

· 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。

Venetoclax 是全球第一个针对蛋白-蛋白相互作用的小分子抑制剂, 屡改靶标和先导物, 甚至在确定了候选物乃至进入临床试验后仍更换作用靶标和候选物, 研发历程 20 年, 彰显出首创性药物的风险与艰辛, 也说明确证靶标贯穿于研发的全过程, 风险贯穿始终。

Venetoclax 的研发包含了多种技术的综合运用, 用 SAR by NMR 方法和片段连接策略构建苗头化合物, 在由苗头过渡到先导物、优化活性、提高选择性、消除脱靶作用等过程中, NMR 二维核磁和 X-射线衍射分析微观结构起到指导作用, 构效关系则是验证与反馈的重要手段。此外, 作为口服药物 venetoclax 的结构和物化性质几乎完全突破了类药 5 规则, 因为指望相对分子质量在 500 以下的小分子阻断两个蛋白的结合是难以实现的。创新不能墨守成规。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0102

第一个蛋白-蛋白相互作用抑制剂 venetoclax

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 引言

干扰蛋白-蛋白相互作用的小分子, 批准上市的第一个药物是 venetoclax。一些蛋白酶抑制剂或激酶抑制剂虽然也是干预蛋白与蛋白的作用, 但由于反应位点有特定的结构特征、特异的结合腔, 或辅酶的参与, 分子设计有“着力点”, 相对容易实现。Venetoclax 干预的两个蛋白相互作用, 是一个广泛而表浅的弱结合作用, 难以确定切入点。本文解析的研发历程, 涉及了高通量筛选, NMR 和 X-射线衍射揭示微观结构和作用, 以及在确定靶标蛋白的可药性等方面, 有许多值得借鉴之处。

2 作用靶标

细胞程序化死亡(凋亡)是机体清除衰老的、受损伤的和无用细胞的首要机制, 与机体正常发育、组织重塑和免疫应答等都起重要作用, 许多疾病的发生是由于凋亡过程的损坏, 例如肿瘤、自身免疫疾病和阿尔茨海默病等。B 细胞淋巴瘤(Bcl)蛋白家族中包含有抗凋亡蛋白如 Bcl-2 和 Bcl-xL, 也有促凋亡蛋白如 Bak、Bax 和 Bad, 二者精确地调控表达, 处于平

衡状态。一些肿瘤为了避免和逃逸凋亡, 高表达 Bcl-2 或 Bcl-xL, 因而成为研发抗肿瘤药物的靶标, 通过结合 Bcl-2 或 Bcl-xL, 释放促凋亡蛋白如 Bak、Bax 和 Bad 的功能, 达到治疗的目的。

3 蛋白结构和结合特征

Bcl-2 蛋白家族的三维结构有相同的折叠形式: 两个疏水性螺旋, 由 5~7 个两亲性的 α 螺旋包围, 后者形成抗凋亡蛋白 Bcl-xL 和 Bcl-2 的疏水性沟槽, 是结合促凋亡蛋白 Bak、Bax 和 Bad 的部位。蛋白-蛋白相互作用的面积广泛 ($750 \sim 1500 \text{ \AA}^2$), 表浅且无特征性结合位点, 增加了设计药物的难度。Bak 的 BH3 肽与 Bcl-xL 的结合面积相对较小, 大约 500 \AA^2 , 而且结合 Bcl-xL 的位点是较深的疏水沟槽, Bak 蛋白的 BH3 肽为两亲性螺旋, 占据并结合于疏水沟槽, 这些信息为分子设计提供了线索 (Petros AM, Nettekoven DG, Wang Y, et al. Rationale for Bcl-XL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. Protein Sci, 2000, 9: 2528-2534)。

4 评价活性

4.1 Bcl-xL 蛋白的制备

含有 Bcl-xL 质粒的细菌在 ^{15}N 标记的氯化铵 (唯一氮源) 介质中温孵, 制备均一的 ^{15}N 标记 Bcl-xL 蛋白 (去除了过膜螺旋); ^{15}N 和 ^{13}C 双标记的 Bcl-xL 蛋白在 ^{15}N 标记的氯化铵和 ^{13}C 标记的葡萄糖 (唯一碳源) 介质中制备。用于 NMR 测定的蛋白浓度为 $0.5\sim 1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4.2 活性测定

评价化合物活性是用 NMR 测定与 Bcl-xL 蛋白的结合力, 结合性能越强预示活性越高。这种基于 NMR 的筛选方法是通过对 Bcl-xL 蛋白与受试物 (或无受试物) 增敏 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC 谱来确定的。通过比对有或无受试物情况下 Bcl-xL 中特定氨基酸残基的 ^{15}N 二维核磁变化, 确定化合物的结合能力。

荧光偏振检测法测定化合物抑制 Bcl-xL 活性, 用荧光素标记的 BH3 肽 (来源于 Bad 蛋白) 作为探针 (与 Bcl-xL 结合常数 K_d 值 $20\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 不同浓度的受试物加入到 Bcl-xL 和探针的混合液中, 用连续的荧光素灯测定偏振光, 计算受试物的 K_i 为活性值。

高表达 Bcl-xL 或 Bcl-2 蛋白的细胞, 用来测定受试物的功能和强度。

5 化合物筛选

5.1 方法

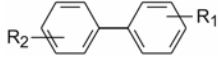
采用基于片段的分子设计方法 (SAR by NMR), 确定片段及其定位。首先用 9 373 个化合物筛选 Bcl-xL 的第一结合位点。化合物的相对分子质量低于 210。筛选结果得到 49 个 K_d 值低于 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的苗头化合物。第二结合位点的筛选是在有第一位点的受试物存在下, 筛选相对分子质量低于 150 的 3 472 个小分子, 得到 24 个 K_d 值低于 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的苗头化合物。受试物的离解常数 K_d 值是基于不同浓度与化学位移的变化值求出的。

5.2 第一结合位点的苗头化合物及其构效关系

与 Bcl-xL 第一位点结合的有代表性的化合物 **1** 是 4'-氟-联苯-4-甲酸骨架的分子, 二维核磁显示苗头化合物引起 Bcl-xL 疏水沟槽内的 Gly94 和 Gly138 的 ^{15}N 化学位移发生变化, 计算得出 K_d 为 $300\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以化合物 **1** 为起点, 合成的周边化合物列于表 1。

