

· 新药发现与研究实例简析 ·

新药创制是复杂的智力活动，涉及科学研究、技术创造、产品开发和医疗效果等多维科技活动。每个药物都有自身的研发轨迹，而构建化学结构是最重要的环节，因为它涵盖了药效、药代、安全性和生物药剂学等性质。本栏目以药物化学视角，对有代表性的药物的成功构建，加以剖析和解读。

作用于多靶标的药物对防治复杂性疾病比单一靶标的药物更为有效，而当前却可遇不可求，因为理性设计水平还达不到精确的要求。尼达尼布同时抑制与肿瘤血管形成相关的 3 个激酶，是对大多数激酶无活性的高选择性药物，其发现也有幸运因素在内。然而研发者优化先导物对三靶标的活性和成药性，对结构的各个部位做到精雕细刻的设计与分析，分子模拟虽然给出了启示，但更多的是药物化学家的灵感、判断和娴熟知识的运用，才得以成功。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2015-0243

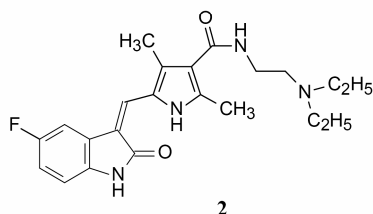
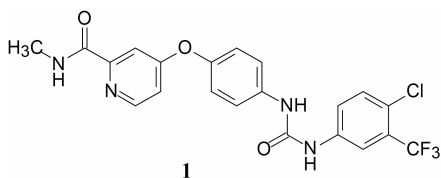
与血管生成相关的三激酶抑制剂尼达尼布

郭宗儒

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

1 研制与外周血管形成相关的多重激酶抑制剂

肿瘤发生和生长需要形成新生血管以提供氧和营养物，抑制血管生成可使肿瘤萎缩，因而是药物治疗实体瘤的重要环节。血管内皮生长因子 (VEGF) 引起其受体 VEGFR 的信号转导，在血管形成过程中起关键作用，因而最先成为肿瘤药物治疗的靶标，已经上市的小分子药物索拉菲尼 (1, sorafenib) 和舒尼替尼 (2, sunitinib) 就是 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂。另一个与血管生成相关的靶标是血小板来源的生长因子 (PDGF) 及其相应受体 (PDGFR)，通过调控血管周细胞的增殖促进血管形成和稳定化。



第三个与血管形成相关的重要环节是成纤维细胞生长因子 (FGF) 及其相应受体 FGFR。当肿瘤细胞的 VEGFR 通路受到抑制，会采取逃逸机制，将 VEGFR 通路转轨到 FGFR 通路，以继续存活。所以单打一的策略对肿瘤的抑制有局限性，而同时抑制 VEGFR、PDGFR 和 FGFR 的多靶标化合物，会是更强效且不易产生耐药的抗肿瘤药物。勃林格殷格翰公司研究的初期只是以 VEGFR 为靶标，后来拓展成基于 3 个受体激酶的多靶标抑制剂。

2 评价活性的模型

用于通量筛选和初筛的体外模型，是用 VEGFR-2 胞浆内激酶的结构域 797~1335 片段克隆到与谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 融合的 pFastBac 蛋白上，表达于 SF-9 昆虫细胞中，经提取构建筛选模型，测定化合物对酶提取液的抑制活性 (IC_{50} 值)。对细胞的抑制活性是用 VEGF 刺激人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 测定半数抑制浓度 (IC_{50} 值)。实验表明，化合物抑制 HUVEC 细胞增殖的活性与抑制 VEGFR 的活性具有相关性，提示对 HUVEC 细胞的抑制是由于抑制 VEGFR-2 激酶而引起的。

3 先导化合物

通过高通量筛选公司的化合物库，并对曾是为

了研发依赖于细胞周期蛋白 4 (CDK4) 激酶抑制剂而合成的、但未呈现 CDK4 抑制活性的化合物进行筛选, 发现母核为吡啶啉酮的化合物 **3** 对 VEGFR2 有较高的抑制活性, $IC_{50} = 763 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 抑制 HUVEC 细胞的活性 $IC_{50} = 342 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物 **3** 对 CDK4 没有抑制作用, 对其他激酶的活性也非常弱, $IC_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因为对 VEGFR-2 激酶较强的特异性抑制作用, 被确定为先导化合物。

