•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。

本品是以低氧诱导因子-2α (HIF-2α) 为靶标治疗透明细胞肾细胞癌 (ccRCC) 的首创性口服药物, 最初由Petolon Therapeutics公司开发, 2019年默沙东高价收购了Petolon Therapeutics公司, 获得了贝祖替凡项目。HIF是Semenza在1992年发现的, 于2019年获诺贝尔医学奖。本品2021年批准上市, 表明基础生物学研究催生了新药的诞生。本品的成功经历了曲折之路, 其先驱化合物终止于I期临床, 是体内代谢失活所致。虽然最终的结构只是先驱物移动了一个氟原子 (同分异构体), 却饱含了研究者应用娴熟的药理、药代、药化和有机知识以及基于蛋白结构设计的技巧。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1388

治疗肾细胞癌的首创性药物贝祖替凡

郭宗儒

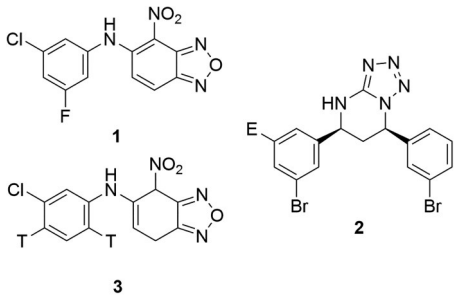
(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

1 靶标

1.1 概述 低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 是2019年诺奖获得者Semenza等在1992年首先发现的, 随后还发现是由HIF-1α和HIF-1β (又称作ARNT) 组成的异源二聚体。调节HIF的氧感应信号主要是脯氨酰羟化酶 (prolyl hydroxylase domain, PHD)。这个发现为靶向调节氧感知通路治疗缺氧相关性疾病提供了重要理论依据。在低氧条件下, PHD的功能受到抑制, HIF-1得以稳定表达, 并与低氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 结合而促进靶基因转录表达。后来又陆续发现了HIF-2和HIF-3。HIF-1普遍存在于人和哺乳动物细胞内, 常氧下 (21% O_2) 也有表达, 但很快被PHD羟化, 羟化后的HIF-1即被称作von Hippel-Lindau蛋白 (VHL, 具有抑癌和E3泛素连接酶性质) 所识别, 从而被泛素−蛋白酶体降解。只有在缺氧条件下HIF-1才可稳定表达。HIF作为转录因子参与许多种疾病的发生和发展, 例如脑瘤、肺动脉高压、铁超载、炎性大肠综合征等。其中HIF-2α是透明细胞肾细胞癌 (ccRCC) 的关键驱动因子, 常常使细胞内的E3连接酶VHL失活, 导致HIF-2α过度蓄积, 因而研制HIF-2α抑制剂是治疗ccRCC的重要途径。

1.2 HIF-2α的结构特征 HIF-2α蛋白结构中含有螺旋−环套−螺旋−PAS-A-PAS-B的折叠域 (HLH-A-B), 其中PAS-B有一个充满水的疏水腔 (Scheuermann TH, Tomchick DR, Machius M, et al. Artificial ligand binding within the HIF2α PAS-B domain of the HIF2 transcription factor. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106: 450−455)。研究发现, 这个疏水腔可以结合小分子化合物, 例如**1**和**2**, 用等温滴定量热法 (ITC) 测定与PAS-B结合的离解常数分别为90和23 nmol·L^{-1}, 从而阻断了HIF2α与HIF-1β结合成二聚体, 失去了转录调节功能 (Rogers JL, Bayeh L, Scheuermann TH, et al. Development of inhibitors of the PAS-B domain of the HIF-2α transcription factor. J Med Chem, 2013, 56: 1739−1747; Scheuermann TH, Stroud D, Sleet CE, et al. Isoform-selective and stereoselective inhibition of hypoxia inducible factor-2. J Med Chem, 2015, 58: 5930−5941)。

1.3 活性评价 由于用ITC测定化合物活性难以实现通量评价化合物活性, 研发者合成了化合物**1**的二氚代类似物**3**, 其活性略有降低 (K_i = 160 nmol·L^{-1}), 受试



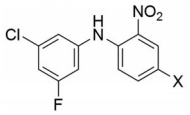
物可与该标记物与PAS-B的复合物发生竞争性结合, 从而用闪烁迫近分析方法 (SPA) 评价受试物的结合力 (IC_{50}), 进行通量评价和分析构效关系 (方法从略)。

