

• 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。

干眼症是常见的慢性病,当解析了炎症引起干眼症的分子机制,通过小分子拮抗淋巴细胞功能相关的抗原1 (LFA-1) 与胞间黏附分子-1 (ICAM1) 之间的蛋白-蛋白相互作用,就得以解除炎症部位的淋巴T细胞的黏附作用。本品的研制成功,是在前人研究的基础上,通过化学结构的合环操作,实现了骨架迁越,赋予结构以新颖性;在优化活性中,也借鉴了已有的构效关系,整合优良片段。所以尽管是首创性药物,但在结构演化中不乏吸纳了同类化合物的相关信息和知识,因而有幸运的色彩。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0727

基于靶标治疗干眼症的首创药物立他斯特

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

干眼病是种慢性病,它的发生是由于减少了泪液的产生或泪膜提高了蒸发量所引起的眼部疾患。干眼病的发病是慢性炎症所引起,因而由复杂和多种因素所致。患者的结膜活检提示,组织中存在异常的CD3呈阳性的T细胞,表明是炎症之所在 (Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, et al. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. Arch Ophthalmol, 2000, 118: 1489–1496),因而常用免疫抑制剂(如环孢素)治疗干眼症。

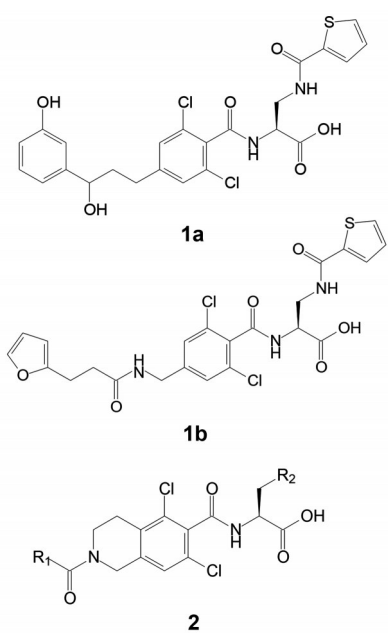
在整合素家族的 $\beta 2$ 亚族中,淋巴细胞功能相关的抗原1 (LFA-1) 是其中的一种异源二聚体,处于T细胞的胞膜上。LFA-1与胞间黏附分子-1 (ICAM1) 发生蛋白-蛋白相互作用,不仅引起炎症部位的T细胞的黏附、迁移和增殖,也影响T细胞的特异性免疫反应。阻断LFA-1与ICAM-1的相互作用作为抗炎的环节,是用来治疗牛皮癣、风湿性关节炎和哮喘病等疾病的环节。研究表明,干眼病患者的结膜表皮细胞和腺泡细胞的ICAM-1表达增高 (Gao J, Morgan G, Tieu D, et al. ICAM-1 expression predisposes ocular tissues to immune-based inflammation in dry eye patients and Sjögren's syndrome-like MRL/lpr mice. Exp Eye Res, 2004, 78: 823–835),因而LFA-1/ICAM-1的小分子阻断剂可作为靶向T细胞抑制剂治疗干眼病。

2 活性评价

用体外方法测定LFA-1与ICAM1的结合能力,模型是评价人淋巴T细胞 (Hut-78细胞) 通过测定与被固定的ICAM1蛋白的黏附作用的变化,评价抑制剂的活性。受试物竞争性结合ICAM1,阻止了Hut-78细胞与ICAM1黏附作用,测定并计算半数T细胞的黏附作用被抑制时的受试物浓度 (IC_{50})。若受试物的 IC_{50} 低于 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,进一步测定含有10%胎牛血清 (FBS) 下,对葡萄球菌肠毒素B (SEB) 激活T细胞的抑制作用,也以 IC_{50} 表示。

