

• 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。

帕那替尼与伊马替尼为同类产品,都是口服治疗慢性粒细胞白血病药物,虽面市晚10年,却是针对伊马替尼耐药的患者,创新性显著,在研发的源头性和路径上具有独立和独创的品格。在设计理念和化学模块的应用方面虽然从同类药物中有所借鉴,但在分子设计—合成—评价—构效关系分析的循环反馈中,将结构生物学、分子模拟和药物化学的交织应用与印证,做到了精雕细刻的考察,甚至是反复地验证,呈现给读者创药的艰辛与严谨。(编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2016-0688

基于靶标结构设计的帕那替尼

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)

慢性粒细胞白血病(CML)是由于细胞核中第9号和第22号染色体的相互易位,使后者变短,被称作费城短染色体,它携带有*Bcr-Abl*癌基因,表达产物为嵌合的*Bcr-Abl*融合蛋白,这个融合蛋白含有激活的*Abl*酪氨酸激酶结构域,导致细胞内信号转导的失控,引起CML的发生。2001年上市的伊马替尼是首创的强效*Bcr-Abl*抑制剂,治疗慢性粒细胞白血病,也开创了靶向药物分子治疗的新领域。但“道高一尺,魔高一丈”,患者反复应用伊马替尼,刺激了*Bcr-Abl*激酶发生变异,是白血病细胞获得性伊马替尼抗性的原因所在。此外,耐受伊马替尼的白血病细胞的*Src*家族的激酶也过分表达。所以,治疗耐受伊马替尼的CML,应是针对*Src/Abl*的双重抑制剂。

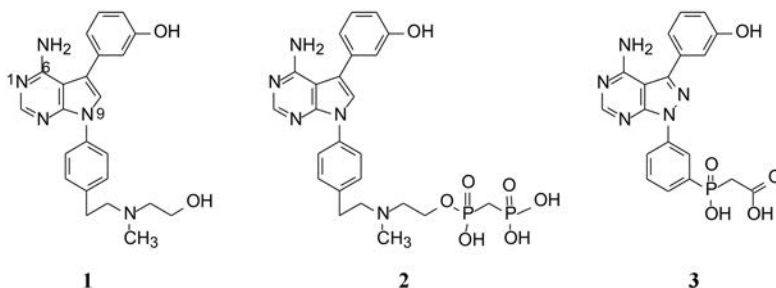
伊马替尼对激酶的选择性抑制作用,是由于结合在*Abl*裂隙处的P环套(P-loop)和活化环套处(A-loop),使得活化环套的构象发生变化,组成A-loop的DFG域(Asp-Phe-Gly)被挤出,移动了10 Å,呈非活化的DFG-out状态,形成新的疏水腔,供伊马替尼

占据,所以结合于DFG-out的激酶抑制剂选择性较强(Wang Y, Metcalf CA, Shakespeare WC, et al. Bone-targeted 2,6,9-trisubstituted purines: novel inhibitors of *Src* tyrosine kinase for the treatment of bone diseases. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 3067-3070)。

1 源于骨质疏松药物的研究

1.1 *Src*酪氨酸激酶抑制剂的研究

帕那替尼也是治疗CML药物,但开始的研究没有借鉴和模拟伊马替尼的思路,而是源于研究骨质疏松药物。实验证明,*Src*过表达可引起骨质疏松,*Src*基因敲除小鼠可避免骨质疏松的发生,在酪氨酸激酶中*Src*与骨质疏松关系密切。基于此,ARIAD公司确定以*Src*激酶为靶标研制抗骨质疏松药物。选择嘧啶并吡咯和嘧啶并吡唑类化合物作为筛选苗头,源于诺华和辉瑞公司曾报道过这类化合物具有活性。ARIAD通过分子对接和设计合成,发现化合物1抑制*Src*激酶 IC_{50} 值 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,进而变换结构,化合物2和3的 IC_{50} 值分别为 $4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



化合物1~3分子对接表明,6-氨基嘧啶并吡(啉)咯环占据ATP的腺嘌呤位置,氨基和N1分别与Met341和Ser342形成两组氢键,N9-苯环相当于核糖的疏水面,所连的极性链未与酶接触,进入水相中,磷(膦)酸基的引入有助溶作用,也是亲骨组织基团(Sundaramoorthi R, Shakespeare WC, Keenan TP, et al. Bone-targeted Src kinase inhibitors: novel pyrrolo-and pyrazolopyrimidine analogues. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 3063-3066)。

1.2 另一研发路径: 基于依赖周期蛋白激酶研发骨质疏松药物

在研究上述内容的同时,ARIAD还启动了以依赖周期蛋白激酶(CDK)为靶标,研发抗骨质疏松的课题。2,6,9-三取代嘌呤化合物purvalanol A(4)是CDK强效抑制剂。将4与Src激酶作分子对接,嘌呤环处于ATP结合的位点,但环的取向和氢键形成方式与ATP不同,C6的NH与Ser320、N7的氮原子与Met319形成氢键(图1)。