表 1 的构效关系提示, 4 位羧基是重要基团, 用酚羟基 (**3**) 和酯基 (**4**) 置换或改为 3-羧基 (**5**) 都失去活性。4-氟用其他原子或片段替换仍有活性 (**8~10**)。NMR 研究还提示, 化合物 **1** 结合于 Bcl-xL 疏水沟槽的中部, 羧基与 Arg139 发生静电结合, 羧基相当于

Table 1 Binding of biphenyl (naphthalene) compounds



Compd.	R ₁	R ₂	NMR $K_d/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
1	4-F	4-COOH	300
2	H	4-COOH	1 200
3	4-F	4-OH	>5 000
4	H	4-COOCH ₃	>5 000
5	H	3-COOH	>5 000
6	H	4-CH ₂ COOH	2 000
7	H	4-CH ₂ CH ₂ COOH	1 990
8	4-CH ₃	4-COOH	383
9	4-Cl	4-COOH	238
10	2,3-benzo	4-COOH	250

Bak 的 Asp83 残基。

5.3 第二结合位点的苗头化合物及其构效关系

联苯甲酸的结合能力弱, 不能阻断 Bcl-xL 与 Bak 的结合, 通过比对化合物 **1** 与 Bcl-xL 的复合物与 Bak、Bcl-xL 复合物的 NMR, 发现远处存在第二个结合位点。为发现结合第二位点的苗头分子, 在化合物 **1** 的存在下, 用 NMR 方法筛选了 3 500 个相对分子质量低于 150 的小分子。发现结合于第二位点的有代表性分子列于表 2。

表 2 中的化合物活性低于化合物 **1**, 其中化合物 **11** 与 Bcl-xL 的复合物 NMR 表明, 除 **1** 结合第一位点引起 Gly94 和 Gly138 变化外, **11** 结合于第二位点, 导致 Gly196 的位移变化。两个分离的分子同时结合于 Bcl-xL 蛋白的不同部位。

5.4 片段的连接

5.4.1 连接位点和连接基的筛选 结合于不同位点的两个片段性分子连接成一个分子, 变三元复合物成二元体系, 由于减少了熵损失, 理论上可提高结合能力, 显然, 连接基的长度和取向对结合有重要影响。混合化合物 **1** 和 **11** 与 Bcl-xL 三组分的 NMR 确定了低能量体系下化合物的相对位置, 提示 **1** 的羧基邻位是最佳的连接位置, 从而用不同的连接基连接 **1** 和第二位点的结合片段, 表 3 列出了合成的化合物。

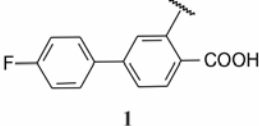
上述化合物经荧光偏振检测, 化合物抑制 Bcl-xL 活性大多数没有活性 ($K_i > 10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 只有化合物 **21** 呈现抑制活性, $K_i\ 1.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比化合物 **1** 强 200 倍。进而 NMR 研究 **21** 与 Bcl-xL 的结合特征, 发现乙烯基并非最佳的连接基。

5.4.2 磺酰胺基的双重作用 为了优化连接基的结构与连接方式, 设想用 *N*-酰化的磺酰胺基作为连接基, 氮上有氢的 *N*-酰化的磺酰胺基由于两侧的酰基

Table 2 Binding activity of fused rings to Bcl-xL

Compd.	Structure	NMR $K_d/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Compd.	Structure	NMR $K_d/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
11		4 300	16		13 000
12		13 000	17		9 000
13		5 000	18		4 000
14		2 000	19		6 000
15		11 000	20		6 000

Table 3 Various fragment at the second binding site and linker connecting to compound 1



1

Second fragment			Linker		
			-	-	-
				-	-

和磺酰基的拉电子效应有酸性, pK_a 3~5, 与羧基相近, 用它连接两个片段, 融合了处于邻位的乙烯基和羧基的作用, 初试的 NMR 测定证实与 Bcl-xL 发生结合, 从而合成了包括 120 个化合物的集中库, 经荧光偏振测试, 发现化合物 **22** 抑制 Bcl-xL 活性 K_i 值 $0.245 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比 **21** 强 5 倍。图 1 是 NMR 确定的化合物 **22** 与 Bcl-xL 的结合模式, 联苯基处于两个 α 螺旋之间, Bcl-xL 的 Phe97 区分开两个片段, Phe97 的苯基与 Tyr194 同硝基苯片段发生 π - π 叠合作用。化合物 **22** 可视作 3 个片段构成: 第一片段是联苯基, 第二片段为硝基苯磺酰胺, 第三片段为苯并异硫代吡喃。

5.4.3 片段 3 的优化 确定了 N-酰化的磺酰胺为良好的连接基后, 对片段 3 进行优化, 合成了 125 个化合物, 其中化合物 **23** 为高活性化合物, K_i 值 $36 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。图 2 是 NMR 方法显示的 **23** 与 Bcl-xL 的结合特征, 表明第一结合片段氟代联苯, 第二片段 N-酰化的磺酰胺和硝基苯的位置与 **22** 相同, 但不同的是第三个片段的硫苯基弯曲回到硝基苯的下方, 此