3.1 先导物的结构特征分析 粗略地看化合物 **3** 与 **2** 相当类似: 共有的吡啶啉酮母核, 经反式双键连接的芳香环, 后者引出碱性端基。但仔细分析 **3** 的结构与 **2** 有异同。相同处是吡啶啉酮的内酰胺经两个氢键结合于铰链区; 不同处是 6 位的氨基可能处于一个特异性腔内, 履行选择性结合的职能; 未取代的苯环可能结合于 ATP 核糖所处的腔内; 哌啶环未必在结合腔内。这些估计, 后经分子模拟和合成-测定-构效分析得到了验证, 深化认识了各个部位结构的作用。图 1 是这些分析和验证的示意图。

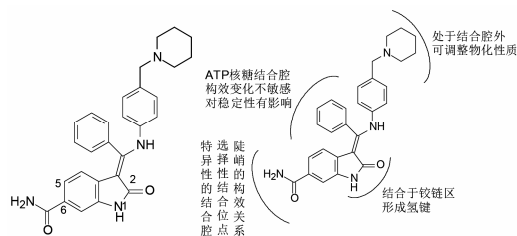


图 1 化合物 **3** 预计的结合方式和后来验证的构效关系

3.2 6-氨基基的特异性作用 去除 6-氨基基的化合物活性降低 2 倍。将氨基更换为取代的苯胺, 活性都显著降低。若将氨基基由 6 位移至 5 位, 失去活性, 这些提示 6-氨基基吡啶啉酮似乎是不可改动的。

3.3 分子模拟: 化合物 3 的结合特征 为了揭示化合物 **3** 与激酶的结合方式和其中 6-氨基基的结合特征, 采用了分子模拟和计算化学方法。由于当时尚未解析 VEGFR-2 结构, 用同源模建方法由已知 VEGFR-1 的结构构建了 VEGFR-2 三维结构, 并根据多数激酶的结构构建了 VEGFR-2 三维结构, 并根据多数激酶的杂环占据活性中心 ATP 的嘌呤环所处的位置, 定位了 **3** 的吡啶啉酮的位置和取向。分子模拟的结果如下: ① 吡啶啉酮环与疏水性氨基酸 Lys868、Val919 和 Phe1047 构成的疏水腔发生疏水-疏水相互作用; ② 1,2 位内酰胺与激酶铰链区的氨基酸发生两个氢键结合: C=O 与 Cys919 的 NH 以及 NH 与 Glu917 的氧原子形成氢键; ③ 6-氨基基进入 ATP 所处的疏水腔内, 该特异性疏水腔由 Val916 和 Lys868 把守门户, Lys868 与氨基基形成氢键结合; ④ 末端的哌啶环未

与激酶接触, 处于水相介质中。图 2 是化合物 **3** 与 VEGFR2 激酶分子模拟的示意图。以上提示 1,2 和 6 位形成多个氢键以及亲脂性母核有利于提高活性和选择性; 末端的碱性基团可以变换以调整物化性质。

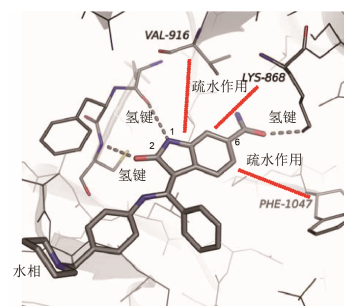


图 2 化合物 **3** 与 VEGFR2 对接示意图

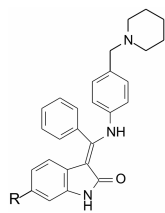
4 先导物的优化—构效关系研究

4.1 6 位氨基基的变换 前述的 6 位氨基基对活性影响很大, 分析 H_2NCO -片段具有亲水性 ($\pi = -1.49$), 却处于疏水腔内, 应是不适宜的, 为了增加亲脂性, 氨基上连接烷基以探究对活性的影响, 合成了化合物 **4**~**7**, 结果活性显著减弱, 可能是由于体积增大, 该特异的疏水腔容纳不下, 产生位阻的缘故。将 6-氨基基“调转方向”成乙酰氨基 ($\pi = -0.97$), 化合物 **8** 完全失去活性。变换成乙酰基 (**9**, $\pi = -0.55$) 活性仍然很低, 再增加脂溶性, 如 6-羧甲酯 (**10**, $\pi = -0.01$) 和 6-羧乙酯 (**11**, $\pi = 0.51$), 活性提高, 超过了化合物 **3**, 推测是亲脂性提高而体积并未加大, 还保留了氢键接受体 C=O 基团。此外, 氯或比较简单的基团如氨基或氰基化合物 (**12**~**14**) 的活性都强于 **3**, 6-硝基化合物 (**15**) 活性最强。表 1 列出了变换 6 位取代基化合物的结构和活性。