化合物的功能评价用两个细胞系进行: 一是ccRCC细胞系786-O, 它的VHL发生了变异, 结构上仍保持HIF-2α的活性, 但没有HIF-1α的活性, 因而该细胞模型评价的是选择性抑制作用; 另一是测定ccRCC细胞分泌血管表皮生长因子A (VEGFA) 的水平, 已经证明VEGFA是ccRCC细胞HIF-2α的靶蛋白, 所以是评价受试物的药理学指标。

2 起始物及其优化

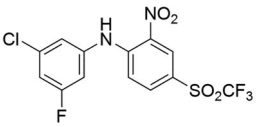
2.1 起始物及取代苯的变换 Petolon公司研制者分析化合物**1**和**2**的结构, 推测两个芳环都是重要的, 结合于PAS-B疏水腔, 所以两个芳环不能缺少。以化合物**1**为起始物, 做出如下的推论: 根据**1**与HIF-2αPAS-B晶体结构, 硝基苯并噁二唑的苯环质心与靶标蛋白的Tyr281羟基氧原子距离为3.28 Å, 苯并噁二唑作为接受电子 (π*) 的片段, 与PAS-B的酪氨酸氧孤电子对 (n) 发生n→π*相互作用, 这些轨道混合释放的能量增加了结合作用 (Singh SK, Das A. The n→π* interaction: a rapidly emerging non-covalent interaction. Phys Chem Chem Phys, 2015, 17: 9596−9612), 为此, 用非环状的亲电性基团替换噁二唑。合成的化合物结构、SPA法测定的活性和基团的Hammett亲电常数 (对位) 列于表1。

Table 1 Replacements to the benzoxadiazole



Compd.	X	SPA method IC_{50}/μmol·L^{-1}	σ_p
1	−	0.49	−
4	SO_2CF_3	< 0.005	0.96
5	SO_2CHF_2	0.016	0.86
6	SO_2CH_2F	0.28	−
7	SO_2NHCH_3	4.2	0.65
8	CF_3	0.28	0.54
9	$CH(OH)CH_3$	12.7	−0.07

分析表1化合物的构效关系, 三氟甲磺酰基 (**4**) 的活性显著强于起始物**1**, 随着取代基的σ_p值变小, 活性减弱, 及至2-羟乙基取代物**9**已无拉电子效应 (σ_p为负值) 活性变得很弱, 提示该取代基与PAS-B发生的n→π*作用很差。图1是化合物**4** (橙色) 与HIF-2αPAS-B的晶体结构放大图, 显示出硝基苯环与Tyr281 (紫色) 和His293 (紫色) 的空间位置。



4

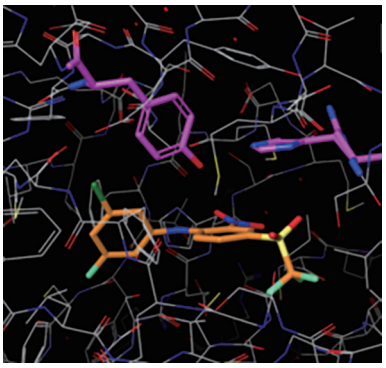
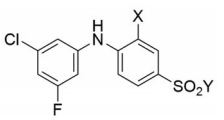


Figure 1 Close-up view of **4** (orange) in the HIF-2α binding pocket with Tyr281 and His293 highlighted (magenta)

2.2 二苯醚为骨架的取代基变换 化合物**4**是活性很强的分子, 但结构中含有苯胺基, 有代谢不稳定的问题。将骨架变成二苯醚, 同时变换硝基和再优化三氟甲磺酰基, 合成的化合物列于表2。构效关系提示: ① **10**与**4**的区别只是连接二苯环的原子不同, 活性相差不多, 说明两苯环的桥连原子可以变换; ② 2位的硝基也可以替换, 拉电子基团仍有利于提高活性; ③ 化合物**17**是突出的化合物, 对细胞的抑制活性最强; ④ 疏水性的大基团取代 (**14**～**16**) 不利于活性, 可能是疏水腔容纳不下的缘故; ⑤ **19**与**11**相比, 二氟甲磺酰的活性损失不多, 但甲磺酰基**20**的活性显著减弱, 可能是拉电子弱的缘故; ⑥ 2位优选的基团是溴原子。

2.3 3位引入亲水性基团 下一步探索3位取代的效应。分析不同的化合物与HIF-2α复合物的晶体结构,

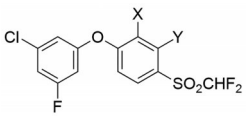
Table 2 SAR of substituted diphenyl ether compounds