3 先导化合物的由来

研制者启动项目时,业界已有多种化合物类型,虽然有个别化合物进入临床研究,但未能成功上市 (Gniadeck R, Zachariae C, Calverley M. Trends and developments in the pharmacological treatment of psoriasis. Acta Derm Venereol, 2002, 82: 401–410)。Gadek等系统研究了二氯苯甲酰胺为母核的化合物 (**1a**) 具有强效的抑制作用,**1a**的活性用ELISA方法测定竞争LFA-1的活性 $IC_{50} = 1.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Gadek TR. Generation of an LFA-1 antagonist by the transfer of the ICAM-1 immunoregulatory epitope to a small molecule. Science, 2002, 295: 1086; Burdick DJ, et al. WIPO Patent Appl. WO2002/059114),还对母核两侧的结构进行了构效关系研究,其中化合物**1b**的活性也很高,结构的左侧用酰胺连接咪唑片段。



夏尔公司 (Shire) 研制者应用骨架迁越方法, 用二氯代四氢异喹啉环替换二氯苯基, 实际是将左侧的仲胺用亚乙基与苯环环合而成, 设计合成了通式为 **2** 的化合物。

4 先导物的优化

4.1 初步的变换 首轮是变换通式 **2** 中的 R_1 或 (R_2), 合成的化合物列于表 1。分析构效关系如下: ① 化合物 **3~9** 是固定 R_2 为 2-噻吩甲酰氨基, 变换 R_1 为不同的基团。当 R_1 为呋喃乙烯基取代 (**3**) 的活性很强, **3** 具有化合物 **1b** 的结构痕迹。换成苯基 (**4**) 的活性仍然不错, 但在苯环 2 位作甲基取代 (**5**) 活性显著降低, 推测邻位效应所致。而化合物 **7** 的 R_1 (4-甲基苯基) 活性最强。由于 4-氯苯基化合物 (**9**) 对 SEB-10% FBS 的抑制活性强于 4-甲基和 3-氯, 因而之后的研究主要以 4-氯苯甲酰基为取代片段。② R_2 用氨基、乙酰氨基或环己酰氨基 (**10~12**) 活性显著下降, 提示该部位为芳香环的必要性。**13** 和 **14** 中等强度的活性; **15** 和 **16** 的 R_2 增加极性 (氢键给体) 使活性降低; **17** 和 **18** 的 R_1 分别为甲基和环己基, 没有平面性的芳香环, 活性显著下降; **19~21** 为高活性化合物, 提示 R_2 为噻吩甲酰氨基是优选片段 (Zhong M, Shen W, Barr KJ, et al. Discovery of tetrahydroisoquinoline (THIQ) derivatives as potent and orally bioavailable LFA-1/ICAM-1 antagonists. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20: 5269-5273)。

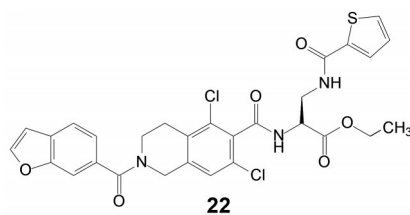
4.2 分子的左右两侧片段的变换 用大鼠和小鼠评价了表 1 中高活性化合物的药代动力学性质, 还用硫代乙酸诱发小鼠腹膜炎模型评价体内的抗炎活性, 发现即使活性最强的化合物 **21** 和 **22** (**22** 是 **19** 的乙酯性

Table 1 SAR of compounds with various R_1 and R_2 for general formula **2**

Compd.	R_1	R_2	$C_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
			Hut-78 I	SEB-10% FBS
3			0.025	-
4			0.079	1.2
5			0.46	-
6			0.090	-
7			0.010	1.6
8			0.066	0.24
9			0.022	0.43
10		NH_2	>1.0	-
11		NHAc	0.62	-
12			0.54	-
13			0.029	0.55
14			0.051	3.8
15			>1.0	-
16			0.81	-
17	CH_3		>1.0	-
18			>1.0	-
19			0.009	-
20			0.013	-
21			0.005	0.069

