

精胺及其衍生物在制备抗肿瘤药物中的应用

技术领域

本发明涉及干扰 SAICAR 合成酶活性化合物的应用，特别涉及精胺及其衍生物在制备抗肿瘤药物中的应用。

背景技术

癌细胞的一个重要的标志是代谢重编程，包括提高葡萄糖摄取和非氧依赖的乳酸发酵，也常被称为沃伯格效应(Warburg effect) [1, 2]。这种重新编程对于肿瘤的生长和存活是必要，特别是外界低氧等压力条件下。然而，对于肿瘤细胞代谢重整与肿瘤快速增殖、分化、迁移等相关性的重要分子机制以及作用方式仍然不清楚。

丙酮酸激酶同工酶 2 (Pyruvate kinase isoform M2, PKM2) 作为一个代谢过程中重要的酶在快速增殖和多数肿瘤细胞中高表达，且对肿瘤细胞的代谢和生长影响巨大[3, 4]。此外，针对 PKM2 酶活性的各种药理试剂影响细胞生长和增殖[5, 6]，这也提示通过靶向 PKM2 的酶活性为代表，进一步改变肿瘤代谢的方式成为肿瘤治疗的一种新途径[7]。

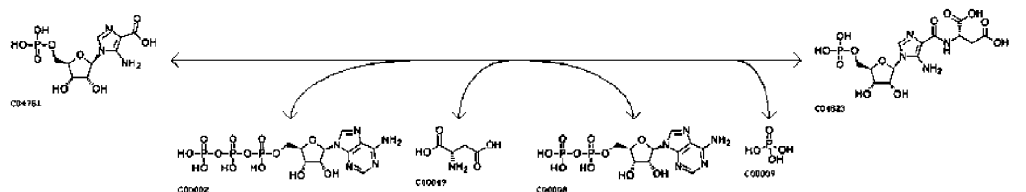
嘌呤合成代谢是生物体普遍存在而又十分重要的生物代谢，其产物 AMP 和 GMP 不仅为生物体内 DNA 和 RNA 的生物合成提供原料，而且也体内许多关键的辅酶(NAD、NADP、FAD 和 CoA)、信号分子(如 cAMP)和重要的能量分子 ATP 提供其合成所必需的嘌呤碱基。可见，嘌呤合成代谢在整个代谢网络中处于核心位置。嘌呤合成包括从头合成(de novo purine synthesis)和补救途径(salvage pathway)两个合成途径。

在腺嘌呤从头合成的代谢途径中，腺苷酸琥珀酸裂解酶（以下简称 ADSL 酶）主要参与将 SAICAR 裂解催化形成 AICAR 以及 S-AMP 生成 AMP 的反应[Spiegel, E.K., Colman, R.F., and Patterson, D. (2006). Adenylosuccinate lyase deficiency. Mol Genet Metab 89, 19-31. Clamadieu, C., Cottin, X., Rousselle, C., and Claris, O. (2008). Adenylosuccinate lyase deficiency: an unusual cause of neonatal seizure. Arch Pediatr 15, 135-138. Castro, M., Perez-Cerda, C., Merinero, B., Garcia, M.J., Bernar, J., Gil Nagel, A., Torres, J., Bermudez, M., Garavito, P., Marie, S., et al. (2002). Screening for adenylosuccinate lyase deficiency: clinical, biochemical and molecular findings in four patients. Neuropediatrics 33, 186-189.]。

