

新型 SHP2 衍生物 NC-55-122 在大鼠体内的药动学研究 及其体内代谢产物分析

张莹^{1,2}, 崔杏², 汤磊², 廖伟科^{1,2*}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心,
贵州 贵阳 550004)

摘要: 考察新型含 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 (SHP2) 蛋白抑制剂三唑并喹啉酮衍生物 NC-55-122 在大鼠体内的药代动力学特征, 并在此基础上对化合物 NC-55-122 在大鼠体内的代谢产物进行分析。首先将大鼠随机分组, 分别灌胃和静脉给予化合物 NC-55-122, 采集不同时间点的血样, 以卡马西平为内标, 采用超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 测定大鼠体内 NC-55-122 的浓度, 并进行方法学的验证, 用 DAS 2.0 软件计算主要的药代动力学参数, 采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件绘制血药浓度-时间曲线; 并同时建立超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法 (UPLC-Q-TOF/MS) 对血浆样品进行分析, 并运用 UNIFI 代谢产物预测软件分析经大鼠灌胃和静脉给药后的代谢产物。结果表明, 化合物 NC-55-122 检测质量浓度的线性范围为 $1 \sim 1600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线性关系良好, 在此线性范围内进行基质效应和提取回收率、精密度和准确度以及稳定性的考察, 均符合生物分析要求; 其次, 药动学参数分析表明该化合物的口服生物利用度相对较低, 仅为 3.09%, 但该化合物在体内吸收的速度较慢; 最后通过分析离子流图以及结合 UNIFI 软件共推测出 5 个可能的代谢产物。本实验建立的检测方法灵敏度高, 专属性强、快速、高效, 适用于化合物 NC-55-122 在大鼠体内血药浓度的测定以及代谢产物的分析, 为后期抗肿瘤药物 NC-55-122 的结构修饰以及成药性评价奠定基础。所有动物实验均经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: 2200823)。

关键词: 抗肿瘤; 含 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶; 药代动力学; 代谢产物分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1422-08

Pharmacokinetic study of a novel SHP2 derivative NC-55-122 in rats and its metabolites *in vivo*

ZHANG Ying^{1,2}, CUI Xing², TANG Lei², LIAO Wei-ke^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Guizhou Provincial Engineering
Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guiyang 550004, China)

Abstract: To investigate the pharmacokinetic characteristics and metabolites of Src homology 2 region-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2) protein inhibitor in SD rats, a triazole quinolinone based derivative NC-55-122 was utilized. Firstly, rats were randomly divided into groups and given compound NC-55-122 intragastric and intravenous administration, respectively. Blood samples were collected at different time points. Taking carbamazepine as the internal standard, ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to determine the concentration of NC-55-122 in rats, and the methodology was verified. DAS 2.0 software was used to calculate the main pharmacokinetic parameters, and GraphPad Prism

收稿日期: 2023-11-17; 修回日期: 2024-03-11.

基金项目: 贵州省科技计划项目中央引导地方科技发展资金 (黔科中引地[2022]4017).

*通讯作者 E-mail: 641212891@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1298

8.0.1 software was used to plot the blood concentration-time curve. At the same time, UPLC-Q-TOF/MS was established to analyze plasma samples, and UNIFI metabolite prediction software was used to analyze metabolites after oral gavage and intravenous injection. The linear range of the mass concentration of compound NC-55-122 was from $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $1\ 600 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the linear relationship was good. The matrix effect, extraction recovery, precision, accuracy and stability were investigated in this linear range, which met the requirements of biological analysis. Secondly, the analysis of pharmacokinetic parameters showed that the oral bioavailability of the compound was low, with $F\% = 3.09\%$, indicating that the compound was absorbed slowly *in vivo*. Finally, five possible metabolites were deduced by analyzing the ion flow diagram and combining UNIFI software. The detection method established in this experiment is highly sensitive, specific, rapid and efficient, which is suitable for the determination of the blood concentration of compound NC-55-122 in rats and the analysis of metabolites, and lays a foundation for the structural modification and druggability evaluation of the later anti-tumor drug NC-55-122. All animal experiments were approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Guizhou Medical University (approval number: 2200823).

Key words: anti-tumor; Src homology 2 region-containing protein tyrosine phosphatase 2; pharmacokinetics; metabolite analysis

随着发病率及死亡率的逐年增加,恶性肿瘤已经成为威胁人类健康重大疾病之一。人们一直在探索治疗肿瘤的方法,传统的化疗、放疗和手术这三大治疗方法对延长患者的生存期已起到极其重要的作用。然而传统放化疗药物缺乏选择性,在杀灭肿瘤细胞的同时对正常细胞也产生了严重的损伤。因此,如何实现开发出更加高效低毒的靶向药物以实现精准治疗已成为目前抗肿瘤药物研发中的重要方向^[1-3]。

