

· 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。

20 世纪 90 年代在基于靶标结构设计药物 (SBDD) 的研究中, 沙奎那韦是为数不多成功的一个。由于解析了 HIV 蛋白酶的作用机制和酶的三维结构, 研究者得以从最简单的基本单元入手, 在成药性理念的指导下, “生长”成与活性中心的形状、尺寸和电性呈互补结合的拟肽链, 同时“注入”过渡态的类似结构, 完成了首创的高活性的口服抗艾滋病药物沙奎那韦。进而研发者针对该首创药物的不足, 继续在结构生物学的指引下, 研制成活性更强、药代完善和克服耐药的两个更新产品。安普那韦和地瑞那韦在同一理念下研制成功, 但无论在宏观生物学和化学性质上, 还是微观的结合特征和热力学的焓-熵转化方面, 都更胜一筹。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2015-0365

基于结构设计的蛋白酶抑制剂沙奎那韦、安普那韦和地瑞那韦

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 作用靶标—HIV 蛋白酶

人免疫缺陷病毒 (HIV) 携有的 HIV 蛋白酶属天冬氨酸蛋白酶家族成员, 在 HIV 复制周期中有十分重要的功能, 即负责裂解 gag 和 gag-pol 的前体多蛋白分子, 生成构成性蛋白 (例如 p17、p24、p7、p6、p2、p1) 和功能性蛋白 (例如蛋白酶 p11、逆转录酶 p66/p51、整合酶 p32 等), 从而促使新生病毒颗粒成熟并具传染性。抑制 HIV 蛋白酶可干扰病毒复制的后期环节, 因而成为治疗艾滋病药物的一个主要作用环节。

HIV 蛋白酶是由两个相同的含 99 个氨基酸亚基构成的同二聚体, 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 (另一亚基为 Asp25'、Thr26'、Gly27 和 Ile50')。每个亚基含有 4 个结合腔穴 S1~S4 (另一组表示为 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。

当 HIV 病毒 RNA 转译 HIV 前体多肽长链蛋白生成后, HIV 蛋白酶水解其中特定的 Phe-Pro (或 Tyr-Pro) 肽键。人体的天冬氨酸蛋白酶如胃蛋白酶、肾素等的剪切位点是 Leu-Val 或 Leu-Ala, 而不水解 Phe-

Pro, 所以针对 Phe-Pro 的底物结构设计抑制剂可提高选择性作用。图 1 是底物蛋白与 HIV 蛋白酶结合模式和水解位点的示意图。

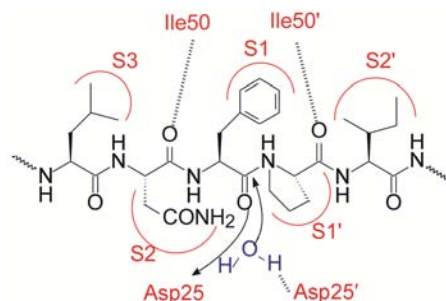


图 1 HIV 蛋白酶与底物蛋白结合模式和水解位点的示意图

2 过渡态类似物原理

过渡态类似物是一类稳定的化合物, 它模拟酶催化反应中底物转变成产物时的过渡态结构。若化合物类似于过渡态结构, 则与酶的结合力很强。过渡态类似物是以稳定的化合物模拟反应过程的过渡态或活化中间体结构, 利用静态化合物与动态中间体的结构相似性设计出的抑制剂, 从而与酶的亲合力非常强。HIV 蛋白酶对天然底物 Phe-Pro 特定肽键

水解时要经过一个过渡态。模拟肽键水解的过渡态结构, 在结构中插入一个“CH₂”, 模拟肽键的酰基 C=O 由 *sp*² 杂化碳原子转变成 *sp*³ 杂化态, 羟乙胺 -CH(OH)-CH₂-NH- 作为肽键 -CO-NH- 水解的过渡态的替换结构, 是众多 HIV 蛋白酶抑制剂的共有片段。例如本文讨论的 HIV 蛋白酶抑制剂以及降压药肾素抑制剂等。

