

• 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。

阿派西林是诺华公司研制的作用于 α 亚型磷脂酰肌醇-3激酶 (PI3K α) 的首创性口服药物, 治疗对PI3K α 突变的HR阳性和HER-2阴性的乳腺癌患者。在本品研制的同时不少制药公司也针对该靶标开展了研究, 都在临床研究中因脱靶的不良反应而中止, 反映了在体外到体内、由动物到患者的转化中的不确定性和风险, 以及本品之幸运。研制阿派西林的药物化学特征, 一是利于区分靶标亚型之间的微观结构差异, 分子模拟指导结构与优化, 聚焦于特定的PI3K α 激酶选择性和高活性的目标, 二是在保障活性和选择性的前提下, 兼顾化合物的代谢稳定性的修饰和对细胞色素P450的无碍, 实现了活性与成药性的同步优化。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0473

分子模拟指导阿派西林的研制

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 研发背景和靶标

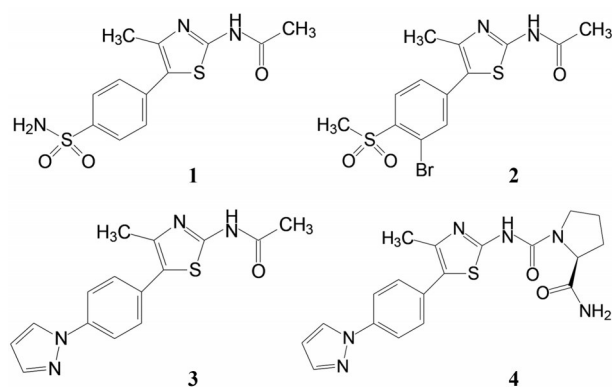
磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 是类脂质激酶, 催化磷脂酰肌醇的磷酸化, 生成3-磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3), PIP3作为第二信使参与细胞内信号转导, 在细胞增殖、存活、迁移、炎症和凋亡等过程起重要调节作用。人体细胞中含有编码PI3K-1A的催化亚基, 称作p110 α 、p110 β 和p110 δ ; PI3K-1B只表达酶p110 γ , p110 γ 和p110 δ 主要存在于白细胞中。PI3K信号通路失控, 使抑癌基因失活, 一些受体酪氨酸激酶发生变异、放大或过表达会发生多种癌症, 例如结肠癌、恶性胶质瘤、胃癌、肝癌和乳腺癌等。

由于p110 α 发生变异而激活其激酶活性, PI3K α 成为研制抗癌药物的理想靶标, 本品就是以PI3K α 为靶标经体外和体内活性评价研制成功的抗肿瘤药物。

2 先导化合物

诺华公司研究本项目的起始化合物是经过高通量筛选, 发现化合物1对PI3K γ 呈现活性 ($K_i = 0.11 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 随后确定的目标是研制泛PI3K激酶抑制剂, 优化过程中发现将氨磺酰基换成甲磺酰基的化合物2对多种PI3K激酶亚型的活性在 $0.03 \sim 0.08 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平。继续优化将甲磺酰基变换为1-吡唑化合物3, 泛PI3K激酶亚型的结合作用进一步增强。再将乙酰基用脲基置换, 经过多轮优化得到化合物4, 对PI3K α 激酶具有选择性结合作用 (对p110 α 的 K_i 值 $0.005 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 比其

他亚型的活性高1个数量级, 之所以聚焦于PI3K α 激酶是因为泛PI3K激酶抑制剂常出现不良反应, 而多种癌症的PI3K α 激酶处于高表达和发生突变 (Bruce I, Akhlaq M, Bloomfield GC, et al. Development of isoform selective PI3-kinase inhibitors as pharmacological tools for elucidating the PI3K pathway. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22: 5445–5450)。



3 先导物的优化

3.1 模板化合物的结合模式 诺华公司为了研制PI3K α 激酶选择性抑制剂, 以化合物4为起始物, 设计的化合物5, 是为了同时探索多个位置的构效关系, 即用叔丁基置换吡唑环; 苯环变换为嘧啶环; 噻唑环上的甲基和脯氨酸的不变。

