

## • 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。

四环素类药物是历史较久的抗生素,从1947~1950年发现并应用的天然四环素,到1971年以米诺环素为代表第二代的长效口服四环素,时隔了24年。四环素药物曾有过的辉煌和后来的冷遇是由于抗药性的产生。又经历了37年诞生的替加环素(2008年)成为第三代四环素的标志性药物,是针对耐药菌的基因产物为靶标而定制的,虽然不是从分子靶标入手,而是以细菌生长表型作为评价化合物的标准,但毕竟研制出新一代的抗耐药四环素而得以复兴。10年后,第四代药物依拉环素(2018年)的成功是以全合成四环素为基础,突破了经天然物改构的结构局限性,并实现规模性全合成制备,而且无论在广谱型、活性强度和抗耐药性上都优于替加环素。所以,复杂结构的老药结构改造随着有机合成的进步带来了新的成果和希望。从四环素药物这70多年的研制轨迹可以看到,生物学和有机化学的进展是新药创制的重要推手。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1815

# 替加环素和依拉环素等四环素类药物的研制

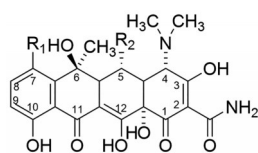
郭宗儒

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所,北京 100050)

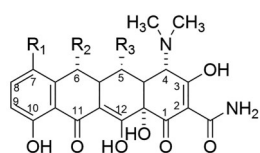
## 1 概说

四环素类药物是一组抗革兰阳性菌、阴性菌以及需氧和厌氧菌的广谱而历史较久的抗生素药物,最早发现的金霉素(1, chlortetracycline)是1947年从金色链丝菌 *Streptomyces aureofaciens* 的培养液分离得到的(Duggar BM. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. Ann NY Acad Sci, 1948, 51: 177),后于20世纪50年代又相继发现了土霉素(2, oxytetracycline) (Findlay AC, Hobby GL, Pin SY, et al. Terramycin, a new antibiotic. Science, 1950, 111: 85)、四环素(3, tetracycline) (Boothe JH, Morton J, Petisi JP, et al. Tetracycline. J Am Chem Soc, 1953, 75: 4621) 和地美环素(4, demeclocycline) 等天然抗生素,这些都进入了临床应用。作为第一代四环素药物,口服可吸收,曾被广泛应用,但因是极性较强分子,体内易于代谢清除,因而作用时间短。

临床称作第二代的四环素是天然四环素的简单结构修饰物,多在环的5、6和7位变换,例如脱去土霉素(2)的6位羟基生成的多西环素(5, doxycycline, 又称强力霉素),由于减少了分子极性,延长了消除半衰期,成为第一个长效四环素(Martell MJ, Boothe JH. The 6-deoxytetracyclines. VII. Alkylated aminotetracyclines possessing unique antibacterial activity. J Med Chem, 1967, 10: 44-46)。美他环素(6, methacycline) 又称甲烯土霉素,可视作土霉素6位脱水的甲烯化合物,体内半衰期可到16~18 h (Blackwood RK, Beereboom JJ, Rennhard H, et al. 6-Methylenetetracycline. III. Preparation and properties. J Am Chem Soc, 1963, 85: 3943-3953)。另一个是去除5和6位的取代基,只在7位连接二甲胺基的四环素称作米诺霉素(7, minocycline),其抗菌活性强于多西环素,也说明6位的取代基并非抗菌所必需,而且7位引入极性基团提高了抗菌活性,推测7位的极性基团促进了同核糖体A位的结合(Redin GS. Antibacterial activity in mice of minocycline, a new tetracycline. Antimicrob Agents Chemother, 1966, 6: 371-376)。四环素的二代药物仍保持广谱抗菌活性,并提高了代谢稳定性,改善了药代动力学性质。



- 1 R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=H
- 2 R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH
- 3 R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H
- 4 R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H



