

## • 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。

临床应用万古霉素已60多年,至今仍是抗击革兰阳性菌严重感染的最后防线,说明它的杀菌威力。然而道高一尺,魔高一丈,研制克服耐药的抗菌药是永恒的课题。本文介绍了万古霉素的作用环节和耐药机制,并对研制半合成的万星药物作了简要的解析,如文中所说,分子质量高达1 500以上,结构中兼有组成生物体的肽、碳水化合物和脂质全部元件,海陆空齐上阵抗击病原菌,彰显出万古类药物的独特性质。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1672

# 万古霉素和半合成的万星药物

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 背景

抗革兰阳性病原菌药物的研制是永恒的主题,是因为细菌为逃逸药物的杀伤发生变异之故。自20世纪60年代出现耐甲氧西林金葡菌(MRSA)以后,万古霉素当时被认为是治疗MRSA感染的王牌药物,也是治疗细菌感染的最后一道防线。然而应用万古霉素具有起效慢和某些组织(例如肺部)难以进入的缺点,而且也出现了耐万古霉素金葡菌(VRSA)和耐万古霉素肠球菌(VRC)。因而需要研制优于万古霉素的新药物。

## 2 万古霉素的发现和化学

礼莱公司E. Kornfeld等在1952年从印尼土壤中的*Streptomyces orientalis*的发酵液中分离出代号为05865活性物质,对包括MRSA在内的大多数革兰阳性菌都有抑制活性,对某些厌氧菌如梭状芽孢杆菌也有效果。这就是在三年后上市的万古霉素(**1**, vancomycin)。万古霉素是含有糖基的寡肽药物(糖肽),寡肽由7个氨基酸组成,可视作骨架结构,其中6个氨基酸分别以二肽同两个二苯醚或联苯酚构成3个特殊的环肽,1个氨基酸(取代的亮氨酸)在环外。结构中还有一个二糖片段,以糖苷键连接在中央的苯环上。万古霉素分子质量为1 500,难溶于水。

## 3 作用机制和耐药性

细菌的细胞壁是由多层的肽聚糖构成,肽聚糖的多糖骨架是由N-乙酰胞壁酸(NAM)与N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)交替连接,NAM经羧基连接出L-Ala-D-Gln-L-Lys-(L-Ala)肽链,其中的L-Lys还连接有二肽片

段D-Ala-D-Ala,在转肽酶催化下,脱去末端的一个D-Ala,同另一个NAM末端相连的L-Ala偶联,形成由寡肽交叉连接成的片层网络结构(图1a和1b)。

万古霉素与靶标的结合模式是分子中的骨架肽链与NAM的C-端肽链上的D-Ala-D-Ala形成5个强力结合的氢键,该牢固的氢键网络结合阻断了细菌的转肽基反应,终止了胞壁的形成(图2a)。然而万古霉素的耐药菌株为了逃逸这种结合,胞壁酸连接的肽链末端的D-Ala-D-Ala变异成D-Ala-D-Lac,丙氨酸变异成乳酸,缺失了一个重要的氢键给体-NH-,降低了结合作用。图2a是万古霉素与Lys-D-Ala-D-Ala的结合方式(5个氢键),2b是与发生变异的Lys-D-Ala-D-Lac的结合(4个氢键)。此外两个万古霉素分子的糖片段经氢键结合形成二聚体,更强化了抑制细胞壁的生成。

## 4 万古霉素的上市

万古霉素分子质量1 500,口服不能被胃肠道吸收,只能注射应用。万古霉素对大多数革兰阳性菌(包括MRSA)有强效抑制作用,  $MIC \leq 1 \sim 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,半衰期  $t_{1/2} = 4 \sim 8 \text{ h}$ ,礼莱公司以盐酸盐形式开发,经临床试验,于1958年被批准上市。

我国学者1957年在广东土壤中的*A. orientalis* Van-23发现N-去甲基万古霉素(Boeck LD, Mertz FP, Wolter RK, et al. N-Demethylvancomycin, a novel antibiotic produced by a strain of *Nocardia orientalis*. Taxonomy and fermentation. J Antibiot, 1984, 37: 446-453),与万古霉素的结构区别只是在右端氨基酸1的N