3 从二肽 Phe-Pro 到先导化合物

Ghosh 等基于上述理念, 以 Phe-Pro (**1**, 没有活性) 为起始物, 将氨基和羧基分别用苄氧羰和叔丁基保护, 同时用羟乙基替换酰基, 合成了含有过渡态结构的拟二肽 (**2**), **2** 对 HIV 蛋白酶呈现弱抑制活性, IC₅₀=6500 nmol·L⁻¹。为了模拟底物序列, 在化合物 **2** 的氨基端连接天冬酰胺得到化合物 **3**, 活性提高 40 倍, IC₅₀=140 nmol·L⁻¹。然而 **3** 的氨基端再延长一个亮氨酸或羧基端增加异亮氨酸或两边同时增加都没有提高活性。

化合物 **3** 的中央羟基的构型对活性有影响, *R* 异构体强于 *S* 构型 (IC₅₀=300 nmol·L⁻¹)。该 *R* 构型的作用在以后的优化中作用更加显著。将 **3** 中的天冬酰胺的末端酰胺换成其他基团, 活性显著降低, 提示该酰胺基参与了重要的结合作用。苄氧羰基、天冬氨酸的酰胺基和苯丙氨酸的苄基分别结合于 S3、S2 和 S1

腔中, 脯氨酸的四氢吡咯环进入 S1' 腔, C-端的叔丁基进入 S2' 中。由于 **3** 具备了呈现较强活性的最小尺寸的骨架, 因而作为先导化合物进行了系统的优化。

4 先导物的优化

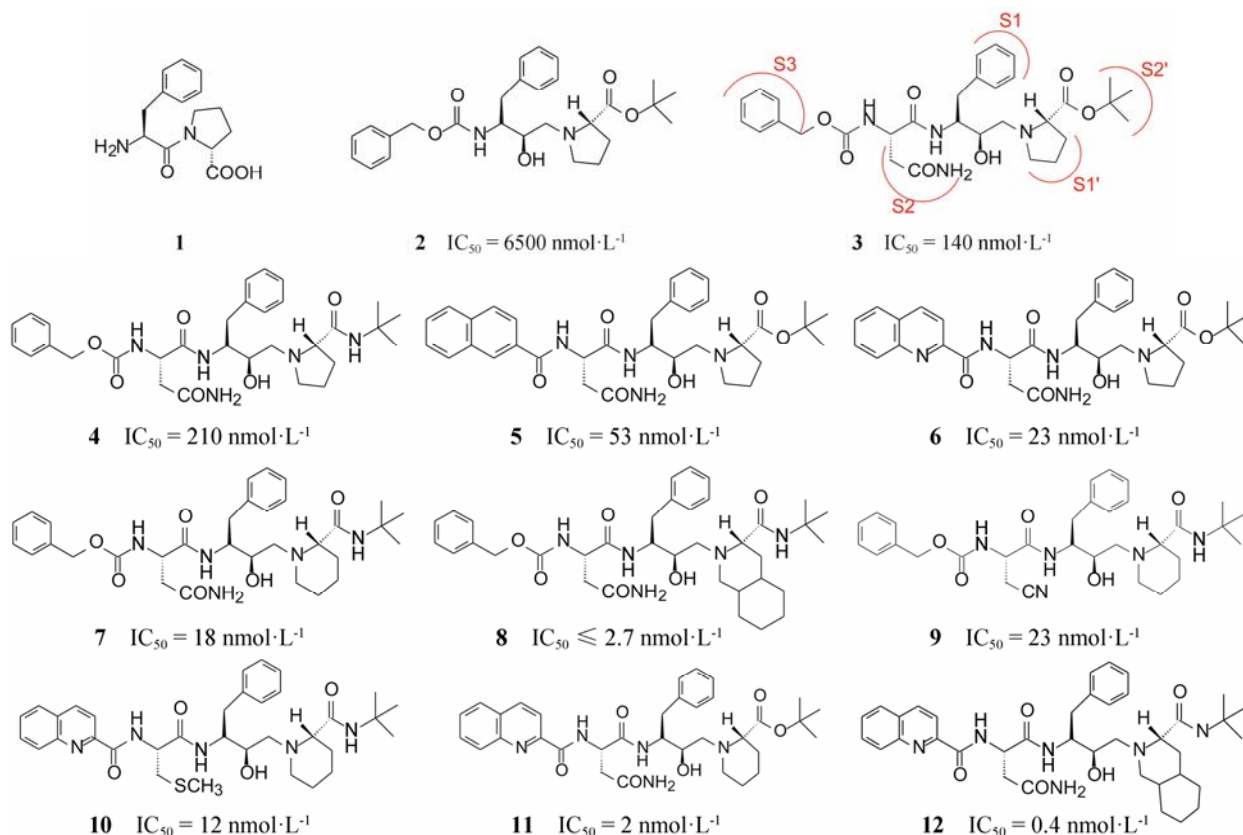
对上述进入结合腔的各个基团进行变换, 包括体积大小和电性强弱的变换, 设计合成了 100 多个含有类似过渡态的化合物, 优化的历程和构效关系概括如下。