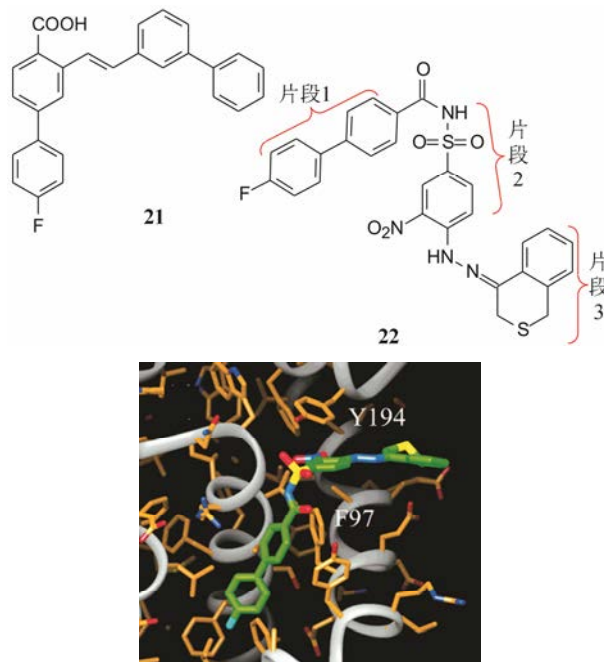


Figure 1 Binding mode of compound **22** to Bcl-xL by NMR

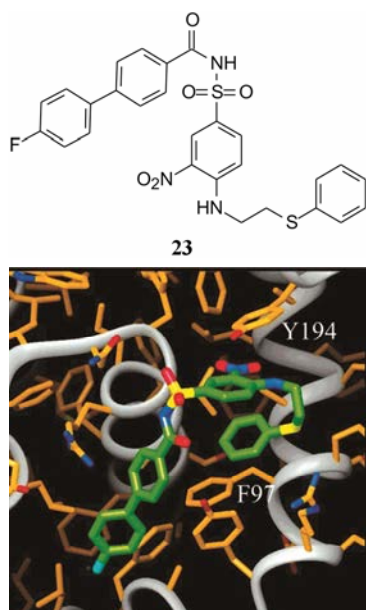


Figure 2 Binding mode of compound **23** to Bcl-xL by NMR

时硫苯基处在蛋白的 Phe97 与 **23** 的硝基苯之间, 而硝基苯在 Tyr194 下方, 形成层叠的 π - π 堆积。这些相互作用体现了 **23** 的活性强于其他化合物 (Petros AM, Dinges J, Augeri DJ, et al. Discovery of a potent inhibitor of the antiapoptotic protein Bcl-xL from NMR and parallel synthesis. J Med Chem, 2006, 49: 656–663)。

5.5 改构以消除血清蛋白的失活作用

5.5.1 人血清对抑制剂的失活 化合物 **23** 高活性抑制 Bcl-xL, K_i 值 $36 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 但测试介质中若含有 1% 人血清, 活性下降 69 倍, 10% 血清则完全失活, 提示血清中含有使 **23** 失活的成分。后来证明是白蛋白 (HSA) 的结合, 而 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白不影响其结合。进而证明是 HAS-III 的结构域与 **23** 的酸性基团 *N*-酰化的磺酰胺相结合, 白蛋白的这个结构域可结合酸性分子和含阴离子的化合物。化合物 **23** 与 HAS-III 的 $K_i < 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

5.5.2 类似物的启示 在合成的 125 个化合物中, **24** 是 **23** 的类似物, 第三片段的苯基多两个甲基。NMR 研究表明, **24** 分别与 Bcl-xL 和 HSA-III 的结合模式都与 **23** 不同。表现在第三和第一片段处: **24** 的第三片段与 HAS-III 的结合呈伸展形, 苯硫乙基埋入非极性的氨基酸残基中, 提示 Bcl-xL 和 HSA-III 的末端分别为极性 (因此 **23** 的苯环向回折曲) 和非极性, 因而设想变换乙基为有极性基团可不影响与 Bcl-xL 的结合, 并促使末端进入溶剂相, 从而削弱与 HAS-III 的结合力, 例如胺、酰胺或砜基不利于与 HAS-III 结合

(Hajduk PJ, Mendoza R, Petros AM, et al. Ligand binding to domain-3 of human serum albumin: a chemometric analysis. J Comput. -Aided Mol Des, 2003, 17: 93–102)。**23** 的第一片段分别与 Bcl-xL 和 HAS-III 相结合的氟代联苯基所处的环境不同, Bcl-xL 在氟端尚留有空间, 而且发生部分溶剂化, 而 HAS-III 结合的氟苯基被非极性残基满满地包围, 没有空隙。提示该片段也可加入或变换为极性基团, 以区分与 Bcl-xL 和 HAS-III 的结合。图 3 是化合物 **23** 进行分子设计的示意图 (Wendt MD, Shen W, Kunzer A, et al. Discovery and structure-activity relationship of antagonists of B-cell lymphoma 2 family proteins with chemopotential activity *in vitro* and *in vivo*. J Med Chem, 2006, 49: 1165–1181)。

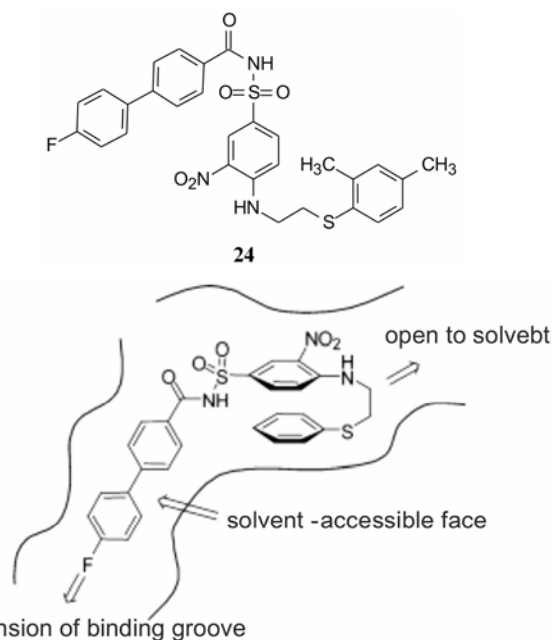
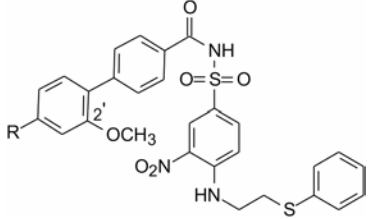
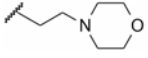
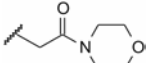
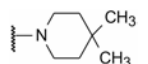


Figure 3 Diagram of **23** bound to Bcl-xL, showing bent-back conformation

5.5.3 氟代联苯基的变换 为了消除化合物被 HAS-III 失活的缺陷, 依照上节的分析, 变换氟代联苯基部分, 引入含有极性基团的不同长度的碳链, 合成的化合物列于表 4, 由于之前合成的 4'-氟-2'-甲氧基化合物活性略强于 **23**, 故表 3 的化合物都含有 2'-甲氧基。

表中的构效关系表明: ① 链长为 1 或 2 个碳的胺基 (酰胺) 抑制 Bcl-xL 活性显著下降; ② 链长为三碳的活性与 **23** 的活性相当, 推测短侧链未能将胺基“顶出”疏水沟槽进入水相, 而三碳够长; ③ 表中 Bcl-xL+1% HS 的数据是在 Bcl-xL 蛋白中加入 1% 人