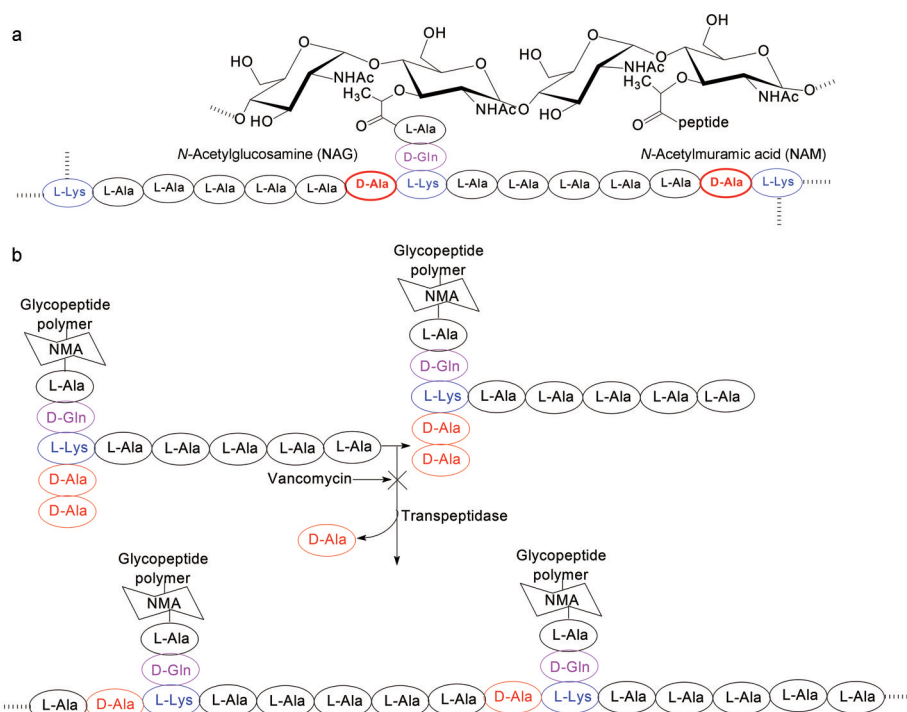


Figure 1 Inhibition of cell-wall synthesis in sensitive bacteria by vancomycin

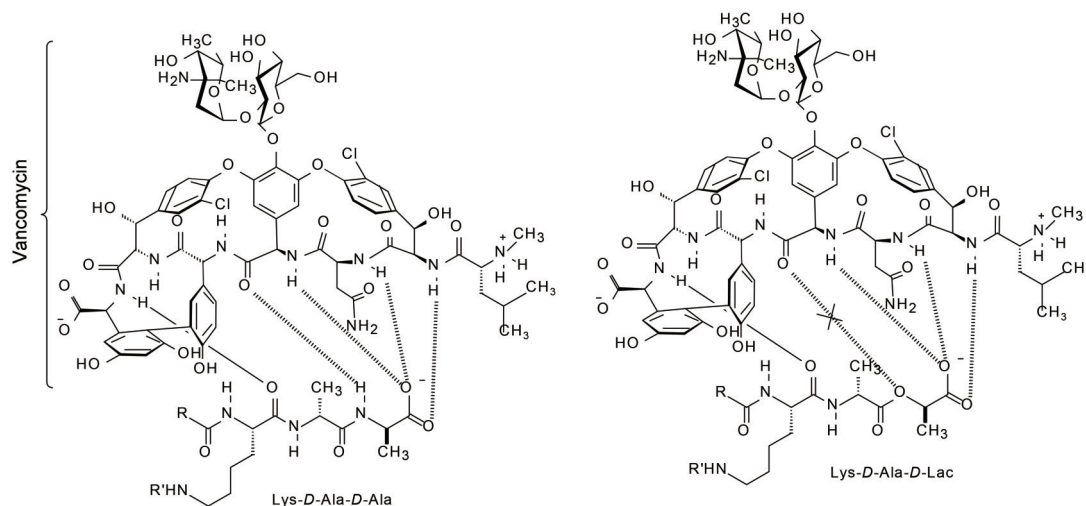


Figure 2 a: The binding mode of vancomycin to NAM---L-Lys-D-Ala-D-Ala with five hydrogen bonds. b: Four hydrogen bonds between vancomycin and mutational peptide NAM---L-Lys-D-Ala-D-Lac

