

• 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。

泽布替尼是我国本土研发成功的抗肿瘤新药。作为跟随性药物,虽然省去了靶标的概念验证,但应在安全有效性能上优于先行者。本品的研发目标明确,临床前数据表明达到了提高选择性和生物利用度的目标。构建的分子结构是在全新的母核骨架上安排、调整和优化结构,走的是创新之路。在时间轴上,从2012年立项到2019年底FDA批准上市,七年时间成功地创制了国际水平的药物,质量和效率都是很高的。本文从药物化学视角简要地叙述了研发的脉络,希望对国内新药创制有所启示和示范。(编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2020-0225

我国创制的抗肿瘤药物泽布替尼

郭宗儒

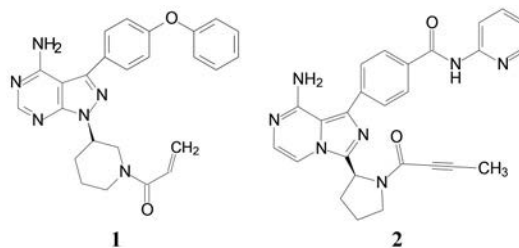
(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所,北京 100050)

1 研发背景

1.1 作用靶标 布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 是 B 细胞受体信号通路的重要组成部分,在 B 淋巴细胞的发育和生长中扮演重要角色。当 BTK 基因由于突变而失活时,骨髓中的 B 细胞就无法发育成熟。若过度活跃,同样会带来病变,白血病和淋巴瘤患者体内的癌细胞中,BCR 信号通路经常处于异常激活的状态, BTK 蛋白的水平提高,因而 BTK 是研制抗癌药物的靶标。

1.2 市场状态 我国百济神州医药公司 2012 年立项研发 BTK 抑制剂,当时国外已有处于临床试验的候选物,还没有批准上市的药物。2013 年 Pharmacyclics 和强生公司首创的伊鲁替尼 (**1**, ibrutinib) 上市 (Pan Z, Scheerens H, Li S, et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. ChemMedChem, 2007, 2: 58-61), 2017 年阿斯利康公司的阿卡替尼 (**2**, acalabrutinib) 是第二个上市的 BTK 抑制剂 (Wu J, Zhang MZ, Liu DL. Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor. J Hematol Oncol, 2016, 9: 21)。本品启动研究时, BTK 靶标已经临床试验的概念验证,确证为可药性靶标,因而是个跟随性的新药创制项目。

1.3 研发目标 研制跟随性药物设定的产品目标须在安全有效上优于首创药物。分析当时在研的项目,研发者将提高口服吸收性和选择性作为目标,是针对伊鲁替尼的不足,即口服生物利用度低 ($F < 10\%$),剂量偏大,治疗窗口窄,而且对野生型表皮生长因子受



体 (EGFR) 呈现抑制,引起皮疹和腹泻等不良反应。所以提高口服吸收性和选择性,可降低用药剂量,扩大治疗窗口,减少不良反应。目标物的化学结构特征为不可逆结合,以期药物作用的持久性和减低用药频度。

2 活性评价

2.1 生化测定化合物对 BTK 抑制活性 重组的 BTK 蛋白与受试物温孵后,加入 ATP 和肽底物 (Biotin-AVLESEEELYSSARQ-NH₂),加入含有隐式铕 (europium cryptate) 缀合的 p-Tyr66 抗体和链霉亲和素标记的 XL665 的终止液以终止反应。用 BMG PHERAstar FS 仪器测定时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET) 信号强度,计算化合物的 IC₅₀,数值越小活性越高。

2.2 生化测定对 ITK/TEC/JAK3/EGFR/HER2 的作用 受试物对这些酶的抑制活性也是用 TR-FRET 方法测定,计算化合物的 IC₅₀,数值越大化合物脱靶作用越小。

2.3 生化测定对细胞中 BTK 的抑制活性 用基于均相时间分辨荧光法 (HTRF) 定量测定受试物对高表达 BTK 的 Ramos 细胞中 BTK Tyr-223 的磷酸化作用。

