

聚乙二醇-达沙替尼结合物的合成及初步药效研究

汪进良, 冯泽旺, 赵宣(天津键凯科技有限公司, 天津 300462)

摘要:目的 合成 2 种聚乙二醇-达沙替尼结合物(JK120303 和 JK120304), 并评价结合物 JK120303 和 JK120304 在 K562 人慢性髓系白血病皮下瘤模型中的抗肿瘤作用。方法 将达沙替尼用缬氨酸衍生后分别和 mPEG-二肽酸和 4arm-PEG-乙酸反应得到聚乙二醇-达沙替尼结合物, 于 NOD/SCID 小鼠右侧背部皮下接种 K562 细胞, 建立人慢性髓系白血病异种移植动物皮下模型, 根据相对肿瘤增殖率进行疗效评价。结果 合成得到 2 个聚乙二醇-达沙替尼结合物。结合物 JK120303($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)的药效优于达沙替尼($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 结合物 JK120304($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)的药效与达沙替尼($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)相当。结论 聚乙二醇-达沙替尼结合物 JK120303 药效优于达沙替尼, 值得进一步研究。

关键词: 达沙替尼; 聚乙二醇-达沙替尼结合物; 合成; 药效

中图分类号: R914.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)12-1717-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.016

引用本文: 汪进良, 冯泽旺, 赵宣. 聚乙二醇-达沙替尼结合物的合成及初步药效研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1717-1720.

Synthesis and Preliminary Pharmacological Efficacy Study of PEG-dasatinib Conjugates

WANG Jinliang, FENG Zewang, ZHAO Xuan(Tianjin JenKem Technology Co., Ltd., Tianjin 300462, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesis two PEG-dasatinib conjugates (JK120303 and JK120304) and get preliminary antitumor effect of these compounds in the K562 subcutaneous tumor model of human chronic myeloid leukemia. **METHODS** Dasatinib was derived with valine, then react with mPEG-dipeptide acid and 4arm-PEG-acetic acid to obtain PEG-dasatinib conjugates, K562 cells were inoculated subcutaneously in the right back of NOD/SCID mice to establish human chronic myeloid leukemia xenograft animal subcutaneous model, the curative effect was evaluated according to the relative tumor proliferation rate (T/C%). **RESULTS** Two PEG-dasatinib conjugates were synthesized, the efficacy of JK120303 ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was better than that of dasatinib ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and the efficacy of JK120304 ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was almost the same as that of dasatinib ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). **CONCLUSION** The efficacy of PEG-dasatinib conjugate JK120303 is better than that of dasatinib and worth further study.

KEY WORDS: dasatinib; PEG-dasatinib conjugate; synthesis; pharmacological efficacy

慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)是一种影响血液及骨髓的恶性增殖性疾病,一般自然起始于“慢性期”,之后经过“加速期”,最终到“急变期”。急变期是 CML 的最终阶段,与急性白血病相似,具有较强致死性^[1]。在 CML 的治疗中,伊马替尼是首选的酪氨酸激酶抑制剂,伊马替尼与 ABL 激酶的 ATP 结合位点结合产生抑制作用,对于野生型的 BCR-ABL 激酶的作用效果良好,而对突变型的效果不佳,而许多肿瘤细胞 BCR-ABL 激酶区存在突变,导致很多患者对伊马替尼产生耐药性^[2]。达沙替尼可以阻断多种致癌蛋白,于 2007 年经过 FDA 的批准用于既往治疗失败或不耐受的 CML 的所有

病期患者,同时还用于治疗对其他疗法耐药或不耐受的费城染色体阳性的急性淋巴细胞性白血病成人患者^[3],达沙替尼结构式见图 1。

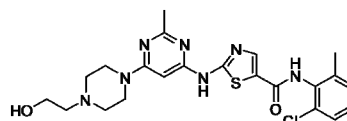


图 1 达沙替尼结构式

Fig. 1 Structure of dasatinib

临床试验表明,达沙替尼的疗效超过高剂量伊马替尼的疗效,且未发现耐药性,但在使用过程中,仍存在发热、胸膜积液、发热性中性粒细胞减少、胃肠道出血、肺炎、血小板减少、呼吸困难、贫血、腹泻和心脏衰竭等不良反应^[4]。此外,