将化合物 **5** 分子对接到 p110 α 的晶体结构 (抽出复合物中的配体 p85 α) 得到的低能复合物如图 1 所示。结合特征如下: ① 噻唑环的氮原子和 2-NH 与 Val851 形成双齿型氢键 (一个给体, 一个接受体); ② 嘧啶环结合于由 Tyr836、Ile932、Ile848、Ileu800、Asp933、Lys802、Pro778 和 Met772 组成的疏水腔内; ③ 末端的脯氨酸的 S-酰胺的 NH₂ 与 Ser854 的羰基形成氢键, NH₂ 作为氢键给体与 Gln859 生成两个氢键。Gln859 在不同的 PI3K 亚型是不一样的, p110 β 、 δ 和 γ 亚型在该位置的残基分别是 Asp、Asn 和 Lys, β 和 γ 的 Asp 和 Lys 显然不能与 **5** 形成如同 Gln 的两个氢键, δ 亚型的 Asn 因长度短于 Gln 也难以形成氢键, 因而, 化合物 **5** 对 p110 α 显示

特异性结合作用。测定 **5** 的活性表明, 对 p110 α 的 IC₅₀ 为 0.007 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而对其他亚型的抑制作用减弱数十到上百倍 (表 1)。

3.2 先导物的优化 以化合物 **5** 为先导化合物变换 4 个位置的原子或基团, 即叔丁基的变换、嘧啶的变换、噻唑环上单甲基和脯氨酸酰胺的变换。合成的代表性化合物列于表 1。表中列出了化合物对 4 种亚型的抑制活性、人肝微粒体的代谢清除率和对 CYP3A4 的抑制作用, 后两个是评价化合物的体外药代性质。分析构效关系如下: ① 分子模拟提示化合物 **5** 的嘧啶环 N3 在 ATP 结合腔内未显示有电性相互作用, 预示换成碳原子的吡啶环对抑制 p110 α 的活性影响不大。果然, 化

Table 1 Inhibitory activities of compounds for p110 α , p110 β , p110 δ and p110 γ , for *in vitro* metabolic clearance using rat liver microsomes, and for CYP450 3A4

Compd.	X	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				CL / $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	CYP IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
					p110 α	p110 β	p110 δ	p110 γ		
5	2- <i>t</i> -Bu	N	CH ₃		0.007 5	1.8	0.35	0.21	62	>10
6	2- <i>t</i> -Bu	CH	CH ₃		0.014	4.4	0.33	0.43	77	>10
7	2- <i>t</i> -Bu	CH	CH ₃		2.7	>9.1	4.2	4.6	104	Not test
8	2- <i>t</i> -Bu	CH	CH ₃		0.62	4.9	0.59	0.93	186	Not test
9	2- <i>t</i> -Bu	CH	CH ₃		>9.1	8.2	3.3	>10	36	Not test
10	2- <i>t</i> -Bu	N	CH ₃		0.019	1.2	0.29	0.32	44	Not test
11		CH	CH ₃		0.005	1.2	0.29	0.25	29	>10
12		CH	CH ₃		0.019	4.1	2.0	1.1	41	>10
13	2- <i>i</i> -Pr	N	CH ₃		0.016	4.0	0.96	1.4	36	>10
14	2- <i>cyc</i> -Bu	N	CH ₃		0.020	1.8	0.69	0.61	53	>10
15	6- <i>i</i> -Pr	N	CH ₃		0.32	>9.1	Not test	Not test	Not test	Not test
16		CH	H		0.009 5	3.9	1.1	0.38	2.7	>10
17		CH	Cl		0.039	5.5	0.43	1.4	17	Not test
18		N	CH ₃		0.016	1.2	0.34	0.41	96	Not test
19		N	CH ₃		0.012	3.1	0.81	0.69	47	>10

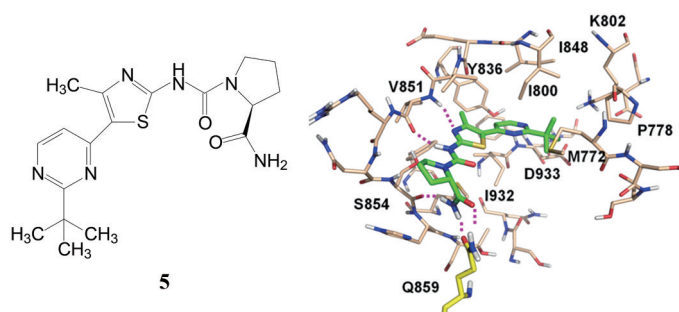


Figure 1 Proposed binding mode of compound **5** in the ATP pocket of PI3K α . Hydrogen bonds are represented as dashed lines

