

• 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。

辉瑞公司研制的格拉德吉, 是以干扰刺猬信号通路为靶标治疗急性髓性白血病的首创性药物, 在多个单位致力于研发 Smo 受体抑制剂中, 成为全球第一个上市的药物。当今处于临床研究状态的 Smo 抑制剂结构类型归属于两类: 天然活性物质环巴胺的类似物和苯并咪唑联苯胺类的合成化合物。本品是以苯并咪唑联苯化合物为先导物, 通过改变苯环为吡啶连接基, 用构效分析和试错反馈调整分子结构和构象, 优化活性-药代-物化性质而成功的。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0386

作用于刺猬信号通路的 Smo 受体首创性药物格拉德吉

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 刺猬信号通路 刺猬信号通路 (hedgehog signaling pathway, Hh) 是哺乳动物调控蛋白引发的信号传导, 该蛋白在突变的果蝇胚胎中呈多毛团状, 酷似受惊刺猬而得名。人体存在 3 种 Hh 同源基因: sonic hedgehog (SHH)、Indian hedgehog (IHH) 和 desert hedgehog (DHH), 分别编码 Shh、Ihh 和 Dhh 蛋白。

Hh 信号传递受控于两种膜受体: patched (Ptc) 和 smoothened (Smo) 受体。Ptc 由肿瘤抑制基因 patched 编码, 能与 Hh 直接结合, 对信号起负调控作用; Smo 由原癌基因 smoothened 编码, 同源 G 蛋白偶联受体, 跨膜区氨基酸序列高度保守。C 端位于细胞内, 末端的丝氨酸与苏氨酸残基为磷酸化部位, 蛋白激酶催化磷酸基的结合。Smo 是 Hh 信号传递所必需的受体。底物或激动剂激活 Smo 受体引起 Gli1、Gli2 和 Gli3 等 3 种转录因子的激活, 最终导致细胞增殖; Smo 基因发生突变时, 可出现与 Hh 基因突变相同的表征。

在正常情况下, Ptc 抑制跨膜的 Smo 蛋白活性, 从而抑制下游通路和靶基因的转录。当 Ptc 发生突变或缺失时, 或是 Smo 突变导致对 Ptc 的抑制作用不敏感而致使基因活化, 则 Hh 信号通路失控。Hh 信号通路失调可引起多种癌症发生, 因此, Smo 受体拮抗剂成为治疗癌症的潜在靶标。

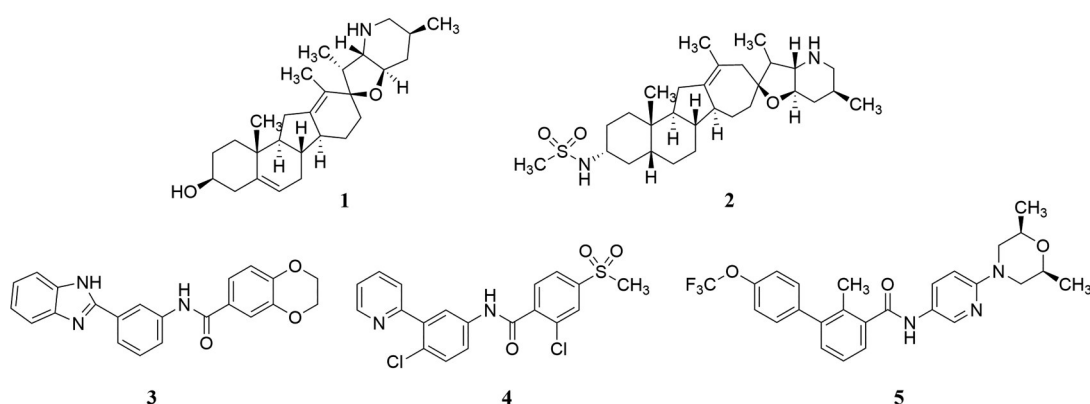
就刺猬信号通路的作用本质而言, 是刺猬蛋白与受体之间的蛋白-蛋白相互作用, 本项目研发的小分子

抑制剂是对 Smo 受体的活性抑制, 用产生 Gli 蛋白量表征对 Smo 的抑制强度。

1.2 研发背景 最早研究的 Smo 受体抑制剂是从加州藜芦 (*Veratrum californicum*) 分离的生物碱环巴胺 (**1**, cyclopamine), **1** 作为化学生物学的工具药证明是 Smo 受体的拮抗剂并阐明了在 Hh 信号通路中的作用, 还作为临床前药物研究模型的对照药 (Taipale J, Chen JK, Cooper MK, et al. Effects of oncogenic mutations in smoothened and patched can be reversed by cyclopamine. *Nature*, 2000, 406: 1005-1009)。