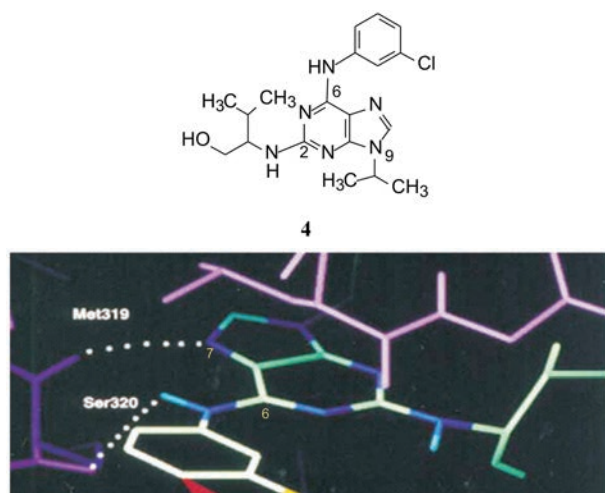


Figure 1 Hydrogen bonds formation in docking compound 4 to Src kinase

化合物4抑制CDK2的活性 IC_{50} 高达 $70 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,但抑制与骨质疏松相关的Src激酶活性不高, IC_{50} 值 $0.24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,由此设计合成了在嘌呤2,6,9-位变换不同取代的化合物,表1列出了化合物的结构与其活性(Wang W, Metcalf CA, III, Shakespeare WC, et al. Bone-targeted 2,6,9-trisubstituted purines: novel inhibitors of Src tyrosine kinase for the treatment of bone diseases. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 3067-3070)。

将化合物4的 R_1 异丙基去除,5的活性降低了6倍。将5的 R_2 异丙基换作间羟基苯乙基,6的活性为

$0.025 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,提示这个较大的片段有利于同靶标的结合。化合物6的 R_3 的氯苯基去除氯原子得到7,活性不受影响。 R_1 的烷基基换成环戊基,如化合物8的活性稍有降低,而 R_2 的苯环对位连接氧化膦基或亚甲二膦酸基,对影响骨生成的Src激酶抑制活性很强,其中9活性最高, IC_{50} $0.45 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,代号为AP23464,为里程碑式化合物。

Table 1 Structures and activity of 2,6,9-trisubstituted purine compounds

Compd.	R_1 (C2)	R_2 (C6)	R_3 (N9)	Src
				$IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
4				0.24
5				1.59
6				0.025
7				0.026
8				0.034
9				0.000 45
10				2.11
11				0.239
12				0.067

1.3 化合物9与Src激酶的结合模式

图2是化合物9与Src激酶复合物单晶在ATP结合腔中的相互作用图,9处于Leu273、Val281、Ala293、Thr338、Tyr340和Leu393等疏水侧链组成的疏水腔中,疏水链相向于9的平面环,而9的极性片段面背于疏水链。嘌呤环的N7与Met341骨架的CO-NH形成氢键,N9相连的3-羟基乙苯基深插入结合腔内,羟基与Lys239、Glu310和Asp404的极性侧链通过与结构水形成氢键网络。膦酸基进入水相中助溶,但也经水分子与端口的Trp340形成弱的氢键。C2相连的环戊基占据了ATP的核糖位置,佐证了核糖一侧亲水另侧疏水的性质。

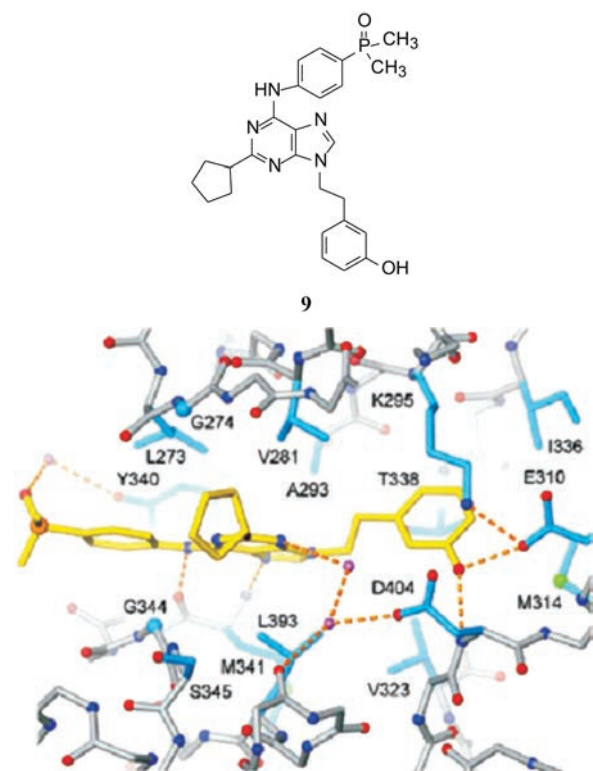


Figure 2 Crystallograph of the complex of compound **9** and Src kinase

2 转向研究 CML 的双重抑制剂

2.1 伊马替尼引起白血病的耐药性

持续应用伊马替尼引起的耐药性是由于激酶的突变,除了 Abl 变异之外,Src 酪氨酸激酶家族的 Lyn、Hck 和 Lck 等也发生突变,ARIAD 进而以耐药的 CML 为目标,研究对 Src/Abl 双靶标抑制的药物。