Compd.	X	Y	SPA IC_{50}/μmol·L^{-1}	Cell EC_{50}/μmol·L^{-1}	cLog*P*
10	NO_2	CF_3	0.032	−	5.03
11	Br	CF_3	0.17	3.7	6.20
12	Cl	CF_3	0.14	3.3	6.05
13	CN	CF_3	0.034	11.6	5.00
14	CO_2CH_3	CF_3	52.9	−	5.29
15	CO_2NH_2	CF_3	22.6	−	4.01
16	CH_2OH	CF_3	1.2	−	4.53
17	CHF_2	CF_3	0.22	0.24	5.76
18	COOH	CF_3	44.4	−	4.88
19	Br	CHF_2	0.18	2.2	5.03
20	Br	CH_3	4.4	−	4.09

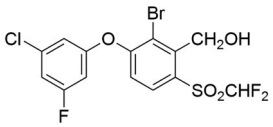
发现His293和Met252残基的侧链有相当大的柔性漂移, 提示在受试物的3位可以连接较大的亲水性基团。基于前面的优化结果, 固定2位为溴或氯取代, 4位是二氟甲磺酰基, 在3位引入亲水性片段, 合成的代表性化合物列于表3。

Table 3 SAR for the introduction of hydrophilic substituents



Compd.	X	Y	SPA IC_{50}/ μmol·L^{-1}	Cell EC_{50}/ μmol·L^{-1}	cLog*P*
21	Br	CH_2NH_2	0.7	–	3.99
22	Br	CH_2NHAc	18.2	–	3.84
23	Br	CH_2OH	0.055	0.33	4.00
24	Cl	CH_2OH	0.046	0.38	3.85
25	Cl	CH_2OCH_3	4.2	–	4.68

结果表明, 与当初设想的并不一样, 蛋白的这一区域对于配体的结合也是特异性的, **21**、**22**和**25**的结构都有碍于结合, 活性较弱或很弱, 而3-羟甲基取代物**23**和**24**对蛋白和细胞的活性都强于3位无取代的**19**。与HIF-2α复合物的晶体结构 (图2) 显示, 化合物**23**结合于蛋白的内腔, 3-位的羟基与His293和经水分子介导与Tyr281形成氢键网络, 增强了结合; 而二氟甲基转动180°, 带动了磺酰基, 拉长了苯环质心与Tyr281的距离为3.55 Å, 不过这种减弱的n→π*相互作用, 被3-位羟基形成的氢键大大地补偿了。



23

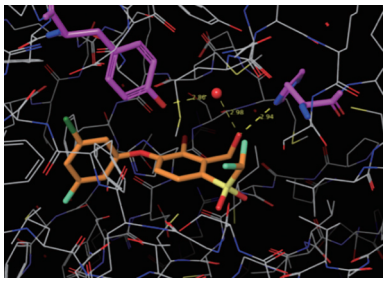


Figure 2 X-ray crystal structure of **23** (orange) in complex with the HIF-2α PAS-B*/ARNTPAS-B* dimer. Tyr281 and His293 are highlighted (magenta). Dotted lines indicate hydrogen bond interactions, and the red sphere denotes a water molecule

3 骨架迁越

化合物**23**是结构优化的关键化合物, 它不仅改善了物化性质, 而且提供了新的结合位点, 即在**23**与HIF-2αPAS-B结合域发生了稳固的氢键网络结合, 从而增加了抑制功能。伯醇基是柔性链, 从分子设计讲, 伯醇基可以同4位或2位环化, 分别形成环砜醇 (二氟甲基提供了连接的可能性) 或茚醇, 将原来柔性的羟基刚性化, 以减少结合热力学的熵损失, 图3是两种环合的路径。

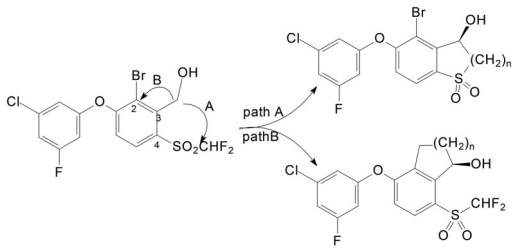
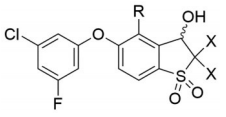