- 5  $R_1=H, R_2=CH_3, R_3=H$   
 6  $R_1=H, R_2=-CH_2, R_3=OH$   
 7  $R_1=N(CH_3)_2, R_2=H, R_3=H$

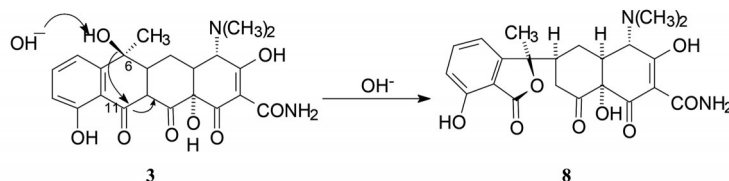
## 2 作用机制和耐药性

四环素类药物的作用机制是抑制细菌的蛋白质合成, 阻断细菌胞壁的肽链生成。其作用靶标是核糖体 30S 亚基, 发生四环素-30S 可逆性结合, 该复合物与 tRNA 竞争性结合核糖体的 A 位, 阻断了 tRNA 与 RNA 之间密码子-反密码子反应, 不能使氨酰-tRNA 的到位, 终止了肽链延伸而抑制细菌生长。四环素类 C10~C12 位存在烯醇和酮的密集功能基, 与靶标的多个氨基酸残基结合, 并和镁离子形成配合物, 对抗菌活性产生重要影响。

如同所有抗菌药物一样, 长期经受四环素药物的刺激, 细菌产生耐药性, 主要通过两种机制。一是更多地表达外排性蛋白。革兰阳性菌和阴性菌中都含有外排性基因, 表达的外排性蛋白 (efflux protein) 具有四环素抗性, 这种外排蛋白属于主要异化转运蛋白超家族 (major facilitator superfamily, MFS), 作为膜蛋白可将四环素泵出细菌细胞外, 降低了胞内药物浓度, 保护了核糖体免受攻击。已知革兰阴性和阳性菌含有 *tet A~tet D* 等外排蛋白。另一是提高核糖体保护蛋白 (ribosome protection proteins, RPP) 的表达量, RPP 存在于细胞质中, 与核糖体结合, 引起后者的构象改变, 使得四环素不能与核糖体结合, 然而核糖体构象改变并不影响蛋白质的合成, 因此保护核糖体免受四环素的作用。已知耐药菌表达的 RPP 有 *tet M~tet O* 等蛋白。

## 3 四环素类药物的构效关系

许多文献报道了四环素的结构修饰, 基于结构变换揭示的构效关系有如下要点: ① 由 4 个六碳环线性并合构成的四环是必不可少的骨架, 开裂一个环就失去活性, 例如四环素 (3) 在碱性条件下, C6 上羟基形成氧负离子, 向具有亲电性的 C11 羰基作分子内亲核进攻, C 环破裂, 生成内酯结构 (8) 而失去活性。此外, 改



变并合环的构型或某个环的芳香化都会失去活性。② C2 连接的酰氨基是必要的药效团, 去除 CONH<sub>2</sub> 则失去活性, N 上 H 原子可用烷基置换而保留活性, 例如连接甲基四氢吡咯的罗利环素 (rolitetracycline) 或连接赖氨酸的赖甲环素 (lymecycline) 仍保持活性, 而且增加了溶解性。③ 4 位的二甲胺基是必要基团, 去除或变构为  $\beta$  构型活性显著减弱, 用其他烷基取代甲基也使活性降低。④ 5、6 和 7 位的功能基变化对活性影响不显著, 即或没有取代基活性变化也不大。但是若 6-羟基与 5a-H 消除水分子, 使 C 环芳香化, 则失去活性。⑤ 天然四环素的 9 位没有取代基, 但后来发现引入含有碱性氮原子的甘氨酸侧链对活性和选择性有重要贡献, 产生了新的半合成四环素, 将于后面讨论。⑥ 1 位和 3 位的酮基-烯醇基, 以及 10、11、12 和 12a 的羟基和酮基 (或烯醇基) 都是与 S30 结合的重要基团, 去除或变换 (包括 12a 羟基构型的翻转) 都使活性降低。⑦ 四环素与核糖体 S30 的复合物晶体结构表明, 环骨架的“东南部”与 S30 发生多氢键结合, 形成的氢键网络对活性是至关重要的。骨架环的“西北部”例如 5、6、7、8 和 9 位的取代基是可以变换的, 因而是优化活性、抗耐药性和调整过膜性的适宜位置 (Orth P, Alings C, Schnappinger D, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tetracycline/operator complex. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1998, D54: 99-100)。

