

· 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。

药物与靶标分子的相互作用是药效的原动力, 基于靶标的三维结构“量体裁衣”式的设计新药, 应是最理性的方法。靶标分子的柔性构象与不同化合物结合的多样性是基于结构的药物设计 (SBDD) 的难点之一。分子量较小的 HIV 蛋白酶是对称的二聚体, 容易获得复合物单晶, 所以在由香豆素演化成最终的替拉那韦的历程中, 在多个节点处解析了复合物结构, 辅助了设计。即使这样, 还有许多需要探索的未知内容, 因而, 应用药物化学的原理和策略, 不断驱动着 SBDD 的进程。替拉那韦的研制特点在于由苗头过渡到先导物乃至先导物优化, SBDD+药物化学方法贯穿于全过程。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2015-0320

基于靶标结构理性设计的替拉那韦

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 研发背景和苗头物的发现

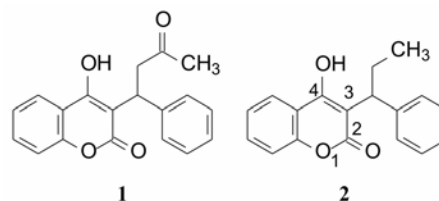
20 世纪 90 年代初, 以 HIV 蛋白酶为靶标研制抗艾滋病药物已经不满足于肽类模拟物, 虽然在拟肽的结构中“镶入”模拟肽键水解的过渡态结构, 可以提高活性强度, 但仍因口服生物利用度低和代谢不稳定而限制了治疗效果, 因而更多关注研发 HIV 蛋白酶的非肽类抑制剂。

Upjohn 公司基于荧光显示的高通量筛选方法, 评价了 5000 个结构多样的化合物对 HIV 蛋白酶的抑制活性, 发现抗凝血药物华法林 (**1**, warfarin) 有弱抑制活性, $IC_{50}=30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在此之前有报道称华法林可抑制 HIV-1 病毒复制和传播 (Bourinbaier AS, Tan X, Nagorny R. Effect of the oral anticoagulant, warfarin, on HIV-1 replication and spread. AIDS, 1993, 7: 129-130)。根据这些苗头信息, 进一步对化合物作相似性搜寻, 发现另一个抗凝血药苯丙香豆素 (**2**, phenprocoumon) 有更强的抑制活性, $K_i=1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 这两个生物利用度高的口服药物作为苗头化合物是一个良好的开端。

2 苗头化合物与蛋白酶的结合方式

2.1 HIV 蛋白酶活性中心的结构特征

HIV 蛋白酶属于天冬氨酸蛋白酶家族, 催化肽键



裂解, 天冬氨酸是活性催化部位的重要组成部分。该蛋白酶是由相同的二聚体组成, 对称组合具有二重旋转对称轴 (C₂), 每个单体的活性部位底部有 Asp25、Thr26 和 Gly27, 顶部有 Ile50 封盖。每个单体含有 4 个结合腔穴 S1~S4 (另一单体表示为 S1'~S4'), 被水解的底物肽的结构部位 P1~P4 和 P1'~P4' 分别结合到相对应的腔内。HIV 蛋白酶有两种亚型: HIV1 和 HIV2, 二者序列的等同性为 50%, 差异主要在活性部位的外围。底物的 Asp25 和 Asp25' 的两个羧基结合并活化结构水分子 (structural water), 是催化反应之关键, 顶部的 Ile50 和 Ile50' 形成氢键有助于水解过程。图 1 是病毒蛋白与蛋白酶结合的示意图。

2.2 化合物 2 与蛋白酶的结合特征

根据酶与抑制剂形成的复合物结构, 可以指导化合物的结构优化, 为此制备了 **2** 与 HIV1 蛋白酶复合物的单晶, 经 X-射线衍射分析表明, 有以下的结

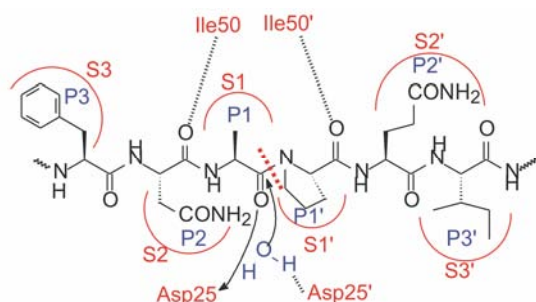


图1 病毒蛋白与蛋白酶结合的示意图

合特征: ① 化合物 **2** 的 C4 相连的羟基与 Asp25 和 Asp25' 形成氢键; ② 内酯环的两个氧原子与顶部 Ile50 和 Ile50' 的酰胺-NH-形成氢键。提示 4-羟基香豆素是重要的药效团特征, 图 2a 是化合物 **2** 与蛋白酶形成的氢键网络示意图; ③ C3 相连的 α -乙基进入 S1 腔内, α -苯基进入 S2 腔; ④ 香豆素环处于 S1' 腔内, 但由于刚性的并合苯环, **2** 不能结合到 S2' 腔内。图 2b 是化合物 **2** 与蛋白酶结合的位置及范德华表面。应当指出, 空闲的 S2' 腔未发生结合是不利因素, 需要有基团填充。化合物 **2** 抑制蛋白酶的活性 K_i 值为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 抑制 HIV 感染细胞的能力 $\text{ED}_{50} = 100\sim 300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

