

• 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。

三羧酸循环 (又称柠檬酸循环) 是糖、脂肪和氨基酸等有氧代谢的最终的物质代谢环节, 人类已熟知近百年。但分子生物学揭示的循环中的异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 的变异, 以及其变异与癌症的关联则是本世纪揭示的科学问题。变异的 IDH 很自然联想为研制新型抗癌药物的靶标。这就需要经过概念验证, 揭示酶的突变与癌症发生发展的因果关系, 而不只限于简单的关联。所以, 艾伏尼布作为该靶标第一个药物需从实验室到临床不断地验证靶标的可药性 (druggability), 这就是风险所在。因而, 艾伏尼布的研制过程用多种变异的 IDH1 酶和表达于多种癌症细胞加以评价, 并确保对正常的 IDH、其他的酶系和细胞色素 P450 等的低活性, 旨在确保药物的靶向性, 以避免对无处不在的三羧酸循环的脱靶作用。此外, 在优化过程中也同步关注了药代的吸收性、稳定性和物化性质等成药性。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0399

作用于变异型异柠檬酸脱氢酶的首创药物艾伏尼布

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 研制背景与靶标

在正常生理状态下人体的异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 是依赖于辅酶 NADP 的脱氢酶系, 催化异柠檬酸氧化脱羧生成 α -酮基戊二酸 (α -KG)、二氧化碳和 NADHP。在三羧酸循环中, 异柠檬酸是由柠檬酸经乌头酸水合酶催化失水, 生成顺乌头酸, 再水合生成异柠檬酸, 后经氧化成草酰琥珀酸, 脱羧生成 α -KG。图 1 是三羧酸循环中柠檬酸生成 α -KG 的简要历程。

异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 有两种亚型: IDH1 和 IDH2。一些肿瘤如恶性胶质瘤的发生是 IDH1 发生变异所致, 变异的位点是在催化中心的三元体的精氨酸 (Arg132) 发生变异, 导致氧化脱羧 α -KG 的生成受阻, 相反却生成了癌性代谢产物 α -羟基戊二酸 (α -HG) (Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-

dependent dioxygenases. Cancer Cell, 2011, 19: 17–30)。

α -HG 是依赖 α -KG 的二氧合酶 (例如组蛋白酶和 DNA 去甲基化酶) 的可逆性抑制剂, 因此, 由于 IDH1 的变异而产生的 α -HG 改变了正常机体的 DNA 和组蛋白的甲基化, 导致癌变。因而抑制发生变异的 IDH1 是治疗某些肿瘤的药物靶标。

2 先导化合物

2.1 苗头化合物 Agios 公司用高通量筛选方法评价公司的化合物库对发生变异的 IDH1^{R132H} (Arg132 变异为 His) 同二聚体的抑制作用, 发现二苯基甘氨酸化合物 **1** 显示较高的活性, IC_{50} 0.09 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。经动力学研究 **1** 的作用机制, 表明其与 α -KG 竞争性地结合于 IDH1^{R132H} 位点, 呈可逆性结合。**1** 对 NADPH 无竞争性影响。为了合成 **1** 的类似物, 从化学结构的逆合成分析, **1** 可以经 Ugi 反应由四组分 (环戊基异腈、邻甲基苯

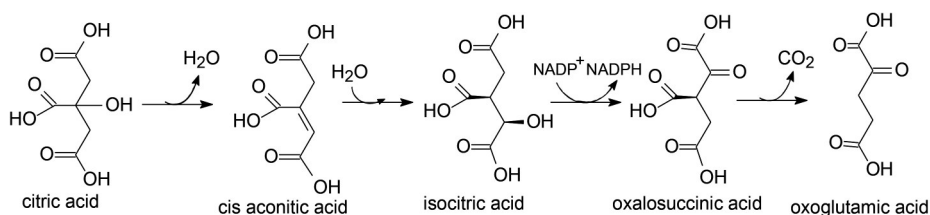
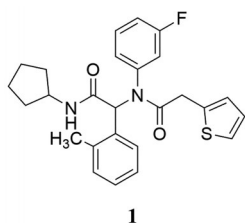