肿瘤的发生是一个多因素的过程,其中本质的因素是细胞信号转导通路失调导致的细胞无限增殖。蛋白质可逆磷酸化的调节是细胞信号转导过程中最广泛和普遍的调节过程,由蛋白激酶和磷酸酶调节^[4]。其中,蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 和蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTPs) 参与酪氨酸磷酸化和去磷酸化的调节^[5],含 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 (SHP2) 是目前 PTP 家族中唯一被证实的原癌蛋白^[6],由蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 11 型 (PTPN11) 基因编码^[7],参与并激活 RAS-ERK、JAK-STAT、PI3K-AKT 等多条信号通路来控制肿瘤细胞的生长、增殖和凋亡。X 射线晶体学研究表明,SH2 蛋白在非活性状态下被 PTP 结构域和 N-SH2 结构域催化表面的残基自动抑制^[8]。SHP2 的异常与肿瘤之间的密切关系使得 SHP2 已成为一个极具吸引力的靶点,控制 SHP2 的活性能够对肿瘤的治疗产生重要意义^[9]。

根据不同的作用位点,SH2 小分子抑制剂可分为两类:催化位点抑制剂和变构位点抑制剂^[10],变构位点抑制剂因其优异的选择性已引起广泛关注^[11]。变构位点 B 是 SHP2 最新的变构位点,国内外对该位点的变构抑制剂研究较少且化合物均处于临床前研究中^[12]。SHP244 由诺华公司于 2018 年开发^[13],但其对 SHP2 仅展现出较弱的抑制活性。鉴于化合物 SHP244 结构的

可修饰性^[14],贵州大学周志旭课题组以开发新型强效的 SHP2 抑制剂为目的,以 SHP244 为先导化合物,采用基于结构的药物设计方法^[15],在苯环中引入含有杂原子的极性官能团,以增强目标化合物与氨基酸残基 LYS266 之间的氢键作用并进一步改善化合物的水溶性^[16],同时调整酚羟基的位置,将各种取代基引入末端苯环^[17],合成一系列化合物,通过考察该系列化合物对 SHP2 蛋白激酶的抑制活性,该课题组获得了活性更好的化合物 NC-55-122 即 12I (图 1),体外大鼠肝微粒体稳定性研究实验表明,其半衰期 $t_{1/2} > 145 \text{ min}$,固有清除率 $< 9.6 \text{ mL}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ ^[18],根据前期的药学研究报告,显示出一定的开发前景。因此,本实验通过研究三唑并喹啉酮衍生物 NC-55-122 在大鼠体内的药物动力学性质,推测出其在动物体内可能的代谢产物,为该化合物的成药性评价及后期该类结构的衍生物设计奠定基础。

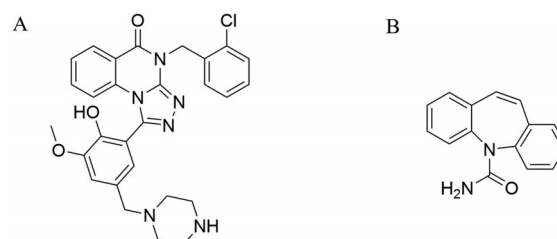


Figure 1 Chemical structures of NC-55-122 (A) and carbamazepine (B)

材料与方法

仪器 研究所用主要仪器 Agilent 1290 LC/TQ 型超高效液相色谱仪、TSQ 6470 型三重四级杆串联质谱仪 (美国 Agilent 公司); XevoG2-XS 型超高效液相-四级杆串联飞行时间质谱仪配有 UNIFI 7.0 数据库 (美国

Waters公司); 冷冻高速离心机 (Gene Company Limited, GENESPEED 型号 1730R); 氮气吹扫仪 (型号 JN300-2 型, 苏州吉米诺仪器有限公司); 十万分之一电子天平 (型号 FA805N, 上海菁海仪器有限公司) 等。

试剂与药品 NC-55-122 (贵州大学药物化学重点实验室制备, 经核磁共振验证结构, HPLC 测定纯度 $\geq 99.0\%$); 卡马西平 (上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号: C12084374, 纯度 $\geq 99.0\%$); 肝素钠 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 325 D025); 甲醇 (德国 Merck 公司, 色谱纯); 甲酸 (美国 Thermo Fisher Scientific, 色谱纯); 蒸馏水 [屈臣氏水, 屈臣氏集团 (香港) 有限公司]; 乙酸乙酯为色谱纯; 生理盐水; PEG-400; 二甲基亚砜 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 401Q037)。

实验动物 SD 大鼠 (SPF 级, 购自长沙天勤生物科技有限公司), 许可证号: SCXK (湘) 2019-0014, 在标准条件下饲养体重 220~240 g, 大鼠适应性饲养 1 周后开始实验, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。待实验结束, 遵循医药科委员会动物实验职业道德的规定执行。所有动物实验均经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: 2200823)。

NC-55-122 含量测定的检测条件

色谱条件 采用 Agilent XBridge Aq C₁₈ 色谱柱 (50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m) 进行梯度洗脱。流动相为 0.1% 甲酸溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈溶液 (B); 梯度洗脱条件如下: 0~1 min, 5% B; 1~2.5 min, 60% B; 2.5~3.5 min, 80% B; 3.5~4.5 min, 5% B; 4.5~5.0 min, 5% B。流速: 0.4 mL \cdot min⁻¹; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 2 μ L。

质谱条件 采用电喷雾电离, 正离子 (ESI+) 扫描模式, 扫描方式为选择反应监测 (MRM)。离子源条件: 温度为 300 $^{\circ}$ C; 离子化电压为 3 500 V; 气帘气压 35 psi (1 psi \approx 6.9 kPa); 雾化电压 55 psi; 辅助气压 50 psi; 用于定量分析的离子对: NC-55-122, m/z 531.19 \rightarrow 445.0; 卡马西平, m/z 237.1 \rightarrow 194.0。

