

• 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。

库潘尼西是拜耳公司研发的磷酸肌醇3激酶抑制剂,作为该靶标的抗肿瘤药物并非是同类第一,属于跟随性创新药物,但从苗头的发现和全新的结构类型看,都具有鲜明的创新特征,而且作为多靶标的泛PI3K抑制剂,尤其呈现出疗效的特色。在优化结构中,传统药物化学的构效关系和分子模拟相结合,证明仍是通向成功的途径。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1026

鲜明创新特征的库潘尼西

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 靶标与研发背景

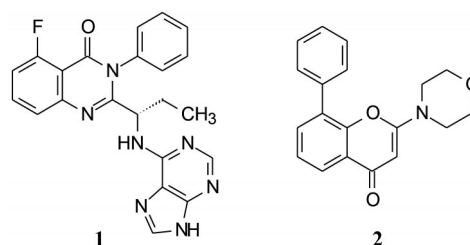
1.1 与肿瘤相关的磷酸肌醇3激酶

磷酸肌醇3激酶(PI3K)是一类脂质激酶,生理功能催化磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP₂)的3-位羟基磷酸化,生成磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP₃)。PIP₃在细胞膜上聚集导致蛋白激酶B(AKT)募集,并经磷酸化激活,引发细胞内级联反应,调控细胞一系列功能改变,如分化、生长、存活和凋亡等。哺乳类PI3K有8个族群,根据结构和脂质底物的特征分为I、II和III类。I类的PI3K有4种异型蛋白:PI3K α 和PI3K β ,以及存在于免疫系统的PI3K δ 和PI3K γ 。这4种酶蛋白都是异二聚体,由p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ 构成。I类又分IA和IB,分别被酪氨酸激酶和G蛋白偶联受体激活。

I类PI3K介导的信号转导与肿瘤密切相关,人体基因编码的p110 α 若发生变异和效应放大引起多种肿瘤发生;而p110 β 亚型与之相反,介导肿瘤抑制因子磷酸酶和张力同系物(PTEN基因产物)的功能,p110 β 功能失活导致肿瘤发生。

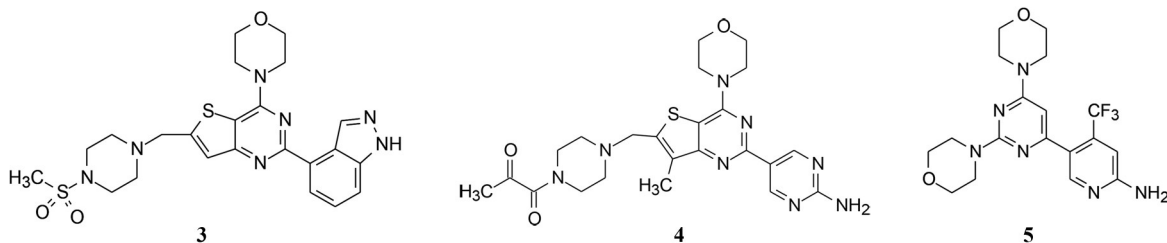
1.2 研发背景

1.2.1 已上市的PI3K抑制剂 2014年FDA批准Gilead公司艾代拉里斯(**1**, idelalisib)上市,是第一个PI3K抑制剂,选择性抑制PI3K δ 亚型,治疗非复发性慢性淋巴细胞白血病和滤泡性淋巴瘤。**1**与PI3K δ 激酶的结合域是ATP结合位点,其选择性显著高于对PI3K α 、 β 和 γ 亚型(Markham A. Idelalisib: first global approval. *Drugs*, 2014, 74: 1701–1707)。



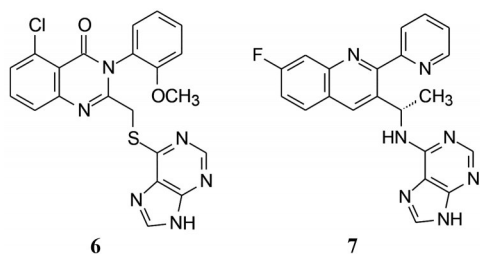
1.2.2 处于临床研究的PI3K抑制剂 **1**以及处于临床I和II期研究状态的PI3K抑制剂,都源于最初研究化合物**2**(LY294002)与PI3K γ 的晶体结构的结合模式,抑制剂同活性部位的腔穴结合是活性的保障,与激酶的铰链区结合是必需的,并由此派生出两类抑制剂的结构。