基金项目: 天津市科技计划项目(15PTSYJC00220)

作者简介: 汪进良,男,工程师 Tel: (022)25616890 E-mail: jinliangwang@jenkem.com

FDA 还于 2011 年 10 月公告了达沙替尼可能会增加肺动脉高压的风险, 并决定将这一风险信息添加到扑瑞赛药品说明书的警告与注意事项当中^[4]。

对达沙替尼及其衍生物进行相应的修饰有助于增加其疗效, 降低可能的不良反应。聚乙二醇(PEG)修饰技术是一种将 PEG 活化后连接到药物分子或表面的技术。药物小分子经过 PEG 修饰, 特别是大分子量 PEG 修饰后, 可以增加水溶性, 降低毒性, 减少酶降解作用, 提高生物利用度^[5]。相对于直链型 PEG, 单臂多头 PEG 和多臂 PEG 具有多个端基, 进而具有多个药物连接点、可以负载多个药物分子的优势。本研究分别选取大分子量的单甲氧基 PEG 谷氨酸二肽酸(mPEG-二肽酸)和四臂 PEG 乙酸(4arm-PEG-乙酸)经氨基酸连接臂和达沙替尼反应, 得到结合物 **JK120303** 和 **JK120304**, 所得到的化合物为大分子量 PEG 衍生物, 是一种前药, 易溶于水, 一般制成冻干粉针, 以注射形式给药。药物进入到体内后因为有 PEG 的键合, 裂解比较缓慢, 大部分到达靶标位置后再裂解出原药形式, 发挥药理作用, 这样比口服所需给药次数少, 药物能平缓地释放出来, 也有利于减少不良反应。本实验随后在 NOD/SCID 小鼠右侧背部皮下接种 K562 细胞, 建立人慢性髓系白血病异种移植动物皮下模型, 根据相对肿瘤增殖率(T/C%)对化合物进行药效评价。

1 材料

Advance 300 MHz 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); Autoflex III 型飞行时间质谱仪(瑞士 Bruker 公司); WRS-2A 数字熔点仪(上海申光仪器有限公司)。

达沙替尼(南京安格医药化工有限公司, 批号: 130523, 质量分数: 99%); *N*-叔丁氧羰基缬氨酸(国药集团北京化学试剂有限公司, 批号: 130607, 质量分数: 99%); 单甲氧基 PEG 谷氨酸二肽酸(天津键凯科技有限公司, 批号: ZZ105P060, 分子量: 20 000, 质量分数: 95%); 四臂 PEG 乙酸(天津键凯科技有限公司, 批号: ZZ101P095, 分子量: 20 000, 质量分数: 95%); 其余试剂均为市售分析纯。

NOD/SCID 小鼠, 实验动物许可证号: SCXK(京) 2009-0004, SPF 级, ♀♂各半, 体质量: 20~24 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司(HFK)。

2 方法

2.1 PEG-达沙替尼结合物的合成

合成路线见图 2。

2.1.1 化合物 3 的制备 将达沙替尼 1.95 g (4 mmol), *N*-叔丁氧羰基缬氨酸 840 mg(4.8 mmol) 和 DMAP 714 mg(4.8 mmol) 加到反应瓶中, 用 40 mL *N,N*-二甲基甲酰胺溶解, 氮气保护下冰浴冷却, 再滴入 DCC 1.03 g (5 mmol) 溶于 20 mL 二氯甲烷的溶液, 滴完后自然升到室温反应过夜。TLC 监测反