4.1 C-末端的变换 化合物 **3** 疏水性的 C-端的叔丁基是必要的疏水基团, 将叔丁氧基换成叔丁胺基, 化合物 **4** 仍有活性 (略低), IC₅₀=210 nmol·L⁻¹。

4.2 N-末端的变换 化合物 **3** 的 N-末端也是疏水性基团, 将苄基换成 2-萘基, 以增加疏水性, 化合物 **5** 活性提高到 IC₅₀=53 nmol·L⁻¹; 2-萘基换成 2-喹啉片段, 化合物 **6** 的 IC₅₀=23 nmol·L⁻¹, 提示增加疏水性和基团体积有利于活性, 环上的氮原子参与了结合。

4.3 四氢吡咯的变换 化合物 **4** 的四氢吡咯扩环成哌啶环, 化合物 **7** 的活性提高到 IC₅₀=18 nmol·L⁻¹, 进而将哌啶换成十氢异喹啉化合物 **8**, 活性更加提高, IC₅₀≤2.7 nmol·L⁻¹, 提示增大体积和疏水性有利于同 S1' 腔的结合。

4.4 天冬氨酸片段的变换 化合物 **7** 的天冬氨酸片段变换为 β-氰基丙氨酸 (**9**) 或 *S*-甲基半胱氨酸 (**10**)



仍有较高的活性, IC_{50} 分别为 23 和 $12 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 但变化不大。

4.5 综合各优化因素一候选化合物的确定 综合上述有代表性的化合物的构效关系, 设计合成了化合物 **11** ($IC_{50}=2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 结构中羟乙胺的手性碳为 *R* 构型, 而 *S*-差向异构体 $IC_{50}=470 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示与催化中心结合的基团取向的重要性。将哌啶改换成十氢异喹啉环, **12** 成为活性最强的化合物 ($IC_{50}=0.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

评价高活性的化合物 **11** 和 **12** 对感染 HIV 细胞的抑制活性, 显示 **12** 活性最高, 对感染细胞的活性 $IC_{50}=2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对正常细胞毒性很低, $TD_{50}>10000 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在高浓度下 (近万倍的有效抑制浓度) 对人体胃蛋白酶, 组织蛋白酶 D、E 和人白细胞弹性硬蛋白酶等都未见抑制作用。化合物 **12** 定名为沙奎那韦 (saquinavir), 以甲磺酸盐形式进入临床研究, 表明可抑制 HIV1 和 HIV2 病毒在患者体内的繁殖。FDA 于 1997 年以 HIV 蛋白酶为靶标批准为第一个上市的抗艾滋病药物。

5 沙奎那韦与 HIV 蛋白酶的结合方式

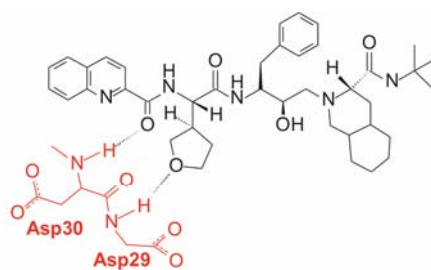
沙奎那韦与 HIV1 蛋白酶复合物单晶衍射图 (图 2) 表明, 羟乙胺的羟基处于催化中心的 Asp25 和 Asp25' 之间, 形成氢键结合网络; 在 S1 和 S1' 中的两个羰基与结构水分子形成氢键结合, 水分子又与顶盖上 Ile50 和 Ile50' 的 -NH- 形成氢键; 与十氢异喹啉相连的酰胺 -CO-NH- 分别与 Asp28 和 Gly48 形成氢键。天冬酰胺的骨架 -CO-NH- 与酶的 Asp30 骨架上的 NH 和末端 COOH 形成氢键; 叔丁基与 S2' 腔、苄基与 S1 腔、十氢异喹啉环与 S3' 腔发生疏水-疏水相互作用。这些基团的配置恰好适于 *R* 构型的羟基发生有利的结合, 从而揭示了比 *S* 构型活性高的结构基础 (Krohn A, Redshaw S, Ritchie JC, et al. Novel binding mode of highly potent HIV proteinase inhibitors

incorporating the (*R*)-hydroxyethylamine isostere. J Med Chem, 1991, 34: 3340–3342)。