一类是含有吗啉环的临床研究的候选化合物如Genentech公司研制的pictilisib(**3**),是选择性p110 α/δ 抑制剂(Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, et al. The identification of 2-(1*H*-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-*d*]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem*, 2008, 51: 5522–5532), Novartis公司研制的buparlisib(**4**)是泛PI3K抑制剂,对多种亚型都有强抑制活性(Burger MT, Pecchi S, Wagman A, et al. Identification of NVP-BKM120 as a potent, elective, orally bioavailable class I PI3 kinase inhibitor for treating cancer. *ACS Med Chem Lett*, 2011, 2: 774–779), Genentech公司的apitolisib(**5**)也是泛PI3K抑制剂(Sutherland DP, Bao L, Berry M, et al. *Discovery*



of a potent, selective, and orally available class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase inhibitor (GDC-0980) for the treatment of cancer. *J Med Chem*, 2011, 54: 7579–7587)。这些化合物都含有吗啉片段, 作为氢键受体与铰链的结合作用较弱, 芳杂环经氢键给体和接受体, 与结合腔有较强的相互作用。

另一类是包括上市的 **1** 和处于临床研究的 AMG-319 (**6**) (Kushing TD, Hao X, Shin Y, et al. Discovery and *in vivo* evaluation of (*S*)-*N*-(1-(7-fluoro-2-(pyridin-2-yl)quinolin-3-yl)-ethyl)-9*H*-purin-6-amine (AMG319) and related PI3K δ inhibitors for inflammation and autoimmune disease. *J Med Chem*, 2015, 58: 480–511) 和 PIK-39 (**7**) (Knight ZA, Gonzalez B, Feldma ME, et al. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 alpha in insulin signaling. *Cell*, 2006, 125: 733–747) 化学结构与 **1** 属同类型, 也是 PI3K δ 的选择性抑制剂, 结构生物学研究表明, 与铰链有较强的结合作用, 分子中的嘌呤环选择性地处于诱导产生的腔穴之中, 但作用较弱。所以, 两类的结合贡献度不同, 这或许决定了一类是泛 PI3K 抑制剂, 另一是选择性 PI3K δ 的抑制剂。



拜耳公司研制的开始目标是针对 PI3K γ 研发抗炎性药物, 以期通过选择性作用治疗哮喘病, 但后来成功于泛抑制剂的抗肿瘤药。

2 苗头和先导物优化

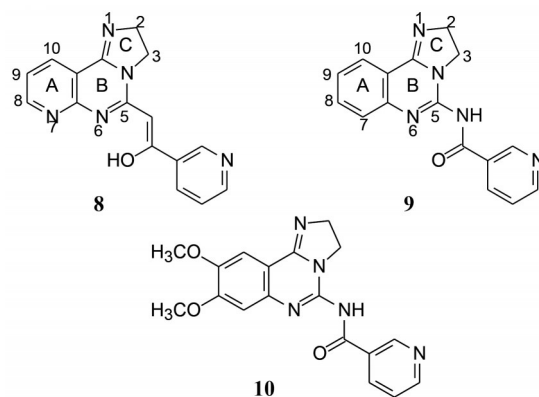
2.1 活性测定

用生化方法测定化合物抑制 p110 α 、p100 β 和 p110 γ 活性的 IC₅₀。将含有等摩尔量的磷脂酰肌醇 (PI) 和磷脂酰丝氨酸 (PS) 涂覆的 384 孔 MaxISORP 板, 放入缓冲

液、含有组氨酸标记 N 端切端的 p110 α 或 p100 β 蛋白, 或纯化的人源 p110 γ 蛋白的牛血清, 加入含有 ³³P 标记的 ATP 溶液, 以及不同浓度的受试物溶液, 室温温孵 2 h, 终止反应后用盒式液闪计数器测定参入到固定于孔中的 PI 的 ³³P 放射性, 计算化合物对各种 PI3K 亚型的 IC₅₀。