前药) 由于血清的存在, 导致活性显著减弱, 因此需进一步改变结构, 特别是母核右侧取代的 S-2,3-二氨基丙酸部分尚需进一步探索性变换。

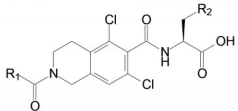
鉴于化合物 **15** 和 **16** 右侧连接的是天然苯丙氨酸和色氨酸残基, 不是经胺酰基与芳环相连, 虽然活性不高, 但有探索更多周边化合物的空间, 因而合成了多种



杂环取代的丙氨酸, 列于表2中。

化合物 **23** 的右端是色氨酸, 活性弱于 **9** 很多, 但已不是二氨基丙氨酸的结构, 肽性质减少了。若咪唑的N原子被甲磺酰化, **24** 的活性显著提高, 特别是在5或6位引入甲基, **25** 和 **26** 的活性更加提高。咪唑环换成异丙基取代的1,2,3-三唑环, 活性会因与母核连接的位置不同而变化很大, 例如化合物 **27** 的活性比 **28** 强8倍。右端为取代的三唑基, 左端变换成2-或6-苯并咪唑 (**29** 和 **30**) 的活性很高, 而且血清的存在对活性影响不大。**31** 是左侧变换成吡啶并吡啶的杂环, 活性也很高。左端为苯并咪唑, 右端为甲磺酰取代的杂环, 以咪唑化合物 (**33**) 活性最强, 而且血清的存在对活性的影响不大 (Zhong M, Hanan EJ, Shen W, et al. Structure-activity relationship (SAR) of the α -amino acid residue of potent tetrahydroisoquinoline (THIQ)-derived LFA-1/ICAM-1 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 307-310)。

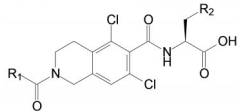
Table 2 SAR of substituted α -amino acid residue of the THIQ-derived LFA-1/ICAM-1 antagonists



Compd.	R ₁	R ₂	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	
			Hut-78	SEB-10% FBS
23			0.81	-
24			0.10	25
25			0.026	11
26			0.039	25
27			0.059	1.0
28			0.31	-
29			0.005	0.19
30			0.019	0.95
31			0.007	0.16
32			0.030	0.56
33			0.001 2	0.095
34			0.15	-
35			1.0	-

4.3 右侧为取代的氨基酸片段的变换 上一节叙述的结构变换提示, 将右侧的二氨基丙氨酸结构减少一个氨基成取代的氨基酸仍可抑制 HuT 78 T 细胞与 ICAM1 蛋白的黏附作用, 即使介质中存在 10% 的血清仍保持活性, 为此进一步优化右侧的结构和与左侧片段的优势匹配, 合成的代表性化合物列于表3。分析构效关系如下: ① 前述的化合物 **33** 的右侧是取代的咪唑环, 活性较高, 将左侧换成 4-氯苯基, **36** 的活性有所

Table 3 SAR of α -amino acid residue of the THIQ-derived LFA-1/ICAM-1 antagonists



Compd.	R ₁	R ₂	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	
			Hut-78	SEB-10% FBS
33			0.001 2	0.095
36			0.006	0.24
37			0.01	>10
38			0.003	0.20
39			>1.0	-
40			0.25	-
41			0.009	0.074
42			0.80	-
43			0.12	2.0
44			0.01	0.20
45			0.12	-
46			0.01	0.26
47			0.039	0.032
48			0.057	0.050
49			0.002	0.18
50			0.20	>10
51			0.004	0.20
52			0.013	0.64
53			0.010	>10
54			0.058	0.39
55			0.012	5.6
56			0.010	4.0
57			0.014	0.94

