

## • 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。

培米替尼是继2019年FDA批准上市的厄达替尼(ertodatinib)第二个成纤维细胞生长因子受体(FGFR)的靶向药物,分别治疗胆管癌和膀胱癌,都是难治的恶性肿瘤。两个药物的研究轨迹不同,前者是从积累的两万个化合物普筛得到的苗头化合物,并以药物化学方法优化成功的;而后者是基于片段的药物发现(FBDD)完成的,所以两个药物有不同的结构类型,但都结合于FGFR激酶的ATP结合域中。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1337

# 治疗胆管癌的首创靶向药物培米替尼

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 靶标—成纤维细胞生长因子受体

成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)属于受体型蛋白酪氨酸激酶,结构上包括胞外配体结合域、跨膜域和胞质酪氨酸激酶域。成纤维细胞生长因子(FGF)作为配体结合于膜外域,激活了胞内的酪氨酸激酶域,导致受体的自磷酸化,从而激活了下游的多向信号通路,调控着细胞增殖、存活和死亡。FGFR有4种类型,即FGFR1、FGFR2、FGFR3及FGFR4,存在于各种组织细胞中。它们的基因放大、突变、染色体易位或融合,导致结构上的改变与功能的活化,或配体依赖的信号通路异常等,临床上伴随肿瘤的发生。肿瘤组织中FGFR过表达和激活,并可促进肿瘤血管形成和肿瘤细胞分裂增殖等,因而FGFR是研制抗肿瘤药物的重要靶标。

## 2 活性评价

**2.1 化合物对FGFRs激酶的抑制作用** 用荧光共振能量转移方法测定。384孔板每孔加入一定量的FGFR1,与不同稀释度的受试化合物预温孵,加入底物(生物素标记的多肽EQEDEPEGDYFEWLE),加入ATP温孵,终止反应,用PheraStar FS微孔板测读仪扫描每孔的读数,拟合的曲线计算化合物 $IC_{50}$ 。用类似方法测定并计算化合物对FGFR2和FGFR3的 $IC_{50}$ 。

**2.2 化合物对VEGFR2激酶的脱靶作用** 这是测定化合物的脱靶作用,活性越强,化合物质量越差。384孔板每孔加入一定量的不同稀释度的受试化合物,加入缓冲液和底物(生物素标记的多肽EQEDEPEGDYFEWLE),

以及VEGFR2激酶和ATP温孵,加入含有链氮亲和素(streptavidin)和抗磷酸酪氨酸抗体的缓冲液以终止反应,保温20 min,用PheraStar FS微孔板测读仪扫描每孔的读数,拟合曲线计算化合物的 $IC_{50}$ 。

**2.3 对依赖FGFR细胞的抑制活性** 96孔板的培养液中加入一定量的依赖FGFR细胞,加入系列稀释的受试化合物,温孵3日,加入细胞消化液,用微板测读仪在一定波长下记录读数,拟合曲线确定化合物抑制细胞生长的 $IC_{50}$ 。

## 3 苗头化合物和先导物演化

**3.1 既有抑制剂的结合模式与借鉴分析** Incyte公司启动本项目时,已有机构研究了FGFR抑制剂,Parke-Davis公司发现了化合物**1**(PD173074)具有抑制FGFR1和血管生成的活性,抑制FGFR1的 $IC_{50} \approx 25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,除对VEGFR2抑制的 $IC_{50}$ 约为亚微摩尔浓度外,对其他激酶的活性小1000倍,提示有相当好的选择性,对VEGFR2有活性是因为两个激酶的ATP结合域结构相似的缘故。Incyte研究者分析**1**与FGFR1的晶体结构发现,结构中的3,5-二甲氧基苯基片段在激酶的铰链处的疏水腔内,并发生了氢键结合(与K414和D641的巯基结合),图1是化合物**1**与FGFR1的ATP结合域的晶体结构。挖掘的这个结构信息在苗头演化到先导物过程中成为重要借鉴(Murry CW, Newell DR, Agibaud P. A successful collaboration between academia, biotech and pharma led to discovery of erdafitinib, a selective FGFR inhibitor recently approved by the FDA. Med-

ChemComm, 2019, 10: 1509 – 1511; Mohammadi M, Froum S, Hamb JM, et al. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. EMBO J, 1998, 17: 5806–5904)。