## 4 替加环素的研制

### 4.1 甘氨酸环素

美国氰胺公司 (后为惠氏, 并入辉瑞) 研制的米诺环素 (7, minocycline) 是 1971 年上市的第二代四环素, 它的抗菌谱、强度和药代性质 (分布和长效性) 都强于已有的第一代四环素。然而广泛长时期的应用, 细菌对米诺环素产生了耐药性。

惠氏着手研制克服耐药性的四环素, 目标是针对耐药的外排蛋白 (*tet B*) 和变异的核糖体保护蛋白 (*tet M*) 阳性和阴性菌以及厌氧致病菌。起始物是米诺环素 (7) 和 7-二乙胺基去氧去甲基四环素。

### 4.2 初步构效关系

由于四环素结构中最经得起修饰并有望优化抗菌作用的位置是 D 环, 因而首轮优化是在 7 位 (二甲胺基和二乙氨基) 和 9 位引入基团。表 1 列出了初步修

饰的化合物活性。用革兰阴性菌大肠杆菌 (*E. coli*) 对四环素外排性耐药株 (*tet B*) 和对核糖体保护性耐药株 (*tet M*) 以及敏感株评价受试化合物的最低抑菌浓度 (MIC), 同时评价化合物对敏感株革兰阳性菌金葡萄菌 (*S. aur*) 以及耐药株 (*tet M*) 金葡萄菌和敏感株肠粪球菌 (*Eterococ*) 活性。

表1结果提示, 化合物9~11对革兰阳性菌有抑制活性, 但对四环素耐药的阴性菌没有活性。13和14在9位引入甲酰胺基, 对耐药的菌株虽有活性但对耐药大肠杆菌株未显示活性。乙酰氨基化合物16~19的活性都不如甲酰胺基。进而合成的*N,N*-二甲基甘氨酸化合物21~24对耐药菌株有较强的抑制活性。实验表明四环素的9位有甘氨酸侧链的四环素 (glycylcycline) 对于耐受甲氧西林的金葡萄菌 (MRSA) 和耐受万古霉素的肠粪球菌 (VRE) 呈现有效的抑制活性, 其中化合物21的活性最强 (Sum PE, Lee VL, Raymond T, et al. Glycylcyclines. 1. A new generation of potent antibacterial agents through modification of 9-aminotetracyclines. *J Med Chem*, 1994, 37: 184-188)。

#### 4.3 氨基酸片段的变换

基于四环素的9位用甘氨酸取代对耐药菌呈现较高活性, 用各种天然氨基酸和非天然氨基酸置换甘氨酸片段, 结果表明抗菌活性都不如甘氨酸片段 (数据省略) (Barden TC, Buckwalter BL, Testa RT, et al. "Glycylcyclines". 3. 9-Aminodoxycyclinecarboxamides. *J Med Chem*, 1994, 37: 3205-3211)。

#### 4.4 进一步优化和候选物的确定

化合物21是优化的化合物, 将7位固定为二甲氨基, 变换9位的甘氨酸上碱性氮原子作不同取代, 以优化最佳取代基, 合成的代表性化合物列于表2。

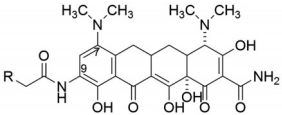
表2的构效关系分析如下: ① 9-溴化合物25是合成目标物的中间体, 对敏感型阳性菌虽有一定的活性, 但对阴性菌无效, 提示9位连接的氮原子是抗阴性菌所必需。② 9-氮杂脂环26~28对阴性和阳性菌以及耐药菌株都有活性, 但不如化合物9-二甲氨基化合物21。③ 9-咪唑、吗啉和硫代吗啉化合物29~31对阴性菌均未显示活性。







下一步仍是固定7位是二甲氨基, 用不同的单烷基连接于9位的氨基上, 考察仲胺对活性的影响, 合成了表3代表性化合物。构效关系如下: ① *N*-单甲基化合物32与21相比, 对敏感和耐药的阴性和阳性菌抑制活性都显著下降, 正丙基(33)、正丁基(34)和正己基(36)虽然活性强于32, 但不如化合物21。十一烷胺基取代物37的活性很差。② *N*-环烷基或芳(杂)环烷基的化合物虽然有活性, 但不突出。