降低。而右侧换成 3'-甲磺酰苯基 **38** 的活性强于 **36**, 略低于 **33**, 说明右侧的 3'-甲磺酰苯基是个不错的活性模块。② 变换甲磺酰基在苯环上的位置, 2'-和 4'-甲磺酰苯基 (**39** 和 **40**) 的活性显著降低, 提示甲磺酰基的间位取代是重要的。③ 再将 **38** 左侧的氯苯基换成 6-苯并呋喃化合物 **41**, 活性显著提高, 而且在 10% 血清存在下仍有相当高的抑制活性。④ 在 **41** 的苯环不同位置上再进一步作卤素取代, 化合物 **42**~**46** 活性都减弱, 提示 3'-甲磺酰苯基是优化的片段。⑤ **41** 的苯环换作甲磺酰吡啶基 **47** 或甲亚磺酰吡啶基 **48** (手性化合物未拆分), 虽然 10% 的血清不干扰化合物抑制活性, 但活性强度低于 **41** 大约 4~6 倍。此外, 甲磺酰基和甲亚磺酰基的不同氧化状态对活性影响不大。⑥ **41** 的甲磺酰基换成乙磺酰基 **49**, 活性略有提升, 但 10% 血清显著降低活性, 因而 **49** 不如 **41**。3-异丙磺酰苯基 **50** 的活性显著降低, 提示间位大体积或高疏水性的取代不利于活性。⑦ 3'-氨磺酰基取代的 **51** 活性很高, 但血清降低其活性, 故不足取。氨基上被单甲基或二甲基取代 (**52** 和 **53**) 均使活性降低。⑧ 3'-甲磺酰基用二甲基亚膦酰取代 (**54**), 或被乙酰基 (**55**) 或 2''-羟乙基 (**56** 和 **57**) 取代, 活性都下降, 不如化合物 **41**。

4.4 评价药代动力学性质 用大鼠和人肝微粒体评价代表性化合物的代谢稳定性, 还用大鼠静脉注射评价体内药代动力学性质, 数据列于表 4。结果提示, 化合物 **41** 的清除速率最快, 而且在血浆中有最小的暴露量, 这对于局部用作的滴眼剂是非常适宜的。

5 候选化合物的确定和立他斯特上市

对化合物 **41** 进行 Ames 实验结果表明为阴性; 抑制细胞色素 P450 的主要亚型都很弱。例如对 CYP3A4 的 $IC_{50} > 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP2C9 的 $IC_{50} = 3.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对

Table 4 Pharmacokinetic properties of the typical compounds

Compd.	% Remaining after 30 min		$t_{1/2}/\text{h}$	Rat iv PK	
	Human LM	Rat LM		Cl /mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	AUC /h·ng·kg ⁻¹
33	65	>95	0.43	60.0	1 514
36	92	>95	0.27	74.3	1 126
41	71	>95	0.78	139.2	705
46	>95	>95	0.65	80.5	1 189
47	>95	>95	0.62	73.5	1 277
48	>95	>95	0.27	121.1	753
51	71	>95	1.03	34.4	2 431
52	>95	>95	0.37	37.0	2 261

人的 hERG 作用 (膜片钳模型), $IC_{50} > 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示 **41** 的离体实验有安全性的保障。

用 ¹⁴C 标记化合物 **41** 的母核羰基碳, 测定眼睛局部给药的吸收分布特征, 化合物溶液滴眼大鼠和犬, 评价对眼睛的药代动力学性质。结果表明, 给药后 30 min 整个眼组织达到最大浓度, 特别是球结膜、睑结膜和角膜部分, 眼泪使 **41** 药液迅速扩散, 并且缓慢地消除, 而在血浆中检测量很低, 表明吸收量很少。

化合物 **41** 的钠盐在磷酸缓冲液中有良好的溶解性, 可达 $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。基于上述的优良药效物化性质, 化合物 **41** 命名为立他斯特 (lifitegrast) 进入开发阶段, 经 III 期临床研究, FDA 于 2016 年批准立他斯特滴眼剂上市, 治疗干眼症。