代谢产物定性分析的检测条件

色谱条件 以 Waters BEH C₁₈ (50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m) 为色谱柱进行梯度洗脱, 流动相为 0.1% 甲酸溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B); 梯度洗脱条件如下: 0~1 min, 5% B; 1~5 min, 5% B; 5~10 min, 40% B; 10~17 min, 98% B; 17~19 min, 98% B; 19~20 min, 5% B; 流速: 0.3 mL \cdot min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 5 μ L。

质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式采集 (positive mode) 和负离子模式采集 (negative mode); 毛细管电压 1 kV, 离子源 120 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气流量 800 L \cdot h⁻¹, 脱溶剂其温度 400 $^{\circ}$ C, 锥孔气流量 50 L \cdot h⁻¹, 质谱数据采集及数据处理软件 MassLynx V 4.1 色谱工

作站; 扫描方式为 Mse 模式。

NC-55-122 储备液以及 1% 肝素钠的配制 精密称取 NC-55-122 原料药 1.00 mg, 加入 1 mL 甲醇溶解并稀释至刻度, 涡旋 5 min, 超声 3 min, 即得质量浓度为 1 mg \cdot mL⁻¹ 的 NC-55-122 的储备液, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。同法配置质量浓度 100 ng \cdot mL⁻¹ 的卡马西平内标溶液。称取肝素钠 0.40 g, 加入 40 mL 0.9% 氯化钠溶液至刻度并涡旋 5 min, 超声 3 min 后得到澄清的肝素钠溶液。

药动学方案 取 SD 大鼠 6 只, 雌雄各半, 体质量 200~230 g, 实验动物接收后进行一周的适应性饲养, 实验前禁食 12 h, 正常饮水。随机分配灌胃组 3 只, 静脉组 3 只。大鼠称量后按常用剂量换算给予灌胃溶液, 剂量为 25 mg \cdot kg⁻¹, 尾静脉注射剂量 5 mg \cdot kg⁻¹。

静脉注射给药方案 精密称取 NC-55-122 12.5 mg, 加入 10 mL 0.9% 氯化钠溶液, 配制成 1.25 mg \cdot mL⁻¹ NC-55-12 注射溶液, 待用。大鼠禁食 12 h (期间饮水自由), 按 5 mg \cdot kg⁻¹ 尾静脉注射 NC-55-12 注射溶液, 分别在给药 0.03、0.15、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12、16、20、24 h 后断尾取血约 0.25 mL, 置血样于提前预冷的肝素钠离心管中, 以 4 $^{\circ}$ C 环境中 3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 取上层血浆, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中, 待测。

灌胃给药方案 精密称取 NC-55-122 41.5 mg, 加入 5 mL 0.9% 氯化钠溶液, 配成 8.3 mg \cdot mL⁻¹ 的 NC-55-12 灌胃溶液, 待用。大鼠禁食 12 h (可自由饮水) 后按 25 mg \cdot mL⁻¹ 灌胃给予 NC-55-122 灌胃溶液。分别在给药 0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、24 h 后断尾取血 0.5 mL, 置血样于预冷后的肝素化离心管中, 以 4 $^{\circ}$ C 环境中 3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 取上层血浆, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中, 待测。

血浆样品的处理 精密取 100 μ L 血浆样品, 加入内标 20 μ L (卡马西平 100 ng \cdot mL⁻¹) 再加入 800 μ L 乙酸乙酯, 涡旋混合 10 min, 超声 3 min, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 13 000 r \cdot min⁻¹ 下离心 10 min。将上层乙酸乙酯层转移至新的离心管中, 剩余下层的沉淀物再加入 500 μ L 乙酸乙酯, 涡旋混合 10 min, 超声 1 min, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 13 000 r \cdot min⁻¹ 下离心 10 min, 将两次萃取的上层乙酸乙酯层转移至 2.0 mL 的 EP 管中, 用氮吹仪吹干, 残渣加入 120 μ L 甲醇溶解, 4 $^{\circ}$ C 条件下 13 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取上层清液进行检测分析。

结果

1 方法学考察

1.1 标准曲线的制备 结果表明, 以化合物 NC-55-122 峰面积与内标峰面积的比值对质量浓度进行线性回归, 得血浆样品标准曲线方程为 $y = 78.151x - 178.16$

($r^2 = 0.9996$), NC-55-122 检测质量浓度的线性范围为 $1 \sim 1\,600 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2 专属性考察 在上述 NC-55-122 含量测定的检测条件下, 按照血浆样品的处理方法下操作, 将空白血浆样品 (用不含内标的甲醇溶解), 空白血浆加 NC-55-122 对照品溶液加内标、大鼠静脉注射后的血浆样品加内标分别进样分析, 记录色谱图。色谱图见图 2, 在该检测条件下, NC-55-122 和卡马西平能同时被检测到, NC-55-122 的保留时间为 1.652 min , 内标物 (卡马西平) 保留时间为 1.916 min , NC-55-122 和卡马西平的色谱峰分离良好, 互不干扰, 且与 SD 大鼠血浆中的内源性物质达到分离, 证明该方法具有较好的专属性, 适用于受试化合物 NC-55-122 的测定。

