

## • 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多维性质。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。

达沙替尼是治疗对伊马替尼产生耐药的白血病患者药物,因而被认为是第二代产品。其实,它是全新的首创性药物,从先导物的发现到优化过程,没有借鉴所谓第一代的结构和药效团信息,而是完全借助药物化学的探索和构效关系的分析,精雕细刻地构建出全新结构的分子,在这当中,分子设计与晶体结构和分子模拟的互动而相得益彰。

(编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2016-0592

# 首创的二代药物达沙替尼

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 作用靶标和评价模型

酪氨酸激酶已是药物治疗许多疾病的靶标,在 Src 激酶家族中的 Lck 激酶主要表达于 T 细胞和自然杀伤细胞 (NK cell) 中, Lck 激酶对 T 细胞的发育、激活和 T 细胞抗原受体的信号通路都起着重要作用。Lck 激酶的生化功能是将 T 细胞的免疫受体酪氨酸活化域的残基磷酸化,经过下游的信号转导,导致 T 细胞活化和增殖。Lck 抑制剂可阻止 T 细胞的活化,治疗 T 细胞介导的自身免疫疾病和炎症,如多发性硬化病、关节炎和牛皮癣等。

研发 Lck 激酶抑制剂,评价化合物的活性包括:酶、细胞、半体内以及整体动物实验。用以下 5 种方法:①生化方法测定对鼠源和人源的重组 Lck 激酶的抑制活性。这两种酶的同源性 84.4%,实验表明,受试物对这两种酶的活性相近且平行,构效关系有认同性。②对 T 细胞增殖的抑制活性是用单抗的方法测定 96 孔板的放射性  $^3\text{H}$ -胸苷的含量,评价 T 细胞增殖的效果。③评价化合物抑制白介素-2 (IL-2) 生成的活性用灌胃小鼠,经半体内放免方法测定血中 IL-2 水平。④评价化合物抑制肿瘤坏死因子 (TNF) 的生成作用是用小鼠静脉注射脂多糖造模,放免法测定血中的 IL-2 水平。⑤用关节炎佐剂致大鼠炎症,通过测量后趾肿胀的体积,评价化合物抑制大鼠炎症的活性。

## 2 苗头化合物及其演化

**2.1 苯胺片段的变换** BMS 公司经高通量筛选库化合物,发现氨基噻唑酰胺 (**1**) 对小鼠和人源 Lck 酶有

弱抑制活性,  $\text{IC}_{50}$  分别为  $6.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 但抑制 T 细胞活性很弱  $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。化合物 **2** 是合成 **1** 的中间体 (Boc 保护), 抑酶活性强于 **1** 一倍。为此, 固定 Boc 基团, 变取代的苯胺部分, 化合物及其结构列于表 1。

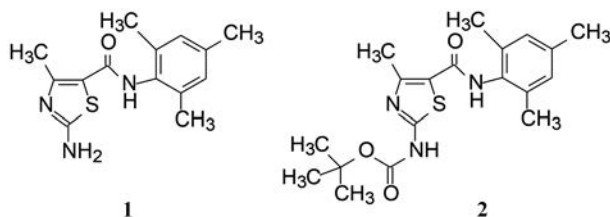
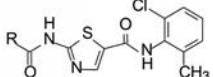


表 1 的数据显示, 变取代的苯胺片段的活性起伏很大, 构效关系比较窄促, 表现在①酰基芳仲胺活性较高 (**2**~**6**), 而酰基脂肪族仲胺或叔胺活性弱 (**7**~**11**); ②苯环的 2,6 位同时存在小取代基的活性强于只有单边取代的化合物 (**12**~**16**), 也强于尺寸较大的双取代化合物 (**17**~**20**)。

**2.2 噻唑环上酰胺的变换** 上节的优化操作表明苯环的 2,4,6-或 2,6-取代基有利于活性, 为此, 固定苯环上的取代基, 变换叔丁氧羰基, 考察对 Lck 的抑制活性, 有代表性的化合物列于表 2。

此外, 用平行合成的方法合成了各种酰胺和脲基的取代, 结果表明抑制 Lck 酶仍维持高活性。化合物 **2** 的叔丁基换成甲基 (**21**), 尺寸变小活性增强。叔丁氧基变成芳基、杂芳基或烷基脲化合物的活性也提高。

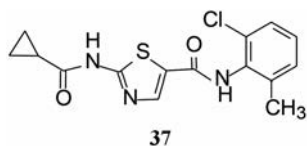


**Table 4** SAR of compounds with varied 2-acylamino group


Compd.	R	h-Lck	
		IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	
37	Cyclopropyl	0.035	
40	Cyclobutyl	>3.13	
41	Cyclopentyl	1.34	
42	2-Thienyl	2.23	
43	3-Thienyl	0.017	
44	1-Methylpropyl	>3.13	
45	2-Methylpropyl	>3.13	