Ramos 细胞与不同浓度的受试物温育 3 h, 加入过钒酸钠, 使细胞溶解, 一定量的细胞溶解液中加入 anti-BTK-d2 和 anti-pBTKK 抗体混合液, 暗处放置过夜, 用兼容性 HTRF 读出在两个波长 (665、620 nm) 下的荧光发射强度, 根据对这两个信号强度的抑制比计算化合物对细胞抑制的活性强度。

2.4 脱靶性评价 对 Rec-1 和 OCI-LY10 细胞的活力、EGFR pY1068 的细胞活性、Jurkat 细胞的 ITK pPLC γ 1 活性和对高表达 HEK293 细胞的抑制活性测定都是为了评价化合物在细胞水平上的选择性作用, 数值越大脱靶作用越小。

3 先导物的骨架演化

3.1 母核氨基咪唑的结构变换 作为跟随性药物, 研制者的理念也是以竞争激酶 ATP 结合腔为作用模式, 抑制剂模拟 ATP 腺嘌呤环, 并变换杂环的结构骨架, 还借鉴 **1** 和 **2** 都在嘌呤的 7 位有疏水性芳环的结构特征, 设计了氨基咪唑酰胺类型的化合物, 酰氨是为了形成分子内氢键, 用假杂环模拟平面性稠合的嘧啶环 (Wang ZW, GuoYH. Protein kinase inhibitors and uses thereof. US Patent US2015005277, 2015-01-01)。在适宜的位置连接迈克尔加成基团, 以实现不可逆抑制。在一系列化合物中发现化合物 **3** 具有活性, *R* 和 *S* 异构体对 BTK 的抑制活性 IC₅₀ 值分别为 0.21 和 0.80 nmol·L⁻¹, 抑制 BTK Tyr-223 细胞活性 IC₅₀ 值分别为 1.0 和 3.8 nmol·L⁻¹, 然而对 EGFR 的抑制活性也很高, 选择性

差意味着有脱靶作用。共晶结构显示 **3** (无 *N*-丙烯酰基) 的结合模式与伊鲁替尼的结合模式相似 (图略)。

进而将氨基与吡啶环并合设计了吡啶并苯并咪唑为骨架的化合物如 **4**~**6**, 没有丙烯酰基的化合物 **4** 活性不高, 处于 7-位的丙烯酰胺取代 (**5**) 活性也很弱, 而 8 位的活性 (**6**) 显著提高。将 **6** 的苯环部分饱和为 **7** 和 **8**, 进一步提高了活性, 将迈克尔基团自 8 位移至 7 位的化合物 **9** 提高了细胞活性, 但扩环成萘环的 **10** 和 **11** 活性未见提高。表 1 列出了上述母核演化过程的结构和活性。

3.2 降低母核的刚性 化合物 **4**~**11** 的母核为三环稠合, 刚性较强不利于药代性质, 为此将苯环或氮杂环由并合改为单键连出, 合成的代表性化合物列于表 2。结果表明, 双环母核体系只要有丙烯酰胺的“弹头”仍然保持活性, 但连接的位置很重要, 例如 **13** 和 **15** 的抑酶活性显著高于 **12** 和 **14**, 这是因为与 Cys481 的位置合适的缘故。若将 Cys481 突变成 Ser481 则活性降低, 说明迈克尔加成基团与巯基结合对活性的重要性。**13** 对 EGFR 活性很低, 较少脱靶作用, 但它抑制细胞活性不如 **15**, 不过 **15** 的药代性质有缺陷, 小鼠一次剂量 10 mg·kg⁻¹, 4 h 后脾细胞的占有率只有 56%, 所以仍然有待优化新的母核。