2.2 活性评价

化合物的体外活性评价用以下模型:对 Src 和 Abl 激酶的抑制活性,和用 K562 [表达有野生型 Bcr-Abl (WT) 人 CML 细胞],转染野生型 Bcr-Abl 的 Ba/F3 细胞,评价对两株细胞的抑制活性。实验表明,化合物的抑酶活性与抑制细胞活性的构效关系具有平行性。

2.3 以化合物 9 为先导物的分子设计

2.3.1 N9 亚乙基链的刚性化 化合物 **9** 对两个激酶 Src/Abl 的抑制作用 IC_{50} 都低于 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,根据 **9** 与 Src 晶体结构信息,认为将亚乙基的柔性连接基刚性化,以固定末端苯环的取向,应能提高活性。用分子对接方法将 N9 连接的乙苯基变换成 *trans*-乙炔苯 (**13**),由于双键的定向作用,使苯基结合于激酶突变后产生的特异性疏水腔。同时也合成了 *cis*-乙炔苯 (**14**) 以验证对接结果,活性评价表明反式异构体 **13** 的活性显著强于顺式体 **14**。进而模仿达沙替尼的结构片段,合成了 *trans*-乙炔 2,6-二甲苯基化合物 (**15**) 和 *cis*-乙炔 2,6-

二甲苯基 (**16**),抑制酶和细胞的活性进一步提高。表 2 列出了结构变换的化合物及其活性。

Table 2 Structure and activity of varied substituents on purine ring

Compd.	R	$IC_{50}/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$			
		Src	Abl	K562	Ba/F3
13	<i>E</i> -Phenyl	31.8	73.3	>1 000	-
14	<i>Z</i> -Phenyl	376	626	>1 000	-
15	<i>E</i> -2,6-(CH_3) ₂ Ph	1.78	5.93	115	122
16	<i>Z</i> -2,6-(CH_3) ₂ Ph	6.58	54.3	964	-
17	2,6-(CH_3) ₂ Ph	8.31	3.58	109	168
18	2-Cl-6- CH_3 Ph	5.56	2.77	109	200
19	2-Cl-Phenyl	128	69.4	1 394	2 006
20	4-Indolyl	198	16.7	954	1 541
21	4-Indazolyl	17	2.36	355	850
22	5- CH_3 -4-Indazolyl	<0.46	<0.46	10.5	37.3
23	(CH_3) ₂ N	3.74	17.6	217	269
24	1-Pyrrolinyl	1.43	19.5	89.1	123
25	1-Morpholinyl	<0.23	3.02	-	20.8
26	4- CH_3 -1-Piperazinyl	<0.23	6.8	23.5	73.7
27	1-Imidazolyl	<0.46	1.63	55.7	-
28	Methoxy	<0.46	1.8	52.4	32.7
29	Isopropoxy	<0.46	7.32	40.6	34.8
30	$\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{O}$	<0.46	1.57	26.7	51.7
31	4-(<i>N</i> - CH_3 -Piperidinyl)	<0.46	<0.46	28.8	285
32	3-Pyridinyloxy	<0.46	0.50	8.5	35.1

然而,化合物 **13** 和 **15** 对 Src 和 Abl 抑制活性相差较大,为提高对 Abl 激酶的活性,特别是抑制白血病细胞的活性,将二丙膦氧基片段换为体积较小的二甲基化合物 **17**,拉近了对 Src 和 Abl 的活性,为此固定二甲基膦氧基不变,变换 N9 乙炔基连接的芳环。

2.3.2 变换 N9 连接的化合物 化合物 **17** (2,6-二甲苯) 和 **18** (2-氯-6-甲基苯) 对两个酶都有较高活性,而且相近。只单边取代的化合物 **19** 活性降低。进而根据化合物 **9** 与 Src 晶体结构该处的氢键网络,合成的吡啶 (**20**) 和吡唑 (**21**) 化合物活性降低,可认为是单边取代的缘故。而 5-甲基-4-吡唑化合物 **22** 活性显著提高,可视作 2,6-双取代物,分子对接表明甲基进入到一个由 Ala293、Lys295 和 Thr338 组成的小疏水腔中,提供了熵的有利贡献。

2.3.3 C2 取代基的变换 为了考察 C2 的不同取代对活性的影响,在 C2 引入了经 C、N 和 O 连接的基团,表

明对酶和细胞的抑制活性都显著提高,尤其是化合物**25~32**对 Src 活性增高 10 倍以上,这是因为从化合物**9**与 Src 激酶的晶体结构揭示,C2 连接的疏水基团与 P-环套(容纳 ATP 核糖疏水面,核糖环面一边亲水,一边疏水)发生疏水相互作用。然而 Abl 的 P-环套折叠方式(构象)不同,Tyr272 残基部分地占据了空间,与 C2 的取代基有所碰撞,故而活性相对较弱。