样, **37** 成为优选的化合物。

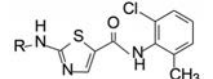
**2.6 里程碑化合物** 化合物 **37** 对 h-Lck IC<sub>50</sub> 呈现高活性, 而且对泛 Src 家族和 Jak3 激酶有强效抑制作用, 而对其他家族激酶的活性很低, 选择性达 300~700 倍以上。37 的抑制 T 细胞增殖活性 IC<sub>50</sub> 值为 0.88 μmol·L<sup>-1</sup>, 可认为是个里程碑化合物 (Wityak J, Das J, Moquin RVD, et al. Discovery and initial SAR of 2-amino-5-carboxamidothiazoles as inhibitors of the Src-family kinase p56<sup>Lck</sup>. Bioorg Med Chem Lett, 1993, 13: 4007-4010)。



### 3 芳杂环替换环丙酰基的变换

**3.1 探索不同的芳杂环和位置异构对活性影响** 前述表 3 和表 4 的构效关系表明, 环丙酰胺基的结合位点是紧缩的构象限制的空间, 柔性的或大体积的片段不利于结合。下一步的结构优化是固定 2-甲基-6-氯苯胺的片段不变 (已是优化了的结构因素), 用芳杂环替换环丙酰基, 就是将羰基的双键融合在芳杂环系统中, 以保持紧缩的结构限制状态。表 5 列出了该系列的化合物活性。

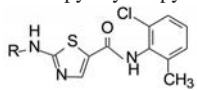
表 5 的构效关系提示, 2-吡啶基替换环丙甲酰基










**Table 5** Effect of varied aromatic heterocyclic compounds on the activities


Compd.	R	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	
		h-Lck	T cell
37	c-Propioformyl	35	884
46	2-Pyridyl	1.2	140
47	3-Pyridyl	6.7	870
48	4-Pyridyl	10	270
49	4-Pyridazinyl	4	350

化合物 (**46**) 抑制 Lck 激酶和 T 细胞增殖活性优于化合物 **37**, 但 **46** 的位置异构体 3-或 4-吡啶基的活性变弱 (**47**、**48**)。为了揭示是否因不同位置的氮原子碱性不同而影响活性的因素, 合成了碱性更强的 4-吡啶基化合物 (**49**), 其活性在 **46** 和 **47** 之间, 提示不是碱性的强弱所致。

**3.2 2-吡啶基或嘧啶基的环上取代** 化合物 **37** 是优选的结构片段, 对环上作取代基变换以考察构效关系, 合成的有代表性的化合物列于表 6。结果显示, 2-吡啶系环上引入 2'-或 3'-甲基化合物 (**50**、**51**) 的活性与 **44** 相当, 但 4'-或 5'-甲基取代 (**52**、**53**) 活性降低 5~7 倍。双取代的化合物 (**54**、**55**) 仍维持高活性。2-嘧啶环上 4',6'-二甲基取代的化合物 **56** 活性下降。这些信息进一步说明该处与酶的结合具有严格的结构要求。

**Table 6** SAR of substituted pyridyl or pyrimidinyl compounds


Compd.	R	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	
		h-Lck	T cell
46		1.2	140
50		<1	106
51		1.1	106
52		0.5	85
53		7.3	365
54		4	140
55		1 (K <sub>i</sub> = 130 pmol·L <sup>-1</sup> )	80
56		50	-
57		2	883

化合物 **55** 抑制激酶和抑制 T 细胞增殖活性都强于其他化合物, 但与酶活性相比对细胞仍有差距, 下一步是优化抑制细胞的活性, 从透入细胞的能力入手。

**3.3 优化物化和药代性质** 化合物 **54** 和 **55** 是对酶和 T 细胞活性较高的抑制剂, 杂环分别是二甲基吡啶和二甲基嘧啶, 作为新的里程碑化合物, 为优化药代性质, 在吡啶或嘧啶的一个甲基上连接含有弱碱性的基

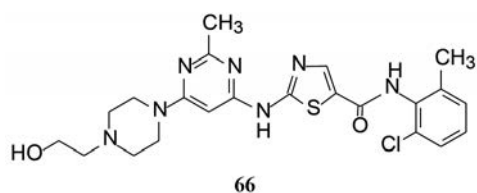
团, 以便提高极性增加溶解性, 改善药代动力学性质, 当然, 前提是保持对酶和 T 细胞的抑制活性。所合成的有代表性化合物列于表 7 中。

**Table 7** Activity of compounds with varied alkali side chain

Compd.	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	
				h-Lck	T cell
54	CH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4	140
55	N	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1 (K <sub>i</sub> = 130 pmol·L <sup>-1</sup> )	80
58	CH		H	<0.2	75
59	CH		H	0.5	8
60	CH		H	<0.5	2
61	N	H		0.5	3
62	N	CH <sub>3</sub>		1.3	5
63	N	CH <sub>3</sub>		0.7	7
64	N	CH <sub>3</sub>		0.2	23
65	N	CH <sub>3</sub>		0.7	4
66	N	CH <sub>3</sub>		0.4	3