综合分析表 1 这些有代表性的化合物的构效关系, 提示 6 位取代基对活性的影响含有多重因素: 基团尺寸、疏水性、氢键形成能力等对结合力有多重复杂影响, 构成“陡峭”的构效关系。但 6 位的电性效应对活性的影响较小, 推论 6 位的推拉电子效应对 1 和 2 位的氢键形成没有显著变化。

其中两个活性最强的是化合物 **15** 和 **10**, 对 VEGFR2 的 IC_{50} 分别是 7 和 36 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 抑制 HUVEC 细胞的活性 IC_{50} 分别是 60 和 103 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。然而 **15** 和 **10** 都有缺点, 硝基在体内可发生多种代谢产物, 有潜在的不良反应; 羧酸酯可能发生水解作用, 都涉及药代的成药性问题。氯取代的化合物 **12** 抑制细胞活性较强, 但对其他激酶有脱靶作用 (off-targeting), 故不可取。

表 1 化合物 3~15 的结构和活性



Compd.	R	VEGFR2 IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	HUVEC/VEGF EC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
3	NH ₂ CO-	763	342
4	<i>i</i> ProNHCO-	1 230	1 070
5	MeNHCO-	2 099	1 097
6	Me ₂ NCO-	1 312	542
7	EtMeNCO-	1 447	715
8	CH ₃ CONH-	>3 000	-
9	CH ₃ CO-	1 752	-
10	CH ₃ OCO-	36	103
11	EtOCO-	109	47
12	Cl	129	49
13	NH ₂	132	414
14	CN	248	281
15	NO ₂	7	60

10 优于所有合成的化合物在于对于 PDGFR 和 FGFR 激酶也有强效抑制活性, IC₅₀ 分别是 54 和 71 nmol·L⁻¹, 但对其他 23 种激酶没有抑制作用, 提示 6 位酯基取代选择性较强。虽然化合物 10 存在发生水解的羧酸酯基, 但灌胃小鼠的药代实验结果尚可 (灌胃 50 mg·kg⁻¹, C_{max} 952 ng·mL⁻¹, t_{1/2} 3.5 h, AUC 5 246 ng·3 h·mL⁻¹), 因此确定化合物 10 作为新一轮优化的先导物。

4.2 新一轮的优化 继续进行结构优化的目标是对 3 个靶标 VEGFR、PDGFR 和 FGFR 激酶都要有较高抑制活性, 而对其他激酶 (off-target) 没有或低活性, 还需有良好的物理化学性质和药代动力学性质。优化的策略是以化合物 10 为起始物, 变换连接于苯胺对位的碱性片段 (哌啶环) 和连接基 (亚甲基), 与双键连接的苯基保持不变。

分子模拟显示哌啶环处于活性部位以外的水相中, 由于没有与激酶结合, 可以对该片段做较大的变换, 合成了长度不同的碱性链 16~20。这些化合物对 3 种酶和对细胞的抑制活性都比较高。化合物 21 没有碱性氮原子仍然有高活性, 提示侧链上带有碱性基团并不是呈现活性的必要前提 (但对成盐性和调整物化性质很重要)。化合物 23 和 24 的侧链尺寸较小, 活性显著降低或失去活性。侧链上有含氮杂环的化合物 25~27 都呈现活性, 活性强弱的结构差异在下节讨论。表 2 列出了变换碱性侧链的化合物及

其活性。

4.3 候选化合物的确定——尼达尼布的上市 综合分析表 1 和表 2 所列的有代表性化合物的构效关系, 可以归纳出的规律性结论较少, 即或经分子模拟的微观分析, 也难以对多数化合物的活性强弱 (或有无) 做出理性的解释, 何况同时对 3 个靶标的作用。一方面说明影响这些靶标的结构因素的复杂性, 也说明现阶段的计算生物学存在局限性, 回顾性解释多于前瞻性的预测。

上述高活性化合物群中存在一个现象就是化合物 20、21 和 22 之间以及 25 和 26 之间的的构效关系。当与苯胺环相连的 4 位为叔氮原子, 活性显著高于相应的仲氮相连的化合物, 如 20 和 21 强于 22; 25 强于 26。叔氮原子引出的侧链与苯胺的环平面呈垂直取向, 仲氮原子连接的侧链与苯胺的共面性几率较大, 推论侧链在空间的取向对活性是有影响的, 侧链与环系呈垂直取向的活性强于侧链与环的共面性。

这样, 候选化合物的选择更集中在 20 和 25, 不仅是由于对 VEGFR、PDGFR 和 FGFR 激酶以及 HUVEC 细胞的高抑制活性, 而且对常见的 23 种激酶的活性很弱, 预示有较少的脱靶作用。20 和 25 可抑制多种移植人肿瘤的裸鼠肿瘤生长, 小鼠灌胃也有良好的药代动力学性质。