1.3 基质效应与提取回收率考察 取空白血浆 $100 \mu\text{L}$, 置 1.5 mL EP 管内, 按血浆样品的方法处理, 氮气吹干后, 分别用质量浓度为低 ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中 ($600 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高 ($1\,200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 NC-55-122 系列溶液 $100 \mu\text{L}$ 复溶, 每个浓度平行 6 份, 计算 NC-55-122 与内标卡马西平峰面积比值 (I) 与同样浓度的 NC-55-122 溶液直接进样获得的峰面积 (II) 的比值, 考察基质效应。在 $100 \mu\text{L}$ 空白血浆中加入低、中、高浓度的 NC-55-122 系列标准液 $100 \mu\text{L}$ 在 NC-55-122 含量测定的检测条件下检测, 计算血浆样品中 NC-55-122 与内标峰面积比值 (III), 以 $III/I \times 100\%$ 计算提取回收率。血浆样品中 NC-55-122 的提取回收率 $94.30\% \sim 96.18\%$ 之间, 关于基质效应, 各个比例均在 $89.125\% \sim 96.59\%$ 内。结果表明 NC-55-122 的血浆样品的处理方法稳定可靠, 血浆基质影响可忽略不计。

1.4 准确度、精密度的考察 精密量取 NC-55-122 储备液, 用不同体积的甲醇将其稀释成质量浓度为低 ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中 ($600 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高 ($1\,200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的系列溶液。取大鼠的空白血浆 $100 \mu\text{L}$, 置于 2 mL EP 管中, 分别加入质量浓度为低 ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中 ($600 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高 ($1\,200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 NC-55-122 系列溶液 $100 \mu\text{L}$, 每个浓度平行 6 份, 各浓度分别连续进样 6 份, 测定日内精密度, 重复操作, 连续测定三天, 将测得的峰面积带入到标准曲线的线性方程中计算日间精密度。准确度是通过样品的测定浓度与理论浓度的符合程度来评价, 用相对回收率和相对误差来表示。NC-55-122 日内和日间精密度被测得在 $0.63\% \sim 4.72\%$ 之间, 相对回收率在 $93.01\% \sim 97.64\%$ 内, 表明该方法测得的 NC-55-122 的准确度和精密度均符合测定要求。

1.5 稀释可靠性考察 按照配制 NC-55-122 储备液的方法下配制质量浓度相当于 NC-55-122 的储备液的 5、25、50 倍浓度的样品, 再加入空白血浆分别稀释其

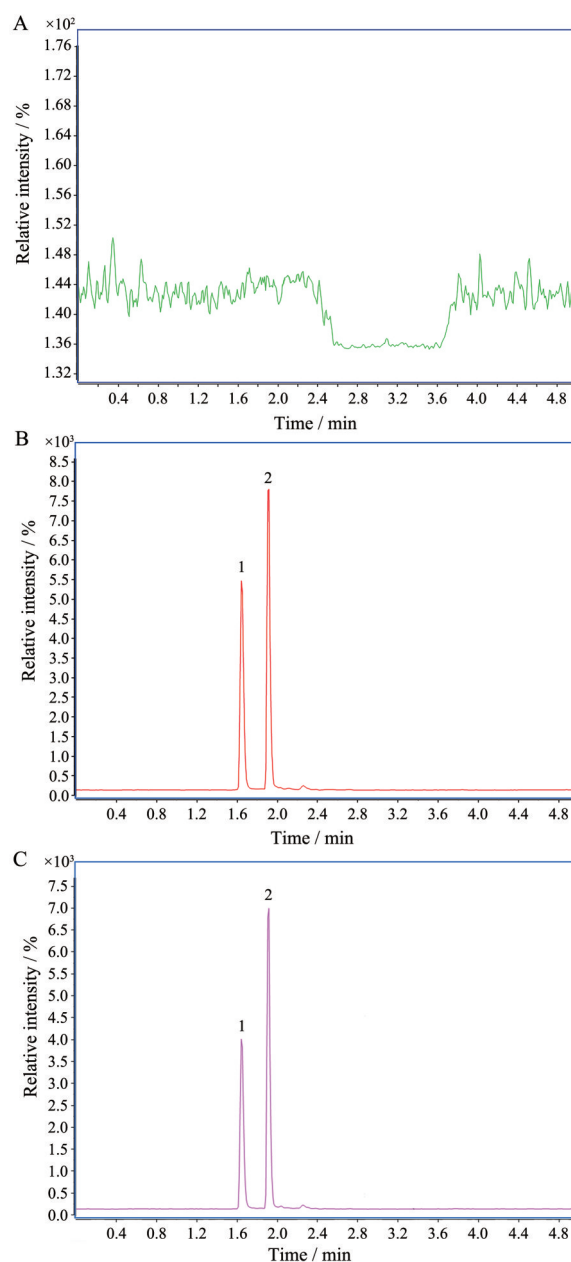


Figure 2 NC-55-122 representative chromatogram. A: Blank plasma; B: Blank plasma + NC-55-122 + internal standard; C: Plasma sample + internal standard. 1: NC-55-122; 2: Internal standard peak