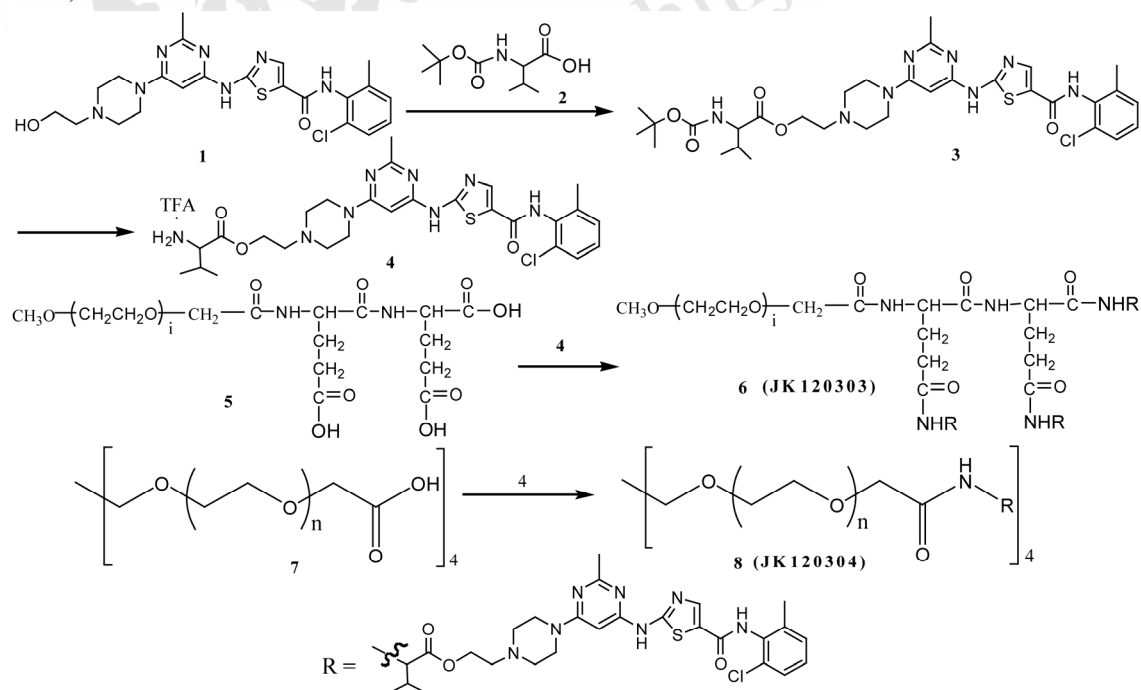


图 2 PEG-达沙替尼结合物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of PEG-dasatinib conjugates

应完全后减压蒸去溶剂, 残分用柱层析分离, 得 *N*-叔丁氧羰基甘氨酸达沙替尼酯 1.5 g, 收率为 58%。

2.1.2 化合物 4 的制备 将 *N*-叔丁氧羰基缬氨酸达沙替尼酯(化合物 3) 1 g(1.6 mmol), 二氯甲烷 50 mL, 加到反应瓶中, 再加入三氟乙酸 25 mL, 搅拌反应 3 h 后减压蒸去溶剂, 残分中加入二氯甲烷, 减压蒸干, 如此重复 3 次, 得缬氨酸达沙替尼酯三氟乙酸盐 0.9 g, 直接往下反应。

2.1.3 化合物 6 的制备 将单甲氧基 PEG 谷氨酸二肽酸(0.5 g, 0.025 mmol), 缬氨酸达沙替尼酯三氟乙酸盐 140 mg (0.15 mmol), HOBt 3.4 mg (0.025 mmol)和 DMAP 24.4 mg(0.2 mmol) 加到反应瓶中, 用二氯甲烷和 *N,N*-二甲基甲酰胺混合溶剂溶解, 氮气保护下冰浴冷却, 再滴入 DCC 36.1 mg(0.175 mmol) 溶于二氯甲烷的溶液, 滴完后自然升温反应过夜。次日将反应液浓缩, 残分用异丙醇重结晶, 得单甲氧基 PEG 谷氨酸二肽缬氨酸-达沙替尼结合物(JK120303)0.32 g。