化合物 25 还对 Src 家族的激酶有抑制作用, 对 Flt-3 激酶的 IC₅₀=26 nmol·L⁻¹, 预示可能对急性髓细胞白血病有治疗效果。全面综合考虑, 确定 25 为候选药物, 公司代码为 BIBF1120, 通用名为尼达尼布 (nintedanib)。

尼达尼布大鼠和猕猴的口服生物利用度 (F) 分别为 12% 和 24%, 半衰期 t_{1/2} 分别为 4 和 7.1 h。口服生物利用度低的原因主要是首过效应酯水解缘故 (Roth GJ, Heckel A, Colbatzky F, et al. Design, synthesis, and evaluation of indolinones as triple angiokine inhibitors and the discovery of a highly specific 6-methoxycarbonyl-substituted indolinone (BIBF 1120). J Med Chem, 2009, 52: 4466-4480)。

该项目自 1998 年启动, 2001 年即确定尼达尼布为候选化合物, 经临床前和临床研究, 长时间大规模的一波三折的临床研究, 说明了创新药物的艰辛与风险, 直到 2015 年 FDA 批准上市, 目前的适应症是治疗非小细胞肺癌和特发性肺纤维化病 (IPF), 后者是 FDA 首次同年批准的两个治疗 IPF 小分子药物之一 (另一个药物是吡非尼酮) (Roth GJ, Binder R, Colbatzky F, et al. Nintedanib: from discovery to the

表 2 不同碱性侧链的化合物及其活性

Compd.	R	VEGFR2 IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	FGFR1 IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	PDGFR α IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	HUVEC/VEGF EC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	
10			36	71	54	103
16		9		17	7	15
17		12		18	8	15
18		23		25	12	14
19		24		88	11	25
20		61		50	20	22
21		8		54	9	37
22		119		–	–	–
23		150		–	–	–
24	H	>8 000		–	–	–
25		5		38	18	10
26		83		219	164	83
27		6		66	8	52

clinic. J Med Chem, 2015, 58: 1053–1063)。

5 尼达尼布与 VEGFR 的结合特征和持续的抑制作用

X-射线研究与 VEGFR2 复合物单晶结构表明, 尼达尼布结合于 ATP 结合位点, 定位于激酶的 N 末端和 C 末端结构域之间的裂隙处 (图 3), 连接有甲酯基的吡啶酮环处于疏水性氨基酸构成的疏水腔内, 内酰胺的-CO-NH-分别与铰链上的氨基酸 Cys919 和 Glu917 残基形成氢键, 这与前面叙述的分子模拟的结果相一致。甲基哌嗪环的位置与前述的哌啶环相同, 进入到水相中, 只是 4 位氮原子与 Glu850 的羧基的两个氧原子形成二齿性离子键, 距离分别为 3.2 和 3.3Å, 增加了结合强度, 这一点在分子模拟中因化合物 3 是哌啶环, 不可能预测到这种结合。

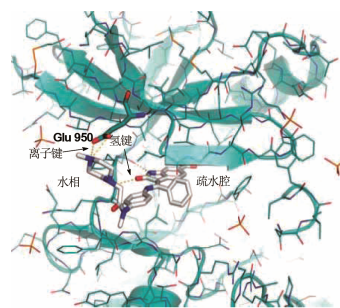


图 3 尼达尼布与 VEGFR 晶体衍射结构

尼达尼布与激酶结合的另一个特征是持续性抑制作用。用 VEGFR2 转染的细胞脉冲追踪 (pulse-chase) 实验证明, 细胞暴露于尼达尼布 1 h 后彻底洗除药物, 继续温孵细胞 8、24 和 32 h, 之后用 VEGF 刺激细胞, Western 印迹分析表明, VEGFR2 受体的磷

酸化一直处于被抑制状态 (32 h 以上)。推测是尼达尼布在细胞内酯基被水解, 游离酸难以穿越细胞膜逃逸, 被封闭在胞内。由于游离酸活性也很高 ($IC_{50} = 62 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 这或许是其持续性抑制的原因之一 (Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, et al. BIBF1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res*, 2008, 68:

4774–4782)。笔者认为也可能有其他因素。一是尼达尼布与酶的强力结合 ($IC_{50} = 5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 几乎成为不可逆状态, 类似于共价键结合导致的持续抑制状态。也可能由于生成的酶-尼达尼布复合物具有慢离解速率常数, 即或介质中已不存在药物, 因药物有较长的驻留时间 (residence time) 使酶分子持续处于与抑制剂结合状态。这需要结合动力学实验证明。