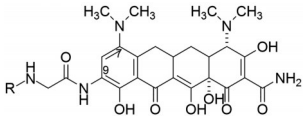
化合物35是叔丁胺基化合物, 对阴性和阳性菌以及耐药菌的活性与化合物21不分伯仲, 从而比较了二者的体内药效与药代性质, 结果显示35对耐甲氧西林金葡萄菌 (MRSA) 和耐受万古霉素的肠粪球菌 (VRE) 以及耐受青霉素的链球菌活性更强, 而且消除半衰期36 h, 作用时程长, 因而是研制中体内外抗菌效果最佳的化合物 (Sum PE, Petersen P. Synthesis and structure-activity








Table 1 *In vitro* activity of 7-substituted 9-substituted-amido 6-demethyl-6-deoxytetracyclines

Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Minimum inhibitory concentration (MIC)/μg·mL <sup>-1</sup>					
			<i>E. coli</i> /tet B	<i>E. coli</i> /tet M	<i>E. coli</i> /sens	<i>S. aur</i> /tet M	<i>S. aur</i> /sens	<i>Eterococ</i> /sens
9	H	H	>32	16	1	8	0.03	0.5
10	NEt <sub>2</sub>	H	2	32	1	2	0.03	0.12
11	I	H	>32	>32	4	0.5	0.015	0.12
12	H	CHO	32	1	0.25	1	0.03	0.06
13	NMe <sub>2</sub>	CHO	>32	1	0.25	0.06	0.03	0.03
14	NEt <sub>2</sub>	CHO	16	8	0.5	0.5	0.03	0.06
15	I	CHO	>32	32	0.5	4	0.03	0.25
16	H	CH <sub>3</sub> CO	>32	8	8	2	0.12	0.25
17	NMe <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO	>32	4	8	1	0.25	0.25
18	NEt <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO	32	32	32	2	0.12	0.25
19	I	CH <sub>3</sub> CO	>128	>128	16	1	0.12	0.25
20	NMe <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> NCOCH <sub>2</sub>	2	1	2	2	1	0.25
21	NMe <sub>2</sub>	Me <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> CCO	0.25	0.25	0.25	0.25	0.06	0.06
22	H	Me <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> CCO	0.25	0.12	0.12	0.12	0.12	0.03
23	NEt <sub>2</sub>	Me <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> CCO	1	1	1	0.5	0.5	0.25
24	I	Me <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> CCO	1	1	2	0.5	0.25	0.06
6		Minocycline	16	>32	1	4	0.12	1
3		Tetracycline	>32	>32	1	>32	0.25	18

**Table 2** *In vitro* activity of varied 9-glycylcyclines


Compd.	R	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$					
		<i>E. coli/tet B</i>	<i>E. coli/tet M</i>	<i>E. coli/sens</i>	<i>S. aur/tet M</i>	<i>S. aur/sens</i>	<i>Eterococ/sens</i>
21	Me <sub>2</sub> N	0.25	0.25	0.25	0.25	0.03	0.06
25	Br	>32	NT	16	1	0.5	0.5
26		0.5	0.25	0.25	0.25	0.12	0.25
27		0.25	0.25	0.25	0.12	0.12	0.12
28		0.5	0.5	0.5	0.25	0.12	0.06
29		>32	>32	>32	32	4	4
30		>32	NT	>32	4	2	2
31		>32	>32	>32	1	1	0.25
3	Tetracycline	>32	>32	1	>32	0.25	16
7	Minocycline	>32	16	16	8	2	4

**Table 3** *In vitro* activity of 9-N-monoalkylglycylcyclines


Compd.	R	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$					
		<i>E. coli/tet B</i>	<i>E. coli/tet M</i>	<i>E. coli/sens</i>	<i>S. aur/tet M</i>	<i>S. aur/sens</i>	<i>Eterococ/sens</i>
21	-	0.25	0.25	0.25	0.25	0.03	0.06
32	CH <sub>3</sub>	1	NT	1	1	0.5	0.5
33	<i>n</i> -Pr	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.25
34	<i>n</i> -Bu	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.12
35	<i>t</i> -Bu	0.5	0.12	0.25	0.12	0.25	0.12
36	<i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	0.5	0.25	0.25	0.25	0.06	0.12
37	<i>n</i> -C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	32	32	16	16	0.5	2
38		4	2	2	0.5	0.5	0.25
39		0.25	0.25	0.25	0.25	0.12	0.12
40		4	2	4	1	0.25	0.25
41		0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.12
42		0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.25
43		2	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25
44		16	8	16	8	4	2

relationship of novel glycylcycline derivatives leading to the discovery of GAR-936. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9: 1359–1462).