2.1.4 化合物 8 的制备 将 PEG 四臂酸(0.5 g, 0.025 mmol), 缬氨酸达沙替尼酯三氟乙酸盐 140 mg(0.15 mmol), HOBt 3.4 mg(0.025 mmol) 和 DMAP 24.4 mg(0.2 mmol) 加到反应瓶中, 用二氯甲烷和 *N,N*-二甲基甲酰胺混合溶剂溶解, 氮气保护下冰浴冷却, 再滴入 DCC 36.1 mg(0.175 mmol) 溶于二氯甲烷的溶液, 滴完后自然升温反应过夜。次日将反应液浓缩, 残分用异丙醇重结晶, 得四臂 PEG 乙酸-达沙替尼结合物(JK120304)0.32 g。

2.2 达沙替尼 PEG 结合物在 K562 人慢性髓系白血病皮下瘤模型中的抗肿瘤作用

K562 细胞系在补充了 10%胎牛血清, *L*-谷氨酰胺(2 mmol·kg⁻¹)的 RPMI-1640 培养基中, 于 37 ℃, 空气中含 5% CO₂ 的条件下体外培养。肿瘤细胞每周常规传代 2 次。收集处于指数生长期的肿瘤细胞, 悬于等体积的 PBS: 基质胶混合物中, 置于冰上, 用于肿瘤接种。

于 NOD/SCID 小鼠右侧背部皮下接种 K562 细胞, 建立人慢性髓系白血病异种移植动物皮下模型。定期观察肿瘤生长情况, 待肿瘤生长至平均 130 mm³ 时根据肿瘤大小和小鼠体质量随机分组并开始给药治疗。实验小鼠分为溶剂对照组、达沙替尼组、受试药物 JK120303(2.5, 5 mg·kg⁻¹) 和 JK120304(2.5, 5 mg·kg⁻¹) 组, 共 6 组, 每组 8 只, 静脉注射给药, 1 周 2 次。

每周测量 2 次小鼠的体质量和肿瘤的大小, 根据 T/C%进行疗效评价。肿瘤大小计算公式: $V=0.5 \times (d_{\text{肿瘤长径}} \times d_{\text{肿瘤短径}}^2)$ 。根据实验组和对照组肿瘤体积大小, 计算相对肿瘤体积(RTV)和治疗组与对照组相对肿瘤体积的百分比值(T/C)。实验结果以平均瘤体积±SE(标准误差)表示, 统计分析时, 相对肿瘤体积数据在统计时方差不齐, 使用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Dunnett T3 多重比较方法对各组间进行相对肿瘤体积显著性差异的比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 化合物结构表征

化合物 3, 白色固体, 熔点: 228~230 ℃; ¹H-NMR(DMSO-d₆, 300 MHz): δ 1.02 (d, 6H, CH₃), 1.21 (s, 9H, CH₃), 2.23(s, 3H, ArCH₃), 2.49(s, 3H, Pyr-CH₃), 2.68 (m, 6H, NCH₂), 3.12(m, 1H, CH), 3.26(m, 4H, CH), 4.28(m, 2H, OCH), 4.52(d, 1H, CH), 6.04(s, 1H, Pyr-H), 7.27(m, 2H, ArH), 7.40(m, 1H, ArH), 8.22(s, 1H, =CHN=), 9.88(s, 1H, NHCO), 11.48(s, 1H, NHCO)。

化合物 6, 白色固体, 熔点: 57~58 ℃; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 0.91(d, 18H, CH₃), 2.23 (s, 9H, ArCH₃), 2.40 (s, 9H, Pyr-CH₃), 3.51(m, ~1800H, OCH₂), 6.04(s, 3H, Pyr-H), 7.27(m, 6H, ArH), 7.40(m, 3H, ArH), 8.22(s, 3H, =CHN=), 9.88(s, 3H, NHCO), 11.47(s, 3H, NHCO); MALDI-TOF MS: M_w 22 466, M_n 22473, Pd=1。