上少一甲基, 杀菌作用与万古霉素相同, 于1967年在  
国内上市。

## 5 万古霉素的结构改造

### 5.1 游离胺基的修饰

万古霉素结构中的七肽可认为是骨架主链, 链右端甲胺基(仲胺)和糖上的氨基(伯胺)是容易修饰的基团。试图用不同的羧酸酰化得到的化合物活性未能优于万古霉素, 提示不是修饰位点。礼来公司继而分别对这两个位置作烷基化(与不同的醛生成西佛碱, 用氰基硼氢化钠还原而得), 合成

化合物近百个, 发现七肽右端连接的甲胺基烷基化成叔胺, 活性下降, 提示NH对于活性是必要的, 因而需保持仲胺结构。氨基糖的N原子被亲脂性烷基或芳烷基取代, 部分化合物的抑菌活性超过万古霉素。

构效关系表明, 氨基糖上N-烷基取代提高活性, 随着碳链的增加而提高, 以C10活性最高。含有支链或氧原子不利于活性。苯基取代以及对位有烷基取代的苯基活性很强, 而且大鼠药代动力学性质也优于万古霉素。表1列出了活性高于万古霉素的化合物结构、体内

外抗菌活性和主要药代参数 (Nagarajan R, Schabel AA, Occolowitz JL, et al. Synthesis and antierial activity of *N*-acyl vancomycins. *J Antibiot*, 1988, 41: 1430–1438)。

**5.2 主链七肽的构效关系** 从右端的 *N*-甲基亮氨酸编号为氨基酸 1 向左依次编号, 考察氨基酸 1~7 的变化对活性的影响。氨基酸 1 是取代的亮氨酸, 是非常必要的片段。去除后活性丧失, 提示该残基对结合和活性的重要性。N 原子上的甲基有无或变化, 对活性影响不大, 但不得 *N,N*-二取代。氨基酸 2 是取代的苯丙氨酸, 链上的  $\alpha$ -羟基是重要基团, 没有该羟基的万古霉素也在天然存在 (M43E), 活性只是万古霉素的一半。去除芳环上的氯原子也使活性降低。氨基酸 3 是天冬酰胺。变换成谷氨酰胺也天然存在 (M43G), 但活性低于万古霉素 1 倍。将酰胺变成天冬氨酸 (M43A), 活性降低 10 倍, 原因是游离羧基离解成带有负电荷引起构象变化, 不利于同 *D*-Ala-*D*-Ala 结合。天冬酰胺换成异天冬酰胺活性完全失去。氨基酸 4 是取代的苯基甘氨酸, 经糖苷键连接二糖的位置, 依次为 *D*-葡萄糖和氨基万古糖。除去氨基万古糖的活性降低 2~5 倍, 再去葡萄糖虽然恢复体外活性, 但体内小鼠抗菌活性低于万古霉素 5 倍。氨基酸 6 是取代的羟基苯丙氨酸, 环上的氯原子的有无对活性影响不大, 不像氨基酸 2 的苯环上失去氯原子活性降低 10 倍之多 (Nagarajan R. Structure-activity relationships of vancomycin-type glycopeptide antibiotics, *J Antibiot*, 1993, 46: 1181–1195)。氨基酸 5 和 7 的天然产物或人工改构物很少。游离羧基是修饰万古霉素的一个位点。俄国学者将氨基酸 6 苄基的  $\alpha$ -羟基连接氨基葡萄糖, 氨基酸 7 的间苯二酚经曼尼希反应芳环引入亲脂性的烷胺甲基链, 活性虽