惠氏公司将**35**选定为候选化合物,代号GAR-396,定名为替加环素(tigecycline),经系统临床前和临床研究,于2008年美国FDA批准上市,治疗细菌性肺炎,革兰阳性或阴性菌引起的皮肤和肠道感染。替加环素是在惠氏于1971年上市的米诺环素37年后的重要突破,

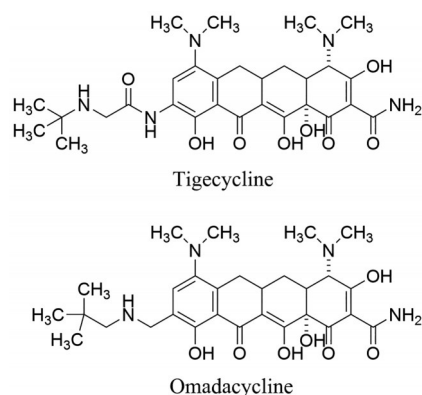
成为第三代四环素的代表性药物。

时隔10年后,美国FDA于2018年批准了Paratek公司的奥马环素(omadacycline)上市。奥马环素的化学结构与替加环素颇为相似,也是在米诺环素的9位引入含有叔丁胺基的碱性侧链,类似于跟随性药物。

## 5 全合成促进了第四代四环素研制

### 5.1 (-)四环素的全合成

最早实现四环素全合成的工作是Woodward在



1967年完成的,合成路线经34步反应,总收率0.002%,所以只有理论价值。Myers等于2005年实现的全合成策略是构建AB环与预构的D环经Diels-Alder环加成反应合成了四环骨架。烯酮AB环**45-1**是由苯甲酸经10步反应得到的,烯酮的 $\alpha$ 位经溴化再置换为 $\alpha$ 苯硫醚基(**45-2**)而活化。苯并环丁基三乙基硅醚**45-3**是发生Diels-Alder反应的双烯物,为目标物提供D环的模块。生成的环加合物**45-4**经三乙胺-氟氢酸处理去除三乙基硅烷,游离出的10位羟基经 $o$ -碘氧苯甲酸(IBX)氧化生成10-酮化合物**45-5**,后者经三氟乙酸除去硫代苯酚,继之用 $o$ -氯过氧化苯甲酸氧化,生成过氧化物**45-7**,氢化还原得到目标物(-)-四环素**45-8**。全合成的17步反应的总收率为1.1%(以初始物苯甲酸计)(Charest MG, Siegel DR, Myers AG. Synthesis of (-)-tetracycline. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 8292-8293)。图1是该全合成的路线图。