Figure 1 The reactions from citric acid to α -oxoglutaric acid in TCA cycle



甲醛、苯胺和噻吩乙酸) 缩合而成。

2.2 构效关系初探 化合物**1**的结构类型便于经多组分反应获得, 下一步是对各个片段和功能基做勘探式的研究, 即合成小型目标库, 揭示初步构效关系。表1列出了首轮合成的化合物及其对 IDH1^{R132H} 的抑制活性。这是一种勘探式的构效分析, 首先用环己基置换环戊基, 化合物**2**活性未变, 将**2**拆分成光活体, *S*构型(**3**)证明为优映体, *R*构型(**4**) (IDH1^{R132H}) 为劣映体, 这种抑制 IDH1^{R132H} 的立体异构现象始终存在于本项目研究的化合物中, 因而后继的化合物都优选为*S*构型。化合物**5**和**6**分别是在 α -C 或 N 原子上连接甲基, 活性分别降低 18 和 45 倍。分别去除羰基的化合物**7**和**8**则完全失去活性, 提示羰基对于与 IDH1^{R132H} 酶结合的重要性。下一步则是对各个片段加以优化。

2.3 脂环的变换 化合物**1**含有 3 个亲脂性片段, 脂溶性过强, $\text{clog}P$ 为 5.6, 这对于药理学和药代动力学性质是不利的, 因而结构变换的目标是提高活性和降低脂溶性。首先, 考察变换 *N*-末端的环戊基对活性的影响, 合成的化合物列于表 2。

分析表 2 的构效关系如下: ① 用环己基替换环戊基, 化合物**9**的活性略有提高, 而**10**~**12**较小的脂环则活性下降, 提示该部位与酶的结合需要有一定体积的基团; ② 邻苯甲基(**13**)和苄基(**14**)的活性降低了 10~30 倍; ③ 化合物**15**和**16**是用六元脂杂环替换环己基, 增加分子的极性, $\text{clog}P$ 显著降低, 但两个化合物的活性分别降低了 10 和 100 倍。这些构效关系提示在活性和脂溶性之间存在不顺应性。

2.4 α -苯基的变换 化合物**1**中 α -邻苯甲基用芳杂环、脂环或没有邻位甲基取代的苯基置换, 活性都显著下降, 提示这个片段已处于优化状态(数据省略)。

2.5 *N*-苯基的变换 3-氟代苯基是佳选片段, 因为换成其他基团, 或将氟原子作位置移动都使活性减弱。苯环用脂肪环、杂环或开链烷基都使活性显著降低(数据省略), 因而 *N*-3-氟苯基固定为优化片段。

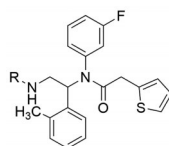
2.6 噻吩环的变换 上述的几个位置的构效关系提示, 化合物结合于 IDH1^{R132H} 的疏水腔内, 当加入极性基团不利于结合。因此, 降低亲脂性以改善整个分子的物化性质, 只能集中于右侧的噻吩环上。设计合成

Table 1 Influence of key structural elements on the binding affinity of phenylglycine scaffold

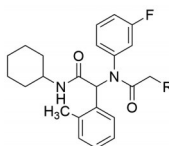
Compd.	Structure	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
1		0.09
2		0.08
3		0.06
4		11
5		1.4
6		3.6
7		>100
8		>100