3 另一路径—设计 DFG-out 构象的抑制剂

上述以化合物**9**为先导物所优化的双重抑制剂,N9 连接的片段所结合的位点是活化环套的 DFG 呈与 ATP 结合的状态,即结合于 DFG-in 构象的抑制剂。同时进行的另一途径是合成激酶的活化环套呈 DFG-out 构象的抑制剂,犹如伊马替尼结合样式。

3.1 分子对接提示的信息

Abl 激酶与抑制剂的晶体结构表明,当活化环套呈 DFG-out 构象时,抑制剂 N9 连接的二芳酰胺片段与酶形成了氢键网络,故而设计了化合物**33**并向呈 DFG-out 构象的 Abl(伊马替尼的结合状态)作分子对接,如图 3 所示。

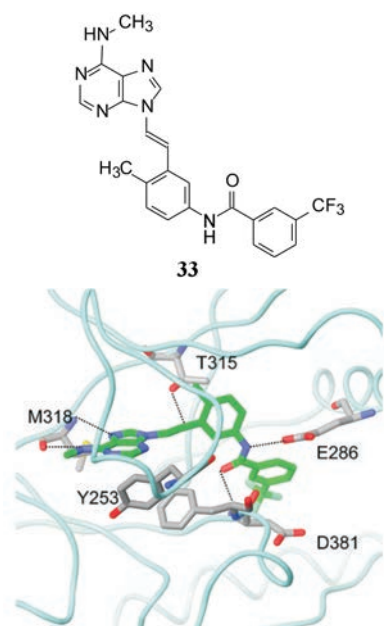


Figure 3 Docking diagram of compound **33** to Abl kinase

化合物**33**与 Abl 形成 4 组氢键: 绞链区的 Met318 与 N7 和 C1 上的甲胺 NH 生成两组氢键,N9 连接的酰胺与 DFG 的 Asp381 以及 Glu286 又形成两组氢键。末端的三氟甲基进入只有 DFG-out 构象才能形成的小疏水腔中(是由 Ile293、Leu298、Leu354 和 Val379 构成)。此外,反式双键与门户残基(gatekeeper) Thr315 的羟基形成非经典氢键。也由于 DFG-out 构象的缘故在 C2 处已没有当初容纳 ATP 核糖的空间,因而不宜

有 C2 取代基。因此,针对 DFG-out 构象的设计只能限制于 C6 和 N9 两位点的变换,而不能是前述的 2,6,9-三位点的变换。

3.2 C6 取代基的变换

合成了上述对接设计的化合物**33**(表 3),活性评价结果证实对 Src 和 Abl 都有较高活性,而且抑制白血病细胞活性也达到亚纳摩尔水平,而且在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下对正常细胞无作用,提示有高选择性。大鼠药代动力学实验表明**33**的口服利用度(F) 20%,半衰期很短,是由于 C6 的甲胺基发生氧化去甲基作用。故而合成了环丙基化合物**34**(环丙基代谢稳定性高于甲基),仍保持了酶和细胞活性,而改善了药代, $F = 40\%$,血浆中有高暴露量。环丙基的亲脂性强于甲基,推论进一步增高亲脂性会有利于活性。为此合成了芳环**35~40**,吡啶和嘧啶化合物活性都很高,但 2-吡啶基化合物**35**却很低,可能是由于 2'-N 与嘌呤 N1 的电性排斥作用,芳环扭转,破坏了共面性,而**36**和**37**没有排斥作用(但嘧啶也有邻位排斥作用,活性下降却不明显)。化合物**39**移植了**9**的模块,酶和细胞活性特别高。**40**的活性很弱。然而这些高活性化合物的大鼠药代都不好,因而将 C6-环丙胺基固定做进一步优化。

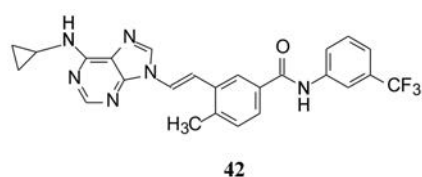
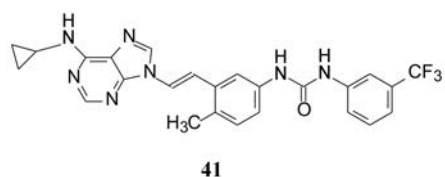
Table 3 Structures and activity of varied C6 substituent. NT = not test

Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹			
		Src	Abl	K562	Ba/F3
33	CH ₃	52	25	67	47
34	Cyclopropyl	91	74	95	57
35	2-Pyridyl	201	243	181	144
36	3-Pyridyl	9.3	26	2.7	NT
37	4-Pyridyl	4.7	9.9	3.7	2.1
38	4-Pyrimidyl	26	40	62	46
39	4-(CH ₃) ₂ PO-Ph	3.8	5.7	0.95	2.5
40	(CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ CH ₂	159	157	NT	NT

3.3 N9 连接片段的变换—借鉴尼洛替尼的设计

优化 N9 位置,借鉴了诺华的尼洛替尼的设计理念,合成了脲基和反向酰胺连接的化合物**41**和**42**。**41**几乎没有活性,而**42**(-CONH-)比区域异构体**34**(-NHCO-)活性强,犹如尼洛替尼活性强于伊马替尼(成功的模拟)。为此,以**42**为新起点,优化末端芳环。表 4 列出了化合物的结构与活性。