Figure 3 Two paths (A and B) to constrain rotation of the benzyl alcohol

3.1 环砜为骨架的优化 按照上述的路径A环合的五元环砜, 合成的化合物列于表4。分析构效关系可以看出, 化合物**26**由于不含有拉电子的氟原子, 活性低于**23**大约40倍, 这可从含有二氟的化合物**27**对蛋白和细胞都有较强活性得以证明。此外, 处于二氟甲基的α碳的羟基与氟原子发生C—F···H—O的静电引力 (也可认为是氢键), 减少了羟基的溶剂化, 从而降低了为了与蛋白结合去溶剂化的焓损失, 增加了活性。化合物**28**是二甲基化合物, 活性显著低于二氟, 也是这个道理。表4中2位是二氟甲基的化合物**34**对细胞的抑制活性最强, IC_{50}达到0.017 μmol·L^{-1}, 也就是说, 将当初的4-二氟甲基磺酰基成环, 而且将3-羟甲基固定在环戊烷上, 同时将亲电性弱的溴 (σ_p = 0.23) 换作较强的二氟甲磺酰基 (σ_p = 0.86), 全面提升了化合物**34**的质量。

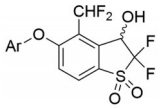
Table 4 Initial SAR of cyclic sulfone scaffold



Compd.	R	X	SPA IC_{50}/μmol·L^{-1}	Cell EC_{50}/μmol·L^{-1}
26	Br	H	2.4	7.2
27	Br	F	< 0.005	0.043
28	Br	CH_3	19.6	–
29	Cl	F	0.020	0.11
30	CH_3	F	0.020	0.34
31	CN	F	0.049	9.2
32	H	F	1.1	–
33	CF_3	F	< 0.005-	0.10
34	CHF_2	F	< 0.005	0.017

3.2 左端芳环的优化 优化到化合物**34**, 还没有对左端的芳环进行变换, 为此, 以**34**为新的起点, 变换左端芳环的取代基, 目标是期望对细胞活性与物化性质(亲脂性适度, 不宜过高) 有最好的适配, 合成的化合物列于表5。结果表明, 化合物**36**适配性最好, 其余化合物要么活性好亲脂性太强 (**34**、**35**), 意味着溶解性和药代有潜在问题, 要么亲脂性较低而活性弱 (**37**、**38**)。将**36**拆分为光学异构体, 发现*R*-**36**是优映体(对蛋白的 IC_{50} < 0.005 μmol·L^{-1}, 对细胞的 EC_{50} = 0.01 μmol·L^{-1}), 而劣映体*S*-**36**对蛋白的 IC_{50} = 1.7 μmol·L^{-1}。

Table 5 SAR of the aryloxy moiety



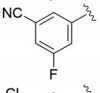
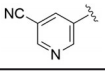
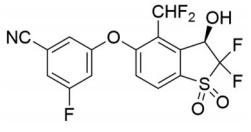
Compd.	Ar	SPA IC_{50}/μmol·L^{-1}	Cell EC_{50}/μmol·L^{-1}	cLog*P*
34		<0.005	0.017	4.89
35		0.011	0.013	4.32
36		0.014	0.032	3.61
37		0.35	0.63	3.34
38		0.14	0.18	2.17

图4是化合物*R*-**36**与HIF-2*α*PAS-B*/ARNT PAS-B二聚体的晶体结构局部放大图, 其结合模式与前述的**23**相似 (图2), 只是苯环的质心与Tyr281的距离拉近了 (3.30 Å), 而且也证实了2位碳的*R*构型可与Tyr281和His293形成氢键网络。



R-**36**

3.3 茚醇系列的初始变换 将化合物**23**的3位羟甲基向2位环合, 失去溴原子, 形成茚醇的骨架, 并在2位作取代, 合成的化合物列于表6。分析构效关系如下: ① 2位没有取代的化合物**39**对蛋白和细胞的活性都不错, 因含有手性碳, 拆分后*S*-**39**显著强于*R*构型, 提示羟基参与结合, 它的空间取向很重要; ② 2,2-二氟化合物**40**的细胞活性提高了10倍, 但亲脂性大约提高了1倍 (0.28log单位); ③ 化合物**41**是将氯原子换成氰基, 亲脂性显著降低, 活性也不错, 拆分后的*S*-**40**细胞活性 IC_{50}达到0.006 μmol·L^{-1}; ④ (*S*)-**42**是将二氟甲基换成三氟甲基, 活性没有变化, 但亲脂性增加了10多倍; ⑤ 有显著优点的是 (*S*)-**44**, 是不含氟的甲基砜, 虽然略损失了一些活性, 但亲脂性大大降低, cLog*P* = 1.84, 预示有良好的物化性质; ⑥ (1*S*,2*R*)-**46**氟和羟基呈顺式构型, 活性显著强于 (1*R*,2*S*)-**46**反式物, 后者不能发生分子内的C−F···H−O静电相互作用; ⑦ 羟基四氢萘骨架 (**47**) 活性弱, 左端为氯代吡啶的化合物**48**却活性很好, 助溶性也比较适中。