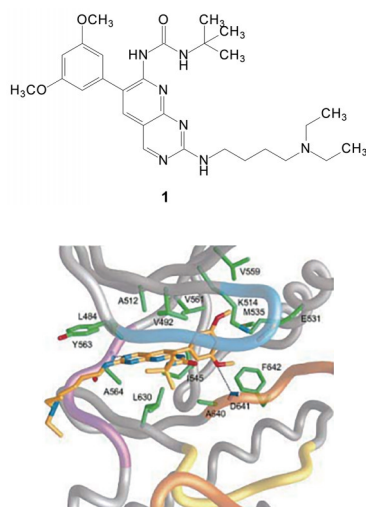


Figure 1 Mode of PD173074 binding to FGFR1

**3.2 苗头化合物和向先导物的演化** Incyte 研究者普筛公司的两万个化合物对 FGFR1 的活性, 发现化合物 **2** 有较高活性, 对 FGFR1 的  $IC_{50} = 6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 但对 JAK2 脱靶活性更强  $IC_{50} < 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 对 VEGFR2 (也是脱靶) 较弱,  $IC_{50} = 2\ 058 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 **2** 作为苗头物演化成先导物 (hit-to-lead) 的过程中, 推测吡啶环与激酶的铰链区经氢键结合, 为提高选择性将前述的 3,5-二甲氧基苯用亚乙基连接, 替换 3 个杂环, 化合物 **3** 对 FGFR1 的

活性有所降低,  $IC_{50} = 83 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 但避免了对 JAK2 的脱靶  $IC_{50} > 10\ 000 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 对 VEGFR2 仍维持低活性。但 **3** 毕竟损失了 10 多倍的活性, 考虑到亚乙基的柔性导致 **3** 的两个甲氧基的位置不能形成优势的氢键, 用并合的环固定其位置, 其中环脲连接二甲氧基苯, 化合物 **4** 提高了对 FGFR1 的活性,  $IC_{50} = 7.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 同时保持了对 JAK2 和 VEGFR2 的低活性。化合物 **4** 定为先导物进行优化。

**3.3 二甲氧基苯环上引入疏水基团** 二甲氧基苯进入的腔是由疏水氨基酸残基构成, 为提高结合力, 在二甲氧基存在 (为形成氢键) 的同时, 环上的不同位置引入亲脂性元素氯或氟 (也为了降低环上的电荷密度), 合成的化合物列于表 1。每个受试化合物测定 FGFR1~3 的活性, VEGFR2 作为脱靶激酶, 以示化合物的选择性, 两株细胞和小鼠体内全血中的 H1581 和 KatoIII 细胞都是 FGFR 诱导的细胞。

分析构效关系如下: ① 2 位 (等同于 6 位) 引入亲脂性氯原子化合物 **5** 提高了对 FGFR 激酶和细胞的抑制活性大约 3 倍, 基本保持了对 VEGFR2 的低活性; ② 6 位再引入氯, 化合物 **6** 进一步提高了抑制酶和细胞的活性, 同时保持选择性; ③ 但第二个氯原子加到 4 位化合物 **7** 的活性显著下降, 所以 4 位不宜有取代基; ④ 2, 6-二氟化合物 **9** 的活性最强, 对离体细胞和血液中 KatoIII 细胞的抑制作用很强。因而, 2,6-二氟-3,5-二甲氧基苯是优选的片段。

**3.4 优化理化性质和药代动力学** 化合物 **9** 有较好的大鼠药代动力学, 例如口服生物利用度  $F = 58\%$ , 半

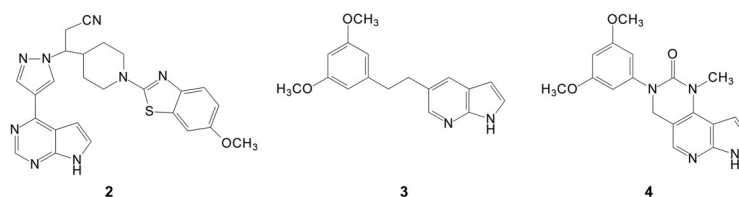


Table 1 SAR investigation of the 3,5-dimethoxyphenyl substituent to improve potency. \*To test KatoIII cell in whole blood

Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Enzyme $IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$				Cell $IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$		WB* $IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
				FGFR1	FGFR2	FGFR3	VEGFR2	H1581	KatoIII	
<b>4</b>	H	H	H	7.5	4.4	5.7	452	40	42	Not test
<b>5</b>	Cl	H	H	1.9	1.4	2.2	131	11	4.3	81
<b>6</b>	Cl	Cl	H	1.1	1.0	1.2	162	4.7	1.8	65
<b>7</b>	Cl	H	Cl	82	97	108	>2 000	538	356	Not test
<b>8</b>	F	H	H	1.1	1.4	1.4	92	5.5	4.7	67
<b>9</b>	F	F	H	0.12	0.15	0.27	24	1.3	0.86	6
<b>10</b>	F	Cl	H	0.17	0.30	0.49	40	0.21	0.13	18

衰期 2.8 h, 以及较低的肝清除率。然而 **9** 的食蟹猴药代动力学不好, 生物利用度只有 15%, 半衰期 1.1 h, 究其原因可能是溶解度低的缘故, 例如模拟肠液的溶解度  $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 因而下一步设计合成的化合物旨在优化溶解性, 变换位点是环脲基的 N-取代基, 合成的化合物列于表 2。

表 3 的数据显示, 尽管用助溶基团替换甲基, 化合物 **11**~**14** 的溶解性仍不如 **9**, 环丙基化合物 **15** 也低, 而且对细胞的抑制活性和药代动力学性质都劣于 **9**, 所以需要另辟他径。

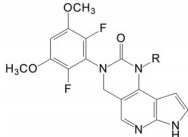
**3.5 氮杂吡啶环的变换** 固定 2,4-二氟-3,5-二甲氧基苯不变, 变换吡咯并吡啶的吡咯环, 由于吡咯环的电荷密度较高, 或许是容易代谢的原因, 因而用吡啶替换吡咯, 得到的化合物 **16** 基本保持了活性, 提高了溶解度, 对大鼠的药代也有所改善, 但食蟹猴的药代仍无改观。化合物 **17** 是咪唑并吡啶为母核, 保持了细胞活性, 溶解性进一步提高, 大鼠药代颇佳, 但食蟹猴的药代仍差强人意。化合物 **18** 和 **19** 的五元杂环是内酰胺环。溶解性虽然不如 **17**, 但仍可达到  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。由于环脲

的电荷密度主要分散到羰基氧上, 因而提高了代谢稳定性, 尤其是 **19** 对猴的生物利用度 ( $F = 74\%$ )。表 3 列出了这些化合物的结构、细胞活性和大鼠与食蟹猴的药代性质。

**3.6 内酰胺环的修饰和引入助溶基团** **19** 的启示使得母核作为内酰胺并吡啶成为新的优化线索, 在 3 位饱和碳上引入对称性基团 (避免出现手性化合物) 以克服分子的平面性, 降低晶格能, 并且在环脲基上继续考察助溶基的影响, 合成的化合物对 FGFR1 酶、3 种细胞系的抑制活性以及溶解度信息列于表 4。

构效关系提示, 在环脲的氮原子上连接极性基团 **21** 和 **22** 降低了细胞活性, 可能是因为过膜性差的缘故。二氟苯基 (**23**) 的活性、药代和溶解性都不错, 但对 CYP3A4 有时间依赖性抑制 (TDI), 有潜在的药物-药物相互作用问题。**23** 和 **24** 都改善了溶解性, 验证了降低分子的平面性和晶格能是提高溶解性的因素。在母核 3 位连接叉环丙基, **25** 的活性很低, 将 N-乙基换成甲基, **26** 的活性不错, 但溶解性差。换成偕二甲基 **27** 或叉吡啶基都使活性下降。所以在 3 位  $\text{sp}^3$  杂化碳上加

Table 2 Modification of urea substitution to improve solubility and PK properties





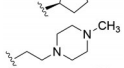
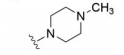

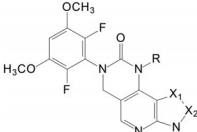
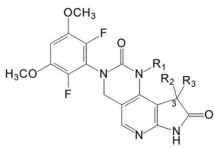
Compd.	R	WB katuIII $\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Sol. in FaFFIF $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Caco-2 $/\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$	Cl $/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	Rat PK		Cyno PK	
						$\text{Cl}/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , HBF/%, $t_{1/2}/\text{h}$ , F/%	$\text{Cl}/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , HBF/%, $t_{1/2}/\text{h}$ , F/%		
<b>9</b>	$\text{CH}_3$	6.0	0.3	6.4	0.5	10/0.82/2.8/58	9/0.09/1.1/15		
<b>11</b>		8.2	4.4	5.1	0.9	42/0.75/1.3/50	Not test		
<b>12</b>		8.6	41	3.3	0.8	41/0.41/0.5/-	Not test		
<b>13</b>		6.8	271	1.0	0.9	51/0.97/4.6/14	Not test		
<b>14</b>		29	Not test	1.9	0.8	21/0.72/9.2/12	Not test		
<b>15</b>		11	11	7.5	0.9	31/0.67/0.90/72	21/0.45/1.1/12		