化合物 8, 白色固体, 熔点: 50~51 ℃; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 0.91(d, 24H, CH₃), 2.23 (s, 12H, ArCH₃), 2.40 (s, 12H, Pyr-CH₃), 3.50(m, ~1800H, OCH₂), 6.04(s, 4H, Pyr-H), 7.27(m, 8H, ArH), 7.40(m, 4H, ArH), 7.70(m, 4H, ArH), 8.22(s, 4H, =CHN=), 9.88(s, 1H, NHCO), 11.48(s, 4H, NHCO); MALDI-TOF MS: M_w 22 855, M_n 22 866, Pd=1。

3.2 K562 人慢性髓系白血病皮下瘤模型中的抗肿瘤作用结果

3.2.1 体质量变化 小鼠给予不同剂量药物后的体质量变化曲线见图 3。

实验各组除溶剂对照组到第 14 天因平均肿瘤体积>2 000 mm³ 处死外, 其余各组体质量呈平稳增长趋势, 表明能耐受所给药物的剂量。

3.2.2 肿瘤体积变化 肿瘤体积变化情况见表 1~2。

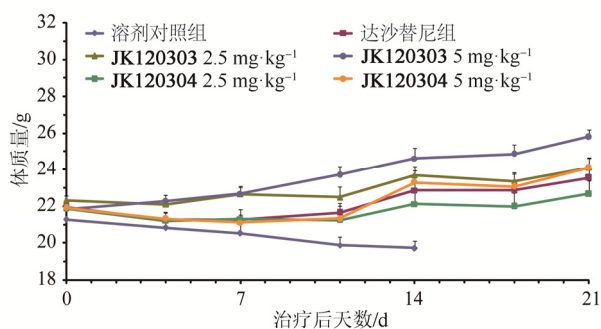


图3 不同剂量药物给药后小鼠体重变化

Fig. 3 The variation of mice weight after different doses of drugs were administered

表1 各治疗组肿瘤体积 T/C%值(与溶剂对照组比较)

Tab. 1 The T/C%(vs that in solvent control group) of tumor volume in each treatment group

实验组	分组后第 14 天		
	肿瘤体积/mm ³	相对肿瘤体积	T/C/%
溶剂对照组	2 447±329	1 819.4±120.2	—
达沙替尼组	311±55	226.9±30.0	12 ¹⁾
JK120303 2.5 mg·kg ⁻¹	76±17	55.5±8.5	3 ¹⁾
JK120303 5 mg·kg ⁻¹	0±0	0.0±0.0	0 ¹⁾
JK120304 2.5 mg·kg ⁻¹	372±80	282.1±46.3	16 ¹⁾
JK120304 5 mg·kg ⁻¹	295±68	215.4±41.1	12 ¹⁾

注: 与溶剂对照组相比, ¹⁾P<0.001。

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.001

表2 各治疗组肿瘤体积 T/C%值(与达沙替尼组比较)

Tab. 2 The T/C%(vs that in dasatinib group) of tumor volume in each treatment group

实验组	分组后第 21 天		
	肿瘤体积/mm ³	相对肿瘤体积	T/C/%
达沙替尼组	391±79	289.1±46.9	—
JK120303 2.5 mg·kg ⁻¹	144±35	103.5±18.9	36 ¹⁾
JK120303 5 mg·kg ⁻¹	0±0	0.0±0.0	0 ¹⁾
JK120304 2.5 mg·kg ⁻¹	462±114	350.3±71.9	121
JK120304 5 mg·kg ⁻¹	161±46	121.5±35.4	42