分析表 4 的构效关系表明,在三氟甲基苯环上再加入卤素(**43**,**44**)活性减弱,三氟甲基换成叔丁基(**45**),对 Src 活性提高一倍多,但抑制 Abl 作用降低,提



示这两种激酶结合腔的差异。化合物**46**为异丙基,酶和细胞活性都比叔丁基弱。然而**45**亲脂性过强, $c\text{-log } P$ 6.76, 超过化合物**42**, 综合考虑**45**不可取。含叔丁基的芳杂环化合物中异噁唑**48**的酶与细胞活性都很强, 但大鼠药代不如**42**。化合物**50**的活性优于**42**, 而且亲脂性比**42**降低10倍。有趣的是, 将上市药物尼洛替尼的“大块片段”连接在酰胺上, 化合物**51**活性非常高, 说明该优化的模块适用于本系列中, 也意味着与激酶结合的相似性。

Table 4 Structures and activity of prepared compounds based on lead compound **42**

Compd.	R	$IC_{50}/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$			
		Src	Abl	K562	Ba/F3
41	-	517	62	>1000	-
42	3- CF_3 -Ph	11	23	17	10
43	2-F-5- CF_3 -Ph	86	236	68	57
44	3- CF_3 -4-Cl-Ph	45	37	69	48
45	3- <i>t</i> -Bu-Ph	4.8	59	22	16
46	3- <i>i</i> -Pr-Ph	46	60	63	60
47		310	267	292	195
48		6.6	23	15	12
49		46	146	35	31
50		7.0	20	6.1	4.8
51		7.6	25	4.3	7.3

3.4 连接基乙烯基的变换

持续应用伊马替尼可引起 Abl 激酶发生变异 (Abl^{T315I}), 即门户残基 Thr315 突变 Ile315, T315I 突变的后果, 是氨基酸侧链由 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 变成 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, 不仅体积变大, 空间上阻碍了伊马替尼的进入, 而且失去形成氢键的能力 (羟基 O 为氢键接受体)。

化合物**51**对 Abl^{T315I}激酶有中等强度的活性, 提示该系列化合物的结构特征对门户残基的 Abl 变异仍可结合。将**51**与 Abl^{T315I}分子对接, 揭示出窄长的乙烯基与 Ile315 没有明显的位阻现象 (图4的绿色分子)。进

而设想将乙烯基换成直线型的乙炔基 (图4的蓝色分子) 更能解除位阻效应。为此将乙烯基和乙炔基与有强结合作用的芳环进行组合优化, 合成的有代表性的化合物和活性列于表5。

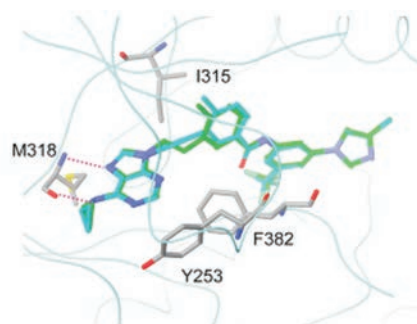


Figure 4 Docking diagram of compound **51** (green) and acetylene analog (cyan) to Abl^{T315I} kinase

Table 5 Activity of compounds with varied linker and substituent on phenyl group

Compd.	a-b	R	$IC_{50}/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$			
			Abl	Abl ^{T315I}	AblBa/F3	AblBa/F3 ^{T315I}
51	CH=CH		25	478	7.3	422
52	CH=CH		13	542	4.2	298
53	CH=CH		20	14 142	4.8	2 746
54	C≡C		30	524	2.0	548
55	CH=CH		23	15 513	12	7 122
56	C≡C		28	359	3.0	513

表5的数据提示, 化合物**54**与**53**比较 (同样**56**与**55**相比) 虽然对未变异的 Abl 的活性相近, 但对变异的激酶活性提高了30~40倍, 对变异的细胞提高了5~10倍。这些结果说明乙炔基是优化的连接基, 实验

证明了乙炔基更解除了对 Ile315 的空间障碍。然而化合物 **54** 和 **56** 的药代动力学性质不佳, 尤其是迅速代谢消除的缺点, 须进一步优化 (Huang WS, Zhu X, Wang Y, et al. 9-(Arenethenyl) purines as dual Src/ABL kinase inhibitors targeting the inactive conformation: design, synthesis, and biological evaluation. *J Med Chem*, 2009, 52: 4743-4756)。

3.5 骨架迁越—更换嘌呤环

乙炔基作为连接嘌呤 N9 与苯环的连接基, 是 N-C≡C-C 的炔胺结构, 在化学和药动学上不如 C-C≡C-C 稳定。试图变换嘌呤环结构, 想到了 8-氨基咪唑 [1,2-a] 并吡啶的母核, 因为 8-氨基与 N1 可与激酶形成两组氢键, 替换嘌呤环形成氢键的元素。合成的化合物列于表 6。

