

## • 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。

创制抗感染药物是新药研发的永恒主题。病原体为了生存和繁衍,逃避或对抗药物的干扰,一个重要方式是对作用靶标作针锋相对的变异,使药物与靶标的互补性结合失效。泰利霉素是第三代大环内酯,是在多种阳性致病菌对一/二代大环内酯产生耐药性下创制的。大环内酯类的特点,都是以红霉素的结构为先导物进行改造的,在14元环上的不同位置发掘突破口,由克拉霉素到阿奇霉素,策略途径都是运用已有知识和构效关系,例如利用日本发现的6位甲醚化,雅培发现的11,12-环胺甲酸酯,德国对3-酮基的重要发现,以及11位柔性碱性侧链的信息等等,法国研发出泰利霉素这重磅药物,在一定程度上是幸运,因为有众多研制单位在共享信息资源中都在以红霉素为骨架作跟随性创新,思路是相近的。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1003

# 结构整合的酮内酯泰利霉素研制

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 研究背景

**1.1 红霉素的结构特征** 红霉素(1, erythromycin)是1952年礼来公司McGuire博士从菲律宾土壤中红色链丝菌(*Streptomyces erythreus*)培养液分离得到的。红霉素对革兰阳性菌和衣原体有强效抑制作用,迅速用于临床,治疗上/下呼吸道感染。由于与已有的抗菌药较少交叉耐药,并且不良反应也较少,迅速得到广泛的应用,并持续相当长时间。红霉素的不良反应是刺激肠道胃泌素受体,引起肠蠕动不适和腹泻。

红霉素是一组化合物,由红霉素A~F组成,之间结构非常类似,只是某个甲基或羟基的区分。批准上市的是主要成分红霉素A(本文以下叙述的是A,简称红霉素)。红霉素是14元环内酯,又称大环内酯(macrolide),大环的3和5位连接两个单糖形成糖苷,其中3位是克拉定糖,5位是脱氧氨基糖,后者是不可少的药效片段,而且碱性氮原子可成盐有助于溶解吸收。

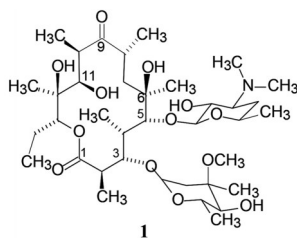
**1.2 红霉素的化学不稳定性** 红霉素具有化学不稳定的因素,在体内(尤其是弱酸性下)发生化学变化失去

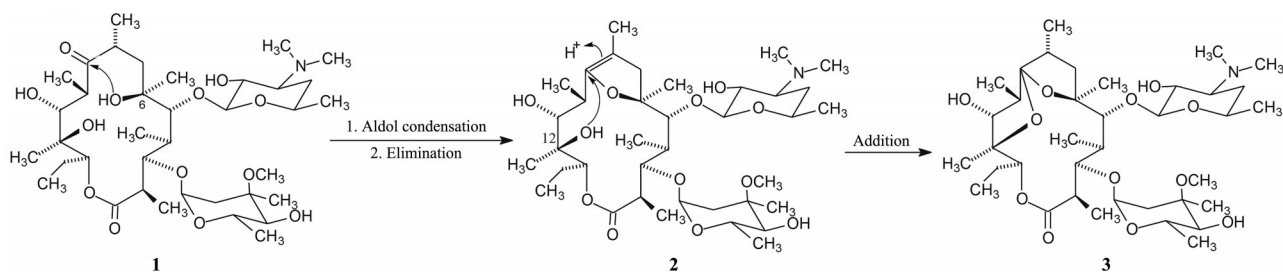
抑菌活性。不稳定的结构因素是大环上的6位羟基与9位酮基处于空间适于发生羟醛缩合的位置,生成环状半缩酮,消除水分子,生成二氢咪喃(2),后者 $\alpha$ 位的不饱和碳原子具有亲电性,容易被12位羟基作分子内亲核进攻,生成另一个四氢咪喃,该螺四氢咪喃(3)失去了抗菌活性,但还保留了刺激胃肠道的不良反应。图1是红霉素发生分子内缩合生成螺四氢咪喃的化学机制。起初红霉素的结构优化的目标是克服该化学不稳定性。此外,长期应用红霉素引起耐药性,即所谓对大环内酯-林可酰胺-链阳菌素B(MLS)耐药菌的交叉耐药。