在人体中腺嘌呤从头合成代谢途径中代谢酶的异常，往往导致中间有害的代谢产物 5-氨基-4-琥珀酸甲酰胺咪唑核糖核苷酸

(succinyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-ribose-50-phosphate, SAICAR)的累积, 在临床上表现为自闭、癫痫、张力减退、发育不良等症状[8-10]。SAICAR 合成酶由基因 *PAICS* (*phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase*) 编码, 在体内负责 SAICAR 的合成。相关的研究报道, *PAICS* 高表达于急性淋巴细胞性白血病, 肺癌, 神经胶质瘤、前列腺癌以及结直肠癌中, 并可以作为III期结直肠癌的一个预后标记[11-13]。近期研究发现, 在葡萄糖受限的条件下高度积累 SAICAR, 从而改变了肿瘤细胞中能量水平、糖摄取和乳酸的产生, 而这些现象并未发生在成人表皮细胞以及肺成纤维细胞中[14, 15]。SAICAR 能够诱导 PKM2 的酶活性, 促进肿瘤细胞的存活[14], 而且 SAICAR-PKM2 的结合能够诱导 Erk1/2 的磷酸化, 高浓度的 SAICAR 也可诱导癌基因 *myc* 的上调表达[15], 这些由于腺嘌呤从头合成代谢途径中异常积累的 SAICAR 促进肿瘤细胞的增殖和存活。

氨基咪唑琥珀基氨甲酰核苷酸合成酶/氨基咪唑核苷酸羧化酶, 即 *PAICS* (*phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamidesynthetase /phosphoribosylaminoimidazolecarboxylase*)是一种嘌呤从头合成途径中重要的双功能酶, 它具有 SAICAR 合成酶(4-(N-succinylcarboxamide)-5-aminoimidazole ribonucleotidesynthetase, SAICARs)和 AIR 羧化酶(5-aminoimidazole ribonucleotidecarboxylase, AIRc)的功能, 催化嘌呤从头合成代谢第六步、第七步反应, 其中的一个关键反应过程如下所示



所以, 对于异常高表达 *PAICS* 的肿瘤常常会伴随着有害代谢产物 SAICAR 的积累, 而针对抑制 *PAICS* 的表达或其酶活性的研究将成为肿瘤治疗的新手段。开发或筛选出可以有效抑制 *PAICS* 活性的化合物, 具有非常重要的意义。

精胺 (DrugBank ID 为 DB00127, Spermine) 是含有两个氨基和两个亚氨基的多胺类物质, 在生物体内由腐胺 (丁二胺) 和 S-腺苷蛋氨酸经多种酶催化后生成。它与亚精胺都存在于细菌和大多数动物细胞中, 是促进细胞增殖的重要物质。在酸性条件下, 它呈现出多阳离子多胺类特性, 并能与病毒与细菌中 DNA 结合。使 DNA 分子具有更大的稳定性与柔韧性, 也是细胞培养液中必要组分之一。精胺在肿瘤组织常过表达, 如 Criss W E. A Review of Polyamines and Cancer[J]. Turkish Journal of Medical Sciences, 2003, 33(4):195-205.、Gerner EW, Meyskens FL Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding.[J]. Nat Rev Cancer.

2004, 4(10):781-792.、Rial NS, Meyskens FL, Gerner EW. Polyamines as mediators of APC-dependent intestinal carcinogenesis and cancer chemoprevention.[J]. Essays in biochemistry, 2009, 46(Suppl. 1):111.、Amendola R, Cervelli M, Fratini E, et al. Spermine metabolism and anticancer therapy[J]. Current cancer drug targets, 2009, 9(2): 118-130.、Mandal S, Mandal A, Johansson H E, et al. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(6):2169-74.等权威论文所公开的, 长期以来, 人们普遍认为精胺可以促进肿瘤细胞的发展, 是一种肿瘤促进因子。通过减少精胺的供给, 有助于抗癌。

参见文献:

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. Hsu, P.P. and D.M. Sabatini, *Cancer cell metabolism: Warburg and beyond*. Cell, 2008. **134**(5): p. 703-7.
3. Christofk, H.R., et al., *The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth*. Nature, 2008. **452**(7184): p. 230-3.
4. Wolf, A., et al., *Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme*. J Exp Med, 2011. **208**(2): p. 313-26.
5. Chen, J., et al., *Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2*. Oncogene, 2011. **30**(42): p. 4297-306.
6. Anastasiou, D., et al., *Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis*. Nat Chem Biol, 2012. **8**(10): p. 839-47.
7. Vander Heiden, M.G., *Exploiting tumor metabolism: challenges for clinical translation*. J Clin Invest, 2013. **123**(9): p. 3648-51.
8. Ciardo, F., C. Salerno, and P. Curatolo, *Neurologic aspects of adenylosuccinate lyase deficiency*. J Child Neurol, 2001. **16**(5): p. 301-8.
9. Gitiaux, C., et al., *Misleading behavioural phenotype with adenylosuccinate lyase deficiency*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(1): p. 133-6.
10. Mierzevska, H., et al., *Severe encephalopathy with brain atrophy and hypomyelination due to adenylosuccinate lyase deficiency--MRI, clinical, biochemical and neuropathological findings of*