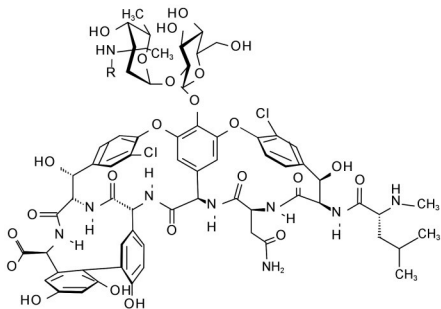
然低于万古霉素, 但对万古耐受菌有一定活性 (MIC = 16 mg·mL<sup>-1</sup>) (Pavlov AY, Lazhko EI, Preobrazhenskaya MN. A new type of chemical modification of glycopeptides antibiotics: aminomethylated derivatives of eremomycin and heir antibacterial activity. *J Antibiot*, 1997, 50: 509–513)。

## 6 特拉万星的研制

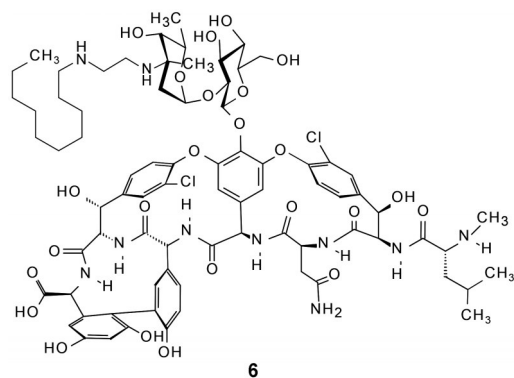
**6.1 引入两性片段的策略** 基于引入亲脂性链可提高抗菌活性的构效关系 (Allen NE, LeTourneau DL, Hobbs JN Jr. The role of hydrophobic side chains as determinants of antibacterial activity of semisynthetic glycopeptide antibiotics. *J Antibiot*, 1997, 50: 677–684), 并对耐万古霉素肠球菌产生活性的事实, Theravance 公司注意到增加亲脂性可提高化合物活性, 但也带来吸收分布代谢排泄 (ADME) 的不利性质, 例如消除半衰期的延长和组织内的蓄积。化合物 6 的抗菌谱显著强于万古霉素, 但蓄积在肝肾组织难以排泄, 有潜在的不良反应。设想再引入亲水性片段, 以保持抗耐药活性的同时改善组织分布和排泄的能力, 因而实施了对万古霉素作双位点修饰的策略: 即在万古霉素结构中同时引入亲脂性和亲水性片段。

**6.2 化合物首轮设计** 以化合物 6 为模板, 在氨基酸 7 片段处引入亲水性片段, 利用羧基连接出极性基团或在间苯二酚的亲核性强的位置 (两个酚羟基之间) 经曼尼希反应连接出极性侧链。首轮合成的代表性化合物列于表 2。引入的亲水性片段可带正电荷, 或负电荷, 或中性的多羟基基团。连接在羧基上 (化合物 7~12), 或连接在间苯二酚上 (13~17), 或同时在这两个位点上 (18)。目标化合物用 5 种菌株的最低抑菌浓

**Table 1** Structure and activity of typical *N*-alkyl vancomycin. a: Benzylpenicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* X.1.1; b: *Streptococcus pyogenes* C203; c: *Streptococcus pneumoniae* Park; d: Concentration of compound after 5 min iv

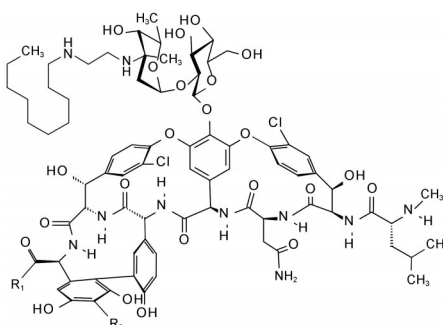


Compd.	R	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			ED <sub>50</sub> /mg·kg <sup>-1</sup> x 2, sc			Serum/iv, rat	
		S.A.1 <sup>a</sup>	S.Py <sup>b</sup>	S.Pn <sup>c</sup>	S.A.1	S.Py	S.Pn	t <sub>1/2</sub> /h	(5 min)/mg·mL <sup>-1d</sup>
1	H(vancomycin)	0.5	0.5	0.5	1.8	0.8	0.9	0.75	160
2	<i>n</i> -C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	0.13	0.06	0.13	1.8	0.65	0.68	3.4	203
3	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	0.06	0.06	0.015	0.8	1.0	0.9	1.84	89
4	<i>p</i> -BuC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub>	0.125	0.125	0.125	0.7	0.4	0.8	5.4	156
5	<i>p</i> -BuOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub>	0.125	0.06	0.06	0.7	0.5	0.6	2.4	205