## 2 红霉素结构优化的成功药物

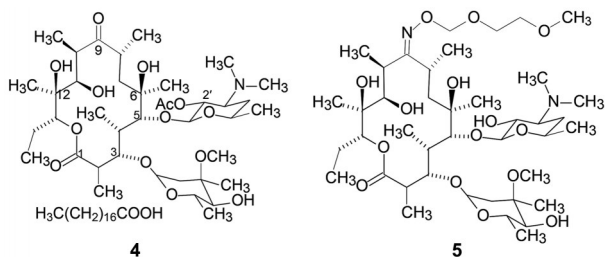
**2.1 早期的研究** 早期提高红霉素的稳定性的方法是利用胺基糖成盐或羟基成酯,例如与琥珀酸单乙酯制成的琥乙红霉素,酯类的有红霉素硬脂酸酯、依托红霉素、红霉素碳酸乙酯和醋硬脂酸酯等,盐和酯的稳定性有所提高。其中醋硬脂酸酯(4, erythromycin acistrate)是红霉素的氨基糖2'-乙酸酯与硬脂酸成盐,是无味红霉素,适于制备儿童口服液。提高红霉素的稳定性更多的途径是功能基的改造。

**2.2 功能基的变换和构效关系** 红霉素大环结构中9位羰基化学性能活泼,是容易修饰的基团,例如可形





**Figure 1** The mechanism of inactivation of erythromycin through intramolecular condensations



成脞、烷氧基脞、脞、亚脞和脞类等衍生物,虽然提高了稳定性,但大都活性降低,其中成功的药物罗红霉素(5, roxithromycin)是9-烷氧基脞红霉素(Gasc JC, d'Ambrieres SG, Lutz A, et al. Novel erythromycin A derivatives. J Antibiot, 1991, 44: 313-330),5对酸稳定,口服生物利用度较好,1990年在法国上市。

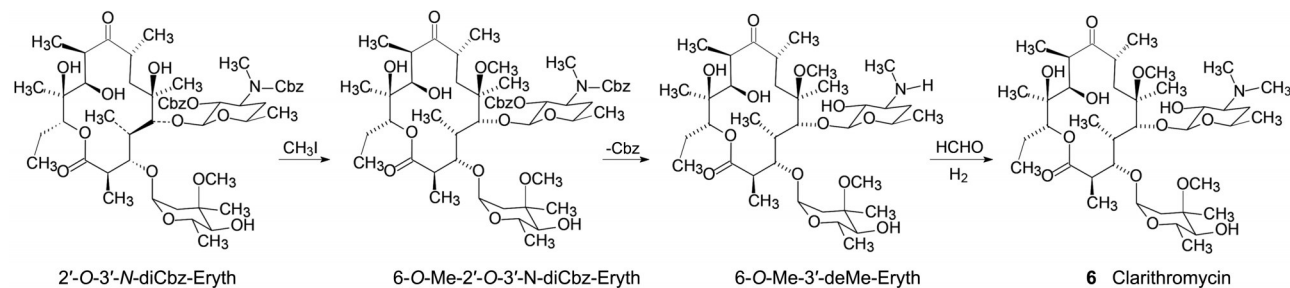
通过红霉素的功能基变换得到的构效关系概括如下:①内酯环非常重要,开环后失效,提示大环是维持药效构象和与靶标结合的重要保障。②胺基糖的二甲胺基是必需基团,去除或变换都使降低活性。③9位羰基还原成亚甲基使活性降低,脞、烷氧基脞保持一定的活性,化学稳定性提高。④6位羟基的烷基化仍保持活性,且稳定性提高,烷基加大活性降低。⑤3位的克拉定糖不是必要片段,但这是后来发现的。