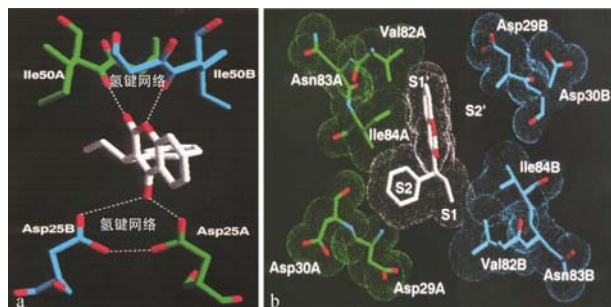


图2 化合物 **2** 与 HIV1 蛋白酶形成氢键的示意图 (a)、**2** 与蛋白酶结合的位置及范德华表面 (b)

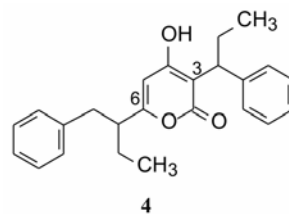
2.3 结构优化—简化母核并引入基团以与 S2' 腔结合

化合物 **2** 的 4-羟基香豆素的苯并结构对与酶的结合不仅没有贡献, 反而使分子无法接近 S2' 腔。若

去除该并合的苯环, 并不影响羟基 δ -不饱和内酯形成氢键的结构因素, 同时在 6 位连接苯乙基, 得到化合物 **3**, 柔性的苯乙基容易接近 S2' 腔。化合物 **3** 提高了抑酶活性, K_i 值为 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。图 3a 表示了化合物 **3** 形成的氢键结合, 图 3b 是 **3** 在 HIV 活性中心的结合模式, 可以看出, C6 连接的乙苯基接近于 S2' 腔。

2.4 与 S1' 腔的结合作用

化合物 **3** 虽然能够接近 S2', 但 S1' 也未被结合, 为此, 在 C6 的 α 位连接乙基, 可伸入到 S1' 腔, 同时将苯基挤得更接近于 S2' 腔。这样, 化合物 **4** 的 C3 和 C6 分别连接了乙基/苯基和乙基/苯基, 犹似假对称性分子, 分别处于 4 个腔穴中, 也因此提高了化合物 **4** 对蛋白酶的抑制活性, K_i 值为 $38 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物 **4** 含有 2 个手性碳原子, 2 对差向异构体经拆分成 4 个单体, 对 HIV-1 蛋白酶抑制的作用 (K_i 值) 分别为 14、42、80 和 $109 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



化合物 **4** 对 HIV1 和 HIV2 的抑制活性都很强, 而对人的蛋白酶没有或弱作用, 例如在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, **4** 对肾素、胃蛋白酶和组织蛋白酶的抑制率分别为 0、52% 和 53%。对 HIV1 感染的细胞 $\text{EC}_{50} = 3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下没有细胞毒作用。化合物 **4** 也有较好的药代动力学性质, 例如对大鼠和犬的口服生物利用度分别为 76% 和 45%, 半衰期 $t_{1/2}$ 为 6.0 和 4.0 h, **4** 可以视作里程碑式的化合物 (Thaisrivongs S, Tomich PK, Watenpaugh KD, et al. Structure-based design of HIV protease inhibitors: 4-hydroxycoumarins and 4-hydroxy-2-pyrone as non-peptidic inhibitors. J Med Chem, 1994, 37: 3200-3204)。

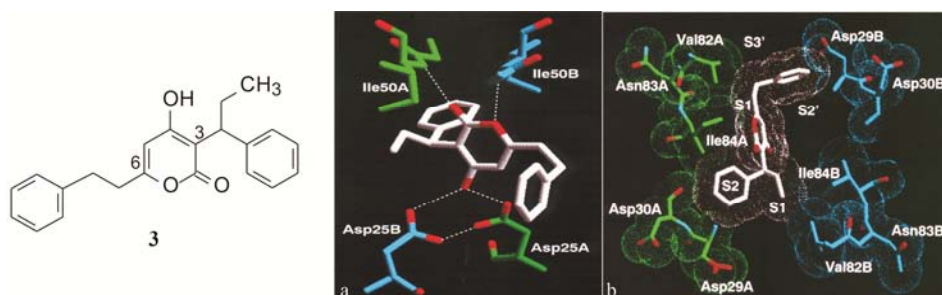


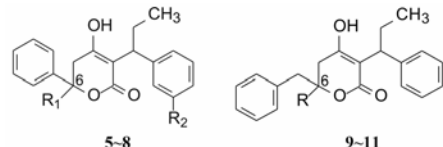
图3 化合物 **3** 与 HIV1 蛋白酶形成氢键的示意图 (a)、**3** 与蛋白酶结合的位置及范德华表面 (b)

