

## • 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。

囊性纤维化属于罕见病,是高致死率的遗传性疾病,从基因和分子水平上解析发病原因和机制,可为创制针对性的治疗药物提供依据和靶标以及评价的模型。从高通量的随机筛选到依伐卡托的批准上市,研发过程清晰地显示出药物化学方法与构效分析的作用。此外,针对依伐卡托代谢转化的位点而设计的氘代物,具有延长半衰期和降低用药频度的良好前景,显示了最简单的电子等排置换的有用性。 (编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2017-0347

# 囊性纤维化治疗药依伐卡托的研制

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

囊性纤维化是人类遗传性疾病,由于特定基因的缺失或突变,使体内多种器官功能逐渐消退,例如导致呼吸和行动困难以及提早死亡。囊性纤维化疾病是由于编码囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)的基因发生突变,蛋白中Phe508残基缺失,使CFTR蛋白折叠、运输和膜稳定性发生变化。CFTR构成了蛋白激酶A(PKA)调控的阴离子通道,调控许多器官上皮细胞的氯离子和碳酸氢根离子的转运,因而CFTR基因变异往往影响全身的机能。囊性纤维化是一类凶恶的罕见病,没有有效的治疗药物。

## 2 苗头化合物

**2.1 研发目标和活性评价** Vertex公司的研发目标是治疗囊性纤维化可口服的小分子药物,作用机制是通过恢复变异的CFTR通道功能,达到缓解和治疗效果。筛选和评价化合物活性的方法是通过两种互补的机制影响CFTR的功能,分别是增强和纠正CFTR功能。增强功能是化合物通过促进CFTR离子通道开启的几率,增加离子的流动;方法是将NIH-3T3小鼠成纤维细胞表达人缺失Phe508的CFTR蛋白,通过毛喉素(forskolin,天然二萜,为cAMP酶激活剂)刺激,在受试物的作用下,使Cl<sup>-</sup>离子流出,从而改变了膜电位,用荧光法测定膜电位的变化强弱,表征受试物的活性。化合物的纠正功能是改善缺失Phe508的CFTR的加工和向细胞表面的传输,从而提高CFTR介导氯离子的分泌。方法

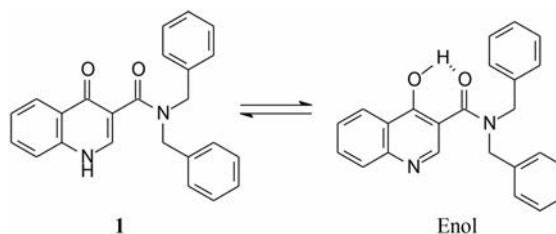
是将成纤维细胞与受试物温孵16 h,按上述方法测定膜电位的变化。

**2.2 高通量筛选获得苗头化合物** 为了发现苗头化合物,对228 000个化合物进行了高通量筛选,筛选方法是用上述促进离子通道的开启功能的模型(Goor FV, Hadida S, Grootenhuis PDJ, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function *in vitro* by a CFTR potentiator, VX-770. Proc Natl Am Sci U S A, 2009, 106: 18825-18830),结果发现了化合物**1**, EC<sub>50</sub>为2.1 μmol·L<sup>-1</sup>。证明化合物**1**是通道蛋白的促进剂,而不是CFTR功能的激活剂。另外,用患者的支气管上皮细胞(缺失Phe508-CFTR蛋白)测定活性, EC<sub>50</sub>为1.5 μmol·L<sup>-1</sup>,但刺激Cl<sup>-</sup>离子分泌的EC<sub>50</sub>为12.2 μmol·L<sup>-1</sup>,再一次证实激活CFTR的功能较弱。

从结构上分析化合物**1**,母核喹啉酮可发生互变异构成为4-羟基喹啉,羟基与酰胺的氧可形成分子内氢键而稳定化,所以**1**存在有两种结构形态,这在优化和结构变换中是需要考虑的问题。