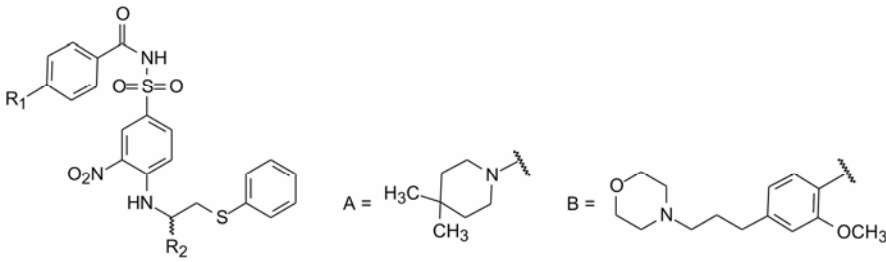
Table 4 Structure and activity of biphenyl tail modified compounds


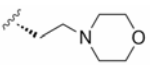
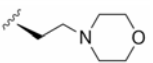
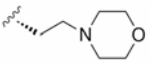
Compd.	R	Bcl-xL, $K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
		Bcl-xL	Bcl-xL+1% HS
23	F	0.036	2.50
25	$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	0.426	1.00
26	$\text{CON}(\text{CH}_3)_2$	0.476	>10.0
27	$(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	0.665	0.998
28	$\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_3)_2$	0.251	>10.0
29	$(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$	0.106	0.73
30	$(\text{CH}_2)_2\text{CON}(\text{CH}_3)_2$	0.039	1.00
31		0.010 4	0.58
32		0.058	0.79
33	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	0.021 5	2.96
34		0.019	0.652

血清的受试物活性,降低的越少,提示化合物抗失活作用越强。化合物 **30** 和 **32** 降低人血清的抑制活性;④叔胺基在介质中易被质子化,为 HAS-III 所不容,即使短侧链的 **25** 和 **27** 也有降低失活作用;⑤ **31** 的活性明显高于 **29**,抑制 HAS-III 的去活作用也强,是系列中优质化合物。从 **31** 和 **33** 的数据可以判断,第一位点引入极性基团可以将活性与失活性 (HAS-III) 分开,也证明了前述的 NMR 研究得出的该区域有空闲空间的推断。

与此同时还合成了 R 为取代的哌嗪化合物,虽然降低了 HAS-III 的失活能力,但抑制 Bcl-xL 的活性也显著降低。然而 4',4'-二甲基哌啶化合物 **34** 的活性和抑制 HAS-III 的结合作用都强于 **23**,因而也成为优化切入点。

5.5.4 另一端的变换 以化合物 **31** 的丙基吗啉或 **34** 的 4',4'-二甲基哌啶为固定基团,变换片段 3 的结构,即在乙硫基的 α 位连接含胺基的侧链,以提高抑制 Bcl-xL 的活性和降低 HAS-III 的去活作用。由于 α 碳为手性原子,可形成对映体。表 5 列出了化合物的结

Table 5 Structure and activity of combination substitution. * Mouse FL5.12 cells transfected with Bcl-xL


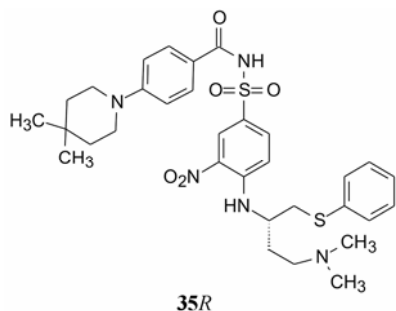
Compd.	R ₁	R ₂	$K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		FL5.12 cell EC ₅₀ /μmol·L ⁻¹ *	
			Bcl-xL	Bcl-xL+10% HS	+gelatin	+3% FBS
35R	A	<i>R</i> -(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	0.000 8	0.360	0.470	5.10
35S	A	<i>S</i> -(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	0.252	3.85	9.50	16.1
36	A	<i>R</i> -(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	0.002 6	0.728	2.00	14.1
37	A	<i>R</i> -(CH ₂) ₄ N(CH ₃) ₂	0.001 2	0.174	1.08	3.89
38	A	<i>R</i> -(CH ₂) ₄ NH ₂	0.001	0.256	4.13	20.8
39R	A		0.001 1	>10.0	0.368	7.0
39S	A		0.075	6.05	4.2	9.31
40	A	<i>R</i> -CH ₂ CON(CH ₃) ₂	0.003 1	1.79	2.14	15.0
41R	B	<i>R</i> -(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	<0.000 5	0.148	0.399	2.08
41S	B	<i>S</i> -(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	0.250	1.14	32.5	59.2
42	B	<i>R</i> -(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	0.000 9	0.071	3.01	8.60
43	B	<i>R</i> -(CH ₂) ₄ N(CH ₃) ₂	<0.000 5	0.215	1.20	6.0
44	B	<i>R</i> -(CH ₂) ₄ NH ₂	0.000 8	0.029 5	2.05	9.0
45	B		0.001 7	>10.0	0.382	2.11
46	B	<i>R</i> -CH ₂ CON(CH ₃) ₂		1.0	1.28	7.63

构与活性。

表 5 的构效关系提示: ① α 碳连接碱性侧链的构型对活性影响显著, *R* 构型的活性强于 *S* 构型, 提示 *R* 构型引出的侧链有利于结合于 Bcl-xL 的第三位点, 活性可高达 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而 *S* 构型的方向使侧链进入水相, 不发生结合。② A 和 B 两种片段如 31 和 34 一样, 都显示对抗 HAS-III 的失活作用。③ 酰胺化合物 40 和 46 以及含吗啉的 39R 和 45 抑制 HAS-III 的失活作用很弱, 是由于不能被质子化, 有利于结合 HAS-III。④ 35R 和 41R 在细胞模型上呈现高活性, 即使加入胎牛血清活性仍优于其他化合物, 与 HAS-III 结合很弱, K_i 值分别为 13.6 和 $94 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 佐证了对 HAS-III 的抗性。

5.6 里程碑式化合物

具有高抑制 Bcl-xL 活性和高对抗 HAS-III 作用的化合物 35R 进一步证实可促进放射治疗或紫杉醇引起非小细胞肺癌 (高表达抗凋亡蛋白 Bcl-xL) 的死亡, 表明有促凋亡作用。小鼠移植对多种细胞毒药物无效的人肿瘤 A549 细胞, 用 35R+紫杉醇给药, 抑制率达 60%~70%, 且未见增加毒性。由此体内外功能性实验表明 35R 是 BH3 蛋白的小分子模拟物。