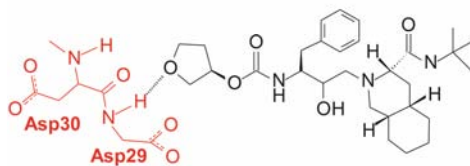
6 由沙奎那韦演化的后续药物

6.1 安普那韦 沙奎那韦是以蛋白酶为靶标的首创性口服抗艾滋病药物, 应用中有两个重要缺点: 生物利用度低和代谢稳定性差, 这是因为分子量大 (游离碱 669.84) 和肽类结构的缘故。因而后续的研究是以沙奎那韦为起始物, 研制消除肽结构和降低分子量的抑制剂。

首先, 根据平行的研究, 发现用四氢呋喃置换结合于 S2 腔的酰胺片段仍呈现活性, 因而合成了化合物 **13**, 活性显著提高, 抑酶活性 $IC_{50}=0.054 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对感染细胞的 $IC_{95}=8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。四氢呋喃的结合模式是环中氧原子与 Asp29 的 NH 形成氢键。**13** 虽然活性高, 但分子仍然很大, 相对分子质量 682.88, 去除喹啉甲酰胺片段, 用胺甲酰片段连接 3*S*-羟基四氢呋喃环, 化合物 **14** 尺寸减小, 相对分子质量为 514.69, 但因失去了与 S3 腔结合, 活性降低为 $K_i=87 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Thompson WJ, Ghosh AK, Holloway MK, et al. Tetrahydrofuranlyglycine as a novel, unnatural amino



13 $IC_{50}=0.054 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$



14 $K_i=87 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

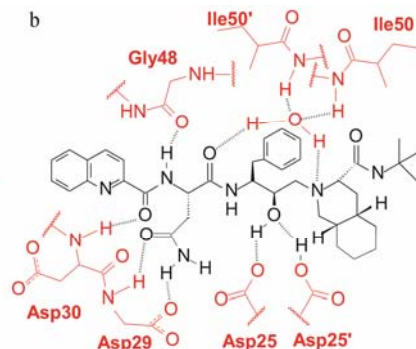
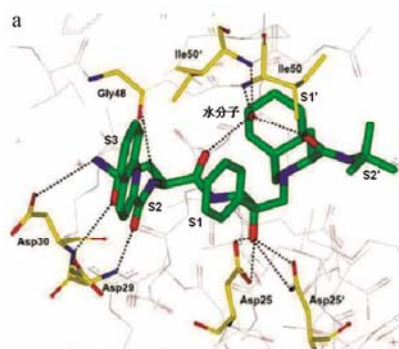
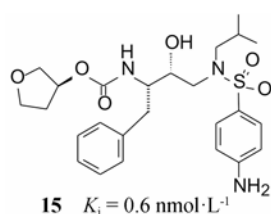


图 2 沙奎那韦与 HIV1 蛋白酶复合物晶体结构图 (a) 和沙奎那韦发生的氢键结合示意图 (b)

acid surrogate for asparagine in the design of inhibitors of the HIV protease. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 801–803)。

根据平行研究所获得的构效关系信息, 可以对化合物 **12** 的十氢异喹啉和叔丁胺甲酰片段加以变换: 将模拟过渡态羟乙胺片段中的胺基用苯磺酰连接, 以替换十氢异喹啉, 也仍然结合于 S2', 叔丁胺片段用 *N*-异丁基替换, 结合于 S1', 这样就消除了 3 个手性碳原子, 简化了分子结构 (MW = 505.63)。通过制备并评价各手性中心的构型对活性的影响, 揭示化合物 **15** 活性最强, 对酶的抑制活性 $K_i = 0.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (HIV1) 和 $19 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (HIV2), 抑制 HIV 感染细胞的活性 $\text{IC}_{50} = 40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**15** 的水溶性显著提高, $S = 190 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Ghosh AK, Kincaid JF, Cho W, et al. Potent HIV protease inhibitors incorporating high-affinity P2-ligands and (*R*)-(hydroxyethylamino) sulfonamide isostere. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8: 687–690)。由于有良好的药效学和药动学性质, GSK 公司将其进入开发阶段, 命名为安普那韦 (amprenavir), 经临床研究于 1999 年 FDA 批准上市。