度 (MIC) 评价活性: 即甲氧西林敏感株金葡菌 ATCC 13709、甲氧西林耐药株金葡菌 ATCC 33591、万古霉素耐药株粪肠球菌 ATCC 51575、万古霉素耐药株粪肠球

**Table 2** Structure and activity of carboxy-(C-) and resorcinol-(R-) substituted *N*-decylaminoethylvancomycin analogs. a: *Staphylococcus aureus* ATCC 13709, methicillin-sensitive; b: *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, methicillin-resistant; c: *Enterococcus faecalis* ATCC 51575, vancomycin-resistant (VanB); d: *Enterococcus faecalis* KPB-01, vancomycin-resistant (VanA); e: *Enterococcus faecalis* MGH-01, vancomycin-resistant (VanA)



Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$				
			<i>S.a.</i> 1 <sup>a</sup>	<i>S.a.</i> 2 <sup>b</sup>	<i>E.f.</i> 1 <sup>c</sup>	<i>E.f.</i> 2 <sup>d</sup>	<i>E.f.</i> 3 <sup>e</sup>
<b>1</b>		Vancomycin	0.7	1	>50	>50	>50
<b>6</b>	OH	H	0.5	0.7	1	2.5	2.8
<b>7</b>	~HN(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NMe	H	1.2	1.5	1	3.1	3.9
<b>8</b>	~N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub>	H	0.8	1.2	4.7	2.3	3.1
<b>9</b>	~N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	0.5	0.8	0.8	2.6	3.5
<b>10</b>	~CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	0.1	0.2	1.6	3.1	3.1
<b>11</b>	~HN(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	H	<0.05	0.2	0.1	3.1	2.3
<b>12</b>	~HN(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	H	0.3	0.5	1.1	6.7	5.3
<b>13</b>	OH	~N(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	1.5	1.2	2	4.5	6.8
<b>14</b>	OH	~N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	0.1	0.3	0.8	6.3	4.7
<b>15</b>	OH	~N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	0.2	0.5	1	13	9.4
<b>16</b>	OH	~N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	0.1	3.3	0.8	4.7	3.1
<b>17</b>	OH	~N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	0.1	3.3	0.8	4.7	3.1
<b>17</b>	OH	~N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub>	3.1	3.1	3.1	6.3	6.3
<b>18</b>	OH	~N(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	0.2	0.1	0.3	1.6	3.1

菌 KPB-01、万古霉素耐药株粪肠球菌 MGH-01。

结果表明,表2中所列的化合物仍然保持与万古霉素相当的活性,而且对耐受万古霉素的粪肠球菌也有较好抑制活性 (MIC 0.1~9.4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),而万古霉素则无效, MIC > 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。其中带有负电荷的化合物 **11** 活性尤为突出,对多种万古霉素耐药菌株都呈现强抑制活性。带有碱性胺基化合物 **7** 和 **17** 的抑菌作用低于化合物 **6**,提示引入正电荷的片段对活性是不利的。

进而研究了上述带有不同电荷数量的活性化合物在大鼠体内的分布,测定一次静脉注射 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  化合物在肝、肾和尿中的百分含量,列于表3中。结果表明,净电荷为零的化合物 **12** 从尿中排泄量最大,肝和

肾脏中的含量较低, 预示有较少组织内蓄积; 而分子中有3个正电荷的化合物**7**和**18**尿中排泄量最少。虽然这些化合物没有显示突出的活性与药代的优势, 但净电荷为零的化合物**12**的尿排泄主要与万古霉素相同, 为进一步结构优化提示了依据。

**Table 3** Single-dose distribution study in the rat (i.v., 10 mg·kg<sup>-1</sup>). a: Values are percentage of 10 mg·kg<sup>-1</sup> dose, 24 h after dosing

