

• 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、产品开发和疗效评价等多维科技活动。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重性质。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。

这是第一个通过干预肿瘤细胞营养代谢治疗急性髓性白血病药物,是以分子生物学和生物化学机制为基础研发的成功实例,只抑制肿瘤细胞的酶,而不影响正常的三羧酸循环,显示出多层面的首创性。作为罕见病药物,由于诊断和适应症明确,疗效肯定,因而获得优先审评资格,研发时程9年获得批准。由于未发现系统介绍本品研发历程的文献,本案例主要根据披露的专利内容,从化学结构、活性和物化性质等探索和解析其研发的要点,这是一个尝试。

(编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2017-1260

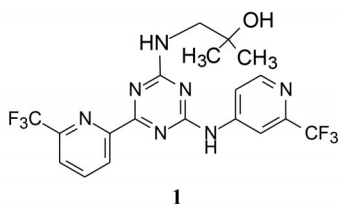
首创的干预肿瘤营养代谢的恩西地平

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

2017年FDA批准Celgene公司研发的药物恩西地平(1, enasidenib)上市,治疗因特定基因变异而发生的急性髓性白血病(AML)。同时还批准了匹配的试剂盒,称作Real Time IDH2,检测AML患者是否发生特定基因的变异,因而是一个精准治疗药物的范例。



1

本品于2009年由Agiros药业开始研究,次年与Celgene联合开发,2013年开始I期临床,2014年作为罕见病药物进入快速研发通道,2017年上市,作为首创性药物研发全程9年。

2 靶标和作用机制

恩西地平是干预特定肿瘤营养代谢的药物。糖的有氧代谢三羧酸循环(TCA)中的一个重要环节是异柠檬酸脱氢后脱羧生成 α -酮戊二酸,由异柠檬酸脱氢酶(IDH)催化。

IDH有5种亚型,分成两类,一类是依赖于辅酶NAD⁺为电子接受体的IDH(三种),存在于线粒体中;另一类(两种)依赖于辅酶NADP⁺,其中一种在线粒体

内,一种在胞浆中。正常的IDH为同二聚体。

人IDH2是由452个氨基酸组成,处于线粒体内,依赖于辅酶NADP⁺。野生型IDH2催化异柠檬酸氧化脱羧生成 α -酮戊二酸,NADP⁺还原成NADPH。某些肿瘤细胞IDH2基因发生突变,产生了新的功能,即利用辅酶NADPH(作为电子供体)将 α -酮戊二酸还原生成R-2-羟基戊二酸(2HG),2HG促进肿瘤的发生和生长。野生型IDH2没有产生2HG的功能,所以抑制突变型IDH2可切断肿瘤细胞的营养物质2HG(Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature, 2009, 462: 739-744)。突变的主要位点是R140Q,即Arg140变异为Gln140,由质子化的碱性侧链变成中性的酰胺。也可发生R172K,即Arg172突变为Lys172。选择性地抑制突变型IDH活性,是切断肿瘤营养代谢的一个环节。图1是野生型和突变型IDH的代谢转化产物和药物干预的环节(Chen J, Yang J, Cao P. The evolving landscape in the development of isocitrate dehydrogenase mutant inhibitors. Mini Rev Med Chem, 2016, 16: 1344-1358)。

3 活性评价

3.1 评价化合物对突变型IDH2酶的抑制活性 测定受试物抑制突变型IDH2的活性,是阻断酶利用NADPH将底物 α -酮戊二酸还原成2-羟基戊二酸的反应。将不同浓度的受试物与酶预温孵后,加入定量的NADPH和 α -酮戊二酸,温孵60 min后,加入黄递酶(diaphorase)

