

• 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。

抗菌药物的长期应用或使用不当,导致致病菌的变异出现耐受性,因而研制抗感染药物成为永恒的课题。20世纪80年代头孢类问世的20年后出现耐药性,不得不与“巴坦”类 β 内酰胺酶抑制剂作配伍应用,维持头孢的抗菌效力。如今巴坦类也出现了耐受性,道高一尺,魔高一丈,需要更新 β 内酰胺酶抑制剂。法硼巴坦就是针对分解巴坦的“超广谱 β 内酰胺酶”而研制的抑制剂,环状硼酸酯是新的结构类型,与活性中心有众多氢键结合,硼原子与丝氨酸残基发生可逆性共价结合,体现了全新的分子取向、结合和作用机制,成就了新一代的超广谱 β 内酰胺酶抑制剂。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1346

超广谱 β 内酰胺酶抑制剂法硼巴坦的研制

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)

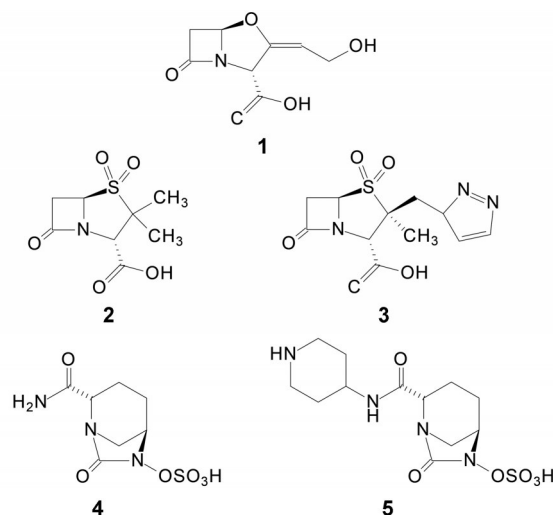
1 研制背景

致病菌不断的基因突变产生耐药性,是研制新型抗菌药物的依据和动力。自20世纪80年代头孢类抗生素成为 β 内酰胺类治疗药的主流以来,几十年来的广泛应用,导致细菌体内产生所谓的“超广谱 β 内酰胺酶”(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs),从而显著减弱了头孢类的治疗效果。虽然后来与碳青霉烯等 β 内酰胺酶抑制剂(巴坦类药物)合用,使 β 内酰胺酶失效,头孢类药物得以发挥杀伤作用。然而道高一尺,魔高一丈,细菌又产生了分解巴坦类药物的 β 内酰胺酶,所以,研制针对ESBLs新型抑制剂一直在路上。

巴坦类 β 内酰胺酶抑制剂往往与已知的头孢(或青霉素类)成对的配伍研制,例如,克拉维酸(1, clavulanic acid)与阿莫西林、舒巴坦(2, sulbactam)与氨苄西林、他唑巴坦(3, tazobactam)与哌拉西林、阿维巴坦(4, avibactam)与头孢他啶、瑞来巴坦(5, relebactam)与亚胺培南和西司他丁(imipenem和cilastatin)三联合用等制剂。前三个巴坦对耐受碳青霉烯的肠道菌(CRE)效果差,阿维巴坦和瑞来巴坦分别于2015和2019年批准上市,结构类型已没有 β 内酰胺环,对CRE具有敏感性,是由于对ESBLs有强效抑制活性。本文讨论的新药是第三类结构类型。

2 含硼元素的先导物

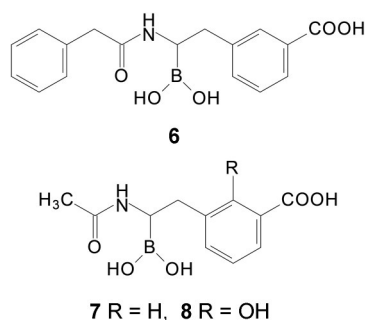
2.1 有机硼对丝氨酸酶的亲和力 本品是由有机硼



化合物演化成功的药物。硼酸与丝氨酸水解酶有亲和力,是由于硼原子与活性中心的丝氨酸羟基发生可逆性共价结合,形成的硼四面体结构相似于丝氨酸水解酶的酰化-去酰化的过渡态结构。苯硼酸对 β -内酰胺酶有抑制活性就在于此(Kiener PA, Waley SG. Reversible inhibitors of penicillinases. Biochem J, 1978, 169: 197–204)。硼原子空轨道的亲电性,可与含未偶电子对原子形成配位键,硼的四面体构型模拟了肽键水解的过渡态。