### 3 两个重磅药物

**3.1 克拉霉素** 按照上述构效关系9位羰基不可少、6位羟基可以烷基化的提示,很自然想到制备6-O-甲基红霉素,可以提高红霉素的活性和稳定性。但直到1980年日本大正制药成功地制备了克拉霉素(6, clarithromycin),才得以实现,这是因为解决了化学转化中

对敏感基团的保护-去保护问题。1984年森本等叙述了克拉霉素研发的化学历程(Morimoto Y, Takahashi Y, Watanabe Y, et al. Chemical modification of erythromycins. 1. Synthesis and antibacterial activity of 6-O-methylerythromycins A. J Antibiot, 1984, 37: 187-189)。最初的合成路线如图2所示,即在对6位羟基甲基化时,为避免叔胺的季铵化,预先将叔胺变成仲胺,用苄氧羰基将最容易发生甲基化的两个位置加以保护,即合成2'-O-3'-N-二苄氧羰基-N-去甲基红霉素,然后用氢钠去除6-OH的质子,碘甲烷将6-羟基甲基化,再氢解脱除苄氧羰基,仲胺经加成甲醛成亚脞,氢化还原成叔胺,得到克拉霉素。由于红霉素含有5个羟基(2个伯醇、3个仲醇),因而不可避免地在其他位置的羟基发生甲基化,所以最初的总收率不到5%。如今工业化规模生产方法已取代了原有路线(Morimoto S, Misawa Y, Adachi T, et al. Chemical modification of erythromycins. 1. Synthesis and antibacterial activity of 6-O-alkyl derivatives of erythromycins A. J Antibiot, 1990, 43: 286-294)。为了实现克拉霉素的市场化,大正制药与BMS合作通过III期临床试验于1989年上市。克拉霉素的抗菌活性与红霉素相近,而化学稳定性和药代动力学性质显著提高(避免了羟醛缩合所致和提高了亲脂性),也降低了不良反应。克拉霉素优胜并取代了红霉素。

**3.2 阿奇霉素** 阻止红霉素形成缩脞的另一策略是去除羟醛缩合的接受体脞基,而无需对6-羟基作甲基化。阿齐霉素(7, azithromycin)是没有9-脞基的另一



**Figure 2** Initial synthesis route of clarithromycin

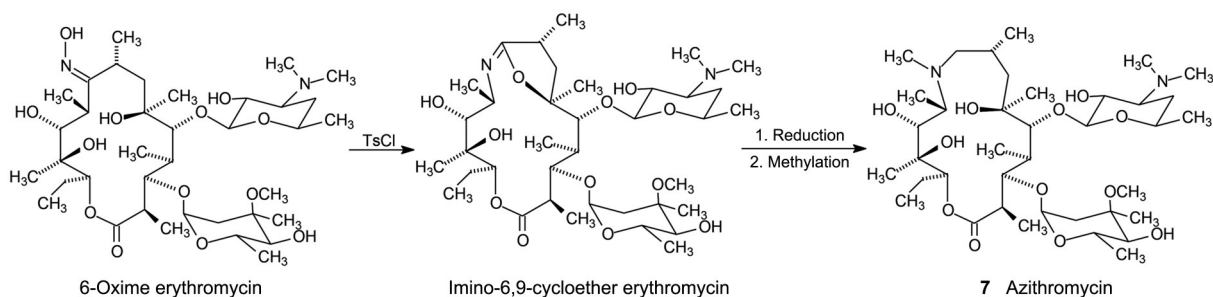


Figure 3 Synthetic route of azithromycin

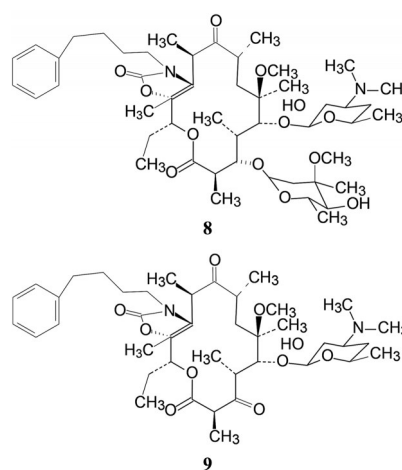
个大环内酯药物。追溯历史,早在20世纪70年代克罗地亚 Pliva 公司即成功合成了阿奇霉素,但直到辉瑞开发才得以1991年上市。阿奇霉素的合成,是将红霉素制成9-肟红霉素,经贝克曼重排扩环生成含氮的15元环,再经N-甲基化得到的,如图3所示。阿奇霉素特点是抗菌谱广、半衰期长、有广泛向组织中传输的作用。在酸性介质中化学稳定,口服生物利用度37%,半衰期68 h。作为第二代大环内酯,是广泛应用的安全有效抗菌药物。