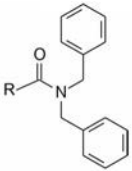
## 3 结构优化







**3.1 喹啉酮的变换** 为了研究构效关系和优化结构,



研发者将 **1** 分解成两个部分, 即羰基左侧的喹啉酮和右侧的胺片段, 分别对着两个片段加以变换。喹啉酮结构变换所合成的化合物列于表 1, 评价模型是对缺失 Phe508-CFTR 的 NIH-3T3 细胞促进通道开启的活性。

**Table 1** Compounds that convert quinolinone fragments



Compd.	R	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>1</b>		2.1
<b>2</b>		16
<b>3</b>		2% @ 30 μmol·L <sup>-1</sup>
<b>4</b>		37% @ 30 μmol·L <sup>-1</sup>
<b>5</b>		10% @ 30 μmol·L <sup>-1</sup>
<b>6</b>		3.5

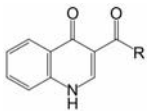
构效关系简析如下: ① 化合物 **2** 是 **1** 的烯醇式去羟基物, 无取代的喹啉环使活性下降; ② 去除并合的苯环 (**3**) 失去活性, 提示该片段要有一定的亲脂性; **4** 和 **5** 失去了 N1 上的氢原子而无活性, 说明 N-H 的重要性, 推测作为氢键给体参与结合作用; ③ 萘酚基本保持活性, 推测 **1** 的烯醇式也可能是与蛋白结合的结构。


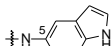

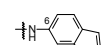

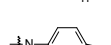



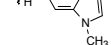

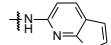

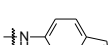


**3.2 二苄基胺的变换** 为优化右侧的二苄基胺, 设计合成了大约 70 多个化合物, 包括伯、仲、叔胺、芳香胺和杂环胺等, 表 2 列出有代表性化合物的结构与活性。

表 2 的构效关系分析如下: ① 苯胺 (**7**)、2,6-二甲基苯胺 (**10**)、4-乙基苯胺 (**12**) 和 β-萘胺 (**14**) 等的活性与 **1** 相似; ② 苯胺的邻位有一个烷基 (**8** 和 **11**) 或对位有支链烷基 (**13**), 可使活性提高 5~10 倍; ③ 化合物 **17** 为吲哚啉结构, 活性是 **1** 的 3 倍, 杂环结构是一个优化的生长点; ④ 化合物 **16** 连接的是 6-氨基吲哚, EC<sub>50</sub> = 0.1 μmol·L<sup>-1</sup>, 比化合物 **1** 提高 20 倍。若连接成 5-氨基吲哚 (**15**) 或将 **16** 的 N1 甲基化 (**18**) 活性下降 60 倍。提示 **16** 的两个 NH 对结合的重要性。

对高活性的化合物 **16** 用 60 多种靶标评价其脱靶作用, 除对 GABA<sub>A</sub> 苯并二氮卓受体 (氯通道) 有较强的活性外 (IC<sub>50</sub> = 0.1 μmol·L<sup>-1</sup>), 都没有呈现活性, 表明 **16** 对缺失 Phe508-CFTR 蛋白的细胞有良好的选择性。然而 **16** 的溶解度较小, 可能的原因是 4-酮基与 NH 发

**Table 2** Compounds that change amine structure



Compd.	R	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	Compd.	R	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>7</b>		1.3	<b>15</b>		6.1
<b>8</b>		0.2	<b>16</b>		0.1
<b>9</b>		8.5	<b>17</b>		0.4
<b>10</b>		1.5	<b>18</b>		6.4
<b>11</b>		0.2	<b>19</b>		13% @ 30 μmol·L <sup>-1</sup>
<b>12</b>		0.8	<b>20</b>		5.6
<b>13</b>		0.2	<b>21</b>		12% @ 30 μmol·L <sup>-1</sup>
<b>14</b>		0.8	<b>22</b>		21% @ 30 μmol·L <sup>-1</sup>