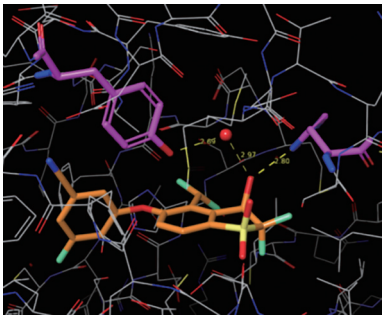
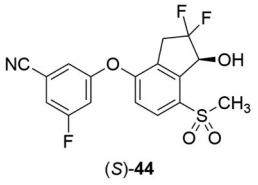


Figure 4 The X-ray crystal structure of *R*-**36** (orange) in complex with the HIF-2*α*PAS-B*/ARNT PAS-B dimer. Tyr281 and His293 are highlighted (magenta). Dotted lines indicate hydrogen bond interactions, and the red sphere denotes a water molecule

化合物 (*S*)-**44**与HIF-2*α*PAS-B*/ARNT PAS-B的晶体结构显示, 在疏水腔的定位与图2的**23**和图4的*R*-**36**基本一致, 羟基与Tyr281和His293形成氢键网络, 如图5所示。



(*S*)-**44**

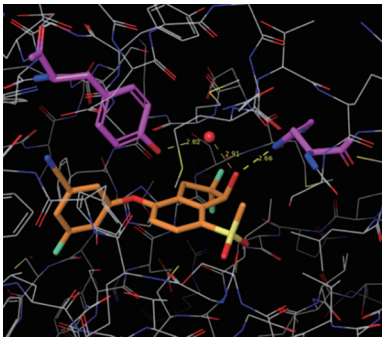
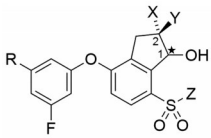
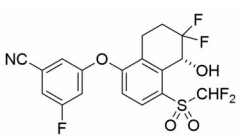


Figure 5 The X-ray crystal structure of (***S***) **-44** (orange) in complex with the HIF-2*α*PAS-B*/ARNT PAS-B dimer. Tyr281 and His293 are highlighted (magenta). Dotted lines indicate hydrogen bond interactions, and the red sphere denotes a water molecule

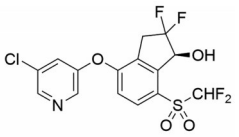
Table 6 SAR of the compounds with indanol scaffold



39–46



47



48

Compd.	R	X	Y	Z	SPA IC_{50}/μmol·L^{-1}	Cell EC_{50}/μmol·L^{-1}	cLog*P*
(±)-**39**	Cl	H	H	CHF_2	< 0.005	0.18	3.78
(*R*)-**39**	Cl	H	H	CHF_2	< 0.005	0.11	3.78
(*S*)-**39**	Cl	H	H	CHF_2	0.46	2.9	3.78
(±)-**40**	Cl	F	F	CHF_2	< 0.005	0.020	4.06
(±)-**41**	CN	F	F	CHF_2	0.01	0.015	2.78
(*S*)-**41**	CN	F	F	CHF_2	< 0.005	0.006	2.78
(*S*)-**42**	CN	F	F	CF_3	< 0.005	< 0.005	3.95
(*S*)-**43**	CN	F	F	CH_2F	< 0.005	0.009	2.01
(*S*)-**44**	CN	F	F	CH_3	0.012	0.027	1.84
(*S*)-**45**	CN	F	F	C_2H_5	0.031	0.088	2.37
(1*S*,2*R*)-**46**	CN	H	F	CH_3	0.041	0.039	1.39
(1*R*,2*S*)-**46**	CN	F	H	CH_3	0.35	0.49	1.39
47		–			3.6		2.40
48		–			0.060	0.065	2.42