2.2 苗头和结构演化

通过高通量筛选发现了 2,3-二氢咪唑并[1,2-*c*]氮杂喹啉 (**8**) 对 PI3K γ 有中等强度的活性和选择性 (IC₅₀ p110 β /p110 γ = 4 000 nmol·L⁻¹/810 nmol·L⁻¹ = 5), 对 γ 型的抑制强于 β 型 5 倍, 由于是新骨架, 定为苗头化合物。由苗头演化为先导物 (hit-to-lead), 目标是提高化合物对 PI3K γ 的选择性 (与 PI3K β 相比)。化合物 **8** 的 5-位连接的苯乙酰侧链是以烯醇式存在 (维持了共轭体系, 以及羟基与 N6 形成分子内氢键), 将 **8** 的烯醇转换成酰胺仍应维持共轭系统, 并合的吡啶 (A 环) 用苯并替换, 化合物 **9** 虽然选择性未变, 但活性提高了 (IC₅₀ p110 β /p110 γ = 310 nmol·L⁻¹/60 nmol·L⁻¹ = 5), 在 A 环的不同位置取代, 8,9-二甲氧基化合物 **10** 活性进一步提高 (IC₅₀ p110 β /p110 γ = 1 700 nmol·L⁻¹/60 nmol·L⁻¹ = 28)。



2.3 分子模拟的初步结果

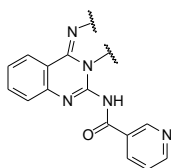
基于 PI3K γ 的晶体结构, 化合物 **9** 进行分子对接, 得到的如下结果可作为结构变换和优化的参考: ① 化合物 **9** 结合于 ATP 结合腔; ② N1 结合于激酶非铰链处; ③ C 环的 sp³ 的杂化碳充盈于邻近的疏水腔内; ④ C5 连出的酰胺基, 提供了氢键结合, 所处的腔穴不

是 ATP 占据的位置; ⑤ C7 是伸向 ATP 的核糖位置; ⑥ C8 指向溶剂相。分子模拟的这些信息, 与后来研发成功的库潘尼西与 PI3K γ 复合物单晶 X 射线衍射提供的结合模式相吻合。

2.4 C 环的变换

为证实分子对接提示的 C 环的饱和碳原子填入裂隙样的小疏水腔中, 表 1 中合成的扩环化合物 **11** (四氢咪唑) 或 2-甲基 (**12**) 或 3-甲基 (**13**) 二氢咪唑, 考察增加疏水性对活性的影响, 结果表明都低于 **9**, 脱氢的咪唑环 (**14**) 抑制 p100 β 的活性降低了 5 倍。

Table 1 Structure-activity relationship of varied C-ring compounds. *NT = not tested

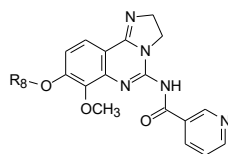


Compd.	C-analog	p110 α /nmol·L ⁻¹	p100 β /nmol·L ⁻¹
9		NT*	192
11		NT	>10 000
12		NT	>10 000
13		>1 000	>1 000
14		NT	1 040

2.5 C8 取代基的变换

分子模拟提示 C8 连接的基团进入溶剂相, 因而有较大的变换空间。与 8-甲氧基 (**17**) 相比, 苄氧基 (**15**)

Table 2 Structure-activity relationship of C8-substituted compounds



Compd.	R ₈	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		Compd.	R ₈	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	
		p110 α	p110 β			p110 α	p110 β
15	Ph	6.1	1 510	21	Me ₂ N(CH ₂) ₃	3.6	18.0
16	H	8.7	210	22		2.9	18.3
17	CH ₃	4.5	30.7	23		1.8	20.8
18	C ₂ H ₅	3.6	76.1	24		0.9	11.2
19	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	8.0	226	25		NT	88.1
20	H ₂ N(CH ₂) ₃	4.7	22.3				