生氢键结合,形成平面性分子,进而分子间氢键结合使排布紧密,高晶格能导致溶解度降低。X-射线分析**16**的晶体结构证实了这种推断。图1是化合物**16**的晶体X-射线衍射测定的结构。

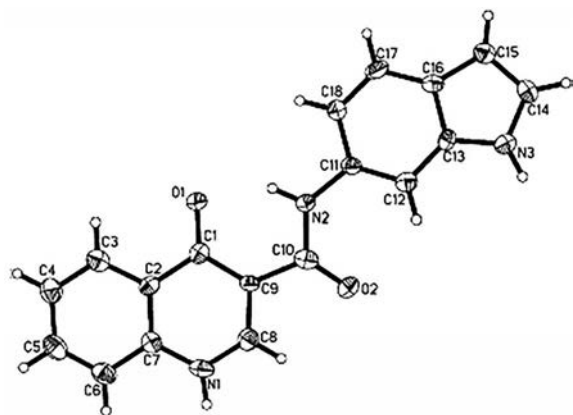
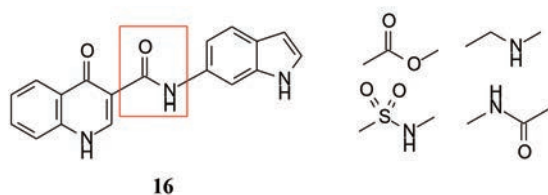


Figure 1 X-ray structure of compound **16**

#### 4 对化合物**16**的结构变换

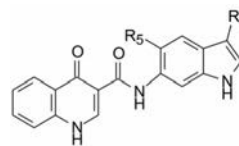
**4.1 变换酰胺键** 化合物**16**作为新一轮的先导物进行优化,首先考察连接两片段的酰胺基的变换对活性的影响。为此设计了由酯基、磺酰胺基、亚胺基和胺基作为连接基的化合物,结果表明活性都非常弱,在 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下活性为1%~19%,提示-CO-NH-连接基不能变动,即使反向连接成-NH-CO-的化合物也没有活性,说明这个连接基是不能变动的。



**4.2 吲哚环上加入取代基** 由于化合物**8**和**13**分别在2位和4位引入烷基,显著提高了活性,所以在吲哚环的3位或5位(相当于**8**和**13**的2和4位)引入烷基。合成的烷基化合物列于表3。结果提示,3-乙基吲哚(**23**)与**16**的活性相同,5-乙基(**25**)则提高了5倍;3-或5-叔丁基(**24, 26**)提高了10倍,提示高亲脂性和空间占位性有利于活性。

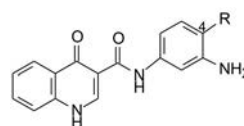
**4.3 开环的胺基化合物** 化合物**17**是二氢吲哚环,剖裂2,3位的饱和碳键而成为含开链烷基的苯胺化合物,设计合成了表4的化合物。**27**的苯环上没有烷基取代,活性比**16**降低近70倍,随着引入大尺寸和叉链烷基,活性则提高,例如4-叔丁基取代的化合物**24**活性与**16**相同。再次表明酰胺的对位含有叉链烷基有利于活性。

Table 3 Indole ring contains alkyl compound



Compd.	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>16</b>	H	H	0.1
<b>23</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	0.1
<b>24</b>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	H	0.009
<b>25</b>	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0.02
<b>26</b>	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.011

Table 4 Ring-opened amine compound

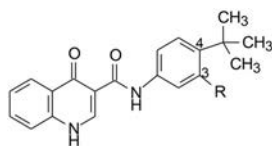


Compd.	R	clog P	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>16</b>	-	1.6	0.1
<b>27</b>	H	0.4	6.9
<b>28</b>	CH <sub>3</sub>	0.8	6.0
<b>29</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1.3	1.7
<b>30</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.5	0.3
<b>31</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1.9	0.4
<b>32</b>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	2.1	0.1