2.2 苗头化合物 加拿大学者Strynadka等以青霉素G作为大肠杆菌的TEM-1 β 内酰胺酶的底物为模板,设计合成了化合物6(Martin R, Jones JB. Rational

design and synthesis of a highly effective transition state analog inhibitor of the RTEM-1 β -lactamase. Tetrahedron Lett, 1995, 36: 8399-8402), 对 β 内酰胺酶的抑制活性 K_i 值为 $5.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分析青霉素 G 和 **6** 与 β 内酰胺酶形成共价结合的过渡态, 具有显著的相似性, 如图 1 所示。将 **6** 的苯乙酰基换成乙酰基, 化合物 **7** 的 K_i 值为 $110 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示 **6** 的苯基与酶的结合有重要贡献。化合物 **7** 的苯环引入酚羟基, **8** 的活性 K_i 值为 $13 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比 **7** 的活性强 8.5 倍, 表明酚羟基有利于与酶的结合。



化合物 **6**~**8** 与 TEM-1 β -内酰胺酶的晶体结构表明, 形成氢键的能力和位点基本相同, 例如, 苯环上的羧基与 Ser130、Ser235 和 Arg244 形成的氢键, 键距 $2.5\sim 3.5 \text{ \AA}$ 不等, 硼酸基与 Ser70 和 Glu166 形成 $2.5\sim 2.8 \text{ \AA}$ 氢键, 酰胺的 NH 与 Ala237 为 $3.2\sim 3.5 \text{ \AA}$, 酰胺的氧原子与 Asn132 的氢键 $2.9\sim 5.5 \text{ \AA}$, 形成的氢键网络加固了结合。化合物 **6** 的苯基与 Ala237 的疏水-疏水相互作用是 **7** 和 **8** 所没有的。此外, **6** 的复合物晶体结构未显示有结构水的存在, 而 **7** 和 **8** 的晶体都含有水分子, 这些有序的水分子增加了熵的消耗, 是化合物 **7** 和 **8** 的活性低于 **6** 的因素之一, 这为以后的优化提供了思路。**7** 和 **8** 之间的活性差异是由于 **8** 的酚羟基与 Ser70

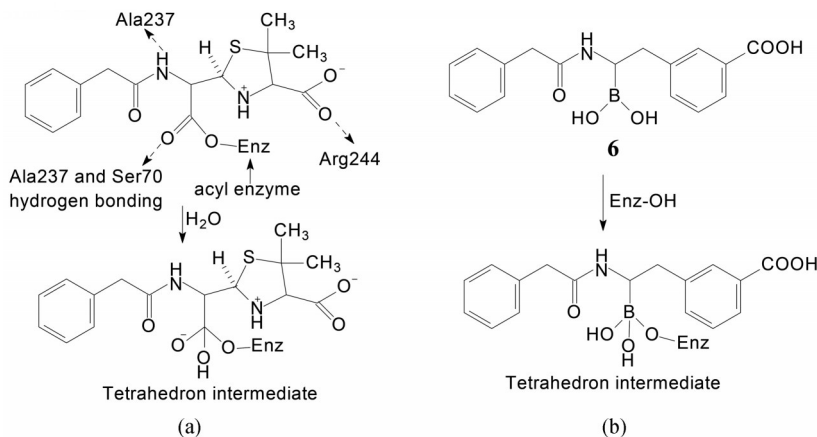


Figure 1 (a) Schematic of the experimentally determined acyl-enzyme complex showing the active site interactions considered to play a key role in the binding of the TEM1 β -lactamase with penicillin G, and upon which the designs of the transition state analogue inhibitors were based. (b) Compound **6** deacylation transition state designed to mimic the binding patterns depicted in (a)

