

• 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。

本品是FDA首个针对PI3K α 发生突变的乳腺癌的治疗药。诺华公司研制过程是以分子对接提供的结构信息作指导,以选择性抑制 α 亚型为目标,针对靶标特有的残基作互补性的配体设计,分子设计中还兼顾化合物的代谢稳定性,在活性/选择性/成药性等因素中优化出最佳化合物阿吡利塞(alpelisib),并以复合物的晶体结构证明当初的虚拟对接提供的信息是正确和成功的导向。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-1004

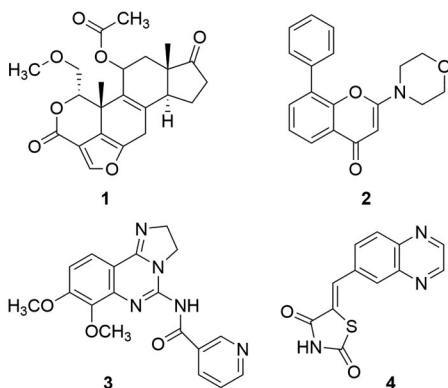
治疗PI3K α 变异的乳腺癌药物阿吡利塞

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 靶标 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)是催化磷脂酰肌醇环上3'-羟基磷酸化的激酶家族,在调控细胞过程中扮演重要角色,包括细胞代谢、存活、迁移和激活等。根据这些脂质激酶结构的不同和底物的特异性,该家族可分为I、II和III三类,其中I类研究得最充分,又分为IA和IB亚型,PI3K的IA蛋白是由一个调控/衔接蛋白(85 kDa)和三个110 kDa的催化亚基(p110 α 、p110 β 和p110 δ)构成,IB蛋白为一个p110 γ 构成,后者被G蛋白偶联受体活化。



1.2 研发背景 制药公司研发PI3K抑制剂的目标是治疗癌症、心血管、呼吸、免疫和炎症疾病的药物。最早的抑制剂例如wortmannin(1)和LY294002(2)只作为工具药。后来发现的泛PI3K抑制剂PIK90(3)和p110 γ 抑制剂(4)等都没有进入临床研究。

2 活性评价

用闪烁逼近分析法(SPA)评价受试物对重组的PI3K激酶(p110 γ 、p110 α 、p110 δ 和p110 β)的抑制活性,测定三磷酸腺苷(ATP)的末端磷酸基转移到磷脂酰肌醇的生成量,来计算受试物抑制酶活性的半数有效浓度(IC₅₀)。

评价受试物对细胞的活性是测定人嗜中性粒细胞和B细胞增殖时对呼吸爆发的抑制作用。呼吸爆发实验是用趋化肽f-Met-Leu-Phe(fMLP)模拟在细菌感染时细胞释放N-甲酰肽的作用,细菌感染引起嗜中性粒细胞募集并释放出活性氧簇物。这个过程主要依赖于p110 γ 和p110 α 、p110 δ 亚型,而B细胞的增殖是p110 δ 依赖过程。

3 先导物及其优化

3.1 先导化合物 用生物化学方法高通量筛选化合物对p110 γ 的抑制作用,发现化合物5有一定的选择性,对p110 γ 抑制活性IC₅₀ = 0.11 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,而对大多数激酶没有作用,因此5作为先导物。

3.2 分子对接 化合物5分子对接到p110 γ 晶体结构(图1),提示5结合于ATP位点,噻唑环的N和酰胺的H原子与Val-882的NH和C=O形成双齿型氢键,磺酰胺的氧原子与Lys-883形成氢键。苯环的上下与Ile-879和Ile-576疏水链发生疏水相互作用。噻唑环上的甲基结合于Tyr-867、Val-882和Ile-963构成的疏水腔。