Infinity 公司基于 **1** 为先导物做结构优化得到萨利德吉 (**2**, saridegib), 是 D 环扩为七元环的类似物, 已进入临床研究 (Peukert S, Miller-Moslin K. Small-molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics. *ChemMedChem*, 2010, 5: 500-512)。

最早发现人工合成的 Smo 抑制剂是 2-苯基咪唑化合物 **3**, 一些公司以这个联芳基分子为先导物, 进行了广泛的研究, 同处于临床阶段的有基因泰克公司的维莫德吉 (**4**, vismodegib) (Dlugosz A, Agrawal S, Kirkpatrick P. First-in-class inhibitor of the hedgehog signaling pathway approved in the United States for the treatment of basal cell carcinoma. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11: 437-438) 和诺华公司的索尼德吉 (**5**, sonidegib) (Pan W, Wu X, Jiang J, et al. Discovery of NVP-LDE225, a potent and selective smoothened antagonist. *ACS Med*



Chem Lett, 2010, 1: 130–134)。4 和 5 都保留了联芳基酰胺的骨架结构。

2 生物学评价

体外评价化合物活性是将载有荧光素酶的 Gli 蛋白的基因转染到小鼠 C3H10T1/2 细胞, 细胞培养基中加入一定量的 Smo 受体激动剂, 再与不同浓度的受试物温孵, 测定由于抑制 Smo 受体而改变的荧光强度, 作为表征 Gli 蛋白的生成量, 确定受试物的 50% 抑制 Smo 活性的摩尔浓度 (IC_{50})。

评价化合物的代谢稳定性是与大鼠和人肝微粒体温孵, 计算受试物的大鼠或人肝清除率 (CL , $\mu L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$)。

3 先导物优化

辉瑞公司启动本项目的先导物也是化合物 3, 在结构变换中, 将 3 分为 3 个片段: 左侧苯并咪唑、中间苯胺和右侧取代的苯甲酰片段。

3.1 中间苯环的变换 通过分析进入临床研究的候选药物例如 4 和 5 的结构, 发现都保持了联芳基的结构, 舍弃了苯并咪唑, 而且中间苯环的 2 位 (邻位) 都存在取代基, 意味着两个芳环不成共面性, 因为邻位取代使两个芳环维持一定夹角。辉瑞公司没有遵循联芳基的惯例, 而是另辟蹊径, 保持苯并咪唑环, 改中间的苯环为脂肪环, 并且以 1,3-*cis* 连接苯并咪唑和右侧片段, 以此模拟化合物 3~5 的间位连接, 合成的代表性分子首先是环己基 (6) 化合物, 后优化成哌啶基 (7) 化合物。

表 1 中列出了代表性分子的结构与活性。化合物 6 经 1*R*,3*S*-环己基替换 1,3 连接的苯基, 活性降低了 18 倍, 然而亲脂性降低了 1.6 个对数单位, 提高了代谢稳定性, 从而将 3 的清除率 $CL = 314 \mu L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$ 降低到 $33 \mu L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$ 。权衡中间苯环变换为环己基药代和药效的得失, 环己基具有优化的特征和前景。不过, 6 的溶解性虽稍高于 3, 但仍属于微溶性 ($37 \mu g \cdot mL^{-1}$), 口服生物利用度 (F) 只有 4%。

以 6 作为新的起始物, 固定环己基, 变换苯并咪唑

Table 1 *In vitro* activity for compounds 3, 6 and 7

Compd.	Structure	IC_{50} / $nmol \cdot L^{-1}$	$clogD$ /pH 6.5
3		5	4.48
6		88	2.85
7		43	1.06

和苯并二噁烷片段, 合成了如图 1 所示的 300 多个化合物, 却都没有显示出活性的明显改善 (Munchhof MJ, et al. Benzimidazole derivatives. WO 2008, 075096 A1)。

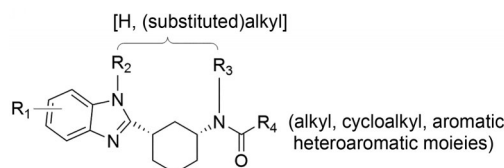


Figure 1 General structure of modified compounds with cyclohexyl moiety

为了提高分子的溶解性, 用四氢吡咯或哌啶环替换环己基, 不仅提高了分子极性, 还可成盐增加水溶性, 在合成的目标物中化合物 7 为 2*R*,4*R* 异构体, 活性强于 6 一倍, 制备并测定了其他差向异构物的活性, 均低于 6 大约 4~50 倍。体外实验化合物 7 的代谢稳定性, 对大鼠和人肝微粒体是稳定的, 对犬的体内实验 $CL = 18 \mu L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$, 口服生物利用度 (F) 为 33%, 提示口服剂量的 50% 可被吸收, 显著强于化合物 6。