Polish patients. *Folia Neuropathol*, 2009. **47**(4): p. 314-20.

11. Eissmann, M., et al., *A functional yeast survival screen of tumor-derived cDNA libraries designed to identify anti-apoptotic mammalian oncogenes*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e64873.

12. Goswami, M.T., et al., *Role and regulation of coordinately expressed de novo purine biosynthetic enzymes PPAT and PAICS in lung cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(27): p. 23445-61.

13. Chakravarthi, B.V., et al., *Expression and Role of PAICS, a De Novo Purine Biosynthetic Gene in Prostate Cancer*. *Prostate*, 2017. **77**(1): p. 10-21.

14. Keller, K.E., I.S. Tan, and Y.S. Lee, *SAICAR stimulates pyruvate kinase isoform M2 and promotes cancer cell survival in glucose-limited conditions*. *Science*, 2012. **338**(6110): p. 1069-72.

15. Keller, K.E., et al., *SAICAR induces protein kinase activity of PKM2 that is necessary for sustained proliferative signaling of cancer cells*. *Mol Cell*, 2014. **53**(5): p. 700-9.

发明内容

本发明的目的在于提供精胺及其衍生物在制备抗肿瘤药物中的应用。

发明人基于现有的蛋白结构数据、小分子结构数据，使用软件计算分析，发现 DrugBank ID 为 DB00127（通用名：Spermine，精胺）的化合物，可以有效干扰 PAICS 的活性，进而减少 SAICAR 的合成，达到治疗或改善肿瘤的目的。

肿瘤为具有沃伯格效应、癌基因 myc 高表达、PAICS 高表达、与 Erk1/2 相关和 PKM2 基因高表达中任一种特性的肿瘤。特别的，肿瘤选自急性淋巴细胞性白血病、肺癌、神经胶质瘤、前列腺癌、结直肠癌、胃癌、肝癌、食管癌、大肠癌、恶性淋巴瘤、子宫颈癌、鼻咽癌、乳腺癌、皮肤癌、膀胱癌，特别是 PAICS 高表达的急性淋巴细胞性白血病、肺癌、神经胶质瘤、前列腺癌、结直肠癌。

高表达的含义为本领域公认的，即与正常组织相比，其含量相对显著提高。

上述化合物药学上可接受的衍生物，具有与化合物本身相同的母核结构，在体内经过水解等作用，可以生成与原化合物具有相同或相近活性的分子，达到相同或相近的治疗效果。

化合物药学上可接受的衍生物，尤其指其简单衍生物，特别是其低级酯、低级醚、低级烷基取代物、药用盐、低级酰胺中的一种，即碳原子数在 1~6，优选为 2~6，2~4 的羧酸、醇、胺与母化合物缩合得到的衍生物。

化合物药学上可接受的药用盐可以通过常规的化学方法从母体化合物合成，如在 *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN:3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002 中描述的方法。一般

来说,这些盐可以由化合物的游离碱和酸在水或有机溶剂或二者的混合液中反应制得;通常,使用非水介质如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。