的代表性化合物结构与活性列于表 3。

分析构效关系如下: ① 化合物**1**的噻吩环被噻唑(**17**)、吡啶(**18**)和呋喃(**19**)置换, 活性基本不变; ② 噻唑化合物**20**的活性降低 22 倍; ③ 氯化物**21**和氨基化合物**22**是合成过程中的中间体, 活性都低于**1**数十倍或百倍; ④ 环烷基基(**23**~**25**)取代物中, 小环的活性强于大环, 但都不如噻吩基; ⑤ 环己胺基换成苯胺化合物**26**, 活性显著高, 与噻吩相近。即使芳叔胺**27**也具有高活性, 因而合成极性较强的杂芳胺, 以降低亲脂性, 然而吡唑(**32**)和三唑(**33**)的活性降低数倍, 甲基咪唑(**34**)的活性相近于化合物**1**; ⑥ 非共轭性杂环的活性低于相应的共轭化合物, 如二氢呋喃(**31**)的活性低于呋喃(**36**), 苯并咪唑也具有高活性, 但脂溶性都

Table 2 SAR of compounds with modified *N*-terminal fragment

Compd.	R	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	clogP	Compd.	R	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	clogP
1		0.09	5.6	13		0.57	5.7
9		0.05	6.2	14		1.8	6.0
10		0.29	5.1	15		0.64	3.8
11		0.86	5.4	16		53.1	3.7
12		2.88	4.7				

Table 3 SAR of the compounds with altered thienyl group

Compd.	R	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	clogP	Compd.	R	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	clogP
17		0.1	4.9	27		0.08	6.8
18		0.05	5.0	28		1.63	5.6
19		0.06	6.5	29		0.24	5.0
20		1.1	4.1	30		5.64	4.6
21	Cl	0.9	5.3	31		0.14	7.0
22	NH ₂	7.8	3.9	32		0.42	4.9
23		0.19	4.9	33		0.14	3.9
24		0.45	5.8	34		0.07	4.7
25		1.27	6.3	35		0.08	6.3
26		0.06	6.1	36		0.07	7.1

很强。

3 选择性和细胞活性

对上述活性较高的化合物进一步评价了对 IDH1^{R132H} 高表达酶的恶性胶质瘤 U87 细胞的抑制活性 (IC₅₀), 以及对 U87 细胞生长的非特异性抑制活性 (GI₅₀, 脱靶作用的指标), 还评价了对发生 R132C 变异的 IDH 酶抑制活性和对高表达 IDH^{R132C} 的软骨肉瘤细胞 HT1080 的抑制活性 (IC₅₀), 以及对 HT1080 细胞生

长的非特异性抑制活性 (GI₅₀, 脱靶作用的指标), 同时还评价了对野生型 IDH1 酶的抑制作用 (也是评价脱靶作用), 结果列于表 4。

表 4 结果表明, 大多数化合物对发生 IDH1^{R132H} 和 IDH1^{R132C} 变异的酶和高表达变异酶的细胞都呈抑制活性, 抑制细胞的活性是以测定产生的 α-HG 的减少为指标, 发现对细胞的活性大约比酶低 3~5 倍, 呈平行相关。而对细胞产生 ATP 的抑制活性 (GI₅₀) 大于

20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与对野生型 IDH1 的弱抑制作用相关, 说明这些化合物对突变型酶和细胞有选择性抑制活性。其中化合物 **34** 对移植高表达 IDH1^{R132H} 恶性胶质瘤 U86 裸鼠的 1 天和 3 天连续给药 (150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip, bid) 的体内实验表明, 对肿瘤生长有显著抑制作用 (Popovici-Muller J, Saunders JO, Salituro FG, et al. Discovery of the first potent inhibitors of mutant IDH1 that lower tumor 2-HG *in vivo*. ACS Med Chem Lett, 2012, 3: 850–855)。

然而其药代和理化性质仍有不足, 例如化合物 **34** 的代谢稳定性差, 与人肝微粒体温孵, 在环己基和咪唑环上发生氧化代谢。下一步是保持对变异型 IDH1 酶和高表达细胞的强效抑制作用的前提下, 提高化合物的代谢稳定性。