注: 与达沙替尼组相比, ¹⁾P<0.001。

Note: Compared with dasatinib group, ¹⁾P<0.001

与溶剂对照组相比, 阳性药物达沙替尼(5 mg·kg⁻¹)、结合物 JK120303(2.5, 5 mg·kg⁻¹)和 JK120304(2.5, 5 mg·kg⁻¹)的相对肿瘤增殖率(14 d, T/C%)分别为 12%, 3%, 0, 16%和 12%, 其中 JK120303(5 mg·kg⁻¹)组的所有肿瘤均消失, 提示 K562 人慢性髓系白血病皮下瘤治疗模型成功建立, 而且所有治疗均有显著的抗 K562 肿瘤生长作用(P<0.001)。与达沙替尼(5 mg·kg⁻¹)相比, 更低和相同剂量 JK120303(2.5, 5 mg·kg⁻¹)的抗肿瘤作用更加显著(P 均<0.001), 相对肿瘤增殖率(21 d, T/C%)分别为 36%和 0, 提示其优于达沙替尼; JK120304(2.5, 5 mg·kg⁻¹)与达沙替尼则无显著性

差异。对于结合物 JK120303 和 JK120304, 5 mg·kg⁻¹ 治疗组的肿瘤生长曲线均低于 2.5 mg·kg⁻¹ 治疗组, 提示抗肿瘤作用存在剂量效应关系。

4 讨论

4.1 合成

本实验合成了 2 个 PEG-达沙替尼结合物, 采用小分子原料过量的方法, 使得大分子原料反应完全, 避免产物中残余难以去除的大分子原料; 由于所用的 PEG 衍生物分别为单臂多头 PEG 衍生物和多臂 PEG 衍生物, 它们所带的多个端基成为多个药物连接点, 进而连接多个药物分子, 但由于这些端基很难完全被药物分子取代完全, 因而产物是多种不同取代产物的混合物, 即产物 JK120303 是以三取代产物为主, JK120304 是以四取代产物为主, 它们都含有少量未取代完全的产物, 可以进一步优化反应条件, 使得取代尽可能完全。

4.2 抗肿瘤作用

在 NOD/SCID 小鼠右侧背部皮下接种 K562 细胞, 建立人慢性髓系白血病异种移植动物皮下模型, 除溶剂组小鼠到第 14 天因平均肿瘤体积>2 000 mm³ 处死外, 其余各实验组小鼠体质量呈平稳增长趋势, 2 个 PEG-达沙替尼结合物 JK120303(2.5, 5 mg·kg⁻¹)和 JK120304(2.5, 5 mg·kg⁻¹)对 K562 人慢性髓系白血病皮下瘤模型均有显著抑制肿瘤生长的作用, 结合物 JK120303(2.5, 5 mg·kg⁻¹)的药效优于达沙替尼(5 mg·kg⁻¹), 结合物 JK120304(2.5, 5 mg·kg⁻¹)的药效与达沙替尼(5 mg·kg⁻¹)相当, 说明模型建立成功, PEG-达沙替尼结合物 JK120303 药效优于达沙替尼, 值得进一步研究。

REFERENCES

- [1] ZHONG H, FENG W L. The molecular mechanism of the blast crisis of chronic myelogenous leukemia [J]. Chem Life(生命的化学), 2011, 31(4): 536-539.
- [2] LI L Y, XU Y G. Advance research of BCR-ABL kinase inhibitor [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学杂志), 2016, 33(7): 954-962.
- [3] KEATING G M. Dasatinib: A review in chronic myeloid leukaemia and Ph+ acute lymphoblastic leukaemia [J]. Drugs, 2017, 77(1): 85-96.
- [4] FDA. FDA drug safety communication: Sprycel (dasatinib) and risk of pulmonary arterial hypertension [EB/OL]. (2011-10-11) <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm275155.htm>.
- [5] GEORGE M, CHI C. W, YU S, et al. Pegylation improves the pharmacokinetics and bioavailability of small-molecule drugs hydrolyzable by esterases: A study of phospho-ibuprofen [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 351(1): 61-66.

收稿日期: 2017-03-30

(本文责编: 曹粤锋)