3.3 变换苯环上的取代基 化合物5对PI3K激酶亚型缺乏选择性(表1),这是因为各激酶之间的ATP结

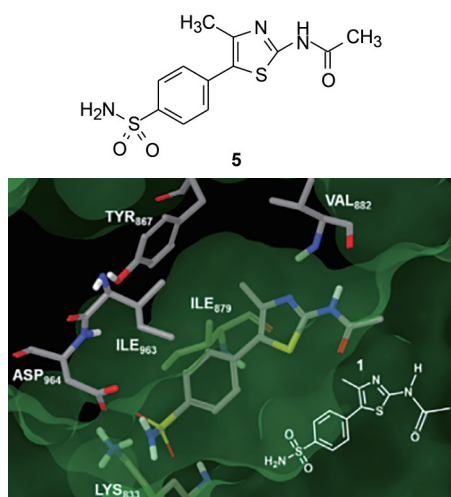


Figure 1 Docking of **5** in the p110 γ crystal structure

合域相当保守,相似性高的缘故。为了区分之间的差异,提高对 p110 γ 选择性,在苯环上作不同的取代,而且还为对细胞的过膜性降低 **5** 的极性 (**5** 的极性表面积 PSA = 102 Å²),将氨磺酰基变换为甲磺酰基 (例如化合物 **6**, PSA = 76 Å²) 或吡啶环取代 (例如化合物 **12**, PSA = 62 Å²),或乙酰基取代 (例如化合物 **13**, PSA = 59 Å²),合成的代表性化合物列于表 1,表中 fMLP 栏的数据是对细胞的抑制活性。在甲磺酰基的邻位引入吸电子基团 (**7**~**11**) 大多提高了酶和细胞的抑制活性,而且对 p110 β 的活性降低。**12** 和 **13** 的活性也有类似的变化。表 1 的构效关系提示,变换为甲磺酰基化合物 **6** 的抑酶活性略低于化合物 **5**,但提高了细胞活性。

3.4 右侧的氨基噻唑的引长 基于分子对接的结构特征,若将分子右侧氨基噻唑片段引长,使抑制剂的结合样式越出保守的 ATP 结合域,目的是提高对细胞的活性和对不同亚型的选择性。为此,用 Bohdan 自动合成仪合成了集中库,即由 2-氨基噻唑合成了经脲基结构连接出不同的片段,合成了 400 多个目标物,发

现大部分目标物显示对 PI3K 激酶有泛抑制作用,那些对亚型具有选择性的代表性化合物列于表 2。构效关系提示含有 *S*-四氢吡咯酰氨的化合物 **14**~**17** 对 p110 α 亚型有强选择性抑制活性,**17** 对 p110 α 活性达到 0.005 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,即使苯并噻唑连接了 *S*-四氢吡咯酰氨 (**18**) 也对 α 亚型有较高的活性。末端含有胺基异噻唑环的化合物 **19** 和 **20** 对 p110 δ 显示有选择性活性。末端含有叔丁基 (酯或酰胺) 的化合物 **21** 和 **22**,以及含有四唑基的化合物 **23** 则对 p110 γ 亚型有强抑制活性,强于 p110 α 的选择性在 20 倍以上。

3.5 代表性化合物的药代性质 对于不同亚型有选择性活性的化合物用大鼠做初步药代实验,表明化合物 **22** 和 **23** 的生物利用度和消除半衰期略优于受试物 **17** 和 **20** (表 3,数据从略) (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*, 2012, 22: 5445–5450)。

4 对选择性抑制 p110 α 的优化

4.1 分子模拟揭示选择性结合特征 化合物 **17** 对 p110 α 显示强效抑制活性,分子模拟提示四氢吡咯环上的酰胺基与 p110 α 亚型的 Gln859 发生氢键结合,*N*-苯基吡啶片段处于由 Ile800、Pro778 和 Met772 组成的疏水腔中。为了优化对 p110 α 的活性,合成了变换 *N*-苯基吡啶片段或四氢吡咯的化合物 **24**~**32**,列于表 4。

首先合成了化合物 **24**,经分子对接到已有晶体结构的 p110 α 的 ATP 结合腔中 (图 2),表明四氢吡咯环外酰胺 NH 作为给体与 Ser854 骨架羰基形成氢键,而酰胺的羰基和氮原子与 Gln859 形成两对氢键。然而,在 p110 β 、p110 δ 和 p110 γ 亚型的 859 残基分别为 Asp、Asn 和 Lys,难以同酰胺发生二齿氢键结合,提示 Gln859 是设计 p110 α 选择性抑制剂的重要残基。