Table 6 Activity of the imidazolo-pyridine compounds

Compd.	R ₁	R ₂	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹			
			Abl	Abl ^{T315I}	AblBa/ F3	AblBa/ F3 ^{T315I}
57	NH ₂		2.3	1 216	8.6	72
58	CH ₃ CONH		6.4	2 414	11	44
59	H		26	102	10	471
60	H		45	168	11	251
61	H		26	185	9.4	135

化合物 **57** 和 **58** 的细胞活性都很高, 证明了骨架迁越的成功, 但大鼠的药代动力学不佳, 根据既往的经验, 在相对于 C8 位置的嘌呤环上有氨基或乙酰氨基的化合物药代都欠佳, 因而合成了没有氨基的化合物 **59**, 保持了对变异酶的活性, 而且改善了大鼠药代, 口服利用度 42%。但细胞活性弱于 **57**, 即使在咪唑环上引入助溶基团 **60** 和 **61** 活性仍不高。进而还得以新的途径优化活性。

4 增加与活化环套的结合—模拟伊马替尼的结构设计

在已有优化的基础上再提高与 Abl^{T315I} 酶的结合作用, 探索增加与活化环套 (A-loop) 的残基结合。设计在末端苯环上引入哌嗪基, 含以下意图: ① 哌嗪的

N4 在生理 pH 下质子化, 若位置合适可与活化环套的 Ile360 形成氢键, 会对结合提供焓的正贡献; ② 哌嗪环是助溶基团, 有利于溶解和降低亲脂性; ③ 在哌嗪与苯环之间用亚甲基连接, 避免了 N 原子直接连于苯环而成为苯胺样片段, 会引起代谢的复杂性。也因嵌入亚甲基增加了局部的柔性, 有利于哌嗪的结合, 这与伊马替尼的设计不谋而合 (或许是借鉴)。通过分子模拟设计了化合物 **62**, 表明确实可与 Ile360 发生氢键结合 (图 5)

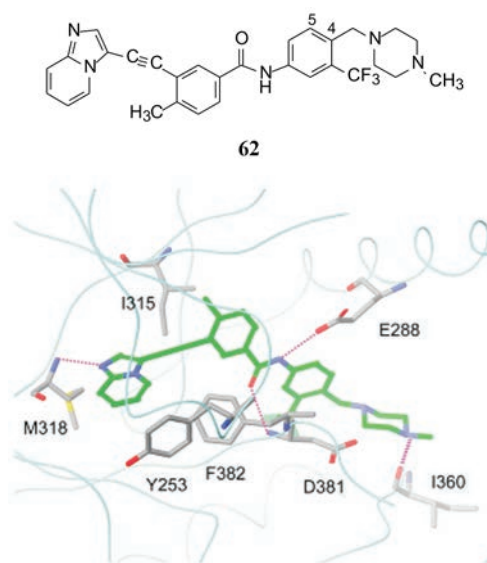


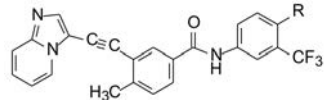
Figure 5 Docking diagram of compound **62** to Abl^{T315I} kinase

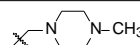
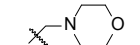
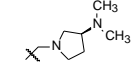
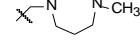
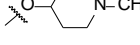
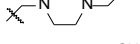
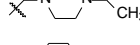
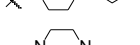
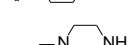
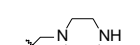

合成后评价化合物 **62** 的活性结果表明, 对 Abl^{T315I} 激酶活性比 **59** 提高 2 倍, 细胞活性提高 20 倍, 而且在高浓度 (340 μmol·L⁻¹) 人血浆白蛋白存在下对白血病细胞抑制活性并不减弱, 提示与血浆蛋白结合的较少, 因而成为一个很好的突破口。若将哌嗪片段移至 5 位, 活性减弱, 提示位置的重要性。下一步优化碱性片段都在苯环的 4 位。

表 7 列出了变换碱性片段的活性结果, 化合物 **62** 的哌嗪 N4 被氧原子替换, 吗啉化合物 **63** 活性显著减弱, 佐证了 N4 形成氢键的重要性。 **64** 和 **65** 分别为缩环和扩环化合物, 虽然也存在类似于哌嗪 N4 的氮原子, 但这两个化合物的活性弱于 **62**, 分子对接表明, **62** 的哌嗪环除与 Ile360 氢键结合外, 还与 Val289、Phe359 和 Asp381 有范德华作用, 推测 **64** 和 **65** 的环有不适宜或碰撞的因素。将 **62** 的 N-CH₃ 换成较大的烷基或氟 (或羟) 乙基 (**69**、**70**) 都不利于抑制突变株。优化结果表明 **63** 为该系列最佳化合物。

5 母核吡咯并吡啶的再检讨

回顾优化路径, 由嘌呤变吡咯并吡啶, 乙烯基变乙

Table 7 Activity of the compounds with alkali substituent on the terminal phenyl ring.