Compd.	Substitution position	Net charge	Tissue distribution/% <sup>a</sup>		
			Urine	Liver	Kidney
<b>1</b>	-	+1	65	<1	<1
<b>12</b>	Carboxyl (C)	0	67	11	6
<b>6</b>	-	+1	16	16	6
<b>9</b>	Carboxyl (C)	+2	23	30	9
<b>13</b>	Resorcinol (R)	+2	23	10	3
<b>7</b>	Carboxyl (C)	+3	<1	28	6
<b>18</b>	(C) + (R)	+3	5	23	16

**6.3 进一步结构优化** 基于上述的构效关系, 下一步是减少分子中的正电荷, 引入带有负电荷的片段, 使连接在氨基酸**7**的羧基或间苯二酚环上, 合成的代表性化合物列于表4。表4的结果提示, 带有负电荷的这些化合物的体外抗菌活性很高, 其中化合物**23**对MSSA和MRSA的活性比化合物**6**强3~5倍。与羧基连接有双膦基的化合物**25**和与间苯二酚相连的氨基葡萄糖谷氨酸片段的化合物**27**的体外活性略弱。然而所有这些化合物对耐受万古霉素的肠球菌的活性都不如化合物**6**。

进而选择了化合物**21**、**24**和**27**等化合物评价体内分布和排泄性质。大鼠静脉注射50 mg·kg<sup>-1</sup>后24 h测定组织内分布和尿排泄量。表5的数据表明, 这三个化合物与化合物**6**相比, 由于分子中加入了负电荷基

**Table 4** Structure and antibacterial properties of negatively charged derivatives attached to carboxyl group (C) or resorcinol ring (R) of compound **6**

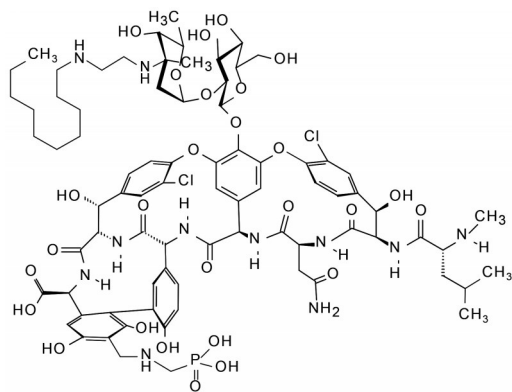
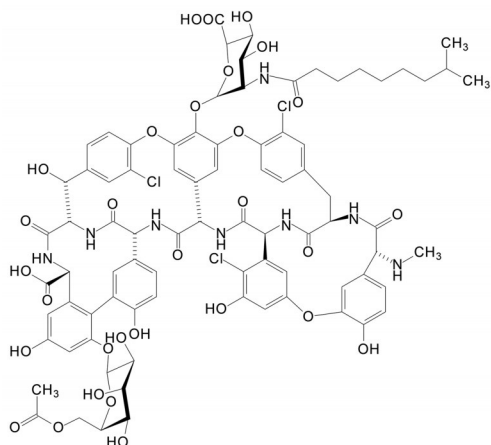
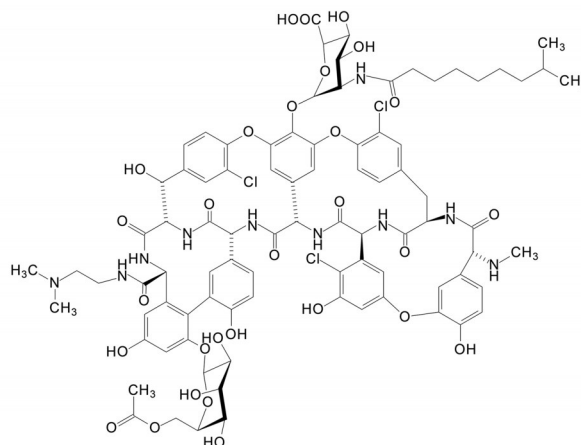
Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	MIC/μg·mL <sup>-1</sup>				
			S.a.1	S.a.2	E.f.1	E.f.2	E.f.3
<b>6</b>	OH	H	0.5	0.7	1	2.5	2.8
<b>19</b>		H	0.3	0.4	1.6	6.3	6.3
<b>20</b>		H	0.5	0.4	1.2	6.3	4.7
<b>21</b>		H	1.0	0.6	1.6	6.3	9.4
<b>22</b>		H	1.2	0.8	1.6	13	13
<b>23</b>		H	0.1	0.2	0.9	6.3	4.7
<b>24</b>	OH		0.6	0.8	1.6	6.3	9.4
<b>25</b>	OH		2.3	3.9	4.7	13	9.4
<b>26</b>	OH		1.2	0.8	1.6	6.3	6.3
<b>27</b>	OH		3.1	2.3	4.7	13	13
<b>28</b>	OH		0.4	0.8	1.2	9.3	6.3