合物**6**对p110 α 活性与**5**相近; ② 化合物**7**、**8**和**9**与**6**的区别分别是*N*-甲基(仲胺)、无酰胺基团的四氢吡咯, 以及**6**的对映异构体, 这3个化合物都不能与Gln859发生双齿型氢键结合, 因而活性显著降低; ③ **10**是缩环氮杂丁烷化合物, 活性略有下降, 可解释为氮杂丁烷不如四氢吡咯与His855的咪唑环发生的充分范德华作用所致; ④ 化合物**11**的活性强于**5**和**6**, 是叔丁基的一个甲基被三氟甲基取代的缘故。分子模拟显示, 容纳叔丁基的疏水腔还有空余的空间, 体积较大的三氟甲基增加了疏水-疏水相互作用。化合物**19**的活性与**6**相同, 连接在嘧啶环的甲基环丙基可视为叔丁基的环合物; ⑤ 其余的化合物活性都有所减弱, 提示那样的变换不利于活性。其中**18**是二乙胺基取代, 虽然体积比叔丁基大, 但基团的形状与结合腔不匹配, 因而活性也减弱; ⑥ 研究对人肝微粒体的代谢作用显示**5**和**6**的主要代谢位点是叔丁基的羟基化和噻唑环的4-甲基羟基化。化合物**11**、**12**、**16**和**17**由于三氟甲基或氰基的拉电子效应, 降低了氧化代谢能力, 因而提高了代谢稳定性。**17**还因为噻唑环有4-氯取代, 进一步提高了稳定性。

4 候选物的确定

用大鼠分别高表达p110 α 、p110 β 和p110 δ 的细胞评价化合物**4**~**19**阻断PI3K/Akt信号通路的活性表明, 抑制剂的活性强度和选择性与酶水平测定的结果有相同的趋势, 提示作用机制是相同的。表2列出了化合物对3种细胞系的抑制活性。数据显示化合物**5**、**6**和**11**对大鼠1-myr-p110 α 细胞的抑制活性达到纳摩尔水平, 选择性作用很高。

进而选出4个高活性和高选择性的化合物评价对大鼠的药代动力学性质, 结果列于表3。化合物**11**的药代性质显著优于其他化合物(Furet P, Guagna V, Fairhurst RA, et al. Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23: 3741-3748)。

Table 2 Inhibition of Akt phosphorylation in rat1-myr-p110x cells

Compd.	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹		
	rat1-myr-p110 α	rat1-myr-p110 β	rat1-myr-p110 δ
4	0.13	2.1	0.62
5	0.039	3.1	1.5
6	0.061	8.1	0.72
7	>10	>10	5.8
8	2.5	>10	0.77
9	Not test	Not test	Not test
10	0.23	6.4	1.6
11	0.074	2.2	1.2
12	0.64	>10	>10
13	0.10	5.9	1.3
14	0.44	7.3	>10
15	4.6	>10	>10
16	0.14	2.4	2.9
17	0.34	>10	4.9
18	0.17	4.4	2.5
19	0.15	9.6	3.0

Table 3 Pharmacokinetic parameters in female Sprague Dawley rats at 1 mg·kg⁻¹ iv

Compd.	Structure	<i>t</i> _{1/2} /h	CL		PPB/%
			<i>in vivo/in vitro</i> /mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	<i>V</i> _{ss} /L·kg ⁻¹	
5		1.2	21/62	1.2	94
19		1.7	8/47	0.9	97.1
6		3.4	39/77	1.4	Not test
11		2.9	10/29	1.9	94.3

进一步对化合物**11**在小鼠、大鼠和犬评价了生物利用度和体内清除率, 并对各种细胞色素P450亚型评价了活性, 证明不是抑制剂和诱导剂。在10 μmol·L⁻¹

浓度下对 448 种激酶没有显示抑制作用, 提示具有选择性抑制 PI3K α 激酶的作用, 遂确定为候选化合物, 定名为阿派西林 (alpelisib), 经三期临床研究证明对 PI3K α 突变的 HR-阳性、HER-2 阴性的乳腺癌患者可延长无进展生存期, 治疗中患者对阿派西林有更高的耐受性。经美国 FDA 批准于 2019 年上市, 成为第一个针对该靶标治疗晚期乳腺癌的口服药物。