相当于 NC-55-122 储备液 5、25、50 倍浓度的样品, 最终将这三种血浆样品分别稀释为低 ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中 ($600 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高 ($1\,200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的系列溶液, 按照 NC-55-122 含量测定的色谱条件下, 各浓度分别连续进样 3 份, 将测得的峰面积带入到同一批随行的回归线性方程中计算不同稀释倍数下的质量浓度。经过不同的稀释倍数下, 所有的质量浓度的血浆样品的 RSD 均不高于 10% ($n = 3$), 表明将血浆样品在 5~50 倍内稀释后进行测定, 稀释可靠性良好, 不会影响血浆样品

的定量准确度和精密性,是接受其使用的。

1.6 稳定性考察 取大鼠的空白血浆 100 μL , 置于 2 mL EP 管中, 分别加入质量浓度为低 ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中 ($600 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高 ($1\ 200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 NC-55-122 系列溶液 100 μL , 每个浓度平行制备 6 份。按照血浆样品处理方法下进行处理, 分别考察在 -80 、 -20 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 下存放 48 h, 反复 3 次冻融循环后 NC-55-122 的稳定性, 所有样品结果按照标准曲线的线性方程进行计算, 在经过 3 次反复冻融循环后, 均保持稳定, 无明显的降解。表明该方法测得的 NC-55-122 的稳定性符合测定要求。

2 大鼠给药后的药时曲线及药动学参数

在药代动力学研究中, 分别灌胃给予 NC-55-122 ($25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 与尾静脉注射 NC-55-122 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后不同时间点尾部采血, 按照 NC-55-122 含量测定的检测条件下测定所得血药浓度, 将得到的数据用 DAS.2.0 软件进行计算主要药动学参数, 如表 1 所示, GraphPad Prism 8.0.1 绘制平均血药浓度-时间曲线, 如图 3 所示。

本实验经过灌胃和静脉注射这两种不同的给药方式给药 (图 3), 结果显示, 将化合物 NC-55-122 以灌胃给药后, 在 2.130 h 后血浆中的药物浓度达到了峰值, 但是半衰期较长为 22.643 h, 说明药物代谢的速度较慢, 平均滞留时间为 6.283 h, 血液中药物浓度低, 可能是药物在体内发生了代谢转化。综上表明, NC-55-122 静脉注射给药后符合单室模型, 且符合一级动力学模型。

3 NC-55-122 在大鼠体内的代谢产物分析

将灌胃和静脉给药不同时间点的血样离心后, 分

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of compound NC-55-122 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Parameter	iv ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	ig ($25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
$\text{AUC}_{0-24\text{h}} / \text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	$12\ 164.688 \pm 244.593$	$1\ 734.504 \pm 77.432$
$\text{AUC}_{0-\infty} / \text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	$12\ 219.839 \pm 445.356$	$1\ 889.618 \pm 45.733$
$\text{MRT}_{0-30\text{h}} / \text{h}$	2.275 ± 0.212	6.283 ± 0.289
$\text{MRT}_{0-\infty} / \text{h}$	2.394 ± 0.366	6.367 ± 0.345
$\text{CLz} / \text{L}\cdot\text{h}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.409 ± 0.076	
$V_d / \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	2.407 ± 0.334	
$C_{\text{max}} / \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$12\ 526.755 \pm 479.244$	261.67 ± 8.862
$t_{1/2} / \text{h}$	4.076 ± 0.705	22.643 ± 0.376
$F / \%$		3.09%

别合并上层血浆样品, 并处理后进样。结果表明, NC-55-122 在大鼠血浆样品中检测到的色谱保留时间为 19.91 min, 且 m/z 531.010 0, 通过分析血浆样品的总离子流图 (图 4), 除原型化合物 NC-55-122 外, 还发现了 5 种可能的代谢产物^[19], 这些化合物的电喷雾离子化 (ESI) 质谱数据见表 2。

代谢产物 A 的色谱保留时间为 6.87 min, 准分子

Table 2 Mass spectrometry analysis of prototype drugs and their possible metabolites

Metabolite	$[\text{M}+\text{H}]^+$	t_R / min	Formula	MS/MS
NC-55-122	531.010 0	19.91	$\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{ClN}_6\text{O}_3$	531.010 0, 445.880 0
A	434.218 5	6.87	$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_3$	112.560 0
B	533.257 1	19.95	$\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{O}_3$	445.110 0
C	442.146 8	15.23	$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{ClN}_6\text{O}_2$	102.990 0
D	629.188 0	20.71	$\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{ClN}_7\text{O}_5$	531.010 0
E	607.110 0	25.70	$\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{ClN}_7\text{O}_4\text{S}$	504.110 0

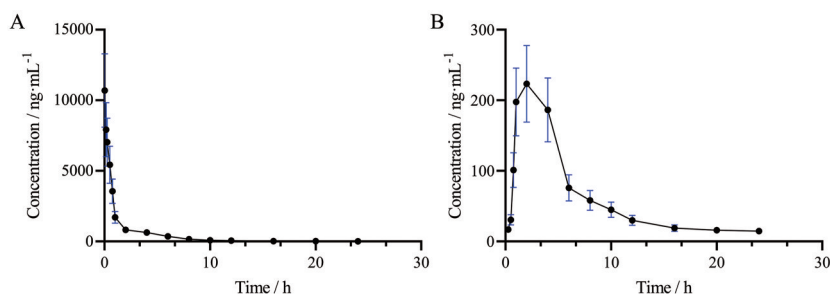


Figure 3 NC-55-122 average blood concentration-time curve after intravenous injection and gavage. $n = 6, \bar{x} \pm s$. A: Injection; B: Igavage