和羟基 (**16**) 对 p110 α 显示高活性 (表 2), 但抑制 p110 β 活性减弱。8-乙氧基 (**18**) 的活性与 **17** 相近, 而再增大的烷基如 8-异丁基 (**19**) 对 p110 β 的活性减弱。经丙氧基末端连接氨基、二甲氨基、哌啶或吗啉基 (**20~23**) 对 p110 α 和 p110 β 的活性都强于甲氧基, 碳链缩短为乙氧基的化合物 **24** 活性虽然很强, 但化学稳定性差, 二丁氧基化合物 **25** 的活性降低。此外, 8-位侧链含有碱性基团有利于溶解性。同时评价了这些化合物的药动学, 发现 **20~22** 有较高的清除率, 因而其他位置的优化都固定为 8-*N*-吗啉代丙氧基。

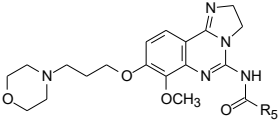
2.6 7-甲氧基的变换


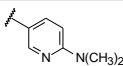


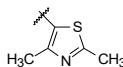


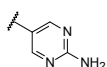

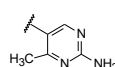

以高活性的化合物 **23** 为新的起点, 固定 8-位为 *N*-吗啉代丙氧基, 变换 7-甲氧基为羟基, C3~C7 的直链、支链或环烷氧基, 结果对两种激酶的活性无显著提高或降低, 故确定 7-甲氧基为优选取代基 (结构与数据从略)。

2.7 5-位酰胺侧链的变换

7-和 8-位分别固定为甲氧基和 *N*-吗啉代丙氧基, 变换 5-位酰胺键连出的芳环 (R₅), 代表性化合物列于表 3。

以化合物 **23** 为基准, 分析构效关系如下: 化合物 **26** 的苯环因没有接受氢键的原子, 活性很低 (尤其对 p110 β), 而噻唑 (**27**) 的活性略强于 **23**, 4-吡啶基 (**28**) 的氮原子位置移动, 活性降低, 提示形成氢键结合的取向很重要, 但加入 1 个氨基 (**29**) 活性略有提高, 化合物 **30** 是 4-氨基-3-吡啶基, 活性强于 **23**, 但氨基被甲基化后活性降低。吡啶环内加入 1 个氮原子成吡嗪 (**32**) 或咪唑 (**33**), 对两种激酶的活性显著下降, 而再引入氨基 (**34, 35**) 活性强于 **23** 和 **30**, 提示同时含有氢键给体和接受体的氨基嘧啶是优化的片段。

Table 3 Structure-activity relationship of C5-substituted compounds


Compd.	R ₅	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		Compd.	R ₅	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	
		p110α	p110β			p110α	p110β
23		1.8	20.8	31		2.9	58.7
26		20.9	668	32		NT	351
27		1.6	7.8	33		132	286
28		NT	63.7	34		0.5	3.7
29		6.2	16.6	35		0.4	1.0
30		0.6	7.9				

3 细胞活性

进而评价上述高活性化合物抑制细胞增殖的活性,是用两种癌细胞(S473和KPL4)评价的,结果列于表4。

Table 4 Mechanistic and functional cellular activity of selected compounds. a. Inhibition of IGF-1-stimulated A549 pAKT; b. Inhibition of proliferation

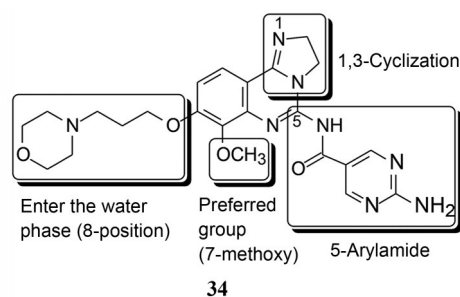
Compd.	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		EC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	
	p110α	p110β	S473 cell ^a	KPL4 cell ^b
17	4.5	30.7	30	NT
27	1.6	7.8	60	86
29	6.2	16.6	170	NT
30	0.6	7.9	11	NT
34	0.5	3.7	3.4	3.7
35	0.4	1.0	0.6	2.3