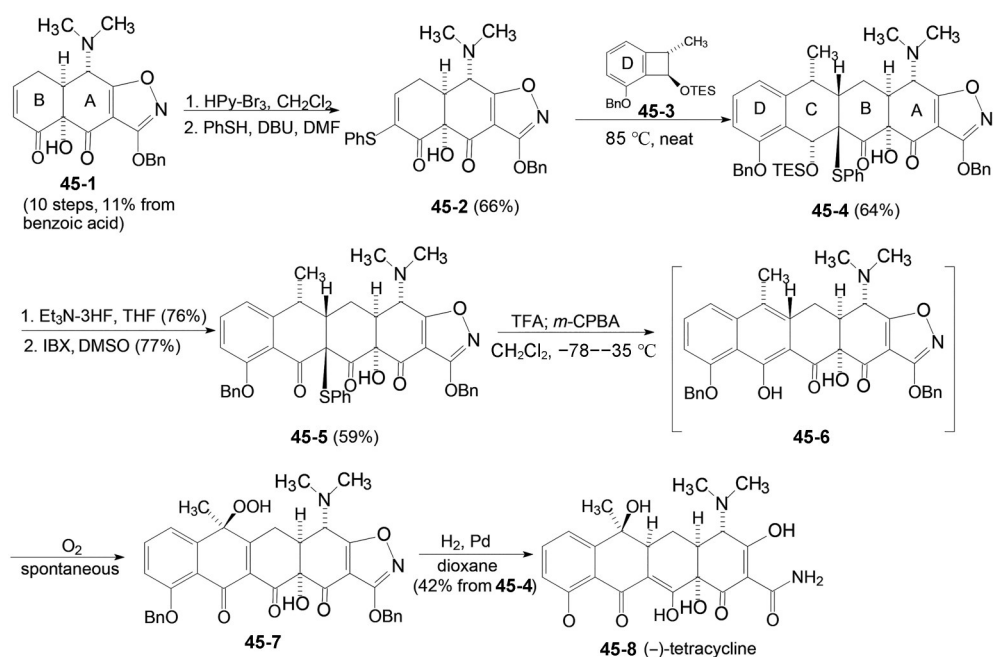


Figure 1 Total synthesis of (-)-tetracycline

## 5.2 8-氮杂四环素

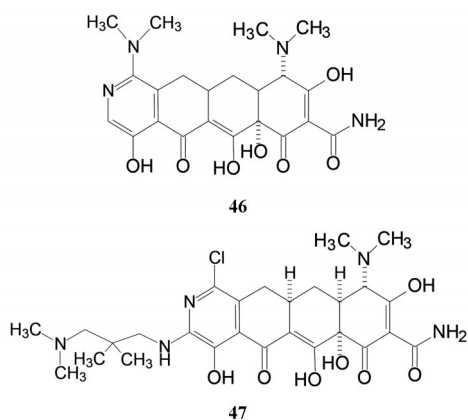
已有的四环素类药物或是天然物,或是半合成的天然改构物,半合成四环素多是利用D环的10-羟基的推电子效应( $p$ - $\pi$ 共轭),提高了7位和9位的电荷密度,因而改构物多是经亲电取代反应引入基团或片段,在D环作有限的基团变换。自从开拓了D环与AB环的Diels-Alder环加成或Michael-Claisen环合反应形成C环而构建四环素骨架后,汇聚式的合成得以在D环作广泛的变更,例如不同取代的苯环、芳杂环或脂环等。

Tetraphase公司对此D环与BA环形成DCBA四环的技术路线进行了深入的研究,工艺学研究使该平台技术实现规模性制备,取得了明显的突破。例如用吡啶作为D环替换苯环,化合物**46**是米诺环素电子等排物,**47**是7-氯-9-脂胺链取代的8-氮杂四环素,都呈现较强的活性(Clark RB, He M, Fyfe C, et al. 8-Azatetracyclines: synthesis and evaluation of a novel class of tetracycline antibacterial agents. *J Med Chem*, 2011, 54: 1511-1528)。

## 5.3 依拉环素的研制

Tetraphase公司借此平台技术,开辟了氟代四环素的项目,并研制出了新药,简述如下(Zhanel GG, Cheung D, Adam H, et al. Review of eravacycline, a novel fluorocycline antibacterial agent. *Drugs*, 2016, 76: 567-588)。

**5.3.1 分子设计与合成通法** 基于四环素类药物的构效关系和已有成功药物的结构的提示,Tetraphase公司启动了7-氟代-9-胺基脂肪链取代的四环素项目,通称



作氟四环素化合物 (fluorocyclines)。合成的策略是将氟原子预构在 D 环的水杨酸衍生物的 5 位 (相当于四环素的 7 位), 与 AB 环的烯酮化合物发生 Michael-Dieckmann 环加成反应, 生成的四环骨架去保护基后, 在 9 位引入硝基, 还原成氨基, 用不同取代的 N-甘氨酸酰化, 汇聚式合成目标物, 如图 2 所示。