4 进一步优化

上述的构效关系对指导下一步优化设计有指导意义, 在重点变换环己基和咪唑片段的同时, 调整其他位置的结构, 协调分子的宏观性质与微观结构。基团(或片段)被氧化代谢的原因, 是该处的电荷密度高, 当酶在分子中找不到代谢的位点, 就通过细胞色素 P450 对其作氧化处置, 增加极性利于排出。基于这些考虑, 合成的代表性化合物列于表 5。

表 5 中列出的化合物多数是将环己基变换为二氟环丁基, 这是因为加入强电负性的氟原子可降低环丁基的电荷密度, 不易被氧化, 提高代谢稳定性。另一变化是 α -碳的邻甲苯基用邻氯苯基置换, 氯原子替换甲基维持了疏水性和片段体积, 消除了甲基被氧化的可能性。同时这些变换大都也提高了对酶和细胞的抑制活性。因而余下的问题是右端的咪唑基 (R_4) 的变换。 R_4 的构效关系 (活性和稳定性) 分析如下: ① 咪唑基换成胺基甲酸酯片段 (化合物 **37**~**39**) 活性变化虽然不大或有所降低 (**38**) 但没有提高代谢稳定性; ② 用噻唑环置换甲酸酯, 化合物 **40** 保持了活性但代谢稳定性差。而吡咯烷酮 **41** 失去了活性, 稳定性也提高了, 推测是羰基的存在 (内酰胺) 电荷密度降低, 从而为进一步优化活性/

稳定性提供了参考; ③ 合成的 *N*-嘧啶基吡咯烷酮 (**42**) 不仅恢复了活性, 稳定性也显著提高 (肝脏提取率仅为 3%)。*N*-吡啶吡咯烷酮的 4-位存在拉电子基团 (**43**, 尤其是 **44**), 活性和稳定性进一步加强。苯环二氟取代的化合物 **45** (代号 AGI-14100) 对酶和细胞的活性 IC_{50} 达到 6 和 1 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 肝提取率为 23%。

化合物 **45** 拟作为候选化合物进入开发阶段, 实验表明对不同动物也有较低的清除率, 但发现是 CYP3A4 的诱导剂, 致使人孕烷 X 受体 (hPXR) 活化, 预示会发生不良反应, 该脱靶作用接近 CYP3A4 诱导剂利福平活性的 70%, 因而不宜作为候选物。为此, **45** 作为新一轮优化的起始物。

5 消除 CYP3A4 诱导作用的优化

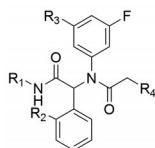
以 **45** 为新一轮的优化的起始物, 固定二氟代环丁基和 2-苯基片段, 变换另两个位置的基团, 合成了众多的化合物, 代表性的列于表 6。总结构效关系如下: ① 吡咯烷酮环上引入羟基如化合物 **46** 提高了分子极性, 仍保持 **45** 的活性, 也降低了对 hPXR 的活化, 但降低了过膜渗透能力, 提高了外排比值, 是不利的; ② 将 **46** 的吡啶环换成嘧啶 (**47**), 又增加了分子极性, 消除了对 hPXR 活化作用, 但失去抑制细胞作用, 也降低了代谢稳定性; ③ 化合物 **48** 是将二氟苯基中的一个氟原子换成磺酰胺基, 极性增强, 降低了 hPXR 的活化, 但也降低了代谢稳定, 提高了外排比值; ④ 化合物 **49** 是将 R_1 细调成间位取代的氟代吡啶, 对 IDH1^{R132H} 和细胞显示高抑制活性, 肝微粒体的氧化代谢很低, 对 hPXR 活化作用很弱, 细胞外排效应很低, 是集药效、药代和低脱靶等多方面优良性质的化合物。

