

· 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。

米哌妥林是多靶标激酶抑制剂, 尤以对 FLT3 发生突变的激酶特异性抑制而成就了治疗急性髓性白血病 (AML)。米哌妥林是抗生素星孢菌素的 *N*-苯甲酰衍生物, 经简单的结构变换将选择性不强的天然活性物质改变为选择性强的药物, 其中的重要推手是对 AML 血细胞中 FLT3 激酶的分子生物学与功能研究, 解析了激酶突变与 AML 的关系, 因而聚焦于该突变的激酶, 为已经制备好的活性化合物找到了归宿。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1287

治疗急性髓性白血病的米哌妥林

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 先导化合物

米哌妥林 (midostaurin, **1**) 是 2017 年美国 FDA 批准上市的抗肿瘤药物, 由诺华公司 (前为汽巴嘉基) 研发, 治疗 FLT3 激酶突变呈阳性的急性髓性白血病和肥大细胞增多症。本品是由天然抗生素星孢菌素 (staurosporine, **2**) 经结构改造而成的。

星孢菌素是 Omura 等在 1977 年由链霉菌 *Streptomyces staurosporeus* 发酵液得到的抗生素 (Omura S, Iwai Y, Hirano A, et al. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. J Antibiot, 1977, 30: 275–281), 其化学结构经单晶 X-衍射分析确证为吡啶并吡咯酮并咪唑-*N*-糖苷的环合物, 为九环并合。最初发现有抗真菌和降血压作用 (Rüegg UT, Burgess GM. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. Trends Pharmacol Sci, 1989, 10: 218–220)。直到 1986 年才发现是蛋白激酶 C (PKC) 的强效抑制剂 (Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I. Staurosporine, potent inhibitor phospholipids/ Ca^{++} dependent protein kinase. Biochem Biophys Res Commun, 1986, 135: 397–402), 由于是多种激酶的泛抑制剂, 且活性强, 因而最初结构改造和成药性的目标是提高对特定 PKC 激酶的选择性, 但没有聚焦于发生突变的 FLT3 激酶。在这期间陆续

发现了多种含有吡啶并吡咯酮并咪唑为骨架的抗生素, 代表性的有 K-252B (**3**)、TAN-1030A (**4**)、UCN-01 (**5**) 和 RK-1409 (**6**)。结构的不同在糖基和吡咯酮片段。

2 先导物的优化

2.1 活性评价 按照 Meyer 等所述的方法测定受试化合物对蛋白激酶 C (PKC)、依赖于 c-AMP 蛋白激酶 (PKA)、磷酸酶激酶 (PPK)、S6 激酶 (S6-K)、EGFR 酪氨酸激酶 (PTR) 和 c-src 激酶等的 50% 抑制浓度 IC_{50} (Meyer T, Regenass U, Fabbro D, et al. A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and *in vitro* anti-proliferative as well as *in vivo* anti-tumor activity. Int J Cancer, 1989, 13: 851–856)。诺华选择星孢菌素 (**2**) 为先导物, 是基于它多种激酶有强抑制活性, 从成药性来讲, 这既有利于对肿瘤细胞多靶标的抑制活性, 也有对正常激酶不利的脱靶作用。在没有周边化合物构效关系信息的情况下, 研发者首先对糖环上仲胺作结构变换。

2.2 仲胺的烷基化 首先对糖环上的仲胺基用烷基或芳基取代成叔胺, 代表性化合物列于表 1。合成的叔胺化合物大都降低了抑制 PKC 的活性, 而对其他酶的变化不大或也降低活性, 只有季铵盐化合物 **9** 基本保持了对 PKC 的活性, 但降低了对 PKA 的活性。叔