安普那韦与 HIV1 蛋白酶复合物晶体结构表明, 4 个疏水性片段分别结合于 4 个疏水腔中: 四氢呋喃进入 S1, 苄基进入 S2, *N*-异丁基进入 S1', *p*-氨基苯基进入 S2' 中, 如图 3a 所示。杂原子与活性中心形成氢键的状态是: 呋喃环中的 O¹ 与 Asp29 和 Asp30 形成弱结合氢键; O² 未见氢键形成; O³ 与磺酰的一个氧原

子 O⁵ 经结构水的介导, 与 Ile50 和 Ile50' 的 -NH- 形成氢键, 中央的 4-OH 与 Asp25、Asp25' 发生氢键结合; 磺酰苯基的 *p*-氨基与 Asp30' 形成氢键, 这些对提高分子的水溶性有重要贡献。图 3b 是安普那韦与蛋白酶的晶体结构的氢键结合图 (Kim EE, Baker CT, Dwyer MD, et al. Crystal structure of HIV-1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable inhibitor of the enzyme. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 1181–1182)。

6.2 地瑞那韦 安普那韦 (**15**) 的成功激励 Ghosh 等进一步研发抗耐药的 HIV 抑制剂, 优化的目标是对耐药株 HIV 蛋白酶有抑制活性, 结构优化的部位是变换四氢呋喃环, 例如用四氢噻吩或氧化成环丁砜替换四氢呋喃 (同时也变换 P2' 的苯环取代基为甲氧基), 得到 **17** 和 **18**, 结果表明仍保持高抑酶活性。因环丁砜活性高于硫醚, 进而在环上做烷基取代。此外, 分析砜基的两个氧原子可能与 S2 腔的 Asp29 和 Asp30 形成两个氢键, 并参照曾经探索过的并合双四氢呋喃片段的有效性, 合成了有代表性的化合物 **21**~**24**, 表 1 列出了化合物结构、抑酶活性和抑制 HIV 感染细胞的活性数据 (Ghosh AK, Kincaid JF, Walters DE, et al. Nonpeptidic P2 ligands for HIV protease inhibitors: structure-based design, synthesis, and biological evaluation. *J Med Chem*, 1996, 39: 3278–3290)。

化合物 **21**~**24** 对酶和细胞都显示高抑制活性, 其中 **21** 对耐受多种药物的 HIV 病毒蛋白酶和细胞仍有高活性, 而且 **21** 与蛋白酶结合生成的复合物离解速率很低, 低于其他“那韦”类抑制剂 2~3 个数量级, 预示有较长持续性作用 (King NM, Prabu-Jeyabalan M, Nalivaika EA, et al. Structural and thermodynamic basis for the binding of TMC114, a next-generation human immunodeficiency virus Type 1 protease inhibitor. *J Virol*, 2004, 78: 12012–12021)。

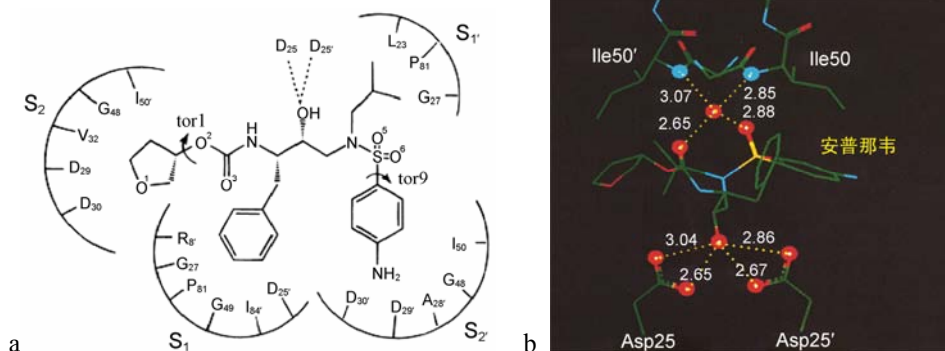
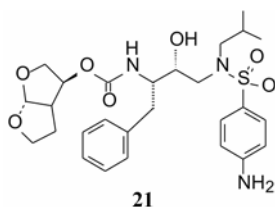


图 3 安普那韦与 HIV1 的结合模式示意图 (a) 和晶体结构图 (b)

