chiu H C, Chang T Y, Huang C T, *et al.* EGFR and myosin II inhibitors cooperate to suppress EGFR-T790M-mutant NSCLC cells [J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(3): 299-310.
- [8] Ciardiello F, Bianco R, Caputo R, *et al.* Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(2): 784-793.
- [9] 李晓园, 商倩, 周祥, 等. 凡德他尼衍生物的抗肿瘤活性筛选研究 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(1): 16-20.
- [10] 茆勇军, 李海泓, 李剑锋, 等. 蛋白酪氨酸激酶信号传导途径与抗肿瘤药物 [J]. *药学学报*, 2008, 43(4): 323-334.
- [11] Larsen AK1, Ouaret D, El Ouadrani K, *et al.* Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 131(1): 80-90.