酸加成盐可以通过各种酸(无机酸和有机酸)制得。酸加成盐的实例包括由酸制成的盐,所述酸选自乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、藻酸、抗坏血酸(如L-抗坏血酸)、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、丁酸、(+)-樟脑酸、樟脑-磺酸、(+)-(1S)-樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、2-羟乙基磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖酸、龙胆酸、葡庚糖酸、D-葡萄糖酸、葡萄糖醛酸(如D-葡萄糖醛酸)、谷氨酸(如L-谷氨酸)、 α -酮戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、氢碘酸、羟乙磺酸、(+)-L-乳酸、($\pm$)-DL-乳酸、乳糖酸、马来酸、苹果酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、($\pm$)-DL-扁桃酸、甲基磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘酸、烟酸、硝酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、帕莫酸、磷酸、丙酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基-水杨酸、癸二酸、硬脂酸、丁二酸、硫酸、单宁酸、(+)-L-酒石酸、硫氰酸、*p*-甲苯磺酸、十一碳烯酸和戊酸,以及酰化氨基酸组成的组。

通过联合使用上述化合物中的至少两种,有望获得更佳的治疗或改善肿瘤的效果。

附图说明

图1是PAICS的三维彩带(solid ribbon)结构图;

图2是CAIR和SAICAR合成酶在晶体结构中的相互作用图,图中A: PDB access ID 2GQS; B: PDB access ID 2CNQ; C: PDB access ID 4FE2;

图3是不同种SAICAR合成酶蛋白序列对齐结果;

图4是精胺对癌基因MYC的抑制实验结果。

具体实施方式

人PAICS蛋白质序列全长425个氨基酸残基,其中2~260AA为SAICAR synthetase结构域,267-425为AIR carboxylase结构域,两结构域由6肽(KSESQC)连接。此外,SAICAR Synthetase结构域的GLN159~GLN183 α 螺旋和AIR carboxylase结构域的ASN395~ASN424 α 螺旋相互作用,紧密结合这一起,如图1所示。

在蛋白质结构数据库中(RCSB),收录了不同来源的SAICAR synthetase晶体结构数据,其中包括*Saccharomyces cerevisiae*(1A48, 2CNQ, 2CNV, 2CNU, 1OBD, 1OBG)、*Pyrococcus horikoshii* OT3(3U54, 3U55)、*Escherichia coli*(2GQR, 2GQS)、*Methanocaldococcus jannaschii*(2YZL, 2Z02)、*Streptococcus pneumoniae*(4FGR, 4FE2)、*Mycobacterium abscessus* ATCC 19977 / DSM 44196 (3R9R)、*Thermotoga maritima* (1KUT)、*Clostridium perfringens* (3NUA)、

Ehrlichia chaffeensis (3KRE)、*Geobacillus kaustophilus* (2YWV)。以及 PAICS 晶体结构数据 *Homo sapiens* (2H31)和 *Bombyx mori* (4JA0)。其中复合物中含有 CAIR 的结构有 2GQS、2CNQ 和 4FE2, 含有 ASP 的结构有 2CNV、2CNU 和 4FE2。

如图 2, 在 2CNQ 中 CAIR 3Å 以内的残基 Arg122、Ser128、ASP215、Arg242 和 Arg264; 2GQS 中 CAIR 3Å 以内的残基 Arg94、Ser100、ASP129、ASP175、Arg199 和 Arg215; 4FE2 中 CAIR 3 埃以内的残基 Arg93、Ser99、ASP174、Arg199、Arg214。对照不同物种来源的 SAICAR 蛋白序列对齐结果(图 3), 可以看出不同物种 SAICAR synthetase 与 CAIR 的结合呈现高度保守性, 主要以氢键作用固定 CAIR。

基于以上结果, 同时考虑到人的 PAICS 晶体结构中没有结合 CAIR 的构象, 催化区域没有形成催化构象。进行计算筛选得到的结果不可靠。因此采用 *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 2CNQ) 和 *Escherichia coli* (PDB: 2GQS) SAICAR 合成酶晶体结构中的构象作为计算筛选的受体结构。采用 Discovery studio 的 ligand fit 模块, 对 DrugBank (<http://www.drugbank.ca/downloads#structures>) 中的 4661 种小分子药物进行计算筛选。

计算结果表明 DB00127 (通用名: Spermine, 精胺) 的 Dock Score 为 316.723, 表明化合物精胺可以有效地与 PAICS 作用, 影响 SAICAR 的合成。