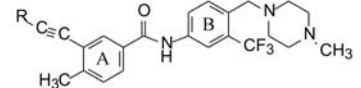
Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹			
		Abl	AbI ^{T315I}	AblBa/ F3	AblBa/ F3 ^{T315I}
62		9.6	56	3.6	26
63		78	668	2.1	727
64		15	92	5.4	58
65		13	107	8.4	157
66		9.1	83	3.4	77
67		23	157	5.2	49
68		56	219	8.0	43
69		19	71	2.3	42
70		49	250	4.0	166
71		14	49	3.5	22
72		22	165	9.5	203









炔基, 胺酰基变酰胺基, 末端苯环引入亚甲哌嗪片段, 至此似乎都已实现了优化状态。再回到母核本身, 当分子的其他部分都呈优化状态下吡咯并吡啶是否仍为最佳选择, 尚需进一步考察, 为此, 变换杂环, 化合物的结构与活性列于表 8。

当初由 8-氨基咪唑并吡啶去除 (环外) 氨基以改善药代时, 损失了一些活性 (权衡结果划算), 现在为弥补该损失, 合成了增加杂环内的 NH, 以提供氢键给体。化合物 **73~76** 的活性表明, **73** 和 **76** 对变异细胞株略有提高, 但 **74** 和 **75** 活性降低。另一思路是, 为了降低 **62** 的亲脂性 (clog *P* 6.69), 在吡唑并吡啶环的不同位置加入一个氮原子 (加一氮原子分配系数降低 1 个对数单位), 化合物 **78** 和 **79** 活性显著提高, 尤其是 **79**。**77** 的低活性是由于杂环的 8 位是用氢键受体占据了氢键给体的位置, 从而发生互相排斥的缘故。**79** 的大鼠药代优于 **78**, 下一步是对母核换作咪唑并吡啶后的继续优化。

6 新骨架的各取代基的综合调整

以化合物 **79** 为新一轮优化的起点, 在苯环 A 的 2

Table 8 Activity of compounds with varied core structure.


Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹			
		Abl	AbI ^{T315I}	AblBa/F3	AblBa/F3 ^{T315I}
62		9.6	56	3.6	26
73		19	162	4.4	14
74		18	250	3.4	42
75		6.9	106	3.9	31
76		42	112	3.0	17
77		69	639	10	500
78		2.3	9.0	0.9	13
79		8.6	40	1.2	8.8

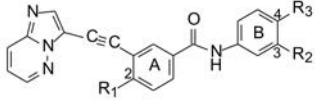
位变换甲基 (称作旗甲基, flag-methyl), 苯环 B 的 3,4 位变换三氟甲基和碱基, 对结构进行微调, 化合物及其活性列于表 9。

表 9 构效关系分析如下: ① N4-甲基哌嗪换成体积较大的烷基 (**80**、**81**) 对白血病变异细胞的抑制活性基本不变, 而 N4 无取代基 (**82**) 或没有哌嗪片段 (**88**) 的活性降低; ② A 环的甲基换成氯原子活性不变, 而小尺寸的 H 和 F 原子 (**83**、**85**) 活性降低, 可以认为是小体积不足以起到调节构象的作用; ③ B 环的三氟甲基是必需基团。

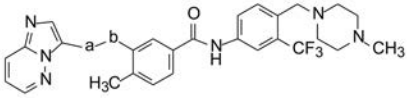
7 新骨架下乙炔连接基的再检讨

各个位置进行多轮优化后, 再考察由亚乙基→乙炔基→乙炔基的优化程式是否仍然有效, 表 10 列出了 3 个化合物的活性比较, 表明乙炔基仍然是高效的连接基团, 线型棒状的乙炔基避开了 Ile315 的阻挡, 而亚乙基和反式乙烯基没能 (完全) 绕开。

图 6 比较化合物 **79** 与 Abl^{T315I} 激酶的晶体结构和 **89** 与 **90** 对接模型, 虽然这个方向投影图没有分辨出太大区别, 但“庞大的”Ile315 横空阻挡, 突出影响了细胞水平的活性 (Huang WS, Metcalf CA, Sundaramoorthi R, et al. Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]

Table 9 Activity of compounds with varied substituents on two phenyl rings


Compd.	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹			
				Abl	Abl ^{T315I}	AblBa/F3	AblBa/F3 ^{T315I}
79	CH ₃	CF ₃		8.6	40	1.2	8.8
80	CH ₃	CF ₃		14	46	1.0	7.3
81	CH ₃	CF ₃		12	45	1.5	14
82	CH ₃	CF ₃		2.3	18	4.0	34
83	H	CF ₃		31	36	2.3	39
84	Cl	CF ₃		41	95	2.5	8.6
85	F	CF ₃		42	61	6.1	35
86	CH ₃	Cl		2.4	82	2.3	210
87	CH ₃			5.3	71	3.9	256
88	CH ₃	CF ₃	H	19	988	10	1 132