Table 1 Inhibition of PI3K by typical compounds

Compd.	R	PI3-kinase inhibition $K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				fMLP $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
		p110 γ	p110 α	p110 δ	p110 β	
5	–	0.11	0.11	0.21	1.43	2.8
6	H	0.23	0.20	0.19	1.36	1.93
7	Cl	0.057	0.035	0.079	1.30	1.93
8	Br	0.032	0.011	0.061	0.55	0.34
9	F	0.183	0.122	0.247	1.41	0.22
10	CN	0.062	0.045	0.079	0.76	0.30
11	CF ₃	0.061	0.028	0.074	0.87	0.29
12	–	0.110	0.030	0.019	0.41	0.32
13	–	0.260	0.190	0.260	1.94	1.76

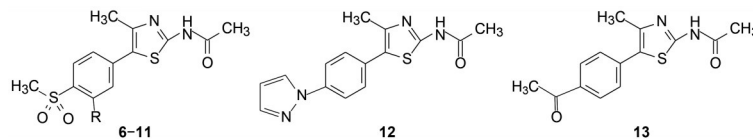


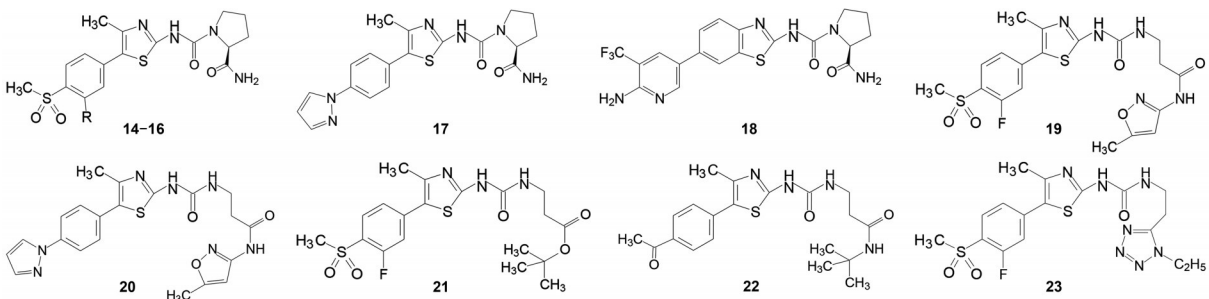
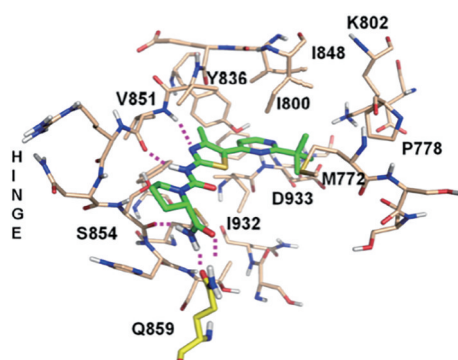
Table 2 Structure and activity of typical compounds with elongation of right-hand side fragment


Figure 2 shows the chemical structures of compounds 14 through 23. Compounds 14-16 have a substituent R on the benzene ring. Compound 17 has a pyrrole ring. Compound 18 has a trifluoromethyl group. Compound 19 has a methyl group. Compound 20 has a methyl group and a pyrrole ring. Compound 21 has a methyl group and a fluorine atom. Compound 22 has a methyl group and a tert-butyl group. Compound 23 has a methyl group and a 2-ethyl-1H-imidazole ring.

Compd.	R	PI3-kinase inhibition $K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
		p110 α	p110 γ	p110 δ	p110 β
14	H	0.187	5.81	3.62	>10
15	F	0.050	3.06	2.90	>10
16	CF ₃	0.020	1.14	1.67	>10
17	–	0.005	0.53	0.22	2.0
18	–	0.040	1.19	0.54	2.94
19	–	0.11	0.12	0.003	0.86
20	–	0.15	1.02	0.004	0.34
21	–	2.13	0.02	0.28	0.09
22	–	1.89	0.088	0.74	0.25
23	–	1.40	0.036	0.47	0.32