**Table 5** Single-dose distribution study in the rat (i.v., 50 mg·kg<sup>-1</sup>) for typical compounds

Compd.	Substitution position	Net charge	Tissue distribution/%		
			Urine	Liver	Kidney
6	-	+1	16	16	6
21	Carboxyl (C)	+1	58	6	3
24	Resorcinol (R)	0	40	5	2
27	Carboxyl (C)	+1	72	4	1

团,显著提高了尿排出率和降低了在肝肾中的分布。

比较这些化合物较好体外活性和体内分布和排泄性质, Theravance 公司对化合物 **24** 进行了体内药代和药效的实验, **24** 表明对 MSSA、MRSA 和万古霉素中度耐药金葡菌 (VISA) 有强效迅速杀菌作用, 遂确定为候选化合物, 定名特拉万星 (**24**, telavancin), 经临床前和临床研究, 证明可治疗甲氧西林敏感和耐药的金葡菌、化脓性链球菌和粪肠球菌等引起的复杂性皮肤和皮肤组织的感染, 于 2009 年 FDA 批准上市 (Leadbetter MR, Adams S, Bazzini B, et al. Hydrophobic vancomycin derivatives with improved ADME properties: discovery of telavancin (TD-6424). *J Antibiot*, 2004, 57: 326–336)。

**24** Telavancin**29****30**

## 7 达巴万星

在天然的万古霉素类糖肽家族中, 替考拉宁 (**29**, teicoplanin) 是个重要成员, 1975 年首次发现, 替考拉宁是放线菌 *Actinoplanes teicomycetius* 的一组脂糖肽产物, 是含有不同脂肪酸链的万古霉素类化合物群, **29** 的抗菌谱和强度强于万古霉素, 于 1988 年首先在欧洲许多国家上市, 因其半衰期长达 30 h, 每日输注或肌肉注射 1 次, 临床用于治疗金葡菌和链球菌所致的严重感染 (Chmara H, Ripa S, Mignini F, et al. Bacteriolytic effect of teicoplanin. *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 913–919)。化合物 **29** 的代号为 A40926, 对淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 非常有效 (Goldstein BP, Selva E, Gastaldo L, et al. A40926, a new glycopeptide antibiotic with anti-*Neisseria* activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987, 31: 1961–1966), 被开发成药物, 通用名为替考拉宁 (**29**, teicoplanin)。替考拉宁的结构骨架与万古霉素相同, 区别在于两个糖片段的结构和位置不同, 以及氨基糖有 *N*-十烷酰化的长脂肪链。

辉瑞公司对替考拉宁作结构优化, 将左端的游离羧基修饰成二甲胺基乙胺的酰胺, 以盐酸盐形式, 称作达巴万星 (**30**, dalbavancin), 于 2014 年 FDA 批准上市 (Bailey J, Summers KM. Dalbavancin: a new lipoglycopeptide antibiotic. *Am J Health Syst Pharm*, 2008, 65: 599–610)。

## 8 奥利万星

奥利万星 (**31**, oritavancin) 是万古霉素的半合成衍生物, 由 Melinta Therapeutics 公司研发, 于 2014 年批准上市。从奥利万星的化学结构分析研发理念, 是在二糖的氨基上连接疏水性片段 *p*-氯代联苯基, 以提高抗菌活性, 尤其是抗万古霉素耐药菌的活性, 同时在氨基酸 **6** 的  $\alpha$  羟基连接亲水性片段 4-*epi*-万古糖胺, 以维持亲脂-亲水的平衡, 起到优化药效和药代 (组织分布