**4.4 优化3位的氨基** 化合物**32**的结构简化为3-氨基4-叔丁基取代,显示了高活性,EC<sub>50</sub>为0.1 μmol·L<sup>-1</sup>,所以固定4-叔丁基,探索变换3-氨基对活性的影响。表5列出的化合物表明,氨基被酰化(**33**和**34**)活性显著下降,用氨基基(**35**)、羧基(**37**)和磺酰氨基(**38**)置换的化合物也使活性减弱,而用羟甲基(**36**)或没有取代基(**39**)或氟代(**40**)仍保持活性,EC<sub>50</sub>为0.1 μmol·L<sup>-1</sup>。

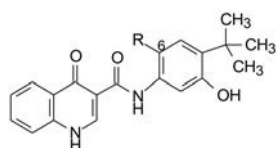
3-羟基化合物**41**显示了意外的高活性,比**16**提高了40倍。羟基为氢键给体(也是接受体),体积较小,可能是高活性的原因。这也再现了药物化学中苯酚与吲哚环互为等排体的概念(在多巴胺受体激动剂的设计中已有应用)(Asselin AA, Humber LG, Voith K, et al. Drug design via pharmacophore identification. Dopaminergic activity of 3H-benz[e]indol-8-amines and their mode of interaction with the dopamine receptor. J Med Chem, 1986, 29: 648–654)。用患者支气管上皮细胞(缺失Phe508-CFTR蛋白)测定化合物**41**的活性,EC<sub>50</sub>为5 nmol·L<sup>-1</sup>,比化合物**1**提高了300倍。

**4.5 苯环的6位变换** 优化至此,3-羟基-4-叔丁基苯成为优化选择的片段。6位是个需要探索的位置,因为前述的**8, 11**和**24**等化合物的酰胺基邻位的烷基取代有增强活性的效应,对应于此处的6位。故而合成了表6的化合物。6位用F,CF<sub>3</sub>或叔丁基取代都显示

**Table 5** The activity of the compound that changes the 3-amino group

Compd.	R	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	Compd.	R	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>32</b>	NH <sub>2</sub>	0.1	<b>37</b>	COOH	13% @ 30 μmol·L <sup>-1</sup>
<b>33</b>	NHCOCH <sub>3</sub>	24% @ 30 μmol·L <sup>-1</sup>	<b>38</b>	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	5.1
<b>34</b>	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3.5	<b>49</b>	H	0.1
<b>35</b>	CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	20% @ 30 μmol·L <sup>-1</sup>	<b>40</b>	F	0.1
<b>36</b>	CH <sub>2</sub> OH	0.1	<b>41</b>	OH	0.003

高活性。结果表明6位有或没有取代基、以及不同性质的取代基都有很强的体外活性。

**Table 6** 6-Position transformation of 3-hydroxy-4-*tert*-butylbenzene

Compd.	R	EC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	Compd.	R	EC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>
<b>41</b>	H	3	<b>43</b>	CF <sub>3</sub>	3
<b>42</b>	F	2	<b>44</b>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3

## 5 综合评价和候选物的确定

对优化出的喹啉系列化合物**24**和**26**和苯酚系列的**41**~**44**作多参数评价,以确定候选化合物。表7列出了这些化合物对患者支气管上皮细胞(缺失Phe508-CFTR蛋白)的体外活性(更接近患者细胞的体外模型)和大鼠的药代动力学性质。结果表明,对支气管上皮细胞的抑制活性都在亚纳摩尔的高活性水平。化合物**44**静脉注射大鼠的药代显示的清除率和半衰期优于其他化合物。

进而试验了**44**对160个蛋白的作用,高浓度下未见显著作用,表明没有脱靶作用,其中包括对hERG离子通道无抑制活性,提示对心脏的不良风险较低。在20 μmol·L<sup>-1</sup>浓度下**44**对与药物代谢相关的CYP酶无抑制作用。