4 高活性化合物的体内药效学和药动学比较

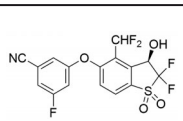
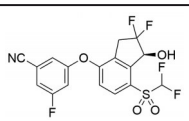
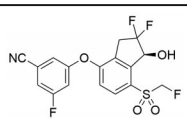
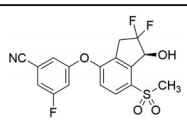
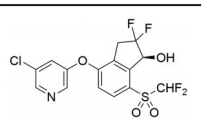
选择对细胞有高活性低亲脂性的化合物*R*-**36**、*S*-**41**、*S*-**43**、*S*-**44** 和 **48**, 评价了对细胞分泌 VEGFA 的能力, 穿透细胞能力、血浆蛋白结合率、对小鼠肝微粒体的稳定性, 以及小鼠的药代动力学 (表 7), 其中 *S*-**44** 抑制 VEGFR 分泌的活性最好, 而且较低的脂溶性和蛋白结合率补偿了体内活性。5 个化合物都有较高的口服生物利用度, 中等或较低的清除率。

进而用 786-O 移植肿瘤小鼠评价 PD/PK, 从中优化出 *R*-**36** 和 *S*-**44**, 用犬评价药动学, 最大的区别是 *R*-**36** 的羟基可发生氧化代谢, 生成 *α*,*α*-二氟代酮, 是一个强亲电性基团, 而 *S*-**44** 在体内不发生氧化。因而将其定为候选化合物, 代号为 PT2385, 进入临床试验阶段。然而临床效果却差强人意 (When PM, Rizzi JP, Dixon DD, et al. Design and activity of specific hypoxia-inducible factor-2*α* (HIF-2*α*) inhibitors for the treatment of clear cell renal cell carcinoma: discovery of clinical candidate (*S*)-3- ((2, 2-difluoro-1-hydroxy-7- (methylsulfonyl) -2, 3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)oxy) -5-fluorobenzonitrile (PT2385). J Med Chem, 2018, 61: 9691−9721)。

5 进一步结构优化

5.1 PT2385临床药代的不足 PT2385 (*S*-**44**) 临床I期发现, 患者口服 800 mg 的血药浓度属于中等或低暴露量, 曲线下面积明显低于中等暴露量, 因而临床治疗效果不佳。血药浓度属于低暴露量估计是口服后的首过效应所致, 因为与人肝微粒体或肝细胞温孵, 对

Table 7 Functional cell activity and mouse PK parameters for typical inhibitors. a: 3 mg·kg^{-1} intravenous dose; b:10 mg·kg^{-1} oral dose

Property					
	R-**36**	*S*-**41**	*S*-**43**	*S*-**44**	**48**
VEGFA EC_{50}/nmol·L^{-1}	16	14	20	41	37
Mouse PPB/%	89	94	89	74	94
Free fraction EC_{50}/nmol·L^{-1}	145	233	182	158	617
12 h plasma conc./ μmol·L^{-1}	0.22	0.38	1.10	0.46	0.56
CL(mouse)/mL·min^{-1}·kg^{-1}	5.9	32.2	26.9	19.9	20.1
P_{app}(A→B)/nm·s^{-1}	26	28.4	27.3	29.8	27.9
(B→A)/(A→B)ratio	0.82	0.63	1.04	0.91	0.83
CL[a]/mL·min^{-1}·kg^{-1}	70.6	34.3	32.3	29.2	58.2
AUC_{0-t}[b]/h·μmol·L^{-1}	6.10	7.30	9.46	16.43	5.44
VSS[a]/L·kg^{-1}	9.5	7.4	12.6	7.0	25
$t_{1/2}$[b]/h	6.5	7.3	5.5	3.3	5.3
F[b]/%	110	67	91	110	101

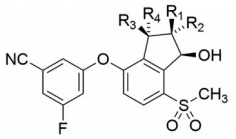
PT2385清除率分别为22%和44%。经LC-MS分析代谢产物是羟基与葡萄糖醛酸的轭合物 **49** (PT2639)。后者对HIF-2α抑制活性非常低, IC_{50} > 100 μmol·L^{-1}。图6a是在UDP-葡醛酸转移酶作用下生成PT2639; 图6b是一次口服PT2385在24 h的PT2385和PT2639血浆平均浓度变化, 后来证明在小肠中的首过效应使得PT2385在血液中暴露量很低 (数据从略)。