#### 4 泰利霉素的研制

本文重点是讨论泰利霉素的研制过程,上面简述克拉霉素和阿奇霉素的历史,是因为大环内酯类药物的研发是围绕大环的结构特征进行的,具有相互借鉴和接力继承的特征,泰利霉素的结构设计融入了既往研究的成功因素。

**4.1 大环的11,12位结构的变换** 雅培公司为研制新的大环内酯,对克拉霉素的11和12位进行了化学修饰。以克拉霉素为起始物,在三甲基硅烷氨钠作用下与羰基咪唑反应,生成11,12-环碳酸酯,然后经DBU作用生成10,11-双键结构。再与氯磺酰异氰酸酯反应得到11,12-N-取代的噁唑烷酮-6-O-甲基红霉素,氮原子上的不同取代基是优化的内容 (Baker WR, Clark JD, Stephens RL, et al. Modification of macrolide antibiotics. Synthesis of 11-deoxy-11-(carboxyamino)-6-O-methylerythromycin A 11,12-(cyclic esters) via an intramolecular Michael reaction of O-carbamates with an  $\alpha\beta$ -unsaturated ketone. *J Org Chem*, 1988, 53: 2340–2345), 其中活性最强的化合物 A-66321 [8, R =  $-(\text{CH}_2)_4\text{Ph}$ ] 对大环内酯-林可酰胺-链阳菌素 B (MLS) 交叉耐药的菌株有显著抑制活性,不过化合物8没有研制成新药。

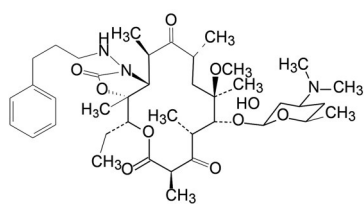
**4.2 3位克拉定糖的变换** 长期以来,3位克拉定糖基被认为是不可缺少的抗菌基团,然而法国的 Roussel Uclaf 公司发现并非如此。用酸水解去除3-克拉定糖基并将羟基氧化成3-酮基的化合物仍有强效抑菌作用,例如化合物 RU-708 (9) 对 MLS 耐药菌没有交叉耐



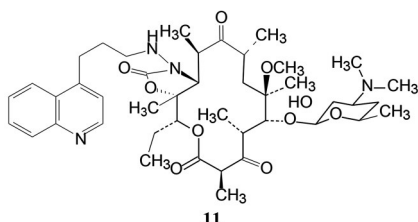
药,提示3位的克拉定糖并不是抑菌作用的必需片段 (Agouridas C, Bonnefoy A, Chantot JF, et al. Nouveaux dérivés de l'erythromycine, leur procédé de préparation, leur application comme médicaments. EP596802-A1. 1994-05-11), RU-708 也未能研发上市。

雅培公司还以3-酮-6-甲氧基-11,12-噁唑烷酮为母体对噁唑烷酮的氮原子变换成胍基,对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的细菌都呈现强效抑菌活性,比较化合物9和10的结构,其实二者是简单的电子等排体,9的一个 $\text{CH}_2$ 被10的NH替换 (Griesgraber G, Or YS, Chu DT, et al. 3-Keto-11,12-carbazate derivatives of 6-O-methylerythromycin A synthesis and *in vitro* activity. *J Antibiot*, 1996, 49: 465–477)。