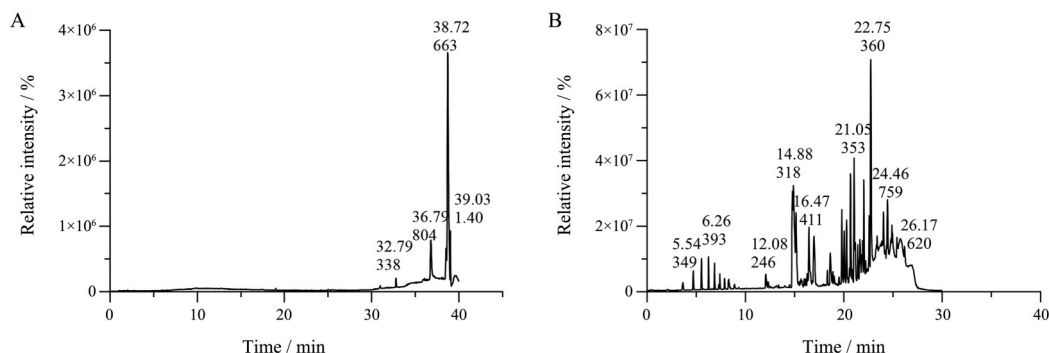


Figure 4 Total ion flow diagram. A: Blank plasma; B: Plasma sample

离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 434.218 5, 比原型药物的分子量少 97 Da, 推测其为 NC-55-122 脱氯苯后再甲基化产生的代谢产物, 在二级全扫描质谱图 (图 5A) 中, 主要的碎片离子为 m/z 112.560 0。因此, 推测代谢产物 A 为 4-乙基-1-(2-羟基-3-甲氧基-5-(哌嗪-1-基甲基)苯基)-[1,2,4]三唑并[4,3-*a*]喹唑啉-5(4*H*)-酮。

代谢产物 B 的色谱保留时间为 19.95 min, 准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 533.257 1, 与原型药物相比, 分子量增加了 2 Da, 推测其为 NC-55-122 哌嗪环的代谢产物。在二级全扫描质谱图 (图 5B) 中, 主要的碎片是断裂的是哌嗪环 m/z 445.110 0, 因此推测代谢产物 B 为 *N*-(3-(4-(2-氯苄基)-5-氧代-4,5-二氢-[1,2,4]三唑并[4,3-*a*]喹唑啉-1-基)-4-羟基-5-甲氧基苄基)-*N*-(2-羟乙基)甲酰胺

代谢产物 C 的色谱保留时间为 15.23 min, 准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 442.146 8, 比原型药物的分子量少 89 Da, 推测其为 NC-55-122 脱 2,3-二氢-4*H*-1*L*2-喹唑啉-4-酮后再甲基化产生的代谢产物, 主要的碎片离子为 m/z 102.090 0 (图 5C), 因此, 推测代谢产物 C 为 2-(5-(2-氯苄基甲基)氨基-4*H*-1,2,4-三唑-3-基)-6-甲氧基-4-(哌嗪-1-基甲基)苯酚。

代谢产物 D 的色谱保留时间为 20.71 min, 准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 629.188 0, 与原型化合物相比, 分子量增加了 98 Da, 根据获得的色谱保留时间、准分子离子和二级碎片离子信息, 以及 NC-55-122 的代谢规律和裂解方式, 可能是二相的结合反应。在二级全

扫描质谱图 (图 5D) 中, 主要的碎片离子为 531.010 0, 代谢产物 D 为 (*S*)-4-(*L*2-氮杂基)-5-(3-(4-(2-氯苄基)-5-氧代-4,5-二氢-[1,2,4]三唑并[4,3-*a*]喹唑啉-1-基)-2-羟基-5-(哌嗪-1-基甲基)苄基)-5-氧代戊酸。

代谢产物 E 的色谱保留时间为 25.70 min, 准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 607.110 0, 比原型药物的分子量多 76 Da, 推测其为 NC-55 断裂乙基之后结合半胱氨酸后产生的代谢产物, 主要的碎片离子为 m/z 504.110 0 (图 5E), 因此, 推测代谢产物 E 为 (*S*)-2-(2-(2-((3-(4-(2-氯苄基)-5-氧代-4,5-二氢-[1,2,4]三唑并[4,3-*a*]喹唑啉-1-基)-4-羟基-5-甲氧基苄基)氨基)乙基)胍基)-3-巯基丙烷。

通过综合分析, 得出 NC-55-122 在大鼠体内可能的结构与代谢途径如图 6 所示。

讨论

本实验通过建立高效液相色谱串联质谱法测定化合物 NC-55-122 在大鼠体内的血药浓度, 可见其方法灵敏度高, 操作简单, 准确度高, 该方法经过系统的方法学验证, 符合 2020 年版中国药典(四部)“生物样品定量分析方法验证指导原则”的要求。