Table 3 The pharmacokinetics of typical compounds in rats

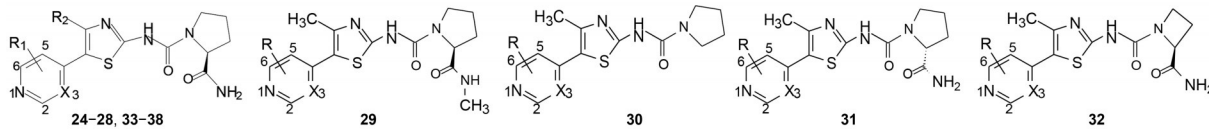
Compd.	T_{\max}/h	$C_{\max}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{AUC}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	$F/\%$	$\text{CL}/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{h}$	$V_{\text{ss}}/\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$
17	4	0.28	4.1	21	21	0.7	1.29
20	8	0.05	0.69	3	18	0.6	0.4
22	0.5	1.72	10.8	57	23	0.8	1.4
23	1	0.49	4.3	24	4.0	1.8	0.6

**Figure 2** Proposed binding mode of compound 17 in the ATP pocket of PI3K α . Hydrogen bonds are represented as dashed lines

4.2 优化活性和药代性质 基于化合物 24 对接提供的信息, 设计合成的化合物列于表 4。构效关系分析如下: ① 嘧啶环上 N3 没有同 ATP 结合腔内极性原子或基团发生极性结合作用, 因而变换成 C3 的吡啶化合物 25 对 p110 α 激酶的活性没有显著变化。② 将酰胺 N 甲基化 (29) 或去除酰胺片段 (30) 或酰胺处于 R 构型 (31) 都使活性降低, 提示酰胺片段与 Gin859 形成二齿型氢键是提高活性和选择性的必要因素。③ 化合物 32 与 24 的结构区别是氮杂环丁烷替换四氢吡咯, 32 的活性显著降低, 是因为 p110 α 的 His855 侧链咪唑环

与氮杂环丁烷的范德华作用力低于四氢吡咯, 而其他亚型的残基不是组氨酸, 因而活性都很差。④ 化合物 24 的叔丁基被三氟叔丁基 (26) 替换, 提高了对 p110 α 的抑制活性, 是因为叔丁基所处的由 Ile800、Ile848 和 Lys802 构成的疏水腔未曾被甲基完全充满, 用体积较大的三氟叔丁基提高了与疏水腔的相互作用。反之, 用体积较小的异丙基 (28) 或环丁基 (33) 替换, 降低了活性。⑤ 三氟叔丁基替换叔丁基的另一个优点是提高了代谢稳定性, 例如 26 的清除率 (CL) 显著低于 25, 其他含有三氟叔丁基的化合物 (如 35 和 36) 也降低了 CL 值。这也提示了叔丁基是个代谢位点。⑥ 35 和 36 与 26 的区别在于噻唑环上的甲基用氢或氯原子置换, 清除率未见显著变化, 提示该甲基不是代谢位点。

4.3 评价化合物的细胞活性 上述的目标化合物进一步评价了对 PI3K 亚型有不同表达的 Rat1-myrr 细胞抑制活性, 是测定受试物阻断 PI3K/Akt 激酶通路的能力, 即抑制 Akt 激酶对目标蛋白的磷酸化的程度, 表征对高表达 PI3K 亚型的抑制活性, 结果列于表 5, 表明对细胞的抑制作用与抑制相应酶活性的构效关系是相同的, 而且 24~26 抑制依赖于 PI3K α 的 Akt 活性可达到纳摩尔水平。虽然 24 和 25 的细胞活性稍强于 26, 但

Table 4 Inhibition of p110 α , p110 β , p110 δ and p110 γ activity, *in vitro* metabolic clearance using rat liver microsomes and CYP450 3A4 inhibition


Compd.	X	R ₁	R ₂	PI3-kinase inhibition $K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				CL $/\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	CYP 3A4 $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
				p110 γ	p110 α	p110 δ	p110 β		
24	N		CH ₃	0.007 5	1.8	0.35	0.21	62	>10
25	CH		CH ₃	0.014	4.4	0.33	0.43	77	>10
26	CH		CH ₃	0.005	1.2	0.29	0.25	29	>10
27	CH		CH ₃	0.019	4.1	2.0	1.1	41	>10
28	N		CH ₃	0.016	4.0	0.96	1.4	36	>10
29	CH		CH ₃	2.7	>9.1	4.2	4.6	104	Not test
30	CH		CH ₃	0.62	4.9	0.59	0.93	186	Not test
31	CH		CH ₃	>9.1	8.2	3.3	>10	36	Not test
32	N		CH ₃	0.019	1.2	0.29	0.32	44	Not test
33	N		CH ₃	0.020	1.8	0.69	0.61	53	>10
34	N		CH ₃	0.32	>9.1	Not test	Not test	Not test	Not test
35	CH		H	0.009 5	3.9	1.1	0.83	27	>10
36	CH		Cl	0.039	5.5	0.43	1.4	17	Not test
37	N		CH ₃	0.016	1.2	0.34	0.41	96	Not test
38	N		CH ₃	0.012	3.1	0.81	0.69	47	Not test