德国 Hoechst Marion Roussel 公司循此路径优化出 HMR 3004 (11), 11 的抗菌活性强于 10, 对耐药的流感嗜血杆菌、肺炎球菌和卡他衣原体具有抑制活性,对感染动物也呈现治疗作用 (Agouridas C, Denis A, Auger JM, et al. Synthesis and antibacterial activity of ketolides (6-O-methyl-3-oxoerythromycin derivatives): a new class of antibacterials highly potent against macrolide-resistant and -susceptible respiratory pathogens. *J Med Chem*, 1998, 41: 4080–4100)。化合物10和11的区别在于11位



10



11

连接的芳丙胺基的苯环变换为4-喹啉环,提示侧链上的碱性基团有利于对耐药菌株的抑制作用。

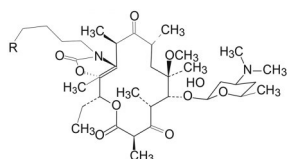
## 5 泰利霉素的研制路径

**5.1 结构变化和体外活性** 化合物**11**的活性强于**10**,提示环上连接含有碱性氮原子的侧链可能有利于抗菌

活性,促使 Hoechst Marion Roussel 公司对其里程碑化合物 RU-708 (**9**) 作进一步的修饰,即变换氮原子的位置、连接方式或增添碱性基团。评价了对重要致病菌如金葡菌和肺炎链球菌的敏感株和耐药株(构成性和诱导性)等的最低抑菌浓度(MIC)。代表性的化合物结构与活性列于表1。

结果表明,所有目标物对大肠杆菌(*E. coli*)和构成性的耐受红霉素的金葡菌(MLS)都没有活性(MIC > 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),但对诱导性的耐受红霉素的球菌和肺炎链球菌(包括构成性菌株)都有活性,只有吡啶取代的化合物**12**无活性。并环化合物**12**~**15**对诱导性耐药的肺炎链球菌的活性弱于喹啉取代的化合物**11'**,但对流感嗜血杆菌略强于**11'**。非稠合的二杂环化合物中咪唑(**16**)和三唑(**17**)与化合物**11'**的活性相当,而四唑(**18**)的活性弱于**12**。尤其是将中间的苯环换作3-吡啶连接,活性显著提高,吡啶基三唑(未报道数据)和吡啶基咪唑化合物**19**对MLS耐药的构成性

**Table 1** Structure and minimum inhibitory concentration (MIC,  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of typical compounds for various bacteria. a: *Streptococcus pyogenes*; b: *Haemophilus influenzae*; c: *Escherichia coli*; d: Erythromycin susceptible; e: Constitutively erythromycin resistant; f: Inducible erythromycin resistant



Compd.	R	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>S. pyo</i> <sup>a</sup>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>			<i>H. i.</i> <sup>b</sup>	<i>E. c.</i> <sup>c</sup>
		EryS <sup>d</sup>	EryRc <sup>e</sup>	EryRi <sup>f</sup>		EryS <sup>d</sup>	EryRc <sup>e</sup>	EryRi <sup>f</sup>		
6	-	0.3	40	40	0.06	0.04	40	40	1.2	40
7	-	0.3	40	40	0.6	0.15	40	40	1.2	20
11'		0.04	0.08	40	0.02	0.02	1.2	0.02	0.6	40
12		0.04	0.08	40	0.02	0.02	2.5	0.08	0.6	10
13		0.04	0.15	40	0.02	0.08	2.5	0.04	0.6	10
14		0.08	0.15	40	0.02	0.02	5	0.15	1.2	10
15		0.04	0.08	40	0.02	0.02	2.5	0.04	2.5	20
16		0.08	0.3	40	0.02	0.02	20	2.5	1.2	40
17		0.02	0.15	40	0.02	0.04	1.2	0.3	1.2	40
18		0.02	0.6	40	0.02	0.02	0.6	0.02	1.2	20
19		0.04	0.08	40	0.02	0.02	0.08	0.02	1.2	10

肺炎链球菌活性很高,对革兰阳性菌敏感株和耐药株的MIC与克拉霉素和阿奇霉素的活性相当, MIC在 $0.15\sim 0.02\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

化合物 **19** 是有希望的活性化合物,代号为 HMR3647。**19** 进一步与克拉霉素/阿奇霉素的活性作比较,表2列出了对4种阳性菌敏感株和耐药株(诱导性和构成性)的半数最低抑菌浓度(MIC<sub>50</sub>)和90%最低抑菌浓度(MIC<sub>90</sub>)。