表4中代表性化合物对两株癌细胞的活性与对p110α和p110β的活性相平行,除化合物17的8位是甲氧基外,其余的化合物8位都是吗啉丙氧基,噻唑甲酰胺(27)和2-氨基-4-吡啶甲酰胺(29)的细胞活性弱,而6-氨基烟酰胺(30)以及氨基嘧啶化合物34和35的细胞活性很高,提示芳环上存在氢键给体和接受体的位置重要性。

4 构效关系总结

基于分子对接和构效关系,提示抑制剂进入激酶的ATP结合腔,以活性和选择性最强的化合物34为模板,分子的各个部位的结构特征和结合模式总结如下:
① 二氢咪唑结合于激酶铰链部位,N1形成氢键,环上

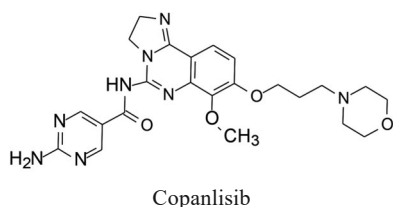
不宜取代或氧化,也不宜芳构化和扩环。② C5连出的芳酰胺对结合有重要贡献。芳环是必要的,氢键给体和接受体有利于活性;需要有酰胺或烯醇式的平面结构。③ 7位甲氧基处于ATP的糖环位置,可允许有不同的取代,但对活性影响不大。④ 8位连出的侧链处于溶剂相,因而可有广泛的变换,是调节物化性质的位点,优选的片段是吗啉丙氧基。



5 候选化合物与上市

化合物34对p110α、β、γ、δ等亚型的抑制活性很高,IC₅₀分别是0.5、3.7、6.4和0.7 nmol·L⁻¹,对mTOT激酶IC₅₀为45 nmol·L⁻¹,对其他220个正常激酶的活性很弱,在10 mmol·L⁻¹浓度下抑制率<50%,提示是选择性很高的泛PI3K抑制剂。对分别高表达p110α、β、γ、δ的细胞抑制作用IC₅₀分别是0.4、10、94和7.4 nmol·L⁻¹。体内对KPL4和TMD-8移植小鼠(剂量14 mg·kg⁻¹)的抑制肿瘤生长分别为100%和75%。34的药代动力学研究表明,血浆蛋白结合率84%,消除半衰期t_{1/2}=39 h。

拜耳药厂确定 **34** 为候选化合物, 定名库潘尼西 (copanlisib), 经临床 III 期研究, 确定其适应症是复发性滤泡性淋巴瘤, 静脉滴注, 每周一次, 4 周为一疗程。



6 库潘尼西与靶标的结合方式

库潘尼西与 p110 γ 的复合物单晶 X-射线衍射分析表明, 氨基嘧啶在结合腔中, 氨基与 Asp836 和 Asp841 的羧基发生静电结合, 嘧啶的 1 个氮原子与 Lys833 形成氢键结合。嘧啶环与 Asp964 发生 π - π 叠合作用。吗啉环进入水相, 靠近 Trp812 的吡啶环, 有一定的疏水性结合。图 1 是库潘尼西与 p110 γ 晶体衍射确定的结

合模式 (Scott WJ, Hentemann MF, Rowley RB, et al. Discovery and SAR of novel 2,3-dihydroimidazo[1,2-c]-quinazoline PI3K inhibitors: identification of copanlisib (BAY80-6946). *J Med Chem*, 2015, 11: 1517–1530)。

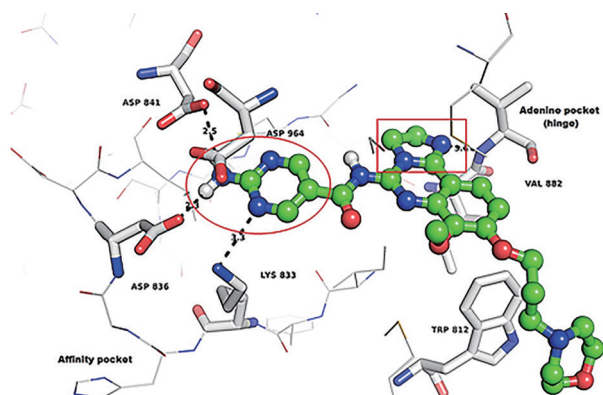


Figure 1 Binding mode from the X-ray crystal structure of copanlisib bound to PI3K γ