3.3 吡啶并哌啶的母核 由于变换母核合成的吡啶并吡啶 (未列出) 的化合物活性很低, 推测与骨架的过于刚性有关, 遂变换母核为吡啶并哌啶, 部分饱和化降

Table 1 Structures and selected properties of **3**–**11**






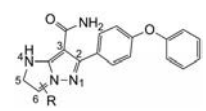
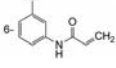
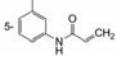
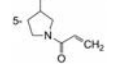
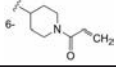
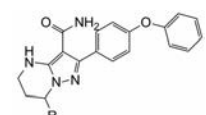
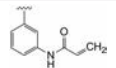
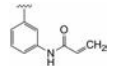
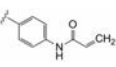
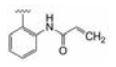
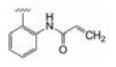
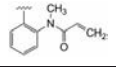
Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		
		BTK	EGFR	BTK pY223 cell
3	–	0.21–0.80	0.21–3.3	1.0–3.8
4	8-NH ₂	17	5.9	322.2
5		14	Not test	Not test
6		0.32	2.2	2.8
7	H	0.14	< 0.25	< 0.5
8	CH ₂ N(CH ₃) ₂	0.19	< 0.25	6.4
9		0.13	< 0.25	1.5
10		0.36	< 0.25	8.2
11		0.15	< 0.25	1.5

Table 2 Structures and selected properties of the compounds with bicyclic core


Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		
		BTK	EGFR	BTK pY223 cell
12		150	Not test	Not test
13		2.7	208	8
14		34	Not test	Not test
15		0.13	<0.25	0.8

低了分子的平面性,或许有利于结合。合成的代表性化合物列于表3。化合物**16**的一对对映体(**16a**和**16b**,拆分了但未确定绝对构型)对BTK酶和细胞活性相近,选择性也比较高。而将迈克尔基团移至对位,活性显著下降。然而连接在邻位的化合物**18a**和**18b**的活性差别很大,活性相差300多倍,提示处于邻位的迈克尔基团与Cys481结合的立体选择性非常高。**18a**的细胞活性和选择性都非常高,而*N*-甲基化的化合物**19**的活性陡然下降,提示这个位置的空间配置是非常严格的。这几个高活性的化合物的大鼠药代动力学表明口服生物利用度很低(例如**18a**的*F*值只有1.7%),因而不值

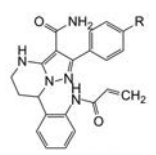
Table 3 Structures and selected properties of compounds with pyrazolopiperidine core






Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		
		BTK	EGFR	BTK pY223 cell
16a (<i>S</i> or <i>R</i>)		2.2	141	2.0
16b (<i>R</i> or <i>S</i>)		2.7	334	8.7
17		9.5	169	43.4
18a (<i>S</i> or <i>R</i>)		0.38	<0.25	3.0
18b (<i>R</i> or <i>S</i>)		130	Not test	Not test
19		4.7	3.1	232.6

得深入研究。不过以吡唑并哌啶为母核的骨架,连接的苯环邻位有迈克尔侧链的结构是个优化的配置。

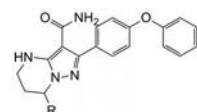
4 其他部位的优化

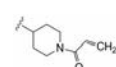
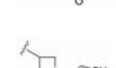
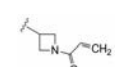

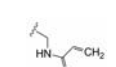
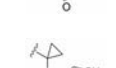
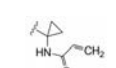
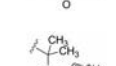
4.1 末端苯氧基的变换 下一步是固定**18a**的下半部分,变换二苯醚部分,合成的代表性化合物列于表4。将末端的苯基用较亲水性的四氢呋喃(**20**)或环丙甲基(**21**)替换,抑酶活性基本不变,**20**对细胞活性减弱,可能是过膜性减弱所致。对EGFR的抑制作用也基本没变。苯氧基换作体积较小的基团如甲氧基、甲基或氯原子,活性仍在纳摩尔水平。化合物**21**、**23**和**27**的溶解性强于**18a**,对肝脏微粒体的代谢稳定性也优于**18a**,灌胃大鼠的生物利用度也高于**18a**,只是所有这些化合物对EGFR仍显示强抑制活性,预示会有不良反应,须要继续优化。