6 作用于双蛋白靶标 Bcl-xL 和 Bcl-2 的抑制剂

6.1 单靶标 Bcl-xL 的不足

化合物 35R 对多种人癌细胞的抑制效果并不高。由于 35R 是基于 Bcl-xL 结构设计的, 没有考虑对 Bcl-2 蛋白的抑制, 对人体多种高表达 Bcl-2 的肿瘤高抑制作用很弱, 不能阻止 Bcl-2 蛋白的抗凋亡作用, 所以抑瘤谱窄。项目研究至此, 意识到当初对靶标的可药性 (druggability) 的认识有局限性。

Bcl-xL 与 Bcl-2 蛋白序列的同源性虽然只有 49%, 其三维结构却很相似 (Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res, 2004, 1644: 83-94), 例如两个蛋白都有疏水型沟槽, 是结合促凋亡蛋白的 BH3 结构域的位置, 沟槽的取向与

定位都处于两个 α 疏水螺旋的中间, 只是 Bcl-2 的沟槽较宽和深, 这个区别为继续修饰结构提供了着力点。为了提高抗肿瘤活性, 设定的新目标是对 Bcl-xL/Bcl-2 双靶标作用, 评价化合物的活性分别用两种蛋白作荧光偏振检测。

6.2 契机——化合物 47 的启示

47 是变换片段 1 时所合成的化合物, NMR 研究 47 与 Bcl-xL 的结合, 发现片段 1 的苄基呈伸展型构象结合于疏水沟槽; 研究与 Bcl-2 的结合模式, 发现该苄基深入到疏水沟槽的深部, 埋入疏水腔中。这为设计双靶标抑制剂提供了修饰位置。图 4 是 47 经 NMR 研究确定的与 Bcl-xL (a) 和 Bcl-2 (b) 的结合模式。然而 47 对 Bcl-xL/Bcl-2 的活性不强, 还不够作为先导物进行优化。

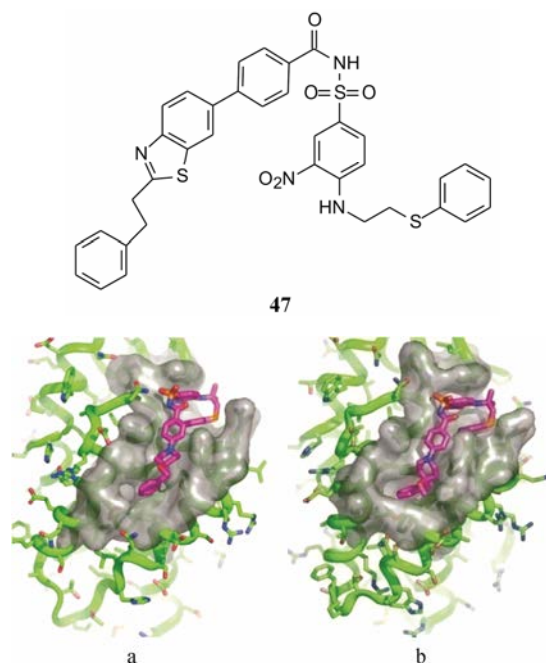
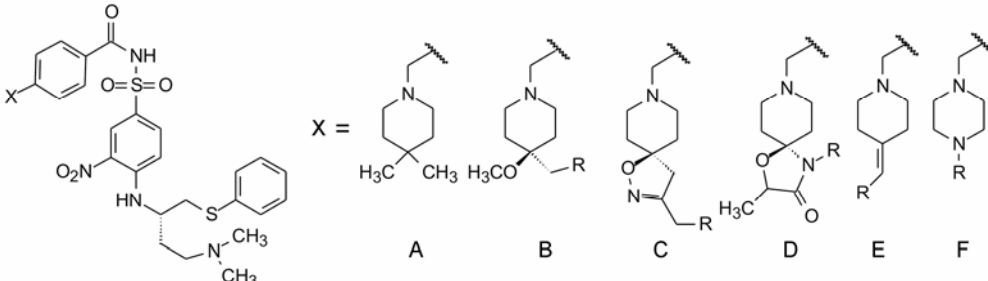




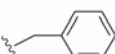
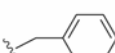
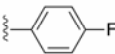
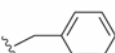
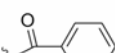
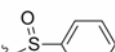
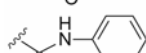
Figure 4 (a) NMR-derived structure of 47 bound to Bcl-xL (PDB code 2O2M); (b) NMR-derived structure of 47 bound to Bcl-2 (PDB code 2O2F)

6.3 以 35R 为新的起点

6.3.1 多片段探索位点 1 的构效关系 化合物 35R 的 4',4'-二甲基哌啶是引长疏水链的位置, 因为二甲基作为“把手”可进行基团变化或引长。为广泛探索首先设计了 8 种片段, 以发现双活性化合物的设计方向。表 6 列出了取代的哌啶和哌嗪片段的有代表性化合物活性。

化合物 35R 哌啶环的 4 位两个甲基换作不同基团, 一个疏水性基团与疏水沟槽结合, 另一个极性基团进入溶剂相, 4 位连接甲氧基和苄基的 48, 对 Bcl-xL

Table 6 SAR of various 4-substituted piperidine and piperazine structural scaffolds


Compd.	X	R	FPA $K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		FL5.12 cell $\text{EC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
			Bcl-2	Bcl-xL	Bcl-2	Bcl-xL
35R	A	-	67	0.8	2.2	0.47
48	B		8.1	1.8	0.93	0.68
49	C		35.2	4.4	>50	>50
50	C		6.5	1.7	2.93	2.34
51	D		9.6	3.7	>50	>20
52	E		3.4	<0.5	0.60	0.38
53	F		39.8	2.6	1.7	1.1
54	F		61.9	<1	>50	14.6
55	F		61	4.0	>20	>20
56	F		300	2.5	>50	>50

(蛋白和高表达细胞)的活性与 **35R** 相同,但提高了抑制 Bcl-2 (蛋白和细胞)活性。异噁唑 **49** 和 **50** 都提高了抑制 Bcl-2 活性。亚苄基化合物 **52** 对两种蛋白和细胞的抑制作用都很强。