5.2 PT2385的再优化 分析PT2385与HIF-2αPAS-B*/ARNTPAS-B*的晶体结构, 发现羟基的存在非常重要, 不仅经水分子介导与Tyr281形成氢键, 还与His293有氢键结合, 在形成氢键网络之际, HIF-2α的Met252、His293和Tyr278被迫发生移动, 从而与HIF-2α的Tyr278和ARNT的Phe446发生碰撞, 影响了二聚体的生成, HIF-2α失去了转录活性。羟基也是有利的助溶基团。

另一方面, 作为SN2反应PT2385的葡醛酸苷化, 取决于羟基的亲核性, α,α-二氟代有利于羟基的离解而发生葡醛酸苷化, 但同时也有利于二氢茚的苯环质心与Tyr281的氧原子发生n→π*静电作用。为了既保持n→π*作用又避免葡醛酸的轭合作用, 将两个α,α-二氟原子分开或单氟化物, 合成的化合物列于表8。分析构效关系如下: ① 化合物 **50** 茚醇上无氟取代, 与PT2385 (*S*-**44**) 的生化或细胞活性相比, 分别降低了6和30倍, 提示氟元素存在的必要性; ② 单氟取代的 **51** 和 **52** 处于羟基的α位, 为局域异构体, 顺式体 (**51**) 的细胞活性与*S*-**44**相近, 而反式体 (**52**) 低于顺式体大约10倍; ③ 氟原子在苄基位置单取代的顺式体 (**53**) 活性与无氟取代的 **50** 相近, 而反式体 (**54**) 活性很差。可认为顺式体可发生前已述及的C−F···H−O的氢键作用; ④ 化合物 **55** α,β-二氟取代物都与羟基呈顺式构型, 对细胞的抑制活性强于*S*-**44**大约2倍, 而差向异构体 **56** 的活性低于 **55** 大约200倍。化合物 **57** 是苄基上的偕二氟物, 活性更差。

5.3 化合物的葡醛酸苷化的酶动力学研究 化合物的羟基被葡醛酸苷化失去活性, 该首过效应发生在小肠, 需要优选出没有或较低的II相代谢。用人小肠微粒体 (HIM) 和UGT2B19重组酶评价高活性化合物 (*S*-**44**、**50**～**53** 和 **58**) 的酶动力学, 测定不同浓度下这些受试物的V_{max}和K_m, 结果列于表9。构代关系提示, **58** 为三氟取代, 葡醛酸苷化的速率最高, 具有最大的V_{max}和最小的K_m值, 原因是协同拉电子使羟基离解, 容易发生SN2反应。**52** 是反式氟代醇也有较高的葡醛酸苷化速率, 比顺式氟代醇代谢快4倍 (HIM) 和5倍 (UGT2B17)。化合物 **55** 和 **51** 的代谢速率显著低于*S*-**44**, 这可解释为 **55** 和 **51** 没有反式的α-氟代醇的结构, 羟基亲核性弱的缘故。

Table 8 SAR of fluorosubstituted indanols



Compd.	R_1	R_2	R_3	R_4	SPA IC_{50}/μmol·L^{-1}	Cell EC_{50}/μmol·L^{-1}
S-**44**	F	F	H	H	0.012	0.027
50	H	H	H	H	0.16	0.93
51	F	H	H	H	0.041	0.039
52	H	F	H	H	0.35	0.49
53	H	H	F	H	0.21	0.46
54	H	H	H	F	> 10	–
55	F	H	F	H	0.009	0.011
56	F	H	H	F	1.9	1.9
57	H	H	F	F	6.5	–
58	F	F	F	H	0.009	0.004

6 候选物的确定

6.1 化合物55与*S*-44的比较 化合物 **55** 可视作*S*-**44** 的将偕二氟反式的氟原子迁移到苄基碳上, 并与羟基呈顺式构型, 导致 **55** 有诸多的优胜因素: 药效学上对HIF-2α的抑制活性提高了近两倍, 对VEGFA的抑制提高了近3倍; 药动学上与血浆蛋白的结合率的降低, 是因为分子极性增加的缘故, 游离分子与细胞活性相协同, 更显示 **55** 的体内有效性, 代谢转化的速率也明显低于*S*-**44**; 在物化性质上, 亲脂性降低也增加了代谢稳定性。表10列出了 **55** 和*S*-**44** 的主要参数, 可以看出