用于评价活性的菌株是从临床患者分离的耐受红霉素和青霉素G的肺炎链球菌、葡萄球菌和流感嗜血杆菌。如表2所示, HMR 3647对大多数敏感型和耐药型菌株都显示较强的抑制活性,除了对结构性耐受红霉素的金葡萄活性较低外,对链球菌、葡萄球菌和流感嗜血杆菌的90%抑制浓度都在 $1.2\sim 0.02\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**5.2 体内活性评价** 用致死量的不同阳性致病菌感染小鼠,评价克拉霉素/阿奇霉素/氨苄青霉素和化合物 **19** 的50%治愈剂量(ED<sub>50</sub>, mg·kg<sup>-1</sup>),结果表明(表3),用金葡萄感染小鼠的败血症,**19**的活性与克拉霉素相当,阿奇霉素的活性较差。对红霉素发生耐药的链球菌感染小鼠,**19**的活性强于克拉霉素10倍。**19**对肺炎链球菌(诱导性和构成性耐药株)感染小鼠的活性ED<sub>50</sub>分别为4.5和6 mg·kg<sup>-1</sup>,而克拉霉素和阿奇霉素50 mg·kg<sup>-1</sup>剂量完全没有作用。对红霉素耐药的肺炎球菌的保护性治疗剂量在4~16 mg·kg<sup>-1</sup>。对流感嗜血杆菌引起的小鼠感染,化合物 **19** 的活性强于克拉霉素2~7倍,阿奇霉素与此相近。

**5.3 药代动力学性质** 化合物 **19** 是第一个酮内酯(ketolide),对敏感/耐药株致病菌的抗菌谱显著强于既有的大环内酯,从而被确定进入开发研究,定名为泰利霉素(telithromycin)。药代动力学性质表明,泰利霉素灌胃小鼠10 mg·kg<sup>-1</sup>,其AUC<sub>0-8</sub> = 17.2 μg·h·L<sup>-1</sup>,口服生物利用度F = 49%,消除半衰期t<sub>1/2</sub> = 1 h, C<sub>max</sub>为2.9 μg·mL<sup>-1</sup>,

远高于体外MIC值。同时还表明AUC/MIC的比值与体内的药效有良好的相关性。泰利霉素对人的口服生物利用度为57%,与血浆蛋白结合率60%~70%,主要结合于血清白蛋白,消除半衰期为10 h。法国赛诺菲-安万特公司对泰利霉素进行了III期临床研究,证明对于多种致病的阳性菌感染患者有治疗作用,泰利霉素于2001年首先在德国批准上市,用来治疗呼吸道感染、肺炎等。

## 6 泰利霉素与靶标的结合模式

红霉素和泰利霉素都是结合在细菌核糖体的肽基转移中心(PTC)处(其他小分子抗生素如林可酰胺和氯霉素亦是,体现了药物结构的多样性),由于大环内酯的结合,使tRNA不能处于正确取向而终止了肽链的增长。另外,大环内酯还堵塞了核糖体50S的出口通道,也抑制了肽链的进入。图4a是红霉素(绿色)和泰利霉素(粉色)在核糖体的PTC域的定位,图中的飘带是核糖体的磷酸戊糖骨架的走向。可以看出红霉素与泰利霉素的大环基本重合在一起都挡住了肽链的出口,泰利霉素的11位侧链靠近了碱基A752,提供了新的结合位点(Dunkle JA, Xiong LQ, Mankin AS, et al. Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. Proc Nat Acad Sci U S A, 2010, 107: 17152-17157)。图4b是泰利霉素与大肠杆菌核糖体50S结合的二维图,可以看出5位的脱氧氨基糖的质子化正电荷与G2505的磷酸根发生离子键结合,糖上羟基与A2085和A2086的腺嘌呤的N原子有氢键结合。11位连接的含有咪唑基吡啶与U2609-A752的Watson-Crick的碱基对叠合,增加了结合能。