和 Ser130 形成强力的氢键网络 (2.3 和 2.7 \AA), 并因此使苯环平面发生扭转, 与 Tyr105 发生 π - π 叠合作用, 这些都是对 **8** 的高活性贡献。图 2 是化合物 **6** 与大肠杆菌 TEM-1 β -内酰胺酶的晶体结构图 (Ness S, Martin R, Kindler AM, et al. Structure-based design guides the improved efficacy of deacylation transition state analogue inhibitors of TEM-1 beta-lactamase. Biochemistry, 2000, 39: 5312-5321)。

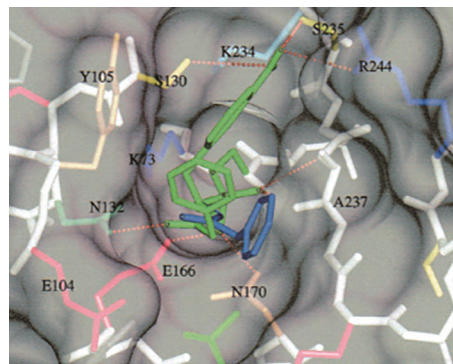
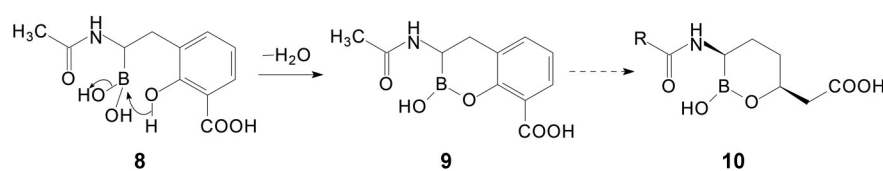


Figure 2 The crystallography of active site of TEM-1 β -lactamase in complex with compound **6**. The phenylacetamido group in **6** is shown in blue. Hydrogen bonds are shown as dotted lines

继而发现化合物 **8** 的酚羟基可对硼原子作分子内亲核进攻, 有可能生成苯并环硼酸酯 **9**, 然而认为 **8** 与 β -内酰胺酶的结合与活性仍是开环结构形式, 环状硼酸没有进一步研究。

3 先导物优化和构效关系

3.1 由开链到环状含硼先导物 Rempex 公司重视苯并硼酸酯 **9** 的结构类型, 设想 **9** 是与 β -内酰胺酶结合的药效构象, 也可能因此提高选择性, 降低对其他丝氨酸酶的脱靶作用。将 **9** 的类似结构分子对接到 β -内酰胺



酶, 分别评价共价结合前的米氏复合物的自由能变化和形成共价结合的自由能, 根据分子对接的结果表明, 剪切掉苯环的化合物类型 **10** 是有潜在活性的结构, 酰胺的 R 基团相当于青霉素 G 的苄基, 与疏水性残基可发生 π - π 相互作用, 因而作为变换基团调节对不同 β 内酰胺酶的选择性。图 3 是通式 **10** 化合物与酶活性部位结合的示意图。

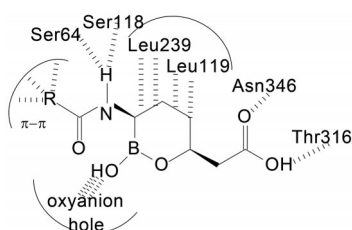
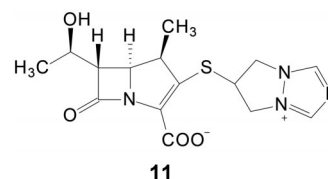