精胺对 PAICS 活性抑制实验结果数据

经过进一步的生化酶活实验、细胞生物学实验确证, 化合物精胺对 SAICAR 的蓄积抑制率可以达到 71.1%, 通过对 PAICS 活性的抑制, 导致有毒化合物 SAICAR 的蓄积下降。

精胺对癌基因 MYC 的抑制实验结果数据

经过进一步的细胞生物学实验、Western Blot 实验确证, 化合物精胺对癌基因 myc 可以产生显著的表达抑制作用, 使得癌基因 myc 的表达量显著下调 (Western Blot 实验结果如图 4 所示)。

精胺对癌细胞的抑制实验结果数据

经过进一步的细胞生物学实验确证, 化合物精胺对肺癌细胞株 A549、肺癌细胞株 H1299、乳腺癌细胞株 MD468、乳腺癌细胞株 MD231 均可以产生有效的抑制作用 (用药 48 小时 IC50 值如下表所示), 抗癌效果十分显著。

癌细胞	IC50 (μM)
A549	117.317
H1299	25.157
MD468	38.027
MD231	3.552

上述计算数据和实验数据充分表明精胺及其药学上可接受的衍生物有望开发为肿瘤，特别是具有沃伯格效应、癌基因 myc 高表达、PAICS 高表达、与 Erk1/2 相关和 PKM2 基因高表达中任一种特性的肿瘤治疗药物或保健品。特别的，肿瘤选自急性淋巴细胞性白血病、肺癌、神经胶质瘤、前列腺癌、结直肠癌、胃癌、肝癌、食管癌、大肠癌、恶性淋巴瘤、子宫颈癌、鼻咽癌、乳腺癌、皮肤癌、膀胱癌，特别是 PAICS 高表达的急性淋巴细胞性白血病、肺癌、神经胶质瘤、前列腺癌、结直肠癌。

上述化合物药学上可接受的衍生物，具有与化合物本身相同的母核结构，在体内经过水解等作用，可以生成与原化合物具有相同或相近活性的分子，达到相同或相近的治疗效果。

化合物药学上可接受的衍生物，尤其指其简单衍生物，特别是其低级酯、低级醚、低级烷基取代物、药用盐、低级酰胺中的一种，即碳原子数在 1~6，优选为 2~6，2~4 的羧酸、醇、胺与母化合物缩合得到的衍生物。

化合物药学上可接受的药用盐可以通过常规的化学方法从母体化合物合成，如在 *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN:3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002 中描述的方法。一般来说，这些盐可以由化合物的游离碱和酸在水或有机溶剂或二者的混合液中反应制得；通常，使用非水介质如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。

酸加成盐可以通过各种酸（无机酸和有机酸）制得。酸加成盐的实例包括由酸制成的盐，所述酸选自乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、藻酸、抗坏血酸（如 L-抗坏血酸）、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、丁酸、(+) 樟脑酸、樟脑-磺酸、(+) -(1S)-樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、2-羟乙基磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖酸、龙胆酸、葡庚糖酸、D-葡萄糖酸、葡萄糖醛酸（如 D-葡萄糖醛酸）、谷氨酸（如 L-谷氨酸）、 α -酮戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、氢碘酸、羟乙磺酸、(+) -L-乳酸、(±) -DL-乳酸、乳糖酸、马来酸、苹果酸、(-) -L-苹果酸、丙二酸、(±) -DL-扁桃酸、甲基磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘酸、烟酸、硝酸、油酸、乳酸、草酸、棕榈酸、帕莫酸、磷酸、丙酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基-水杨酸、癸二酸、硬脂酸、丁二酸、硫酸、单宁酸、(+) -L-酒石酸、硫氰酸、*p*-甲苯磺酸、十一碳烯酸和戊酸，以及酰化氨基酸组成的组。

组合用药在一定程度上可以提高疗效，减少毒副作用。优选的，可以同时使用 2 种、3 种、4 种、5 种或更多种化合物或其衍生物作为治疗肿瘤的活性成分。