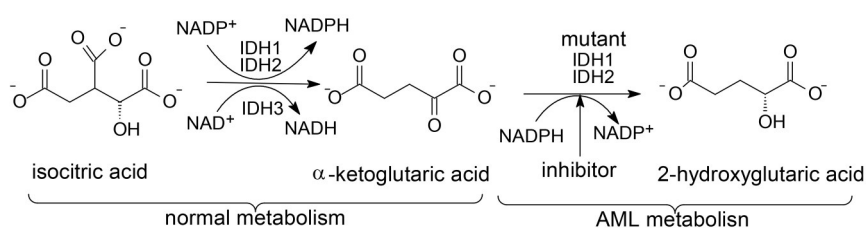


Figure 1 The catalytic process of wild and mutant IDH

和该酶的底物刃天青 (resazurin), 黄递酶利用剩余的 NADPH 将刃天青还原成具有强荧光性的试卤灵 (resorufin), 测定后者的荧光强度计算消耗的 NADPH 量, 回算 IDH2 受抑制的程度。每个受试物的活性分别用发生突变的 IDH2^{R140Q} 和 IDH2^{R172K} 的 IC₅₀ 值表示。图 2 是测定原理的示意图。

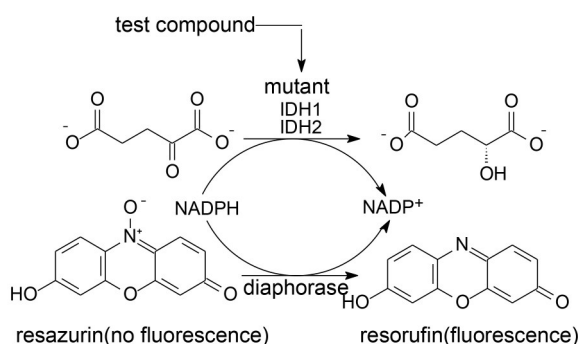


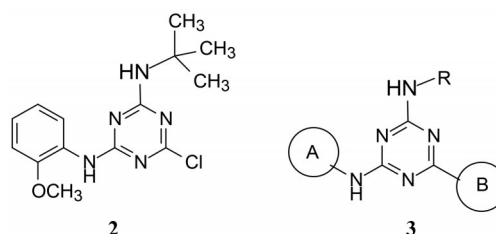
Figure 2 The reaction for measuring inhibitory activity of test compound on mutant IDH2

3.2 评价化合物对发生 IDH2^{R140Q} 突变的细胞抑制活性 将 IDH2^{R140Q} 突变的细胞于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中温孵 24 h 后, 加入不同浓度的受试物温孵 72 h, 加入 Cell Titer Glo 化学发光活性检测试剂盒, 测定积分时间为 500 ms 的发光值, 计算受试物的 IC₅₀。

所以, 每个受试化合物测定 3 个活性数据: IDH2^{R140Q} 酶、IDH2^{R172K} 酶和发生 IDH2^{R140Q} 细胞的半数抑制浓度 IC₅₀。

4 先导物和结构优化

肿瘤细胞 IDH2 的一个氨基酸残基发生变异, 导致出现新的催化功能, 虽然底物结构和反应机制明确, 但难以基于酶-底物结构进行分子设计。Agiost 公司通过对化合物库的随机筛选发现了均三嗪化合物 **2** 对 IDH2^{R140Q} 有初步活性, IC₅₀ = 1.9 μmol·L⁻¹。2 的结构骨架均三嗪, 环上的 3 个氮原子不宜改变, 氯原子显然是变换的原子, 从而确定了通式 **3** 的 3 个位置作取代基变换。合成的近 600 个化合物公布于专利中, 其中 A 和 B 分别代表脂肪族或芳香族五或六元环片段, R 代



表开链或环状烷基或杂原子 (Cianchetta G, Delabarre B, Popovici-Muller J, et al. Therapeutically active compounds and their method of use. WO 2013/102431)。