Table 5 Inhibition of Akt phosphorylation in Rat1-myr-p110s cells

Compd.	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
	Rat1-myr p110 α	Rat1-myr p110 β	Rat1-myr p110 δ
17	0.130	2.1	0.62
24	0.039	3.1	1.5
25	0.061	8.0	0.72
26	0.074	2.2	1.2
27	0.64	>10	>10
28	0.10	5.9	1.3
29	>10	>10	5.8
30	2.5	>10	0.77
31	Not test	Not test	Not test
32	0.23	6.4	1.6
33	0.44	7.3	>10
34	4.6	>10	>10
35	0.14	2.4	2.9
36	0.34	>10	4.9
37	0.17	4.4	2.5
38	0.15	9.6	3.0

体外的代谢稳定性不如化合物 **26**。

4.4 候选物的确定和阿吡利塞上市 化合物 **24** 和 **38**、**25** 和 **26** 之间嘧啶环或吡啶环上的叔丁基变换成甲基环丙基或三氟叔丁基, 在雌性大鼠体内的清除率显著降低 (表 6), 是因为位阻和三氟甲基拉电子效应难以

Table 6 Pharmacokinetic parameters of typical compounds in female Sprague Dawley rats at 1 mg·kg⁻¹ iv

Compd.	Structure	$t_{1/2}$ /h	$\text{CL}/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$		V_{ss} $/\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	PPB /%
			<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>		
24		1.2	21	62	1.2	94.0
25		3.4	39	77	1.4	Not test
26		2.9	10	29	1.9	94.3
38		1.7	8	47	0.9	97.1

发生氧化代谢的缘故。尤其是化合物 **26** 的大鼠、小鼠和犬有良好的口服生物利用度 (数据省略), 对 CYP450 未显示有抑制作用等。而且对多种激酶 (50 倍于 PI3K α 的 IC_{50} 浓度) 没有抑制作用, 显示出对 PI3K α 的

选择性作用。从而确定 **26** 为候选化合物, 定名为阿吡利塞 (alpelisib), 经临床前的系统研究和 III 期临床试验, 于 2019 年美国 FDA 批准上市, 口服治疗激素受体阳性、HER2 阴性和 PI3K α 发生突变的晚期乳腺癌患者。

5 阿吡利塞的结合模式

阿吡利塞与 PI3K α 复合物单晶经 X-射线衍射分析, 表明结合于激酶的 ATP 结合腔中, 侧链的酰胺与 Gln859 的侧链形成二齿性氢键 (图 3 中下部的虚线所示), 这与前述分子对接提示只有 PI3K α 可发生二齿氢键的选择性结合相一致。此外晶体结构还显示, 在由 Tyr836、Asp810、Asp933 和 Lys802 构成的腔穴中, 吡啶

环上的氮原子参与了与 3 个水分子形成的氢键网络, 而且 Lys802 侧链的 NH₂ 与三氟甲基的氟原子还形成氢键。

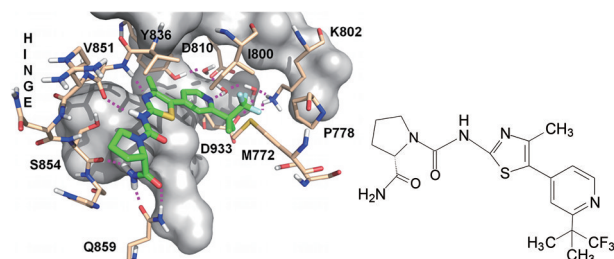


Figure 3 Crystal structure of PI3K α in complex alpelisib with **26**. Hydrogen bonds are represented as dashed lines