Figure 3 Schematic of the binding mode of **10** to binding site of β -lactamase

3.2 活性评价 体外抗菌活性是用可产生碳青霉烯酶 (KPC) 的肺炎杆菌 (KP1004) 作为评价体系, 观察受试物提高比阿培南 (**11**, biapenem) 抗菌能力, 用 MPC1 作为活性指标, 受试物的 MPC1 定义是, 降低比阿培南的最低抑菌浓度 (MIC) 由没有受试物的 $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 降低到 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 所需受试物的最低浓度。

3.3 结构变换和构效关系 通式 **10** 的结构变化是连接酰胺的基团, 考察不同的芳 (杂) 环、链长对活性的影响。表 1 列出代表性的化合物结构与活性。

表 1 的构效关系分析如下: ① 酰基只作简单的甲



基取代 (乙酰基, **12**), 浓度为 $0.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 就能够将比阿培南的抑制浓度降到 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 但变成较大体积的基团如环丙基 (**13**)、苄基 (**14**) 和苯乙基 (**16**) 活性变化不大。② 噻吩乙酰基 (**17**) 的活性比 **12** 提高了 15 倍 ($\text{MPC1} = 0.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 联想到某些头孢菌素如头孢噻吩和头孢西丁都含有噻吩环, 或许是结合在相同的部位。然而换成其他杂环如 **20**~**22**, 活性减弱。不过, 氨基吡啶 (**23**) 的活性可达到 $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。③ 含羟基的酰基如 **24**~**26** 和含有碱性基团的 **27**~**29** 的活性都很一般。④ 所有这些具有抑制 β -内酰胺酶活性的化合物, 单独应用都没有抗菌活性。

3.4 候选物的确定 进而广泛地评价了化合物 **17** 的生物学性质, 包括: ① 抑酶的广谱性: 对不同 β -内酰胺酶亚型抑制作用的广谱性, 包括 KPC、CTX-M、SHV、TEM10、p99 和 CMY 等 β -内酰胺酶, K_i 值都在 0.03 ~ $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内, 大多数强于克拉维酸和他唑巴坦 (数据从略)。② 增强抑制耐受头孢类的细菌的广谱性: 用表达不同 β -内酰胺酶亚型的细菌如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、克雷氏肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 和产酸克雷氏肠杆菌 (*Klebsiella*

Table 1 Potentiation of biapenem by compounds of series **10**

Compd.	R	MPC1/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Compd.	R	MPC1/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Compd.	R	MPC1/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
12		0.30	18		0.61	24		0.16
13		0.15	19		1.25	25		1.25
14		0.15	20		0.15	26		0.61
15		0.30	21		0.15	27		0.30
16		0.30	22		0.15	28		0.30
17		0.02	23		0.04	29		0.15

oxytoca) 等, 这些病菌对第四代的头孢吡肟 (**30**, cefepime) 的抗药性, 在用 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 化合物 **17** 的浓度下, MIC 降低 4~128 倍不等 (数据从略)。③ 提高培南类药物对耐药菌株抑制的敏感性: 上述致病菌还由于用培南类药物而产生碳青霉烯酶 (KPC), 以至于分解诸如比阿培南 (biapenem)、美罗培南 (meropenem)、厄他培南 (ertapenem) 和亚胺培南 (imipenem) 等, 降低了疗效, 当加入浓度为 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 化合物 **17** 时这些培南的最低抑菌浓度显著降低, MIC 降低百倍以上, 提示 **17** 对产生碳青霉烯酶的耐药菌有显著增强作用 (数据从略)。④ 对人体丝氨酸蛋白酶没有影响: 化合物 **17** 的作用位点是 β -内酰胺酶丝氨酸残基, 因而评价了对人体 11 种丝氨酸蛋白酶的脱靶作用, 结果 IC_{50} 都大于 $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 显示了 **17** 的选择性活性。⑤ 药代动力学性质类似于 β -内酰胺类抗生素: 用大鼠多剂量给化合物 **17**, 提示 C_{max} 和 AUC 存在剂量-浓度相关性。 **17** 的半衰期和分布容积较小, 与多数 β -内酰胺药物相似。⑥ 体内抗菌增效作用: 用肺部感染肺炎杆菌、导致中性粒细胞减少的小鼠为病理模型, 当单用 $50 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 比阿培南或 $100 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 美罗培南, 未见群落形成单位 (CFU) 的变化, 说明治疗无效; 而同时给 $50 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 化合物 **17**, CFU 降低 2 个对数单位, 说明 **17** 有强力增效作用 (Hecker SJ, Reddy KR, Totrov M, et al. Discovery of a cyclic boronic acid β -lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases. J Med Chem, 2015, 58: 3682-3692)。