表 1 变换四氢呋喃片段的化合物及其活性

化合物	R ₁	R ₂	K _i /nmol·L ⁻¹	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
15		NH ₂	1.6	15
16		OCH ₃	1.5	12
17		OCH ₃	2.5	47
18		OCH ₃	1.2	19
19		OCH ₃	1.4	18
20		NH ₂	1.5	40
21		NH ₂	2.1	4.5
22		OCH ₃	1.1	1.4
23		CH ₃	1.2	3.5
24		OCH ₃	2.2	4.5



化合物 **21** 定名为地瑞那韦 (darunavir), 相对分子质量为 547.66, 水溶性 0.15 mg·mL⁻¹, 分配系数 log*P* 1.8。与利托那韦 (CYP3A4 抑制剂) 合用的口服生物利用度 *F* = 82%, 半衰期 *t*_{1/2} = 15 h, 经临床研究, FDA 于 2006 年批准上市。

地瑞那韦与 HIV1 蛋白酶的复合物晶体结构提示, 双四氢呋喃环、苄基、*N*-异丁基和氨苯基分别结合于 S2、S1、S1'、和 S2'腔内, 各极性基团或原子与活性中心形成的氢键与安普那韦相似 (图 3), 唯一的不同是由于并合了一个四氢呋喃环, 新的氧原子形成了更多的氢键, 图 4 是地瑞那韦与 HIV1 蛋白酶的

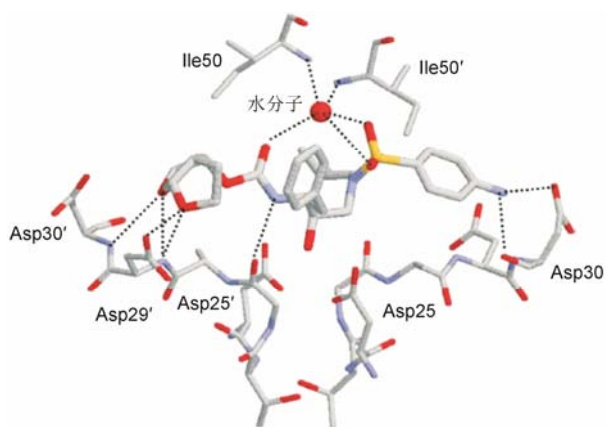


图 4 地瑞那韦与 HIV1 蛋白酶的复合物晶体结构

复合物晶体结构, 虚线表示氢键的结合 (Tie YPI, Boross YF, Wang L, et al. High resolution crystal structures of HIV-1 protease with a potent non-peptide inhibitor (UIC-94017) active against multidrug-resistant clinical strains. *J Mol Biol*, 2004, 338: 341–352)。

7 沙奎那韦、安普那韦和地瑞那韦与蛋白酶结合的热力学分析

沙奎那韦、安普那韦和地瑞那韦都是由 Ghosh 研究组设计合成并成功研发的, 而且每个药物都是在前面的基础上优化得到的, 因而与酶的结合作用逐渐增强, 地瑞那韦的结合自由能最大。比较三者的配体效率, 也是随着结构的优化, 配体效率增高, 表明后续研发药物的原子有助于结合效率的提高。另一个重要参数是焓和熵对结合能的贡献。沙奎那韦的结合能全部是熵的贡献, 提示疏水和范德华作用是酶结合的驱动力, 焓对结合的作用是负贡献 (不利的焓变 ΔH 为正值); 安普那韦的焓 (ΔH) 与熵 ($-T\Delta S$) 的贡献大约各半, 提示氢键和电性作用与范德华作用的贡献相近; 地瑞那韦对结合能的贡献主要是焓贡献, 是由于多个氢键结合, 提高了结合的特异性, 因此地瑞那韦的配体效率最高。表 2 列出了这三个药物的热力学参数 (Mittal S, Bandaranayake RM, King NM, et al. Structural and thermodynamic basis of amprenavir/darunavir and atazanavir resistance in HIV-1 protease with mutations at residue 50. *J Virology*, 2013, 87: 4176–4184)。

表 2 沙奎那韦、安普那韦和地瑞那韦的热力学参数

药物	相对分子质量	K _i /nmol·L ⁻¹	ΔG /kJ·mol ⁻¹	配体效率	ΔH /kJ·mol ⁻¹	$-T\Delta S$ /kJ·mol ⁻¹
沙奎那韦	669.84	2.0	-53.5	0.26	13.0	-66.5
安普那韦	505.63	0.39	-55.2	0.38	-28.8	-26.4
地瑞那韦	547.66	0.004 5	-62.7	0.39	-53.1	-9.6