3 骨架的再变换

3.1 6,6-二取代吡喃酮骨架

分析化合物 **2** 与酶的晶体结构, 显示出 C6 侧链上的苯环没有进入 S2' 腔内, 因而化合物的结构改造有较大的空间。由于 S1' 和 S2' 很接近, 设想将 C6 由 sp^2 杂化碳换成 sp^3 碳原子, 以便从 C6 引出两个疏水性基团, 分别进入 S1' 和 S2' 腔内, 从而设计合成了化合物 **5~11**, 连接于 C6 的两个基团一个是苯基 (**5~8**) 或苄基 (**9~11**), 另一为烷基、环烷基或苄基, 表 1 列出了化合物结构和对 HIV 蛋白酶的活性。**5~8** 的构效关系表明, 连接 C6 的基团一个是苯基, 另一个基团较小时活性较强, 若是环己基或苯基等较大基团, 则活性显著减弱。化合物 **6** 与蛋白酶的复合物单晶衍射图 (图 4) 表明, 4-羟基经水分子搭桥 (氢键) 与一个丝氨酸残基形成氢键; C3 连接的苯基和乙基分别结合于 S1 和 S2 腔内; 连接于 C6 的苯基结合于 S1' 中, 另一基团进入 S2' 内。化合物 **7** 和 **8** 的低活性提示 S2' 不能容纳较大的基团。显然, **9~11** 的 C6 为苄基取代的化合物活性都很弱。

表 1 化合物 **5~11** 的结构和抑制 HIV 蛋白酶活性



化合物	R ₁	R ₂	K _i /nmol·L ⁻¹	化合物	R	K _i /μmol·L ⁻¹
5	乙基	H	160	9	苯基	> 10
6	正丙基	H	95	10	苄基	> 10
7	环己基	OH	610	11	正丁基	3
8	苯基	H	> 10 000			

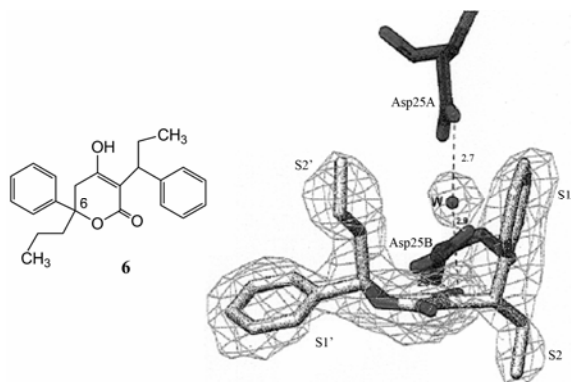


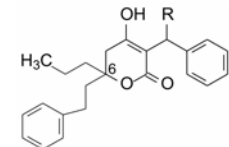
图 4 化合物 **6** 与 HIV1 蛋白酶晶体结构的活性中心结合图

3.2 集高活性基团于吡喃酮的 6 位

化合物 **3** 的吡喃酮的 6 位是苯乙基, 活性为 $K_i = 500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 化合物 **6** 的 K_i 值为 $95 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 它的

6 位是正丙基, 将这两个基团同时连接在 6 位, 化合物 **12** 的 $K_i = 35 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 活性显著提高, 进而变换 C3 侧链 α 位的乙基, 合成了化合物 **13~17**, 结构与活性列于表 2 中。当 R 为较小的乙基或乙烯基时, 活性很强, 换成较大环状取代基团也有较强的活性 ($33 \sim 64 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 提示 C3 侧链的 α 烷基尺寸对活性的影响不大。

表 2 化合物 **12~17** 的结构与活性



化合物	R	K _i /nmol·L ⁻¹	化合物	R	K _i /μmol·L ⁻¹
12	乙基	35	15	环戊基	59
13	乙烯基	16	16	苯乙烯基	50
14	环丙基	64	17	苯乙基	33

3.3 化合物 **12** 与蛋白酶的结合特征

化合物 **12** 与蛋白酶复合物晶体结构表明, 二氢吡喃酮环在骨架上的折叠方向与化合物 **6** 相反, 使得 C3 侧链的 α 苯基结合到 S2 腔, 乙基进入 S1 腔 (图 5), 这与化合物 **6** 的结合模式相反, 因此 4-羟基结合的天冬氨酸也与化合物 **6** 的结合模式不同 (即另一亚基的天冬氨酸)。