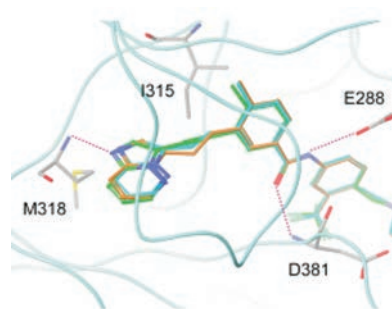
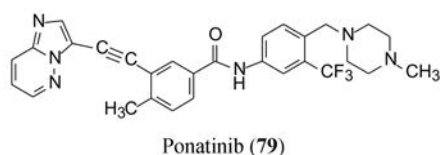
Table 10 Effect of varied linkers in the novel skeleton on activity


Compd.	a-b	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹			
		Abl	Abl ^{T315I}	AblBa/F3	AblBa/F3 ^{T315I}
79	C≡C	8.6	40	1.2	8.8
89	CH ₂ -CH ₂	19	317	4.3	295
90	E-CH=CH	54	536	7.9	211

pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)-methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *J Med Chem*, 2010, 53: 4701-4719)。

8 候选化合物的药代性质

化合物**79**胜出为候选化合物,与各个里程碑化合物作了药代动力学比较,**79**大鼠灌胃的生物利用度18%,半衰期11 h,静脉注射的清除率0.65 L·h⁻¹·kg⁻¹。

**Figure 6** Crystallographic diagram of the complex between **79** and Abl^{T315I} kinase and docking diagram of **89** and **90** to Abl^{T315I} kinase

79定名为帕那替尼(ponatinib),临床前和临床实验,表明对慢性粒细胞白血病和费城染色体阳性的急性白血病有效,于2012年经美国FDA批准上市。

9 小结

帕那替尼是一个线型分子,它的研制涉及了整个分子所有的基团和片段的优化,虽然同类产品伊马替尼在它10年前面市,也在设计上有所借鉴,但仍不失为创新性药物。在分子设计-合成-评价-构效关系分析的循环反馈中,结构生物学、分子模拟和药物化学的交织应用与印证,对结构的各个侧面做到了精雕细刻的考察,甚至是反复地验证。图7列出了重要节点的化合物结构变迁,扼要展现出研发梗概。

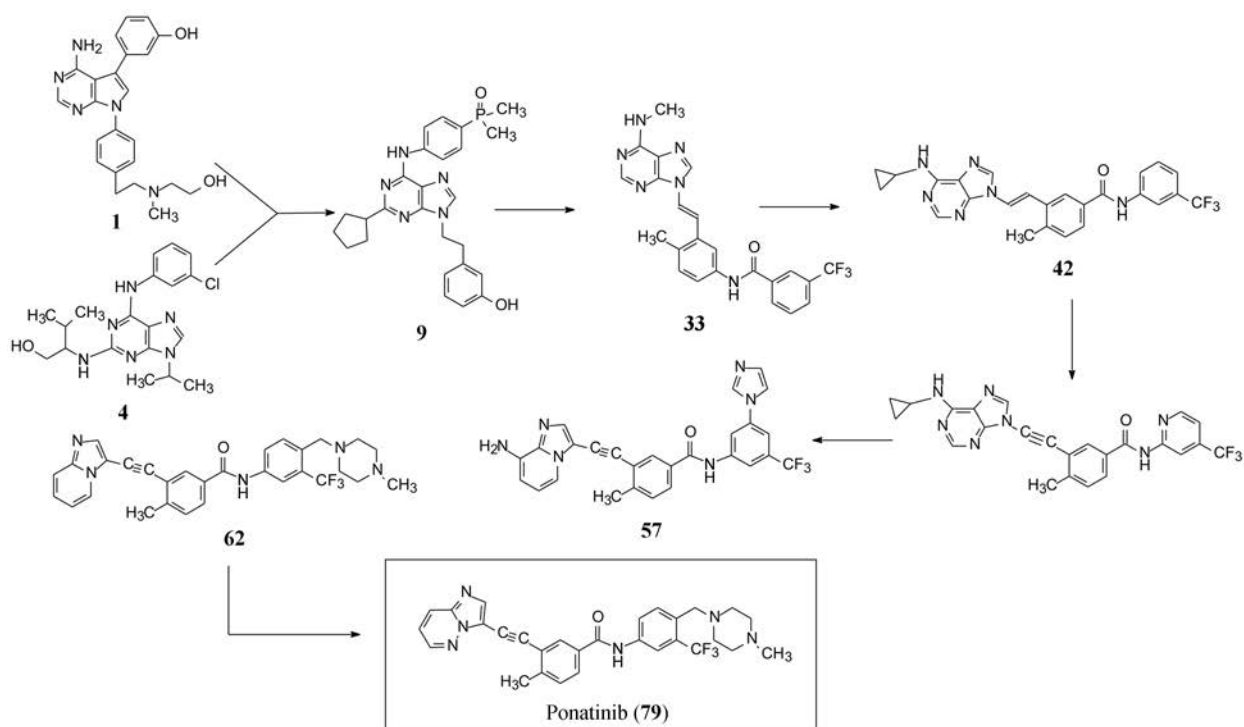


Figure 7 Key nodes and molecules in the course of optimization and ponatinib creation