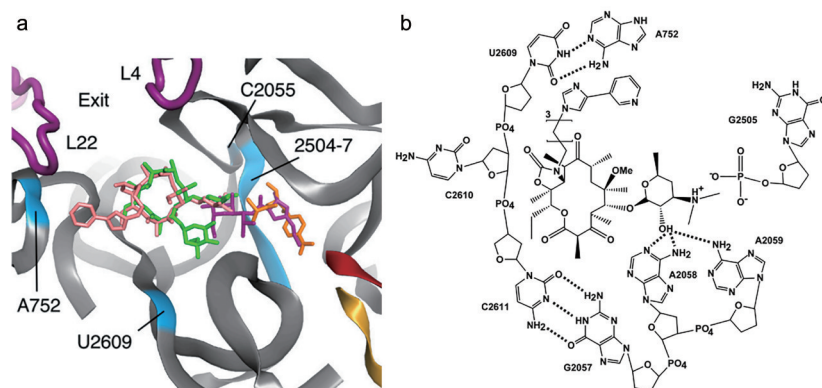
大肠杆菌的抗药性是由于A2058变异成G,或者A2058的N6被甲基化转移酶催化成N-甲基腺嘌呤,泰利霉素仍保持对突变株的活性,是由于结合腔中水分

**Table 2** Extended *in vitro* evaluation of compound **19** (HMR 3647, MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub>, μg·mL<sup>-1</sup>)

Compd.	Staphylococci		Streptococci	<i>S. pneumoniae</i>			<i>H. influenzae</i>	
	EryRi	EryRc	EryR	EryRi	EryRc	PenR	AmpRi	AmpRc
7 (CLA)	40/40	Not test	1.2/40	40/40	40/40	0.3/40	1.2/5	2.5/10
8 (AZI)	40/40	Not test	10/40	40/40	40/40	2.5/40	0.15/1.2	0.3/1.2
Ampicillin	Not test	Not test	Not test	Not test	Not test	Not test	0.3/0.6	1.2/10
<b>19</b>	0.08/0.3	40/40	0.02/0.08	0.005/0.02	0.04/0.3	0.005/0.15	0.6/1.2	0.6/0.6

**Table 3** *In vivo* evaluation of compound **19** against Gram positive pathogens and *H. influenzae*, ED<sub>50</sub> in mice (mg·kg<sup>-1</sup>)

Compd.	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>			<i>Haemophilus influenzae</i>		<i>S. pyogenes</i>	
	EryS	EryRi	EryS	EryRi	EryRc	AmpRβ(-)	AmpRβ(+)	EryS	
7 (CLA)	6	55	7.5	>50	>50	71	>300	120	16
8 (AZI)	30	>100	6	>50	>50	56	145	94	16
Ampicillin	Not test	Not test	Not test	Not test	Not test	5.5	39	>600	Not test
<b>19</b>	10	4.5	1	4	6.5	68	40	57	16



**Figure 4** a: An overview of the antibiotic binding sites within the 50S subunit. Erythromycin (green) and telithromycin (pink) are shown as stick models. Ribbons denote the sugar phosphate backbone of 23S rRNA with nucleotides, the location of the peptide exit tunnel is labeled "exit". b: 2D representation of telithromycin and bases within the macrolide binding pocket. 29-OH to 2058/2059 hydrogen bonding, stacking between telithromycin's ARM and A752-U2609 WC base pair, and ionic interactions between telithromycin's 39-protonated dimethylamine and G2505

子的缔合-离解暴露出被掩盖的新结合腔, 泰利霉素与该结合腔发生结合, 维持了活性, 同时 11 位连接的柔性侧链对  $\pi$ - $\pi$  叠合作用的贡献, 对熵贡献是有利的, 也增强了结合力。这是通过巨正则蒙特卡洛方法和分子动力学 (GCMC/MD) 分子模拟得到的证明 (Small

MC, Lopes P, Andrade RB, et al. Impact of ribosomal modification on the binding of the antibiotic telithromycin using a combined grand canonical Monte Carlo/molecular dynamics simulation approach. PLoS Comput Biol, 2013, 9: e1003113)。