4.1 R 的变换 固定 A 和 B 为苯环, 变换 R 的化合物如图 3 所列的片段。

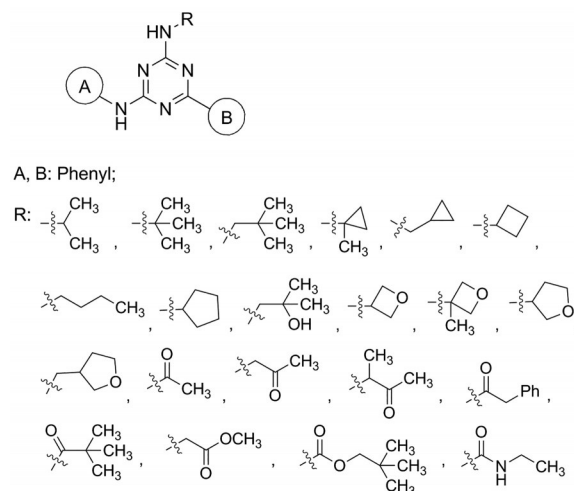
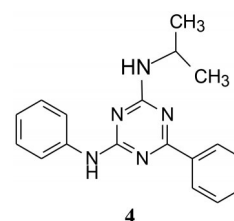


Figure 3 The compounds with altered R moiety



化合物 **4** 是代表性的高活性化合物, 抑制 IDH2^{R140Q} + NADPH 于 16 h 的 IC₅₀ = 7 nmol·L⁻¹。

4.2 片段 A 的变换 将 R 固定为异丙基, 片段 B 为苯基, 变换 A 的结构, 代表性的化合物列于图 4。

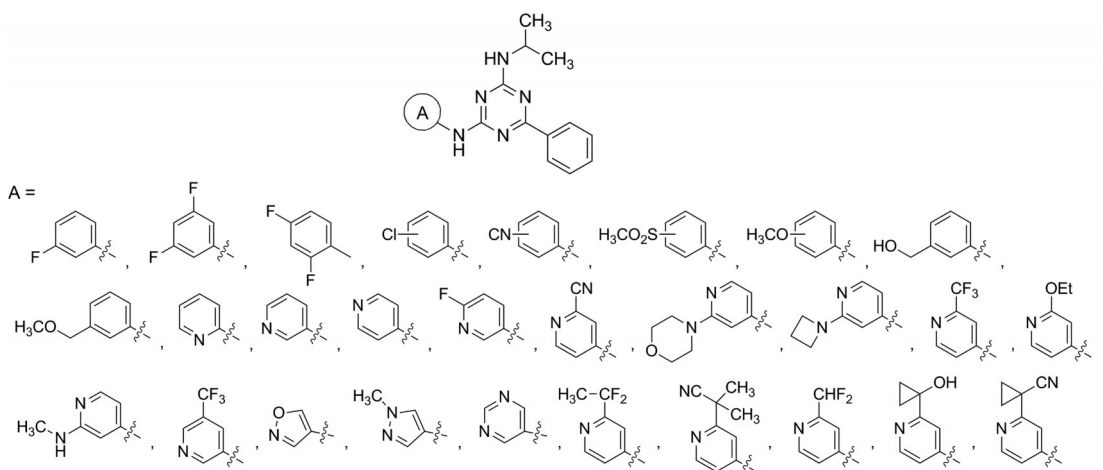


Figure 4 The compounds with alteration of fragment A

NH相连的基团A为取代苯、不同位置连接的取代吡啶、噻啶、异噻唑和吡唑等芳杂环,评价对IDH2^{R140Q}、IDH2^{R172K} (需加入NADPH)和IDH2^{R140Q}突变细胞的抑制活性,结果表明吡啶取代系列的活性与取代苯的活性相当,由于吡啶的极性强于苯,因而溶解性和代谢稳定性优于苯系列,所以在吡啶环上引入不同的取代基。结果表明3-三氟甲基-4吡啶基是优选的片段。

4.3 片段B的变换 片段B直接连接于均三嗪母核,因而B与A片段没有对称性。固定A为苯环,R为异丙基,变换B的结构,代表性的化合物列于图5。在合成的取代苯、吡啶、噻啶、噻唑和噻唑等化合物中,以2-吡啶系列的活性和溶解性占优势。