### 5.3.2 首轮设计合成 9-取代-7-氟四环素化合物 以

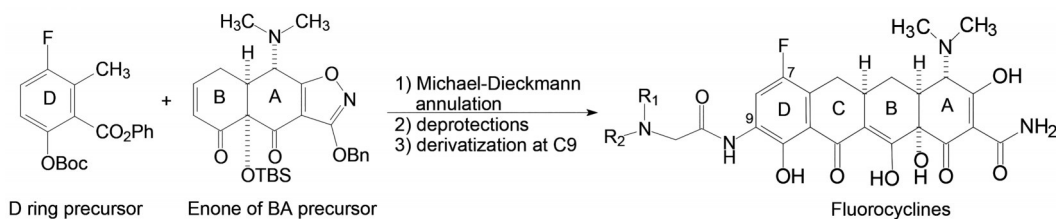


Figure 2 Synthetic scheme of fluorocyclines

Table 4 *In vitro* antibacterial activity of fluorocycline analogues. \* SA: *Staphylococcus aureus*; EF: *Enterococcus faecalis*; SP: *Streptococcus pneumoniae*; EC: *Escherichia coli*; KP: *Klebsiella pneumonia*

Compd.	R	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *											
		SA101	SA161	SA158	EF103	EF159	SP106	SP160	EC107	EC155	KP109	KP153	
		sens	<i>tetM</i>	<i>tetK</i>	sens	<i>tetM</i>	sens	<i>tetM</i>	sens	<i>tetA</i>	sens	<i>tetA</i>	
48	EtNH-	0.062 5	0.25	1	0.062 5	0.125	0.015 6	0.015 6	0.25	16	1	8	
49	MeO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH-	0.25	0.5	4	0.125	1	0.015 6	0.062 5	1	16	2	8	
50	F <sub>3</sub> CCH <sub>2</sub> NH-	1	2	4	2	4	0.5	1	16	>32	32	>32	
51	<i>i</i> -PrNH-	0.125	0.25	0.5	0.062 5	0.062 5	0.015 6	0.015 6	0.5	8	1	4	
52	<i>t</i> -BuNH-	0.125	0.25	0.062 5	0.062 5	0.125	0.015 6	0.015 6	0.25	2	1	2	
53	PhNH-	2	4	2	2	2	2	4	>32	>32	>32	>32	
54	3-PyNH-	4	>32	>32	8	>32	0.25	2	16	>32	32	>32	
55	Me <sub>2</sub> N-	0.015 6	0.125	0.25	0.015 6	0.031 2	0.015 6	0.015 6	0.125	8	0.5	8	
56		0.125	0.25	0.5	0.0625	0.125	0.0156	0.0156	0.25	8	1	4	
57		0.015 6	0.015 6	0.016 5	0.015 6	0.015 6	0.015 6	0.015 6	0.015 6	8	0.125	0.5	
58		0.5	1	0.5	0.25	0.5	0.015 6	0.015 6	1	32	2	4	
59		4	8	8	8	8	0.5	1	32	>32	>32	>32	
3	Tetracycline	0.125	64	32	16	64	0.25	32	1	16	2	>64	
35	Tigecycline	0.062 5	0.125	0.062 5	0.062 5	0.062 5	0.015 6	0.015 6	0.125	16	0.25	1	

7-氟-6-去氧-6-去甲基四环素为模板, 在 9 位连接不同结构的含氮片段, 评价目标物的抗菌活性是测定体外抑制细菌的最低有效浓度 (MIC,  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 表 4 中自左到右前 7 个菌株为革兰阳性菌, 后 4 个为阴性菌。sens 代表对四环素敏感菌株, *tet A*、*tet K* 或 *tet M* 代表耐药菌株。

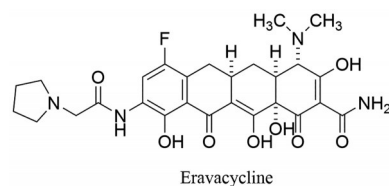
表 4 中化合物的构效关系总结如下: ① 9 位游离的仲胺或叔胺都有活性, 小基团取代活性较高。② 仲胺 48、51 和 52 对耐药菌的抗菌活性, 随着烷基的增大而提高。③ 叔胺 55~59 对耐药株 *tet K* 都呈现活性, 其中化合物 57 对 *tet A* 的活性较高。④ 胺基的碱性减弱 (化合物 49、50、59) 抗菌活性也减弱, 尤其对阴性菌更为显著。⑤ 芳香环的存在如 53 和 54 不利于活性。⑥ 环胺类环的大小对化合物活性影响很大, 57 中吡咯烷化合物对革兰阴性菌的 MIC  $\leq 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 对于耐药外排蛋白高表达 *tet A* 的致病菌活性也很高, 是表 4 中化合物活性最强的分子。缩环物 56 和扩环物 58 对所有菌株的活性都比 57 弱 4 到 32 倍。