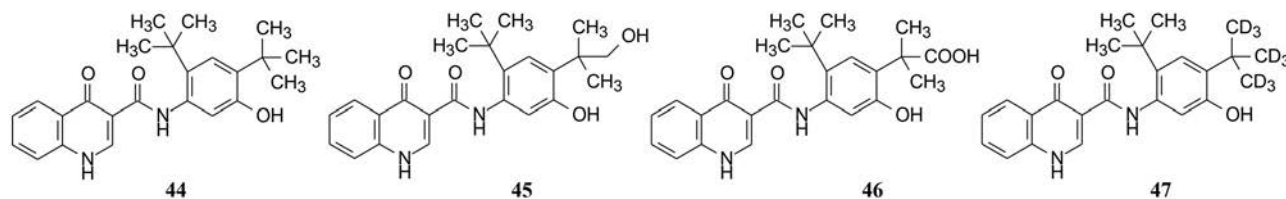
化合物**44**另一个重要作用是对双突变(F508缺失和G511D突变)的人支气管上皮细胞门控通道有较高的活性,也提高了细胞对氯离子的分泌活性,EC<sub>50</sub> = 236 nmol·L<sup>-1</sup>。所有这些性质都提示**44**有良好的开发前景,因而用小鼠、大鼠、犬和猴经灌胃和静脉注射途径系统地评价了药代性质,表明有良好的口服生物利用度和较长的半衰期(数据省略)。从而确定为候选化合物,定名为依伐卡托(ivacaftor),经临床前和临床研究,2015年7月2日美国FDA批准上市,可单一用药,或与鲁玛卡托(lumacaftor)合用,治疗囊性纤维化患者,可显著改善囊性纤维化病人的肺功能。

## 6 依伐卡托的代谢转化和氘代物的研制

依伐卡托为口服用药,每日两次。体内外研究表明,依伐卡托可被CYP3A4和3A5氧化代谢成M1(**45**)和M6(**46**)而失活(Schneider EK, Reyes-Ortega F, Wilson JW, et al. Development of HPLC and LC/MS-MS

**Table 7** Multi-parameter evaluation of compounds **24**, **26** and **41**–**44**. \* *In vitro* activity measured with patient bronchial epithelial cells (without Phe508-CFTR protein)

Compd.	EC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup> *	Dose/mg·kg <sup>-1</sup>	AUC/μg·h·mL <sup>-1</sup>	Cl/mL·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	t <sub>1/2</sub> /h	V <sub>s</sub> /L·kg <sup>-1</sup>
<b>24</b>	42	2.45	0.70	60.7	1.3	4.4
<b>26</b>	97	2.49	2.64	15.8	2.9	3.3
<b>41</b>	5	1.29	0.26	85.6	0.7	2.9
<b>42</b>	45	1.57	0.52	62.9	1.1	2.9
<b>43</b>	22	0.65	0.65	17.7	2.9	3.2
<b>44</b>	22	1.3	3.04	5.5	9.5	3.6



methods for the analysis of ivacaftor, its major metabolites and lumacaftor in plasma and sputum of cystic fibrosis patients treated with orkambi or kalydeco. *J Chromatog B*, 2016, 1038: 57-62)。为降低依伐卡托的代谢速率, Concert 公司利用其 DCE (氘代化学实体) 平台技术将 4 位叔丁基变换为氘代叔丁基, 代号为 CPT-

656 (47)。由于 C-D 键的化学稳定性强于 C-H 键, 动力学同位素效应表明, 降低了 CTP-656 的代谢速率, 提高了稳定性, 延长了在体内的暴露时间, I 期临床研究表明, CTP-656 口服每日一次可维持有效浓度。Concert 以 2.5 亿美元转让给原研公司 Vertex 公司。这是一个基于氘代改善药代动力学的例子。