哌啶环换成哌嗪的化合物虽然便于合成,但除化合物 **53** (*N*-苄基哌嗪)对两种蛋白和细胞有中等活性外,酰基取代的 **54**~**56** 活性都差。基于这些结果,下一步的研究集中于 B、E 和 F 片段的变换。

6.3.2 确定哌嗪构成的骨架 化合物 **48** 的 R 基作烷基、取代苯基和联苯基等变换,测定对 Bcl-xL 和 Bcl-2 以及高表达的细胞抑制活性,发现 **57** 为高活性化合物。对 **52** 的 R 基用取代苯基和吡啶基连接,发现化合物 **58** 为高活性化合物。对 *N*-苄基哌嗪的苯环作不同的取代,发现 **59** 为高活性化合物。这 3 个化合物对双靶标的活性列于表 7。

3 个化合物的片段 1 具有共同特点,都连接了联

苯结构,延伸了疏水性,深入到 Bcl-2 蛋白的疏水腔穴中 (结合图省略),也不影响与 Bcl-xL 的结合。化合物 **59** 活性显著强于 **57** 和 **58**,用 3 株高表达 Bcl-2 蛋白的滤泡性淋巴瘤细胞评价 **59** 活性,即使含有 3% 胎牛血清, IC_{50} 也低于 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。移植滤泡性淋巴瘤细胞的小鼠用 **59**、依托泊苷和 **59** 加依托泊苷实验,表明单独应用 **59** 的抑制作用相当于依托泊苷的最大耐受剂量,联合用药可达到 90% 的抑制率 (Bruncko M, Oost TK, Belli BA, et al. Studies leading to potent, dual inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL. J Med Chem, 2007, 50: 641-662)。 **59** 进入了临床研究 (ABT-737)。但由于水溶性很低,静脉用药有很大困难,口服的吸收性因人波动性很大,显示出 **59** 的物化和药代性质有缺陷。

7 优化药代动力学性质

进一步优化目标是改善药代性质。为了不影响与靶标蛋白的结合强度,主体结构不作重大变化,在非

Table 7 Structure and activity of typical compounds

Compd.	FPA / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			FL5.12 cell $\text{EC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
	Bcl-2	Bcl-xL	Bcl-xL+10%HS	Bcl-2	Bcl-xL
57	<1	<0.5	<60	0.02	0.35
58	<1	<0.5	83	0.18	0.16
59	<1	<0.5	<60	0.016	0.018

药效团部位加以改动, 评价活性也因此以细胞模型为主, 包括 Bcl-2 和 Bcl-xL 依赖性的人小细胞肺癌 (H146) 细胞模型。

59 的相对分子量 799.40, 含有 5 个苯环、1 个脂环、11 个氢键接受体、2 个氢键给体。分子尺寸大, 脂溶性强, 虽然不大符合 Lipinski 的口服类药 5 规则 (ROF), 而作为蛋白-蛋白相互作用的抑制剂却是需要的。ROF 是小分子药物大数据的统计概率, 不能成为药物设计的羁绊。**59** 的代谢位点是 N-去甲基化, 二甲胺基也是结构改造的位点。

7.1 变换硝基

硝基拉电子性有利于提高磺酰胺的酸性, 有助于结合, 但不利于溶解性。换成其他拉电子基团如氰基、三氟甲基、三氟乙酰基和甲磺酰基等化合物的活性都有下降, 其中三氟甲磺酰基化合物 **60** 活性较好, 也增加了生物利用度和体内暴露量。

7.2 变换联苯基

联苯基刚性过强, 不利于吸收, 将中间的苯环用不同大小的环烯烃替换, 以保持片段 1 的构象的同时, 改善物化性质。结果表明都有一定的细胞活性, 环的大小对活性影响很大, 其中环己烯化合物 **61** 活性最强。

7.3 变换二甲胺乙基侧链

去除二甲胺乙基侧链的化合物 **62** 的口服生物利用度为 28%, 提高了 37 倍, 但细胞活性显著下降, 增加了与血清的结合, 因为设计这个侧链本意就是抑制与血清白蛋白的结合。用吗啉环 ($\text{pK}_a \approx 7.5$) 代替二甲胺基, 化合物 **63** 的细胞活性仍在亚微摩尔水平, 生物利用度提高了 4 倍 ($F = 16\%$), 所以吗啉环是维持活性提高吸收性的基团, 可与其他优化基团搭配。

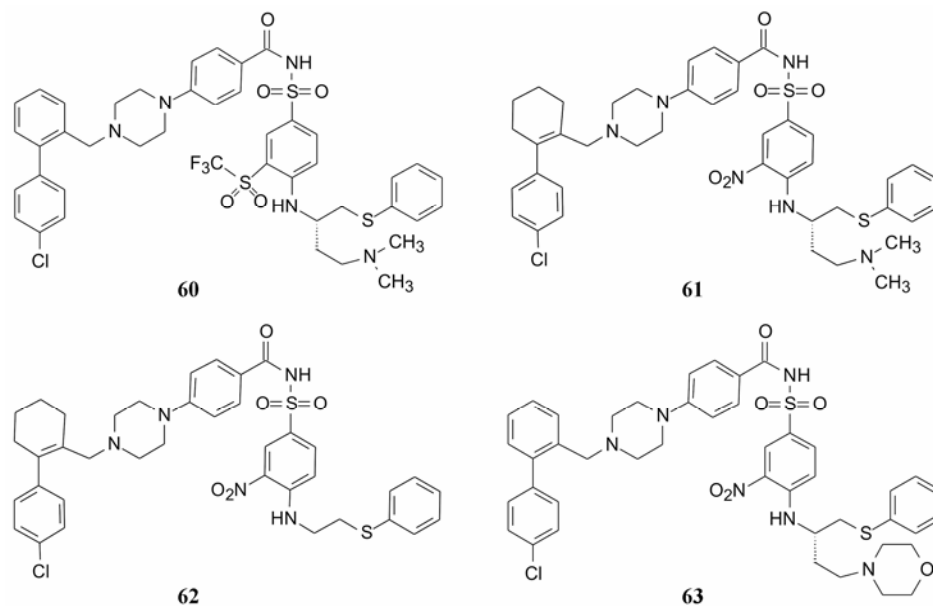
表 8 列出了这些化合物的细胞活性、药代性质与优化前的 **59** 的比较。

分析表中化合物的不同位置优化的构效 (SAR) 和构代关系 (SPR), 曲线下面积 (AUC, 代表一定时程内的药物暴露量) 与药效的比值 ($\text{AUC}/\text{EC}_{50}$) 可表征化合物的药代和药效的总体质量, **60** 和 **61** 显著提高了活性, AUC 也优于化合物 **59**, 提示三氟甲磺酰基和环己烯分别替换硝基和苯环是优势选择; **62** 没有碱性侧链, 活性很差, 说明 **62** 是不可取的; **63** 的吗啉基对药代呈正贡献。