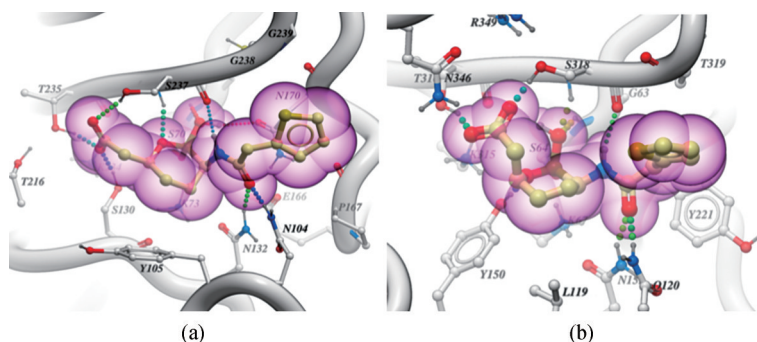
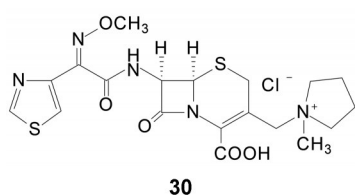
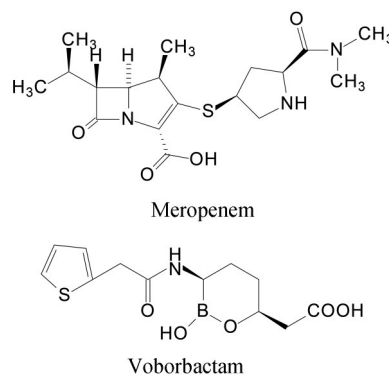


Figure 4 Crystallography of vaborbactam bound to CTX-M-15 (a) and AmpC (b)

4 法硼巴坦的批准上市

候选物 **17** 定名为法硼巴坦 (vaborbactam), 作为 β -内酰胺酶抑制剂, 与碳青霉烯类药物美罗培南 (**31**, meropenem) 配伍合用, 进入临床前和临床研究, 于 2017 年经 FDA 批准上市, 治疗包括肾盂肾炎在内的复杂尿路感染和耐受碳青霉烯类的肠杆菌科感染, 治愈率分别为 64% 和 33%。



5 法硼巴坦与 β -内酰胺酶的结合模式

法硼巴坦分别与两种 β -内酰胺酶的不同亚型 CTX-M-15 和 AmpC 生成复合物, 共晶结构显示具有相同的结合特征, 分别如图 4 (a) 和 (b) 所示。硼作为亲电基团与 CTX-M-15 酶催化中心的 Ser70 (a), 与 AmpC 的 Ser64 (b) 发生共价结合; 酰胺基的 NH 作为氢键给体分别与肽链的 Ser237 (a) 或 Ser318 (b) 的 C=O 结合; 酰胺的 C=O 作为氢键接受体分别与 Asn132、Asn104 (a) 或 Asn153、Ort120 (b) 的侧链结合; 羧基与 Thr235、Ser237、Ser130 (a) 或与 Thr316、Ser318 (b) 结合。噻吩环的取向大体也相似。而两种复合物的显著不同是六元环硼酸酯的构象, 虽然都呈椅式构象, 但 (a) 的酰胺基处于直立键, 羧甲基为平展键; (b) 的这两个基团的取向正相反。