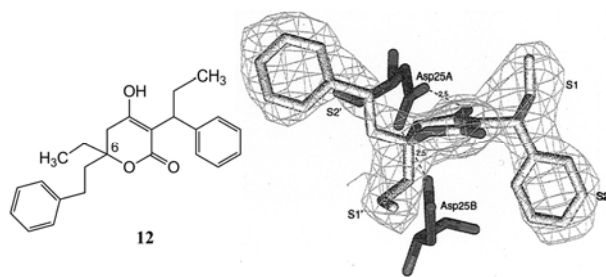


图 5 化合物 **12** 与 HIV1 蛋白酶晶体结构的活性中心结合图

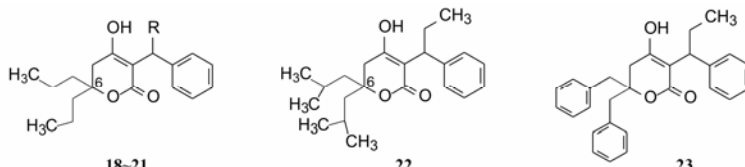
3.4 含有相同基团取代的 C6—去除一个手性中心

在羟基吡喃酮的 C6 位若连接相同取代基, 则减少一个手性中心, 可避免生成差向异构体的复杂性。为此合成了 6,6-二正丙基、C3 α 变换的化合物 **18~21**。结果表明, C3 α 连接较小的基团如乙基或环丙基时有强抑制活性, 环戊基活性仍较强, 而叔丁基失去活性, 提示体积过大不适于结合。然而, 若 C6 连接二异丁基 (**22**), 活性显著减弱, 二苄基化合物 (**23**) 则完全失去活性。表 3 列出了化合物 **18~23** 的结构与活性。

3.5 C6 的螺环化合物

C6 连接两个正丙基的化合物 **18** 和 **19** 显示强效

表 3 化合物 18~23 的结构与活性

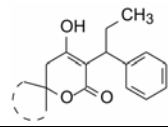





化合物	R	$K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	化合物	R	$K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
18	乙基	22	21	叔丁基	> 1 000
19	环丙基	15	22	-	75
20	环戊基	39	23	-	> 10 000

抑酶活性, 若将烷基链连接成环, 形成螺环化合物, 希望对烷基链经构象限制而有利于结合, 因而合成了螺 5、螺 6、螺 7 和螺 8 元环化合物 24~27。然而结构表明, 除螺 6 化合物 25 活性略强外, 其余 3 个活性都很弱。

由于 25 呈现尚可的活性 ($K_i=780 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 而且 C8 的位置接近酶的 Arg8, 若在 C8 处引入氧原子, 有可能形成氢键而增强结合力。令人意外的是, 合成的含氧螺 6 环化合物 28~30 活性极弱。后来经解析化合物 25 与 HIV2 蛋白酶 ($K_i=370 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的复合物晶体结构, 发现 C8 距离 Arg8 甚远, 不能形成氢键。表 4 列出了螺环化合物 24~30 的结构与活性。

表 4 螺环化合物 24~30 的结构与活性



化合物	R	$K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	化合物	R	$K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
24	5	3 000	28		> 1 000
25	6	780	29		> 3 000
26	7	> 1 000	30		> 10 000
27	8	> 3 000			

上述评价的是对 HIV1 (或 2) 的蛋白酶抑制作用, 继而测定了细胞培养的抗病毒生长的活性, 结果显示, 即使酶活性最强的化合物 19 ($K_i=15 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 其抗病毒活性并不高 $\text{EC}_{50}=5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因而仍需继续优化结构与活性 (Thaisrivongs S, Pomero DL, Tommasi RA, et al. Structure-based design of HIV protease inhibitors: 5,6-dehydro-4-hydroxy-2-pyrones as effective, nonpeptidic inhibitors. J Med Chem, 1996, 39: 4630-4642)。

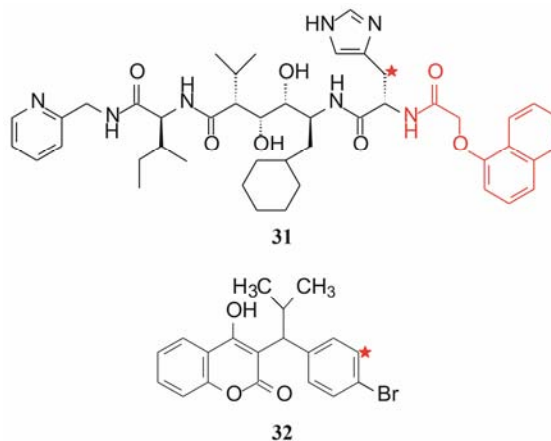
4 S3 结合腔的利用

4.1 模拟肽类抑制剂的部分结构

以上述及的是与酶活性部位的 S1、S1'、S2 和 S2'