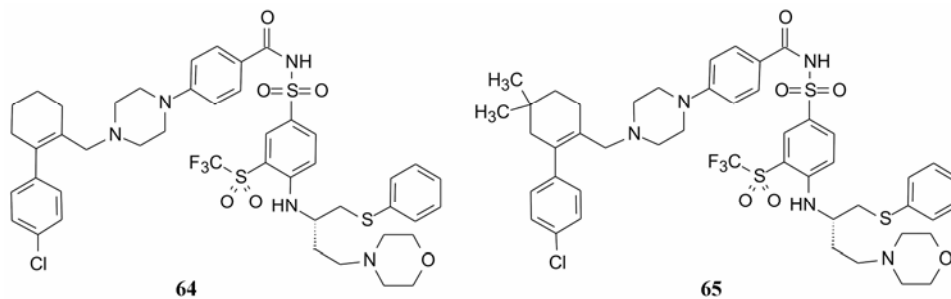
7.4 优势片段的组合

将片段 1 换成 4-氯代苯基环己烯, 片段 2 的硝基换成三氟甲磺酰基, 片段 3 换作吗啉基, 拼合成新的分子, 化合物 **64** 和 **65** 是有代表性的化合物, 药效学和药代动力学性质如表 9 所示。

表中数据表明, 化合物 **64** 和 **65** 由于整合了环己烯 (替换苯环)、三氟甲磺酰基 (替换硝基)、吗啉 (替换二甲胺基) 诸因素, 几乎是加和性地改善了药代性质, 比 **59** 提高了 20~30 倍, 药理活性也有所提高。由于蛋白-蛋白相互作用的热域 (hot spots) 具有播散性, 热域之间独立存在, 相互影响较小, 因而这种加和性 (药效和药代) 比较直观明显, 与作用酶或受体的药物 (基团间相互影响显著) 有所不同。用小鼠、大鼠、犬和猴系统地比较了 **64** 和 **65**, 绝对生物利用度都达到 20%, **65** 优于 **64**。进而用小鼠多种移植性肿瘤模型灌胃 **65**, 表明有抑制作用。**65** 的代号为 ABT-263, 定名 navitoclax, 确定为候选化合物, 进入临床试验研究 (Park CM, Bruncko M, Adickes J, et al. Discovery of an orally bioavailable small molecule inhibitor of prosurvival B-cell lymphoma 2 proteins. J Med Chem, 2008, 51: 6902-6915)。

Table 8 Activity and PK properties of typical compounds

Compd.	H146/10% HS EC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	C _{max} /μmol·L ⁻¹	AUC/μmol·L ⁻¹ ·h	F/%	AUC/EC ₅₀
59	0.087	0.039	0.28	6	3.2
60	0.039 4	–	0.83	–	21.0
61	0.026	–	0.65	–	25.3
62	33.0	1.15	10.4	28	0.32
63	0.61	0.20	1.16	16	1.9

Table 9 PD and PK of compound 64 and 65

Compd.	EC ₅₀ /nmol·L ⁻¹			AUC/μmol·L ⁻¹ ·h	AUC/EC/h
	FL5.12/Bcl-2	FL5.12/Bcl-xL	10% HS, H146c		
59	7.7	30	87	0.28	3.2
64	1.1	0.7	58.9	3.87	65.7
65	5.9	4.2	86.7	6.26	72.2

8 结构再改造—消除抑制血小板的不良反应

8.1 降低血小板的不良反应

Navitoclax (65) 的 II 期临床试验, 显示对患者有抗肿瘤作用, 但同时出现血液毒性, 与临床前实验发现剂量依赖性的降低血小板相吻合。研究表明是由于抑制 Bcl-xL 蛋白的缘故。这个不良反应限制了给药剂量, 致使治疗窗口狭窄。这个结果是对靶标蛋白 Bcl-xL 的进一步质疑, 也由此可见首创性药物靶标风险时刻存在, 靶标的可药性被不断地考量。因而

拟从化学结构上改造, 去除对 Bcl-xL 抑制作用, 保留和提高抑制 Bcl-2 的活性。

8.2 分析结合特征

促凋亡的 Bcl-xL 和 Bcl-2 蛋白与抗凋亡蛋白的 BH3 结构域的结合模式非常相似, 这是分开两种活性的困难所在, 但有必要深入分析结合的微观特征, 为提高选择性修饰分子结构提供信息。

Bcl-xL 与 Bcl-2 共同的结构域是两个疏水性 α 螺旋被 5~7 个两亲性的 α 螺旋围绕, 其中 4 个螺旋形

成了长度为 20Å 疏水沟槽, 与抗凋亡蛋白的 BH3 多肽域结合。丙氨酸扫描提示, Bcl-xL 和 Bcl-2 沟槽中主要结合位点是 P2 和 P4 疏水腔, 以及精氨酸与 BH3 的天冬氨酸残基的静电结合。

Navitoclax 与 Bcl-2 复合物晶体结构显示, 苯硫基进入 P4 疏水腔中, 还与磺酰胺发生 π - π 叠合作用。4-氯代苯基环己烯片段结合于 P2 疏水腔。

8.3 结构变换

8.3.1 去除苯硫基侧链 上述分析并不能分辨 Bcl-xL 与 Bcl-2 的结构差异, 因而通过变换小分子结构, 分析构效关系方法, 即药物化学的试错法 (trial and error), 提高对 Bcl-2 的选择性作用。通过系统地除去或变换重要的结合基团, 发现去除苯硫基的化合物 **66** 对 Bcl-2 失去了部分活性 ($K_i = 59 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但明显降低了抑制 Bcl-xL 作用 ($K_i = 5540 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 提示有可能区分两个靶标蛋白。