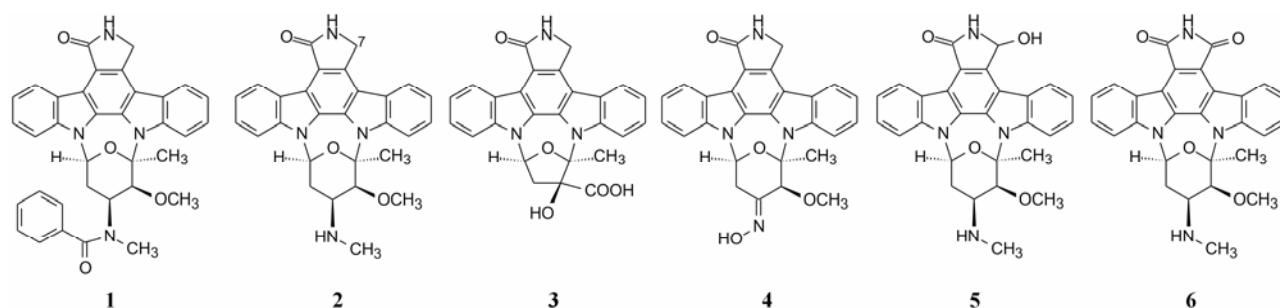


Table 1 SAR of alkylated secondary amines on the sugar moiety

| Compd. | R | IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹ | | | | | |
|--------|---|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | PKC | PKA | PPK | S6-k | PTK | c-src |
| 2 | H | 0.006 | 0.015 | 0.003 | 0.005 | 0.10 | 0.35 |
| 7 | Et | 0.10 | 1.6 | 0.07 | — | 0.33 | 0.24 |
| 8 | Me,Me | 0.032 | 0.068 | 0.021 | — | 0.043 | — |
| 9 | Me,Et | 0.014 | 0.27 | 0.018 | — | 0.91 | — |
| 10 | C ₆ H ₅ CH ₂ | 0.70 | 0.068 | 0.10 | — | 0.91 | — |
| 11 | C ₆ H ₅ | 0.63 | 0.48 | 0.015 | — | — | — |
| 12 | | 0.26 | 0.055 | 0.44 | — | 1.30 | — |
| 13 | | 0.046 | 3.2 | 0.015 | — | 0.031 | — |
| 14 | | 0.19 | 0.14 | 0.024 | — | 1.10 | — |
| 15 | | 0.14 | 0.36 | 0.05 | — | 1.30 | — |

胺化失去了氮上的氢, 氢键作用或许是与 PKC 结合的重要因素。季铵化合物的正电荷可能也有利于结合。

2.3 仲胺的酰化 用脂肪酸、芳香酸或氨基酸酰化先导物 **2** 糖环上的 NH, 代表性化合物列于表 2。仲胺基被酰化后对 PKC 的抑制活性减弱, 但对其他激酶往往减弱更显著, 因而相对提高了 PKC 选择性抑制作用。特别是 *N*-苯甲酰星孢菌素 (**25**) 与先导物相比, 对 PKC 活性虽降低了 10 倍和对 PPK 降低了 15 倍, 但对其他激酶活性很弱, 因而选择性优于 **2**。进而合成取代的苯甲酰化合物 (**26**~**36**), 但选择性没有提高。3,5-二硝基苯甲酰化合物 (**33**) 虽然对 PKA 和 EGFR 激酶完全没有活性, 但对 PKC 的活性降低了 20 倍。二硝基化合物的成药性也较低。

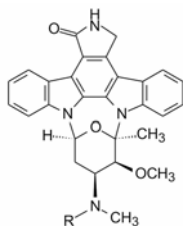
2.4 吡咯烷酮环的变换 以选择性较强的 **25** 为新的起点, 将吡咯烷酮的 NH 烷基化, 合成的 **37** 和 **38** 对所有激酶都失去了活性 (表 3), 提示该 NH 是活性的关键基团, 或许是必需的氢键, 或不容有位阻性基

团, 因而需保留 NH 存在。吡咯的内酰胺氧化成酰亚胺 **40**, 仍保持对 PKC 的活性, 但同时做苯甲酰化的 **44** 虽然选择性提高了, 但也降低了对 PKC 的活性。氧化成羟基的两对差向异构体 (**5**, **41**~**43**) 对 PKC 和 PKA 的活性都有所降低, 而对 PPK 的活性不降, 这种选择性不可取 (Caravatti G, Meyer T, Fredenhagen A, et al. Inhibitory activity and selectivity of staurosporine derivatives towards protein kinase C. *Bioorg Med Chem Lett*, 1994, 4: 399-404)。

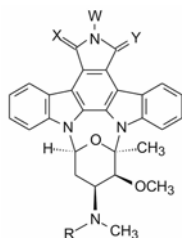
3 候选物对 FLT3 变异激酶和急性髓性白血病作用

3.1 FLT3 激酶变异的分子生物学研究 以上对星孢菌素的结构改造只是为了提高对 PKC 的活性与选择性, 尚无明确的治疗目标。聚焦于治疗急性髓性白血病 (AML) 是在发现了 AML 有 30% 患者的 FLT3 激酶发生变异。分子生物学研究表明, 突变后的 FLT3 的近膜结构域内部串联重复 (Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the FLT3