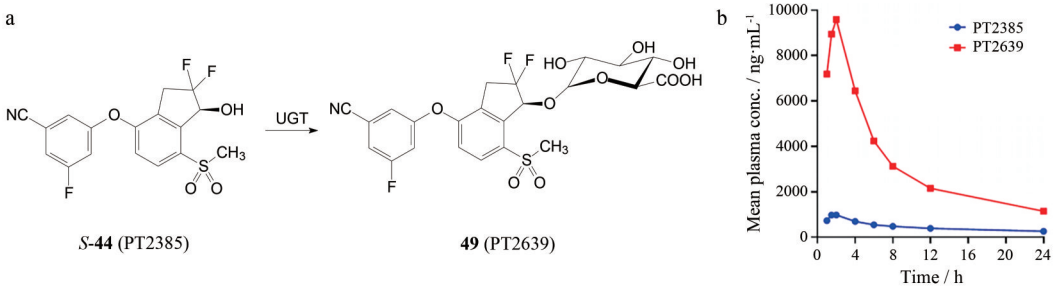
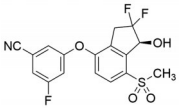
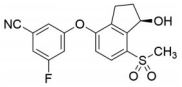
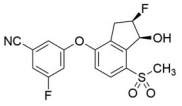
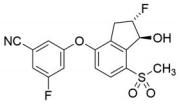
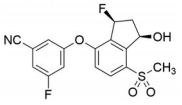
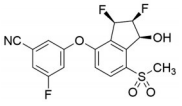
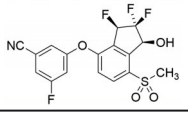


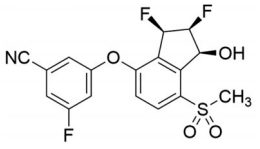
Figure 6 (a) Structure of the glucuronide metabolite **49** (PT2639). (b) Mean plasma concentration of PT2385 and PT2639 after single oral administration of 800 mg of PT2385

Table 9 Enzyme kinetic parameters for the metabolism of representative indanols in human intestinal microsomes (HIM) and UGT2B17 supersomes

Compd.	Structure	HIM		UGT2B17	
		V_{max}/(pmol·min^{-1})·mg^{-1}	K_m/μmol·L^{-1}	V_{max}/(pmol·min^{-1})·mg^{-1}	K_m/μmol·L^{-1}
S-**44**		49	20	280	11
50		0.8	40	3.8	12
51		2.1	28	14	15
52		11	26	50	15
53		0.3	130	1.4	12
55		0.5	15	4.7	10
58		72	15	440	5.5

55优于 *S*-**44** (Xu X, Wang KS, Rizzi JP, et al. 3-[(1*S*,2*S*,3*R*)-2,3-Difluoro-1-hydroxy-7-methylsulfonylindan-4-yl]oxy-5-fluorobenzonitrile(PT2977), a hypoxia-inducible factor 2*α* (HIF-2*α*) inhibitor for the treatment of clear cell renal cell carcinoma. J Med Chem, 2019, 62: 6876−6893)。

6.2 候选物的确定和贝祖替凡上市 化合物**55**在许多方面超越了 *S*-**44**, 研发公司 Peloton Theraprutics 确定其代号PT2977, 进行临床前开发研究。后于2019年公司被默沙东收购, **55**定名为贝祖替凡 (belzutifan), 进行临床研究, 基于II期临床的卓越疗效, 美国FDA提前于2021年8月批准上市, 作为首创的HIF-2*α*靶向药物, 用于治疗无需立即手术的、与希佩尔·林道综合征 (Von Hippel-Lindau disease, VHL 综合征, VHL 病) 相关的透明细胞肾细胞癌 (ccRCC) 患者。



Belzutifan (MK-6482, PT2977)

Table 10 *In vitro* and *in vivo* profile of compounds **55** and *S*-**44**

Parameter	*S*-**44**	**55**	Parameter	*S*-**44**	**55**
log$D_{7.4}$	2.2	1.2	$t_{1/2}$/h (dog/monkey)	11/–	14/9.2
Luciferase EC_{50}/nmol·L^{-1}	27	11	CL_p/(mL·min^{-1})·L^{-1} (dog/monkey)	21.5/–	1.3/3.5
VEGFA EC_{50}/nmol·L^{-1}	46	17	*F*/%	86	–
Plasma protein binding /% bound in human/mouse	82/71	52/56	AUC_{last}/h·μmol·L^{-1} (dog/monley)	7.2/3.1	60/31
Free fraction adjusted EC_{50}/ng·mL^{-1}	95	13	Free fraction adjusted EC_{50}/ng·mL^{-1}	540	75