表 7 中的 3 个吡啶系列的化合物抑制 Lck 激酶的活性都很高, 它们之间难以区分, 但评价对细胞的活性则吗啉与咪唑化合物 (59、60) 的活性高于乙醇胺 (58)。这种趋势也反映在噻唑系列中。吗啉直接连在噻唑环上 (61、62) 抑制酶和 T 细胞增殖的 IC<sub>50</sub> 都在 10 nmol·L<sup>-1</sup> 以下。不过化合物 66 的活性最强, 是噻唑环上连接羟乙基哌嗪片段, 抑制 T 细胞的活性为化合物 55 的 30 倍。进而用多种激酶评价了化合物 66 的选择性作用, 表 8 列出的有代表性的数据表明 66 对 Src 家族有较强的抑制活性。

大鼠以剂量 10 mg·kg<sup>-1</sup> 静脉注射和灌胃化合物 66, 血浆达峰浓度 C<sub>max</sub> 为 2 μmol·L<sup>-1</sup>, t<sub>max</sub> 为 1 h, 半衰期 t<sub>1/2</sub>



**Table 8** Activity of compound 66 on kinases

Kinase	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	Kinase	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>
Bcr-Abl	1.0	MEK	1 700
Sic	0.50	VEGFR-2	2 000
Lck	0.40	CDK2	5 000
Yes	0.50	IKK	>50 000
c-kit	5.0	AKT	>50 000
PDGFRα	28	FAL	>50 000
P38	100	IGF-1R	>50 000
Her1	180	IR	>50 000
Her2	710	MK2	>50 000
FGFR-1	880	PKCα, δ, τ, ζ	>50 000

和平均保留时间为 4 h, 血浆清除率 CL 为 29 mL·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>, 分布容积 V<sub>ss</sub> 为 12 L·kg<sup>-1</sup>, 大鼠灌胃的生物利用度 F 为 65% (Chen P, Norris D, Das J, et al. Discovery of novel 2-(aminoheteroaryl)-thiazole-5-carboxamides as potent and orally active Src-family kinase p56Lck inhibitors. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14: 6061-6066; Das J, Chen P, Norris D, et al. 2-Aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure activity relationship studies toward the discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, BMS-354825) as a potent pan-Src kinase inhibitor. J Med Chem, 2006, 49: 6819-6832).

#### 4 候选药物的确定和达沙替尼上市

化合物 66 是泛 Src 激酶的高活性和选择性抑制剂, 具有良好的物理化学和药代动力学性质, 为此, BMS 公司确定 66 为候选化合物, 定名达沙替尼 (dasatinib)。经 III 期临床研究, 于 2006 年 FDA 批准上市, 用于治疗伊马替尼耐药或不能耐受的慢性骨髓性白血病所有病期的成人患者。同时, FDA 也批准达沙替尼治疗对其他疗法耐药或不能耐受的费城染色体阳性的急性淋巴细胞性白血病成人患者。

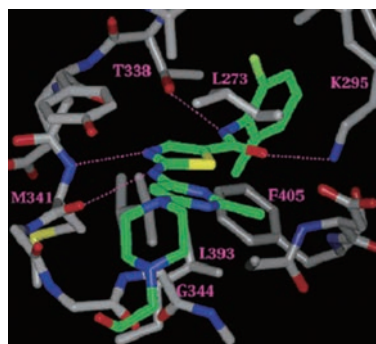
#### 5 达沙替尼与 Src 激酶的结合模式

达沙替尼 (66) 与 Abl 复合物单晶衍射揭示了与酶活性中心的结合特征 (图 2), 二者之间形成 3 组氢键是 ① 苯胺的 NH 与 Met318 的羰基之间; ② 噻唑环上氮原子作为氢键接受体与 Met318 的 NH 形成氢键; ③ 另一个酰胺的氮原子与 Thr315 的羟基形成氢键。形成的这 3 组氢键对于达沙替尼与突变耐药的 Abl 结合是非常重要的。而且, 这对于揭示达沙替尼与 Src 激酶的结合特征也是有帮助的。图 3 是达沙替尼分子对接到 Src 激酶的 ATP 结合位点并经能量优化得到的分子模拟图。在 Abl 复合物的 3 组氢键同样在与 Src 激酶的结合中出现。此外, 达沙替尼酰胺羰基与 Lys295 也



**Figure 2** Diagram for crystallography of dasatinib-Abl kinase complex

形成氢键, 2-氯-6-甲基苯甲酰胺处于蛋白深部的疏水腔中, 取代的嘧啶环处于 Leu273 和 Gly344 形成的疏



**Figure 3** Docking diagram of dasatinib to Src kinase

水裂隙中, 这也解释了这部分结构不允许有较大和柔性的片段存在。此外, 助溶基团 2-羟乙基哌嗪伸向水相, 未与酶发生特异性结合。