结合的优化过程, 其实 HIV 蛋白酶与底物的作用涉及 6 个结合腔, 上述的研究没有利用 S3 和 S3'。为了研究对 S3 结合的结构特征, 借鉴了肽类蛋白酶抑制剂的结构因素。

Upjohn 研究者通过分子模拟比较了拟肽蛋白酶抑制剂 U-75875 (31) 和香豆素类小分子 32 与蛋白酶的结合特征, 发现有许多相似之处: 骨架可以叠合; 都分别占据了 S1'、S1 和 S2 结合腔, 咪唑环和溴原子进入 S2 腔, 而且咪唑的 α 亚甲基与苯环的间位碳原子重合在一起 (用星号表示); 31 的含萘环片段进入 S3 腔, 对结合有重要贡献, 而 32 太短未触及该腔。因而推论若化合物 32 自间位苯环处引出适宜的片段结合于 S3, 可能提高化合物活性。



分析 31 的复合物结构, 星号右边的胺甲酰基分别与酶的 Gly48 和 Asp29 形成两个氢键, 萘环发生疏水-疏水相互作用, 这些都会提升化合物对蛋白酶的亲和力。

4.2 构效关系

基于上述的分析, 设计合成了一系列化合物, 表 5 列出了有代表性的化合物 33~38 的结构和活性。33 是在化合物 2 的 C3 α -苯基的间位经胺甲酰连接基引出叔丁氧羰基疏水末端, 活性 $K_i=160 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比化

合物 **2** 的活性增加了 5 倍 (**2** 的 $K_i = 1\,000\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 提示新链的引入有利于同蛋白酶的结合。**33** 与酶的复合物晶体结构表明, 叔丁氧羰基占据了 S3 腔, NH 与 Gly48、酰基氧与 Asp29 和 Asp30 形成氢键, 另一 NH 则与 Arg8 形成氢键, 母核香豆素仍然保持与 Asp25、Ile50 的氢键网络结合。图 6 是化合物 **33** 与 HIV2 蛋白酶晶体结构的活性中心结合图。

表 5 有代表性的化合物 **33**~**38** 的结构和活性

化合物	R	$K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	化合物	R	$K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
33		160	36		0.17
34		280	37		3 600
35		1 600	38		110

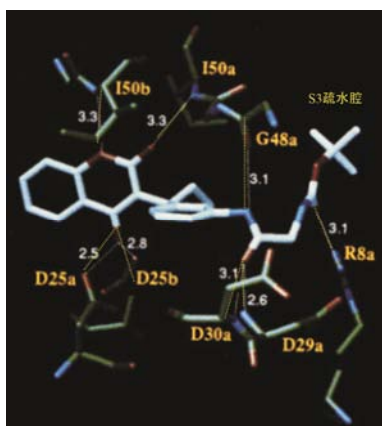


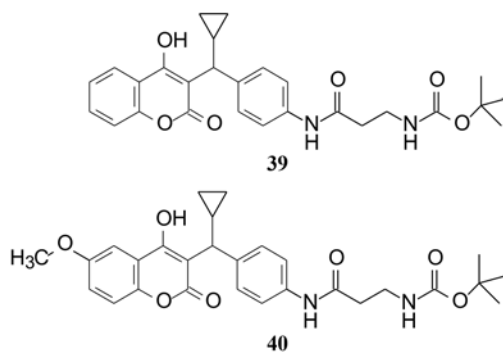
图 6 化合物 **33** 与 HIV2 蛋白酶晶体结构的活性中心结合图 (黄色虚线表示氢键结合)

化合物 **33** 的 C3 苯环引出的侧链其实是用 Boc 保护的甘氨酸酰化的 C3 α -苯胺, **34** 和 **36** 分别是 Boc 保护的 β -氨基丙酸和 L-丙氨酸, 活性与 **33** 相近, 但 γ -氨基丁酸 (**35**) 和脯氨酸 (**37**) 的活性很弱, 推测是链过长或过短之故。化合物 **38** 的活性增强, 提示末端基团可作广泛的变换。

鉴于 C3 α -乙基变换成环丙基可提高活性, 如化合物 **19** 活性强于 **18**, 合成的有代表性化合物如 **39** 和 **40** 的活性 K_i 分别高达为 $86\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $28\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 确证了侧链进入 S3 腔促进了结合。