本实验通过灌胃和静脉, 用这两种不同的给药方式进行单一剂量的给药, 在不同的时间点准确测定血药浓度, 且不受内源性基质所干扰, 合适的给药时间和给药剂量是确保实验准确可靠的基础。实验结果显示, 该化合物的半衰期较长, 有可能发生药物在体内的

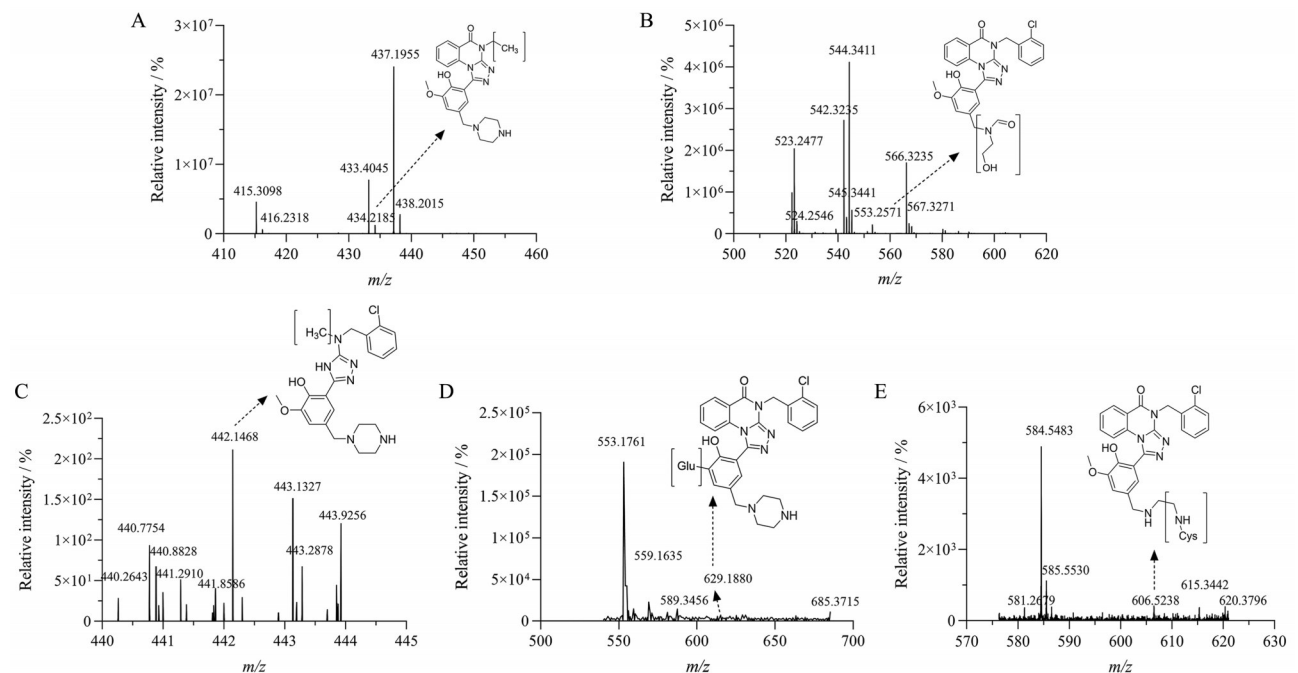


Figure 5 MS diagram of metabolites. A-E: Metabolites A-E

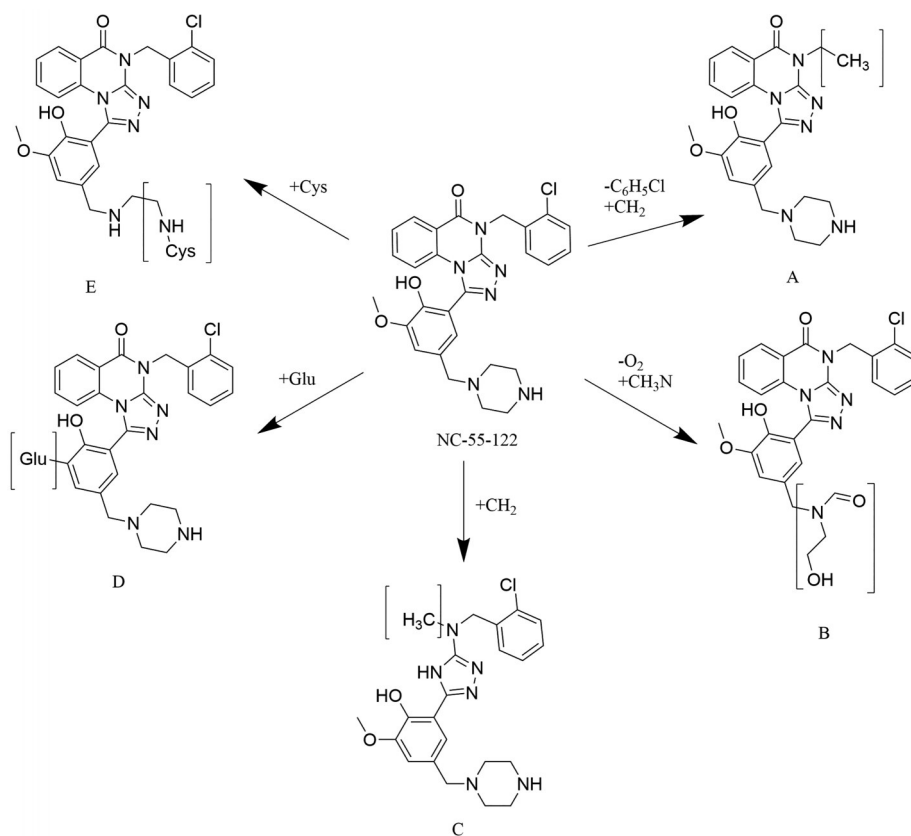


Figure 6 Possible metabolic pathways of NC-55-122 in rats

转化,同时可能存在体内的蓄积情况,不利于药物的排出。药物作用时间较长,有利于药物更好发挥作用,药物需要合适的半衰期,才能使药物得到较好的代谢和排泄。因此继续分析药物在体内代谢产物,通过分析空白血浆和血浆样品的总离子流图,以及结合UNIFI代谢产物预测,推测化合物NC-55-122可能的代谢途径,有I相和II相的代谢产物。本次实验共推测出5个可能的代谢产物,其中I相代谢产物3个,主要是甲基化和哌嗪环部分,II相代谢产物为2个,主要为葡萄糖醛酸的结合以及与半胱氨酸的结合。

本实验研究了将抗肿瘤化合物NC-55-122用不同的给药方式给大鼠进行单一剂量给药后在体内的药动学变化,并对其代谢产物进行分析。为后续对其药物的结构修饰以及能够发挥更好的药理活性和成药性奠定基础。

作者贡献: 张莹负责完成实验,数据分析及文章的撰写;廖伟科提供了有益的指导和审阅;崔杏和汤磊对论文进行详细的校对。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhang SR. Problems and improvements in tumor immunotherapy [C]//Exchange report at the 13th National Immunology Academic Conference (中国免疫学会,第十三届全国免疫学学术大会分会场交流报告). Shanghai: Chinese Society for Immunology, 2018.
- [2] Song ZD, Wang MJ, Ge Y, et al. Tyrosine phosphatase SHP2 inhibitors in tumor-targeted therapies [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11: 13-29.
- [3] Ren LW, Yang YH, Li W, et al. Research progress on drugs targeting tumor-associated macrophages [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 3508-3518.
- [4] Grossmann KS, Rosário M, Birchmeier C, et al. The tyrosine phosphatase SHP2 in development and cancer [J]. Adv Cancer Res, 2010, 106: 53-89.
- [5] Xie J, Si X, Gu S, et al. Allosteric inhibitors of SHP2 with therapeutic potential for cancer treatment [J]. J Med Chem, 2017, 60: 10205-10219.
- [6] Zhang X, He Y, Liu S, et al. Salicylic acid based small molecule inhibitor for the oncogenic Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP2) [J]. J Med Chem, 2010, 53: 2482-2493.
- [7] Zheng H, Yu W, Waclaw RR, et al. Gain-of-function mutations in the gene encoding the tyrosine phosphatase SHP2 induce hydrocephalus in a catalytically dependent manner [J]. Sci Signal, 2018, 11: eaao1591.
- [8] Chen YNP, LaMarche MJ, Chan HM, et al. Allosteric inhibition