Table 3 Scaffold hopping to improve PK properties



Compd.	$\text{X}_1-\text{X}_2$	R	WB katoIII $\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Sol. in FaFFIF $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Caco-2 $/\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$	Cl $/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	Rat PK		Cyno PK	
							$\text{Cl}/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , HBF/%, $t_{1/2}/\text{h}$ , F/%	$\text{Cl}/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , HBF/%, $t_{1/2}/\text{h}$ , F/%		
<b>16</b>	CH=N	$\text{CH}_3$	32	4	8.1	0.5	27/0.64/0.8/>100	21/0.4/0.8/21		
<b>17</b>	N=CH	$\text{CH}_3$	22	21	6.8	0.6	29/0.99/1.9/>100	29/0.27/0.9/6		
<b>18</b>	$\text{CH}_2\text{CO}$	$\text{CH}_3$	35	10	3.4	<0.5	34/1.33/1.3/74	12/0.68/2.8/24		
<b>19</b>	$\text{CH}_2\text{CO}$	$\text{CH}_2\text{CH}_3$	20	10	5.7	0.6	11/0.51/1.1/-	11/0.46/2.1/73		
<b>20</b>	CH=N	$\text{CH}_2\text{CH}_3$	18	3	8.3	0.9	20/0.47/0.7/>100	12/0.25/1.6/16		

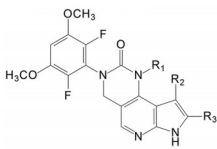
**Table 4** SAR to improve solubility for the lactam series


Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> /R <sub>3</sub>	FGFR1 enzyme IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	H1581 Cell IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	KatoIII Cell IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	WB katuIII IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	Sol. in FaFFIF /μg·mL <sup>-1</sup>
21		H/H	4.4	48	16	Not test	Not test
22		H/H	27	>200	77	Not test	Not test
23		H/H	1.5	18	3.9	25	77
24		H/H	0.2	45	13	Not test	77
25	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		20	>200	38	Not test	Not test
26	CH <sub>3</sub>		0.79	7	2	33	0.3
27	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub>	9.8	>200	106	Not test	Not test
28	CH <sub>3</sub>		21	>200	84	Not test	Not test

入基团是不可取的, 环脲基上也不宜引入极性基团。

**3.7 吡咯并吡啶母核的再探索** 为协调活性、药代和溶解性的共处, 再回到吡咯并吡啶母核的骨架, 对2,3位和环脲的取代基进行结构微调, 合成的化合物列于表5。鉴于环脲的N-取代基不宜有极性基团, 这一轮的化合物固定为N-甲基或乙基。构效关系如下: ① 化合物

**29**的R<sub>2</sub>是甲基吡啶片段, 活性很好, 但因是CYP2C9抑制剂 (IC<sub>50</sub> = 2 μmol·L<sup>-1</sup>), 是潜在的不利因素。考虑到氮杂吡啶的2位 (R<sub>2</sub>) 是伸向溶剂相的区域, 因而将不同的助溶基团连接在2位; ② 甲基吡啶连接在2位, 化合物**30**对多种激酶呈现脱靶作用, 故不足取; ③ 2位引入胺酰基以降低吡咯环的电荷密度, 提高代谢稳定性,