Table 2 SAR of acylated secondary amines on the sugar moiety



| Compd. | R | IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹ | | | | | |
|--------|---|--|-------|-------|-------|------|-------|
| | | PKC | PKA | PPK | S6-k | PTK | c-src |
| 2 | H | 0.006 | 0.015 | 0.003 | 0.005 | 0.10 | 0.35 |
| 16 | | 0.075 | 1.5 | 0.01 | – | 2.6 | – |
| 17 | | 0.18 | 0.48 | 0.04 | – | 2.4 | – |
| 18 | | 0.041 | 1.6 | 0.01 | 0.9 | 12.5 | – |
| 19 | | 0.081 | 1.0 | 0.019 | – | 1.1 | – |
| 20 | | 0.13 | 17.0 | 0.01 | 0.1 | 6.4 | – |
| 21 | | 0.064 | 2.25 | 0.12 | 0.2 | 3.5 | 0.16 |
| 22 | | 0.014 | 0.36 | 0.051 | – | 0.22 | – |
| 23 | | 0.04 | 0.7 | 0.062 | 0.16 | – | 0.2 |
| 24 | | 0.35 | 28 | 0.42 | 1.0 | 13.5 | – |
| 25 | | 0.050 | 2.4 | 0.048 | 5 | 1.9 | 0.8 |
| 26 | | 0.56 | 1.57 | 0.08 | – | – | – |
| 27 | | 0.031 | 0.38 | 0.012 | – | 8.18 | – |
| 28 | | 0.036 | 0.75 | 0.020 | – | 8.18 | – |
| 29 | | 0.23 | 1.5 | 0.078 | – | 4.7 | – |
| 30 | | 0.57 | 6.8 | 1.9 | – | 4.6 | – |
| 31 | | 0.35 | 2.6 | 0.32 | – | 2.0 | – |
| 32 | | 0.063 | 2.5 | 0.06 | 0.1 | 4.8 | – |
| 33 | | 0.125 | >100 | 0.37 | 0.2 | >70 | – |
| 34 | | 0.27 | 1.5 | 0.13 | – | 3.6 | – |
| 35 | | 0.315 | 3.67 | 0.053 | – | 7.4 | – |
| 36 | | 0.062 | 10.0 | 0.03 | 0.1 | 0.11 | – |

Table 3 SAR of the modified pyrrolidone compounds

| Compd. | W | X | Y | R | IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹ | | | | |
|--------|---|-------------------|-------------------|----------------------------------|--|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | PKC | PKA | PPK | PTK | c-src |
| 2 | H | =O | H,H | H | 0.006 | 0.015 | 0.003 | 0.10 | 0.35 |
| 37 | C ₆ H ₅ CH ₂ | =O | H,H | C ₆ H ₅ CO | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 38 | MeO ₂ CCH ₂ | =O | H,H | C ₆ H ₅ CO | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 39 | H | =O | =O | Boc | 1.5 | >100 | 5.25 | — | — |
| 40 | H | =O | =O | H | 0.009 | 0.026 | 0.005 | 0.2 | 0.8 |
| 5 | H | =O | H,OH ¹ | H | 0.013 | 1.15 | 0.004 | 0.017 | 0.6 |
| 41 | H | =O | OH,H ¹ | H | 0.255 | 1.85 | 0.006 | — | — |
| 42 | H | H,OH ² | =O | H | 0.096 | 2.25 | 0.022 | 0.26 | 1.8 |
| 43 | H | OH,H ² | =O | H | 0.235 | 3.3 | 0.17 | — | — |
| 44 | H | =O | =O | C ₆ H ₅ CO | 0.096 | 0.75 | 0.27 | — | — |
| 45 | H | =O | H,OH | C ₆ H ₅ CO | 0.030 | 0.3 | 0.035 | — | — |

gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1996, 10: 1911–1918), 还在激酶的活化环套的 Asp835 残基发生点突变, 导致构象改变, FLT3 激酶成为激活的形式, 引起细胞分化不完全并持续增殖 (Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 2001, 97: 2434–2439)。AML 的这些分子生物学研究为研发治疗药物提供了靶标支持。

3.2 化合物 25 抑制变异的 FLT3 激酶、细胞和体内活性 诺华公司系统地评价了上述活性化合物对变异的 FLT3 激酶和高表达变异酶的细胞—依赖于生长因子的 Ba/F3-FLT3-ITD 细胞的抑制作用, 发现化合物 25 对变异的酶和细胞有强效抑制作用, 在 24~72 h 内抑制 Ba/F3-FLT3-ITD 细胞的 IC₅₀ 低于 10 nmol·L⁻¹, 而对正常的肠 Ba/F3 细胞在 100 nmol·L⁻¹ 浓度下没有抑制作用, IC₅₀ 高于 500 nmol·L⁻¹, 化合物 25 的作用是诱导了 AML 细胞凋亡和终止了细胞周期。

体内动物实验是用骨髓移植表达有 FLT3-ITD 激酶的逆转录病毒的 Balb/c 小鼠, 造成模拟 FLT3 变异

的 AML 动物模型, 从第 30 天到第 88 天 (实验 1) 或 25~65 天 (实验 2), 每日灌胃给药 100 mg·kg⁻¹ 一次 (血药浓度高于 IC₅₀), 90 天后给药的两组动物全部存活, 而对照组存活率只有 20% (均值), 给药组的脾重和白细胞计数都显著低于对照组, 表明化合物 25 体内抗 AML 的效果 (Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell*, 2002, 1: 433–443)。遂以代号 PKC412 进入临床研究, 定名为米哌妥林 (midostaurin), 证明对 FLT3 呈阳性的 AML 和晚期肥大细胞过多症有效, 于 2017 年批准上市。