4.3 羟基吡喃酮母核上引入侧链以结合 S3 腔

研究至此, 已揭示并积累了多个可提高活性的



结构因素: ① 母核香豆素简化为羟基吡喃酮; ② 吡喃酮 6 位连接 α -乙基和苯乙基, 如化合物 **4** ($K_i = 38\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$); ③ C3 的 α 位连接环丙基或乙基; ④ C3 的 α 位苯基的间位连接有胺甲酰引出的末端疏水片段, 如化合物 **40** ($K_i = 28\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 这些因素也分别反映在晶体结构的结合特征中。拼合这些有利的因素为一体设计合成了 **41**~**45** 化合物, 结构与活性列于表 6。

表 6 化合物 **41**~**45** 的结构与活性

化合物	R	$K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	化合物	R	$K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
41		41	44		19
42		44	45		4
43		15			

这 5 个有代表性的化合物都有较高的抑酶活性, 除 **42** 不是氨基酸的类似物外, 其余 4 个是尺寸不同的氨基酸片段, 活性差异不大, 即使组氨酸的咪唑环被对甲苯磺酰基保护, 仍不影响与酶的结合, 提示该侧链的基团安排和定位取向是相近的。化合物 **42** 的末端为吡啶, 虽不是氨基酸的结构, 仍呈现高活性, 表明该侧链的变换的自由度大, 有较大的变换空间。

活性最强的化合物 **45** ($K_i = 4\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 含有两个手性中心, 两对差向异构体经分离和拆分得到的 4 个光活单体都有高抑制活性, 分别为 1.4 、 4.2 、 6.3 和 $8.5\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示这两个手性中心的立体构型对酶分子的结合没有显著影响。

化合物 **41** 与 HIV1 蛋白酶复合物的晶体结构表明, 母核 4-羟基吡喃酮与活性中心形成如前述的氢

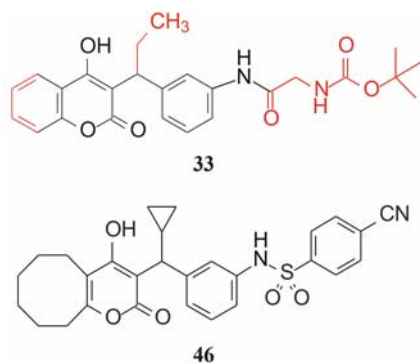
键网络, C3 α -苯基的间位取代的氨甲酰基也发生氢键结合, 分子中的各个片段“对号入座”地分别结合于 S2'、S1'、S1、S2 和 S3 腔中, 提示依据前面所述的化合物结合特征设计的新分子确实适配于 HIV 蛋白酶的活性中心。

化合物 41~45 对感染 HIV1_{III}B 病毒的 WT4 细胞实验表明, IC₅₀ 在 3~6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围; 用 MTT 法测定化合物的细胞毒作用, 在 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下未呈现细胞毒作用, 提示对正常细胞的毒性 TD₅₀ > 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Thaisrivongs S, Watenpaugh KD, Howe WJ, et al. Structure-based design of novel HIV protease inhibitors: carboxamide-containing 4-hydroxycoumarins and 4-hydroxy-2-pyrones as potent nonpeptidic inhibitors. J Med Chem, 1995, 38: 3624–3637)。

5 含胺磺酰连接基的结构类型

5.1 胺甲酰基的电子等排变换

在优化活性的过程中, 对 C3 α -苯基的间位取代的胺甲酰连接基进行了变换, 胺磺酰基是胺甲酰基的二价等排体, 在本项目中都能履行氢键给体 (NH) 和接受体 (氧原子) 的功能。化合物 46 是优化过程中的一个有代表性的化合物, 它是化合物 33 的优化改构物: 将香豆素母核变换为环辛并吡喃酮结构; C3 α -乙基替换为环丙基; C3 α -苯基间位的胺甲酰基换成胺磺酰基, Boc-甘氨酸变成 4-氰基苯, 由于这些变换都是采纳了提高活性的结构因素, 因而抑酶活性由化合物 33 的 $K_i = 160 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到 43 的 $15 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 后者抑制病毒生长的 IC₅₀ = 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Harvey I, Skulnick HI, Johnson PD, et al. Structure-based design of sulfonamide-substituted non-peptidic HIV protease inhibitors. J Med Chem, 1995, 38: 4968–4971)。



化合物 45 的抑酶活性 $K_i = 4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 但结构中含有手性的组氨酸残基, 为了减少手性中心, 同时将胺甲酰基改换为胺磺酰基, 合成了一系列化合物, 其中 47 的 $K_i = 1.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 抑制病毒生长的活性 IC₅₀ = 1.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (对细胞和酶的活性相差 1 000