**Table 5** SAR of pyrrolopyridine series to improve PK properties


Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	WB katuIII /IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	Sol in FaFFIF /μg·mL <sup>-1</sup>	Rat PK Cl/L·h <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> , HBF / %, t <sub>1/2</sub> /h, F/%	Cyno PK Cl/L·h <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> , HBF/%, t <sub>1/2</sub> /h, F/%
29	CH <sub>3</sub>	H		18	20	Not test	Not test
30	CH <sub>3</sub>		H	Not test	Not test	Not test	Not test
31	CH <sub>3</sub>		H	6	2	3/0.23/1.2/46	31/0.27/0.6/1
32	CH <sub>3</sub>		H	15	6	23/0.85/1.4/100	17/0.31/0.9/28
33	CH <sub>3</sub>		H	84	44	45/0.32/0.2/15	Not test
34	CH <sub>3</sub>		H	39	472	68/0.51/0.3/-	Not test
35	CH <sub>3</sub>		H	15	372	64/1.0/3.1/6	Not test
36	CH <sub>3</sub>		H	24	942	51/5.12/11.9/49	8/12/26
37	CH <sub>3</sub>		H	16	200	51/0.42/0.7/7	Not test
38	CH <sub>3</sub>		H	29	17	31/1.25/1.4/100	8/0.74/7.9/53
39	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		H	11	11	31/1.85/4.0/>100	8/0.58/10/29

化合物**31**活性和选择性良好,溶解性和大鼠药代也不错,但对食蟹猴的口服利用度仅为1%,半衰期也很短;④虽然**32**的溶解性和食蟹猴的药代有所改善,但进一步改构没有改善;⑤将哌嗪环直接连在2位,化合物**33**的活性有所下降,但溶解性和体外过膜性很好,然而大鼠药代未能改善;⑥用饱和烃基C1~C3连接N-乙基哌啶环,化合物**34~36**溶解性显著提高,动物药代以C1连接的**36**最好,对食蟹猴的口服利用度为26%,半衰期10 h;⑦进而变换哌嗪环为哌啶**37**或吗啉环**38**,后者的溶解性虽然略降,但体内活性显著提高,进而将环脲基的甲基换成乙基,**39**的体外活性提高了3倍,大鼠和食蟹猴体内药代也与**38**相当。

#### 4 候选物确定和培米替尼的批准上市

系统地研究**39**的临床前药理学、药代和药学性质,显示对肿瘤细胞的FGFR1、FGFR2和FGFR3激酶有较高的抑制活性,IC<sub>50</sub>分别为0.4、0.5和1.0 nmol·L<sup>-1</sup>,而对重组人的FGFR4和VEGFR2活性分别为30和71 nmol·L<sup>-1</sup>,提示有较好的选择性。对171种激酶和70种酶、受体和离子通道都没有显示抑制作用。在25 μmol·L<sup>-1</sup>浓度下对CYP各种亚型都没有抑制作用。用膜片钳方法测定对hHEG离子通道抑制作用,在5 μmol·L<sup>-1</sup>浓度下只有9%的抑制率。有较好的药代动力学性质。移植katuIII细胞的小鼠有剂量依赖性的治疗效果。遂确定**39**为候选化合物,定名为培米替尼(pemigatinib),经III期临床研究证明对晚期胆管癌有显著疗效,用于治疗FGFR2基因融合/重排的晚期胆管癌患者。于2020年经FDA批准上市,成为第一个治疗胆管癌的口服靶向药物。

#### 5 培米替尼与FGFR1结合模式

培米替尼与FGFR1的分子模拟(图2)显示,**39**结合于ATP结合域,吡咯并吡啶环与铰链的Ala546的NH和CO形成氢键网络,三环母核与Val492、Leu484和Leu630的侧链形成夹心式的疏水作用,二氟二甲氧基苯与母核呈垂直取向,处于互补的疏水腔中,接近于门户氨基酸Val461。吗啉片段未与激酶接触,进入了水相,起到助溶作用(Wu LX, Zhang CL, He CH, et al. Discovery of pemigatinib: a potent and selective fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor. *J Med Chem*, 2021, 64: 10666-10679)。

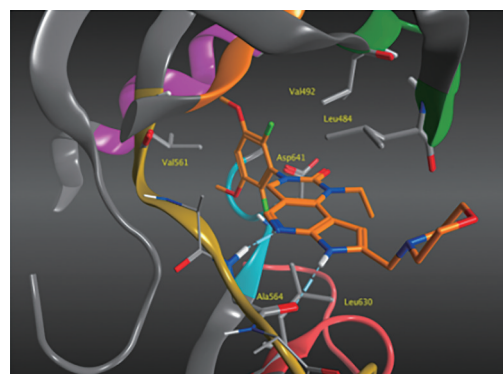
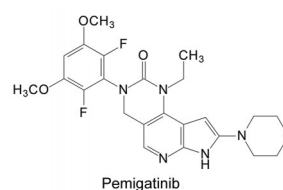


Figure 2 Molecular modeling of the binding mode for pemigatinib with FGFR1