Table 4 Structures and properties of pyrazolopiperidine series with varied phenyl ether part


Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		
		BTK	EGFR	BTK pY223 cell
18a		0.38	<0.25	3.0
20		1.3	0.79	26.3
21		1.2	0.3	2.5
22		2.7	0.63	16.7
23	OCH ₃	1.0	0.48	2.5
24	OCF ₃	4.2	0.46	Not test
25	CH ₃	1.6	0.34	3.9
26	CF ₃	4.2	0.66	Not test
27	Cl	0.64	0.18	4.2
28	F	1.9	1.2	2.5

4.2 携带迈克尔加成片段的结构变换 为了提高抑制BTK的选择性抑制、降低对EGFR的作用和提高化合物的生物利用度,下一步仍以**18a**为起点,变换分子中另一端,即连接丙烯酰胺的苯环为不同的脂肪环或链状结构。并将手性目标物拆分成光活体,测定必要的活性数据,结果列于表5中。化合物**29**、**30**和**31**的活性与**18a**相当,而**32**和**33**的活性显著降低,提示环丙基和谐二甲基的位阻效应妨碍了发生共价结合反应。**29**、**30**和**31**的消旋体对BTK激酶都表现高抑制活性,拆分成光学异构体,分别测定对BTK、EGFR和细胞活性,提示**29a**的活性和选择性略优于**30a**和**31a**,需要作进一步比较。

Table 5 Structures and activity of the compounds with varied carrier of acrylamide moiety


Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹			
		BTK	EGFR	BTK pY223 cell	Rec-1 cell viability
29		0.63	Not test	Not test	Not test
29a (<i>S</i>)		0.30	2.6	1.8	0.36
29b (<i>R</i>)		11	Not test	Not test	Not test
30		0.53	Not test	Not test	Not test
30a (<i>S</i> or <i>R</i>)		0.58	2.1	1.6	0.20
30b (<i>R</i> or <i>S</i>)		1.3	27	4.2	0.2
31		0.9	Not test	Not test	Not test
31a (<i>S</i> or <i>R</i>)		0.24	0.72	5.3	1.3
31b (<i>R</i> or <i>S</i>)		11	21	63.3	15.5
32		3.5	3.2	18.9	1.30
33		4.1	Not test	Not test	Not test

4.3 优质化合物的药代性质的比较 化合物 **29a**、**30a** 和 **31a** 显示为高活性化合物, 用大鼠静脉注射和灌胃比较药代性质, 结果列于表 6, 表明化合物 **29a** 的半衰期、清除率、 t_{max} 、 C_{max} 、AUC 和口服生物利用度都优于 **30a** 和 **31a**, 从而确定 **29a** 为候选化合物。

Table 6 Pharmacokinetic property of compound **29a**, **30a** and **31a**

Compd.	iv (1 mg·kg ⁻¹)			Po (5 mg·kg ⁻¹)			
	$t_{1/2}$ /h	CL /mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	V _{ss} /L·kg ⁻¹	t_{max} /h	C_{max} /ng·mL ⁻¹	AUC /ng·h·mL ⁻¹	<i>F</i> /%
29a	0.53	76.8	2.32	0.33	235	257	23.6
30a	0.26	169	2.85	2.33	10.4	50.3	8.6
31a	0.21	93.9	1.19	0.33	19.6	51.1	5.7

5 候选化合物的确定和泽布替尼的上市

为了确定化合物 **29a** 为候选化合物进入开发阶段, 对其血浆蛋白结合率, 人、犬和啮齿动物的肝微粒体清除率, 对重要细胞色素 P450 的抑制作用以及对小鼠移植性 OCI-LY10 DLBCL 等肿瘤的体内试验 (数据从略), 还与伊鲁替尼对 15 种激酶的抑制作用作比较, 表明 **29a** 对多种酶系的作用优于 (或不劣于) 伊鲁替尼, 数据列于表 7 中。