倍!)。进而用不同取代的苯环、吡啶、喹啉等替换化合物 47 中的甲基咪唑环, 然而这些化合物的抑制酶和病毒感染细胞的活性都低于 47。含有两个手性中心的 47 分离成 4 个立体异构单体, 分别测定酶活性的 K_i 值最低为 $0.52 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最高 $1.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 对感染 HIV 细胞的 IC₅₀ 为 $0.9\sim 2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

化合物 47 与 HIV2 蛋白酶复合物晶体结构显示 (图 7), 母核 C6 连接的 α -乙基和苄基分别结合于 S1' 和 S2', C3 α -环丙基进入 S1 腔, C3 α -苯基进入 S2 腔, 甲基咪唑环结合于 S3 腔内。在氢键结合的特征上, 4-羟基吡喃酮环与 Asp25 和 Asp25' 以及 Ile50 形成氢键网络, 与前述的化合物相同; 磺酰基的氧原子与 Asp30' 形成氢键, 咪唑氮原子作为氢键接受体与 Asp29' 结合 (Thaisrivongs S, Janakiraman MN, Chong KT, et al. Structure-based design of novel HIV protease inhibitors: sulfonamide-containing 4-hydroxycoumarins and 4-hydroxy-2-pyrones as potent non-peptidic inhibitors. J Med Chem, 1996, 39: 2400–2410)。

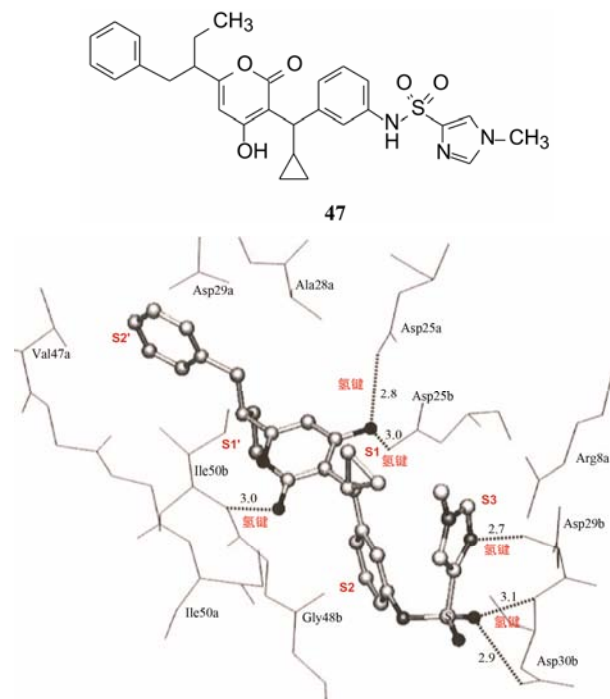


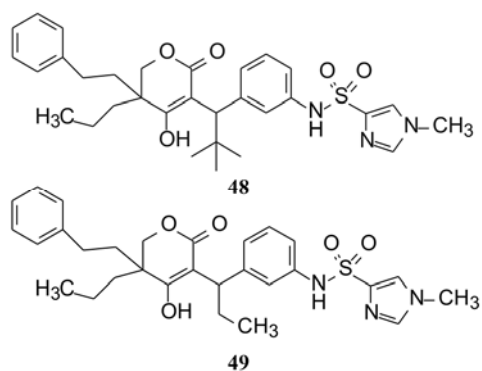
图 7 化合物 47 与 HIV2 蛋白酶复合物晶体结构

5.2 整合优势片段于一体

先导物多位点的构效关系研究, 得到如下对活性具有优势贡献的片段或基团: ① 母核为 4-羟基吡喃酮; ② 6,6-二取代片段, 其中一个的尺寸不大于正丙基; ③ C3 α_1 -取代基为乙基或环丙基; ④ C3 α_2 -苯基的间位有连接基为胺磺酰基-NHSO₂; ⑤ C3 侧链的末端为疏水性基团, 优选为 *N*-甲基咪唑, *p*-取代苯

或吡啶。原则上讲, 将这些优选的结构片段组装成一个分子理应有较高的活性, 但由于每个优选的片段都是在不同的骨架结构中表现的, 经验告诉我们, 优选的片段共同组装在新的骨架上未必成为最佳分子, 因而继续探索和优化仍是必要的。

5.2.1 C6 基团的变换 以 4-羟基吡喃酮为母核, C3 α ₁ 固定为乙基, C3 α ₂ 固定为间位经胺磺酰连接的甲基咪唑的苯基, 变换 C6 的两个片段, 如二正丙基、二正丁基、二异丁基、二环丙乙基、(取代的) 苯乙基正丙基、苄基苯乙基等, 测定了抑酶活性 (K_i)、抑制病毒活性 IC₅₀ 和 IC₉₀, 其中化合物 **48** 的活性最佳, K_i 、IC₅₀、IC₉₀ 分别为 1.2 nmol·L⁻¹、0.3 μ mol·L⁻¹ 和 0.9 μ mol·L⁻¹。