- of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases [J]. *Nature*, 2016, 535: 148-152.
- [9] Zhang J, Zhang F, Niu R. Functions of SHP2 in cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19: 2075-2083.
- [10] Jiao K, Long YQ. Research advances in the protein tyrosine phosphatase SHP2 and its inhibitors [J]. *Prog Pharm Sci (药学进展)*, 2019, 43: 517-526.
- [11] Wu J, Zhang H, Zhao G, et al. Allosteric inhibitors of SHP2: an updated patent review (2015-2020) [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28: 3825-3842.
- [12] Guo Y, Xu YP, Dong XW, et al. Cross the undruggable barrier, the development of SHP2 inhibitors: from catalytic site inhibitors to allosteric inhibitors [J]. *ChemistrySelect*, 2021, 6: 5504-5523.
- [13] He RJ, Yu ZH, Zhang RY, et al. Exploring the existing drug space for novel pTyr mimetic and SHP2 inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 6: 782-786.
- [14] Guan ZH, Xu XY, Tang H, et al. Research progress and structure-activity relationship analysis of SHP2 small molecule inhibitors [J]. *Prog Pharm Sci (药学进展)*, 2022, 46: 232-242.
- [15] Fodor M, Price E, Wang P, et al. Dual allosteric inhibition of SHP2 phosphatase [J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13: 647-656.
- [16] Zhang Y, Xie C, Liu Y, et al. Synthesis, biological activities and docking studies of pleuromutilin derivatives with piperazinyl urea linkage [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2021, 36: 764-775.
- [17] Garcia Fortanet J, Chen CH, Chen YN, et al. Allosteric inhibition of SHP2: identification of a potent, selective, and orally efficacious phosphatase inhibitor [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 7773-7782.
- [18] Luo R, Wang Z, Luo D, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel triazoloquinazolinone derivatives as SHP2 protein inhibitors [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2021, 36: 2170-2182.
- [19] Jie F, Liu N. Regulation of cysteine metabolic pathways and new strategies for tumor treatment [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2021, 52: 522-528.