化合物 **29a** 定名为泽布替尼 (zanubrutinib), 于 2014 年在包括中国在内的全球进行临床试验, 证明是治疗套细胞淋巴瘤和慢性淋巴性白血病/小淋巴细胞淋巴瘤的有效药物, 于 2019 年经 FDA 批准上市。

6 泽布替尼与 BTK 激酶结合模式

泽布替尼与 BTK 激酶共晶结构显示, 分子定位于

Table 7 Biochemical kinase selectivity of **29a** and ibrutinib

Enzyme	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		Selectivity	
	29a	Ibrutinib	29a	Ibrutinib
BTK	0.30	0.18	-	-
ITK	56	3.0	187	17
TEC	2.0	0.57	6.7	3.2
JAK3	580	10	1 933	56
EGFR	2.6	0.75	8.7	4.2
HER2	530	19	1 800	106
BLK	1.13	0.23	1.2	0.5
BMX	0.62	0.5	0.7	1.1
BRK	33	18	36	39
HER4	1.58	0.25	1.7	0.5
FGR	1.55	1.82	168	4.0
FRK/PTK4	378	79	412	172
LCK	187	2.85	203	6.2
TXK	2.95	2.89	3.2	6.3

ATP 结合腔内, 酰氨基与铰链的 Glu475 和 Met477 形成氢键网络, 嘧啶的氮原子也与 Met477 发生氢键结合, 吡唑的氮原子经水分子 (氢键) 介导与 Lys430 的侧链氨基形成氢键, 二苯醚的末端苯环与 Phe540 发生 T-型 π - π 相互作用, 迈克尔基团与 Cys481 巯基的距离 2.9Å, 处于发生共价结合的范围。此外, 酰氨基与嘧啶氮的分子内氢键 (图 1 中未示) 也验证了最初模拟嘧啶酮结构的设想 (Guo YH, Liu Y, Hu N, et al. Discovery of zanubrutinib (BGB-3111), a novel, potent, and selective covalent inhibitor of Bruton's tyrosine kinase. J Med Chem, 2019, 62: 7923-7940)。

7 后记

泽布替尼是继伊鲁替尼和阿卡替尼之后 FDA 批准的第三个 BTK 抑制剂, 是在我国本土研发成功的。

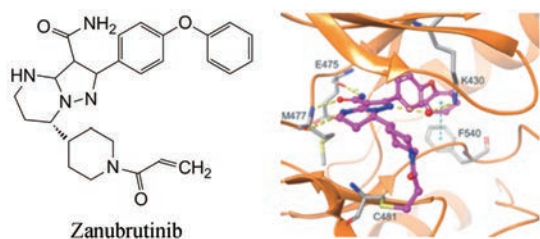


Figure 1 Binding mode of zanubrutinib and BTK from cocrystal structure

作为跟随性药物, 虽然省去了靶标(概念)验证, 但在安全和有效性上应优于依鲁替尼和阿卡替尼, 风险置后是显而易见的。所以设定的目标是提高选择性作用

和口服生物利用度, 临床前数据表明达到了预期的目标。就分子结构而言, 乍一看与已上市的两个结构有相似之处, 其实从本文介绍的研发路径看, 某些片段(例如二苯醚和迈克尔基团)有参考的痕迹, 但终究在全新的母核骨架上如何安排、调整和优化结构, 走的是完全创新之路。在时间坐标上, 从立项(2012年)到开始临床研究(2014年), 从设计合成的500多个化合物中优选出了候选物, 开始了临床试验, 到2019年底FDA批准上市, 7年的时间创制了一个国际水平的新药, 可谓高质量高效率的研发。本文从药物化学视角简要地叙述了研发的脉络, 虽然个中的细节和艰辛不得而知, 但对国内业界的新药创制有一定的启示作用。