6 候选化合物的确定和艾伏尼布的上市

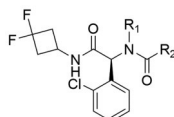
在优化过程合成众多化合物中, **49** 呈现出多维度的优良属性, 进而扩大了对多种变异的 IDH1 酶 (例如 R132C、R132G、R132L、R132S 等) 和相应的细胞的活性评价, 表明 **49** 的活性 IC_{50} 处于 2~15 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高活性范围。在高浓度下对多种脱氢酶未显示抑制作用。用大鼠、犬和猴进行体内药代动力学评价, 显示良好的性

Table 4 Selectivity and cell-based profiling of potent compounds

Compd.	clogP	IDH1 ^{R132H}			IDH1 ^{R132C}			IDH1 ^{wt} $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
		Enzyme	U87 cell	U87 cell	Enzyme	HT1080I	HT1080	
		$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{GI}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{GI}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
1	5.6	0.09	0.58	>20	0.05	0.39	>20	7.7 (32%)
9	6.2	0.05	0.19	>20	0.03	0.15	>20	2.9 (22%)
17	4.9	0.1	0.29	>20	0.06	0.22	>20	20 (32%)
18	5.0	0.05	0.21	>20	0.05	0.26	>20	19 (34%)
19	6.5	0.06	0.36	>20	0.03	0.09	>3	6.3 (39%)
34	4.7	0.07	0.07	>20	0.16	0.48	>20	>100
35	6.3	0.08	0.24	>20	0.04	0.11	>20	>100
36	7.1	0.07	0.37	>20	0.04	0.17	>20	>100

Table 5 Activity and metabolic stability of optimized compounds. a: Enzymatic IC_{50} values for the IDH1^{R132H} homodimer; b: Cellular IC_{50} values from HT080 chondrosarcoma cell line; c: Microsome stability recorded as the hepatic extraction ratio in human liver microsomes

Compd.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Enzyme $IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$ ^a	Cell $IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$ ^b	Extraction ratio ^c
34	CH ₃	H			70	497	0.93
37	CH ₃	H			46	155	0.94
38	Cl	H			230	605	0.45
39	Cl	H			44	279	0.91
40	Cl	H			34	53	0.93
41	Cl	H			13 310	Not test	0.18
42	Cl	H			45	73	0.03
43	Cl	H			40	66	0.15
44	Cl	H			9	3	0.37
45	Cl	F			6	1	0.23

Table 6 Activity and property of compounds with reducing hPXR activation. a: Human pregnane X receptor activation was determined as the fold activation relative to reference compound; b: The cell permeability coefficient (Papp) was determined in both directions (apical to basolateral [A-B] and basolateral to apical [B-A]) across the Caco2 cell membrane (rifampicin)

Compd.	R ₁	R ₂	Enzyme $IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$	Cell $IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$	Extraction ratio	hPXR activation ^a	Efflux ratio ^b
45			6	1	0.23	69/70	14.2/2.3
46			10	1	0.37	21/61	1.9/26
47			7	297	0.54	2/10	Not test
48			11	13	0.62	2/3	0.19/129
49			12	8	0.15	2/21	15/2

质, 列于表 7 (Popovici-Muller J, Lemieux RM, Artin E, et al. Discovery of AG-120 (ivosidenib): a first-in-class mutant IDH1 inhibitor for the treatment of IDH1 mutant cancers. ACS Med Chem Lett, 2018, 9: 300–305)。

基于这些优良性质确定 **49** 为候选化合物, 定名为

Table 7 Pharmacokinetic profiles of compound **49**

Animal	$F/\%$ (po, 10 mg·kg ⁻¹)	$t_{1/2}/\text{h}$	$Cl/L\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ (iv, 1 mg·kg ⁻¹)
Rat	42	8.9	0.2
Dog	21	19	0.02
Monkey	49	5.3	0.2

艾伏尼布 (ivosidenib), 经III期临床试验, 表明艾伏尼布是口服针对突变型异柠檬酸脱氢酶 1 (IDH1) 的急性髓性白血病有效药物, 于 2018 年美国 FDA 批准的首创性药物。