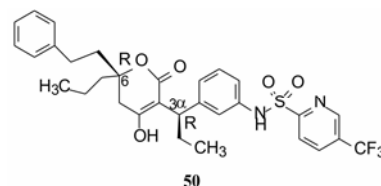


5.2.2 变换 C3 α -烷基 固定 C6 为正丙基和苯乙基或为二正丙基, 变换 C3 α -烷基为环丙基、叔丁基或氢, 对酶和病毒的活性最高的两个化合物是 **48** 和 **49**, **49** 的 K_i 、IC₅₀ 和 IC₉₀ 分别为 1.2 nmol·L⁻¹、0.15 μ mol·L⁻¹ 和 0.69 μ mol·L⁻¹。

5.2.3 变换末端基团和确定候选药物 固定 C6 为正丙基和苯乙基, C3 α 为乙基或环丙基, 变换 C3 α 侧链的末端基团, 合成了含有 *p*-CN、F 取代的苯基、8-喹啉基、2-(5-取代基)吡啶, 后者如 5-CN、F、CF₃、NH₂ 或 NO₂ 等基团, 其中活性最强的是化合物 **50**。**50** (结构式标出的是 3*aR*,6*R* 异构体) 含有两个手性

中心, 经拆分得到 4 个立体异构体, 列于表 7。

表 7 通式 **50** 的差向异构体



50	K_i /nmol·L ⁻¹	IC ₅₀ / μ mol·L ⁻¹	IC ₉₀ / μ mol·L ⁻¹
3 <i>R</i> ,6 <i>S</i>	0.018	0.14	0.84
3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>	0.006	0.03	0.10
3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>	0.22	1.70	3.00
3 <i>S</i> ,6 <i>R</i>	0.032	0.41	1.80

化合物 **50** 的 3*aR*,6*R* 异构体是 4 个立体异构体的活性最强的化合物, 也是所有合成化合物活性最强的分子, 对沙奎那韦、茚地那韦和奈非那韦耐药的 HIV 病毒敏感度提高了 47~>125 倍, 对利托那韦耐药株敏感度提高 2~3 倍。对临床 AZT 耐药的 10 株病毒的 IC₉₀ 平均值为 0.16 μ mol·L⁻¹。大鼠灌胃的口服生物利用度 $F=30\%$, 半衰期 $t_{1/2}=5.4$ h, 健康受试者单次剂量 100~1000 mg 是安全可以耐受的。化合物 **50** 命名为替拉那韦 (tipranavir), 经临床研究表明对 HIV 感染患者可有效地控制血液中病毒载量, 遂于 2005 年 FDA 批准上市 (Turner SR, Strohbach JW, Tommasi RA, et al. Tipranavir (PNU-140690): a potent, orally bioavailable nonpeptidic HIV protease inhibitor of the 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone sulfonamide class. J Med Chem, 1998, 41: 3467-3476)。

5.3 替拉那韦与 HIV1 蛋白酶的结合方式

替拉那韦与 HIV1 蛋白酶复合物晶体结构表明 (图 8a 和 b), 4-羟基吡喃酮的羟基和氧原子与 Asp25'/Asp25' 和 Ile50/Ile50' 形成两对氢键; 磺酰基氧原子与 Asp30 和 Ile50 形成氢键; C6 的苯乙基和正丙基分别结合于 S1' 和 S2' 腔; C3 α -乙基和苯环分别进入 S1 和 S2 腔内; 胺磺酰基连接的末端基团结合于 S3 腔。

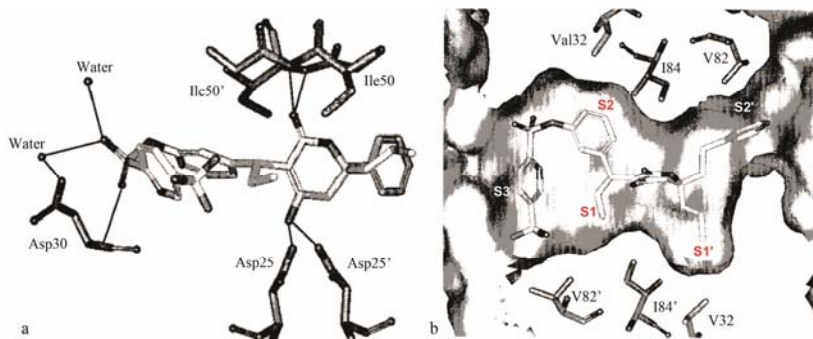


图 8 替拉那韦与 HIV1 蛋白酶的氢键结合 (a)、替拉那韦与 HIV1 蛋白酶的各个腔的结合 (b)