4.4 优化片段的组合 通过以上分别变换通式3的R、A和B得到的信息是,R为支化的烷基,A和B分别

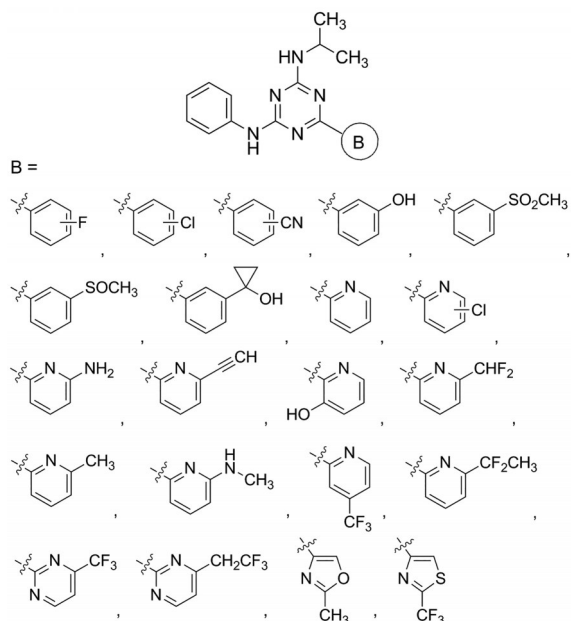


Figure 5 The compounds with alteration of fragment B

是取代的吡啶环对提高抑制IDH2^{R140Q}、IDH2^{R172K}和IDH2^{R140Q}突变型细胞的活性是有利的。其中A以取代的4-吡啶,B为取代的2-吡啶基更为优选。下一步是同时变换3个位置的取代基,组合合成了100多个化合物。

图6列出的代表性化合物,报道了抑制IDH2^{R140Q}、IDH2^{R140Q}突变型细胞和IDH2^{R172K}的活性,分别用三连码表示。a代表 $IC_{50} < 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,b为 $IC_{50} = 0.1 \sim 1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,c为 $IC_{50} = 1.0 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,o为没有活性。需要强调的是,取代的吡啶不仅因为活性较高,而且溶解性和代谢稳定性也比苯环或其他杂环好,尤其是三氟甲基取代的吡啶,出现高活性化合物的概率高,因而对含有三氟甲基吡啶的片段变换烷胺基作为目标化合物加密合成,代表性的化合物列于图6。

应当指出的是,所报道的化合物活性数据,抑制IDH2^{R140Q}突变型细胞的 IC_{50} 值往往低于抑制酶IDH2^{R140Q}的 IC_{50} ,这与通常细胞的活性弱于酶活性的规律相反(专利报道未说明原因),不过细胞活性更接近化合物的真实活性。图6列出含有3-三氟甲基-4-吡啶(片段A)和3-三氟甲基-2-吡啶(片段B)的化合物抑制IDH2^{R140Q}细胞的活性 IC_{50} 都在 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下,三氟甲基吡啶片段是优选的基团,此外,三氟甲基有助于提高化合物的代谢稳定性。

化合物1的脂肪胺侧链(R)是2-甲基-2-氨基丙胺基,R既含有极性的羟基也维持了侧链的亲脂性,兼顾了活性和成药性的要求。

5 候选物的活性与成药性特征

在众多高活性化合物中选定化合物1作深入研究的细节与根据未见详细报道,但以下特征显示出1的优势:溶解性能好:pH 7.4的水中溶解度为 $23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 2.0的溶解度为 $47 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;对肝微粒体只有弱代谢

的两个-NH-与 Gln316 的 NH 和 C=O 形成氢键网络, 三氟甲基与 Asp312 形成极性结合的卤键, Tyr194、Leu298、Ile319 和 Leu320 等氨基酸构成的疏水腔与恩西地平的亲脂性基团发生范德华和疏水性结合。由于这些结合改变了酶的构象, 导致结合动力学上呈慢结

合/慢离解 (slow-on/slow-off) 的抑制作用, 成为高选择性和长效的结构基础 (Yen K, Travins J, Wang F, et al. AG-221, a first-in-class therapy targeting acute myeloid leukemia harboring oncogenic IDH2 mutations. *Cancer Discov*, 2017, 7: 478-493)。