化合物 **66** 与 Bcl-2 的晶体结构显示结合模式与 navitoclax 相似, 但片段 3 占据的 P4 腔穴的空间变小。另一个特征是 **66** 与 Bcl-2 二聚体结合, 第 2 个 Bcl-2 蛋白的色氨酸残基 (Trp30) 嵌入到 **66** 结合的 P4 腔内, 吡啶环与硝基苯形成 π - π 叠合作用, 与 navitoclax 的苯硫基的 π - π 叠合相似。Trp30 的吡啶氮原子与 Bcl-2 的 Asp103 发生氢键结合 (Bcl-xL 的残基为 Glu103)。图 5 是 **66** 与 Bcl-2 二聚体的晶体图, 紫色的吡啶环与硝基苯发生 π - π 叠合, 氮原子与 Asp103 发生氢键结合。

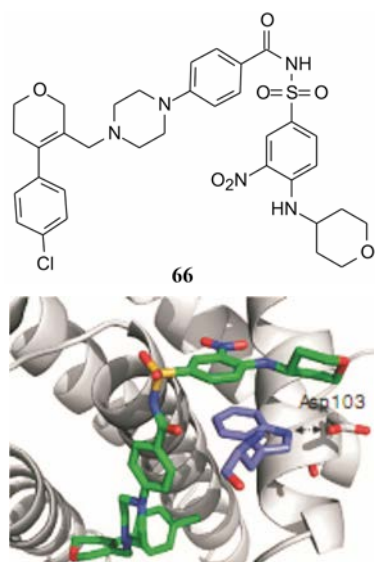


Figure 5 Crystal diagram of the complex of **66** with Bcl-2

8.3.2 片段 3 连接吡啶环 模拟上述的结合特征将吡啶环经醚键连接在母核苯环上, 化合物 **67** 结合 Bcl-2 有高度选择性, $K_i < 0.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与 Bcl-xL 结合

的 $K_i > 660 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 活性相差千倍。与 Bcl-2 二聚体的晶体图 (图 6) 显示吡啶环处于 Trp30 的位置, 氮原子与 Asp103 发生氢键结合, 此外, 吡啶的并合苯环与 Asp107 的距离适于氢键结合, 提示可利用该位置换作氮杂吡啶以增强结合作用。

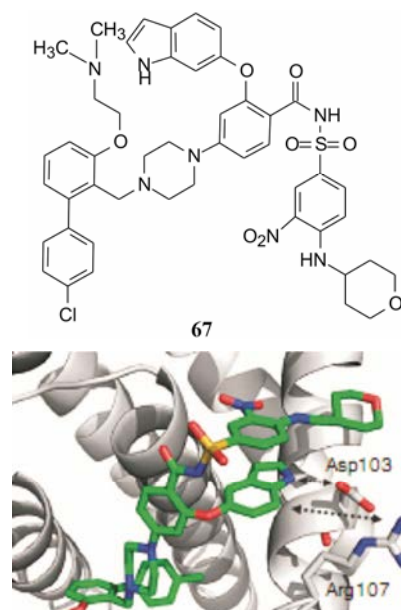
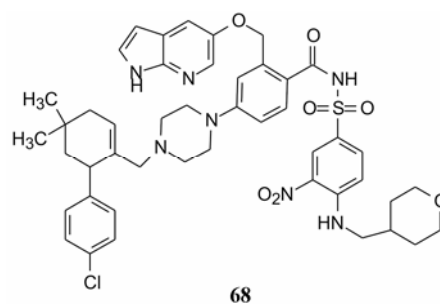


Figure 6 Crystal diagram of the complex of **67** with Bcl-2

8.4 新的候选化合物和 venetoclax 的上市

优化至此, 将原来作用于双靶标蛋白的 navitoclax 改造成只选择性结合于 Bcl-2 的化合物。整合的结构因素包括有利于药代性质、不与血浆白蛋白结合、增强对 Bcl-2 结合和消除对 Bcl-xL 的作用等结构因素, 经药物化学和构效关系的反馈, 优化出化合物 **68** (ABT-199)。



68 选择性抑制 Bcl-2, 而对 Bcl-xL 作用很弱, 表 10 列出了对靶标蛋白和高表达细胞的作用。例如对 Bcl-2 高表达的急性淋巴细胞白血病细胞 (ALL) $EC_{50} = 8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而对 Bcl-xL 高表达的 H146 细胞 $EC_{50} > 4000 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。**68** 消除了抑制血小板的不良反应, 小鼠灌胃 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($AUC = 2261 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$), 血小

Table 10 The selective action of **68** to BCL-2

$K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$		$\text{EC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$			
Bcl-2	Bcl-xL	FL5.12 Bcl-2	FL5.12 Bcl-xL	RS4;11/ALL Bcl-2	H146 Bcl-xL
< 0.01	48	4	261	8	4260

板计数未见变化, 而 navitoclax 犬口服 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($\text{AUC} = 115 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$), 用药后 6 h 的血小板降低 95%, 是由于作用靶标不同的缘故。

化合物 **68** 可口服吸收, 6~8 h 血药浓度达峰, 半衰期 26 小时。定为候选化合物, 名为 venetoclax, 经临床实验, 证明对 17 号短臂染色体缺失的慢性淋巴白血病有效, 于 2016 年 4 月 FDA 批准上市 (Souers AJ, Levensonl JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. Nat Med, 2013, 19: 202-208)。

9 后记

Venetoclax 是全球第一个针对蛋白-蛋白相互作用的小分子抑制剂, 屡改靶标和先导物, 研发历程 20 年, 彰显出首创性药物的风险与艰辛。由开始以

Bcl-xL 为靶标, 中间转换为作用于 Bcl-xL 和 Bcl-2 双靶标, 后来才聚焦于 Bcl-2 靶标, 是在确定了候选物乃至进入临床试验后的更换, 提示确证药物靶标贯穿于研发的全过程, 风险贯穿始终。

Venetoclax 是基于片段的药物发现 (FBDD) 的成功范例, 用 SAR by NMR 方法和片段连接策略构建苗头化合物, 在由苗头过渡到先导物、优化活性、提高选择性、消除脱靶作用等过程中, NMR 和 X-射线衍射分析微观结构起到指导作用, 分子模拟和构效关系则是验证与反馈的重要手段。Venetoclax 的成功也体现了概念验证是至关重要的。此外, venetoclax 的结构和物化性质几乎完全突破了类药 5 规则, 创新不能墨守成规, 因为指望相对分子质量在 500 以下的小分子阻断两个蛋白的结合是难以实现的。