3.2 化合物 7 的优化 哌啶作为中间环优于环己基, 故以 7 为新的先导物从 3 个方面做结构优化: ① 变换 N1 取代基; ② 苯并咪唑环上取代基的变换; ③ 氨酰基连接的片段变换。通过广泛的构效关系分析, 合成了 2*R*,4*R*-构型 70 余个化合物如图 2 所示的通式。化合物

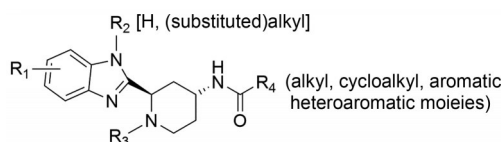


Figure 2 General structure of modified compounds with piperidyl moiety

的活性和物化性质优于环己基系列 (Munchhof MJ, et al. Benzimidazole derivatives. WO 2009, 0005416 A1)。

在变换连接于氨基哌啉的酰胺片段中,发现连接基为脲基化合物的活性显著提高,遂合成了以脲基连接的烷基、环烷基、芳基化合物等80余个,通式结构列于图3 (Jones CS, et al. Benzimidazole derivatives. WO 2009, 0004427 A2)。代表性的化合物列于表2,构效关系简述如下:①苯环上邻位取代基不利于活性;②间位和对位取代基有利于活性,尤其是对位优于间位取代。例如化合物**13**比**14**的活性强14倍;③对位取代的拉电子基团有利于活性,例如化合物**13** (*p*-CN, $\sigma_p = 0.66$)和化合物**11** (*p*-CF₃, $\sigma_p = 0.54$)的IC₅₀都是5 nmol·L⁻¹;化合物**12** (*p*-Cl, $\sigma_p = 0.23$)和**10** (*p*-OCH₃, $\sigma_p = -0.27$)的活性明显减弱;④吡啶环化合物(**15**)由于替换了苯环活性减弱很多。化合物**13**的clog *D* = 2.06,脂溶性适度,而且代谢稳定性也较好CL < 12.8 μL·min⁻¹·kg⁻¹,因而确定了**13**为候选化合物作进一步研发。

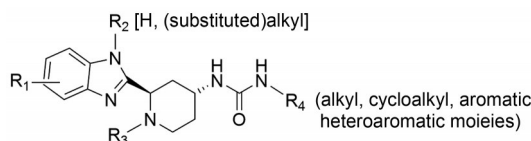


Figure 3 General structure of modified compounds with ureido moiety

4 候选物的确定和格拉德吉上市

化合物**13**的相对分子质量374, log *D*实验测定值2.49,极性表面积97 Å²,在高浓度下对多种激酶未呈现抑制作用,提示对Smo受体有较高选择性抑制作用。对于与药物代谢关系密切的多种细胞色素P450

Table 2 *In vitro* activity for compounds with ureido linkage

Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	clog <i>D</i> /pH 6.5	CL /μL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹
8		103	1.82	<7.6
9		45	1.62	<7.6
10		35	1.48	17.9
11		5	3.18	21.3
12		20	3.06	25.4
13		5	2.06	<12.8
14		72	2.24	Not test
15		191	1.64	29.4

未呈现抑制作用, IC₅₀ > 30 μmol·L⁻¹。表3列出对大鼠和犬的药代动力学数据,提示有适宜的口服生物利用度、半衰期和血浆蛋白结合率 (Munchhof MJ, Li QF, Shavnya A, et al. Discovery of PF-04449913, a potent and orally bioavailable inhibitor of smoothened. ACS Med Chem Lett, 2012, 3: 106-111)。

Table 3 Pharmacokinetic properties of compound **13** in animals

Animal	CL/μL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	<i>V</i> _{ss}	<i>t</i> _{1/2} /h	<i>F</i> /%
Rat	31	4.8	1.4	33
Dog	3.9	4.3	2.9	68

基于临床前研究结果,确定**13**为候选化合物,定名格拉德吉 (glasdegib)。经III期临床研究,表明格拉德吉是口服治疗急性髓性白血病的有效药物,经美国FDA批准于2018年上市。