**5.3.3 含吡咯烷的结构变换** 鉴于化合物 **57** 的抗菌活性最强, 对吡咯烷环作进一步修饰, 合成代表性的化合物列于表 5。结果表明, 吡咯烷环上连接氟原子 (**60** 和 **61**) 对阳性菌的活性与 **57** 相近, 而且构型之间的活性差别也不大; 但对阴性菌显著低于 **57**。引入极性基团 (化合物 **62~64**) 抗菌活性减弱, 尤其是抗阴性菌的强度显著降低。双环化合物 **65** 和 **66** 有一定的抗阳性菌活性。总之, 表 5 中所有修饰吡咯烷的化合物活性都不如化合物 **57**。

**5.3.4 候选化合物确定和依拉环素的上市** 化合物 **57** 对阴性菌和阳性菌的广谱强效抗菌作用 (铜绿假单胞菌除外), 而且对四环素高表达耐药的外排蛋白和核糖体保护蛋白菌株也有较强抑制作用, 遂用广泛产生  $\beta$ -内酰胺酶的大肠杆菌致小鼠败血症模型 (也编码 *tet* B) 外排蛋白基因 EC133 和 MRSA (编码微粒体保护基因 *tet* M, SA191) 引起小鼠中性粒细胞减少症模型进行实验治疗, 表明其抗菌作用 ( $PD_{50} = 1.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 强于替加环素两倍 ( $PD_{50} = 3.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。大鼠药代动力学实验提示, **57** 的体内分布容积 (AUC) 高于替加环素 70%, 消除半衰期 4~5 h。大鼠的口服生物利用度较

差, 不如四环素, 但后来发现人体的口服利用度  $F = 60\% \sim 80\%$ 。

基于药效和药代性质的综合考虑, 确定化合物 **57** 为候选化合物, 定名为依拉环素 (eravacycline), 经临床前和临床研究, 于 2018 年 FDA 批准上市, 用于治疗复杂性腹腔内感染, 效果非劣于两种广泛使用的对比疗法厄他培南和美罗培南的治疗 (Xiao XY, Hunt DK, Zhou J, et al. Fluorocyclines. 1. 7-Fluoro-9-pyrrolidinoacetamido-6-demethyl-6-deoxytetracycline: a potent, broad spectrum antibacterial agent. *J Med Chem*, 2012, 55: 597-605; Ronn M, Zhu Z, Hogan PC, et al. Process R&D of eravacycline: the first fully synthetic fluorocycline in clinical development. *Org Process Res Dev*, 2013, 17: 838-845)。



**Table 5** *In vitro* antibacterial activity of fluorocycline with substituted pyrrolidine compounds

Compd.	R	MIC/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$											
		SA101 sens	SA161 <i>tet</i> M	SA158 <i>tet</i> K	EF103 sens	EF159 <i>tet</i> M	SP106 sens	SP160 <i>tet</i> M	EC107 sens	EC155 <i>tet</i> A	KP109 sens	KP153 <i>tet</i> A	
<b>57</b>		0.015 6	0.015 6	0.016 5	0.015 6	0.015 6	0.015 6	0.015 6	0.015 6	8	0.125	0.5	
<b>60</b>		0.25	0.5	0.5	0.125	0.25	0.015 6	0.015 6	1	16	4	8	
<b>61</b>		0.25	0.5	1	0.25	0.25	0.015 6	0.015 6	2	32	4	32	
<b>62</b>		8	>32	>32	16	16	2	4	>32	>32	>32	>32	
<b>63</b>		2	2	16	2	2	0.25	0.5	>32	32	16	>32	
<b>64</b>		1	2	1	1	1	0.125	0.125	4	16	8	16	
<b>65</b>		0.5	1	0.5	0.25	0.5	0.125	0.06	1	2	2	4	
<b>66</b>		0.25	0.5	0.25	0.25	0.5	0.125	0.125	2	4	4	32	