

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。

本品通过借鉴文献报道的复合物晶体结构,经骨架迁越设计了新的结构类型。充满化学意味的是,利用脲基嘧啶基发生较牢固的分子内氢键,以假芳香并环模拟了ATP的嘌呤环,赋予了化合物的结构新颖性,也有利于化学合成。四取代苯的优化也包含了有机和药化的知识内容,将活性、选择性、药代与物化性质结合的臻于完美,成为同年批准的第二个针对FGFR的治疗胆管癌的口服治疗药。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1422

治疗胆管癌的第二个药物英菲格拉替尼的研制

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 靶标

人体成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 家族属于受体酪氨酸激酶,有4种亚型FGFR1~4,同源性很高。每一种受体由3部分组成:胞外配体结合域、单链跨膜域和分离的酪氨酸激酶域以及酪氨酸自磷酸化位点。FGFR与其配体成纤维细胞生长因子 (FGF) 有高度亲和力,结合后调控细胞增殖、迁移、凋亡和分化,并参与机体的发育和生长。许多肿瘤的发生发展与FGFR或FGFs变异或过度表达相关,因而业界自然将FGFR作为研制抗肿瘤药物的靶标。并聚焦于FGFR激酶域的ATP位点,多数激酶都有ATP结合域,所以选择性作用是成功的关键因素。

启动本项目是诺华公司研究者分析了流行病学数据,发现膀胱癌的病理学与FGFR3的异常呈主要的关联因素,因而将靶标聚焦于FGFR3,但首先批准本品上市的适应症是胆管癌,可见FGFR的突变不只是在膀胱癌。用放射性标记ATP的生化方法评价化合物对FGFR3激酶的抑制活性 (IC_{50}),以及用依赖于FGFR3的BaF3细胞评价化合物对细胞增殖的抑制活性 (EC_{50})。

2 苗头化合物和骨架迁越

诺华公司研制c-Src和EGFR等抑制剂,苗头化合物1母核是嘧啶并吡啶酮,为了赋予结构的新颖性。用模型分子4-(N^3 -甲基)脲基嘧啶作量子化学计算,发现假环状物B比伸展型结构A更趋于稳定,是因为生成了分子内氢键的缘故,如图1所示。

对1的母核作骨架迁越,用开环的4-脲基嘧啶替

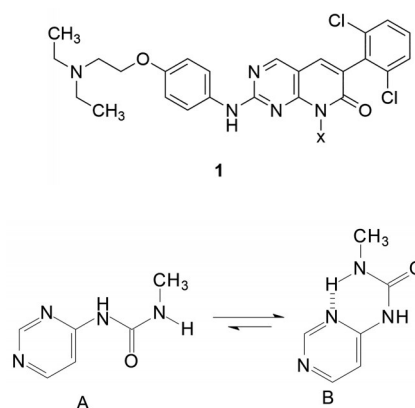


Figure 1 Model compound studied by *ab initio* calculations. Using the DFT-B3LYP/6-31G** method, the pseudo cyclic conformation B is predicted to be more stable than the extended conformation A

换嘧啶并吡啶酮,认为4-脲基嘧啶是嘧啶并吡啶酮的环状等排体,所构建的分子的药效团位置、构型和构象是相同的,同时也简化了合成,赋予了分子结构的新颖性。合成的化合物2仍保持对激酶亚微摩尔的抑制活性。例如2对FGFR1的抑制 IC_{50} 值为 $0.57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Furet P, Caravatti G, Guagnano V, et al. Entry into a new class of protein kinase inhibitors by pseudo ring design. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 897–900)。

3 化合物优化

3.1 借鉴其他化合物晶体结构 诺华公司的研制者在启动本项目时分析了流行病学数据,发现多数膀胱

癌组织 FGFR3 过高表达, 提示以 FGFR3 为靶标研制抗膀胱癌的靶向药物。化合物 **2** 对 FGFR1 有较高的活性, 推测对 FGFR3 也有近似的活性。

为了对 **2** 进行结构变换, 借鉴了帕克戴维斯公司的化合物 **3** (FGFR1: $IC_{50} = 19 \sim 28 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 FGFR1 的晶体结构提供的信息。表明 **3** 定位于 ATP 结合腔中, 嘧啶并吡啶与二甲氧基苯的构象呈垂直取向。与 FGFR1 空蛋白比较, 移动最大的残基侧链是 Lys514, 使得两个甲氧基得以进入 ATP 背后的疏水裂隙中, 这个裂隙在 ATP 的类似物 AMP-PCP 与 FGFR1 晶体结构中没有被占据。疏水裂隙是由 Lys514、Glu531、Met535、Ile545、Val559、Val561、Ala640 和 Phe64 的侧链构成, 而且其中一个氧原子还同 Asp641 形成氢键, 如图 2 所示 (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: 5896–5904)。

3.2 结构变换 设计合成的化合物 **2** 的变换部位是在苯环上引入甲氧基, 以提高疏水结合和氢键结合力, 左端的叔胺链是助溶基团, 由于没有与蛋白结合, 也作了较大的变换, 用烷胺苯胺基替换烷乙氧基, 叔胺也作了变换。合成的化合物及其活性列于表 1。

分析构效关系如下: ① 化合物 **4** 的右端苯环在

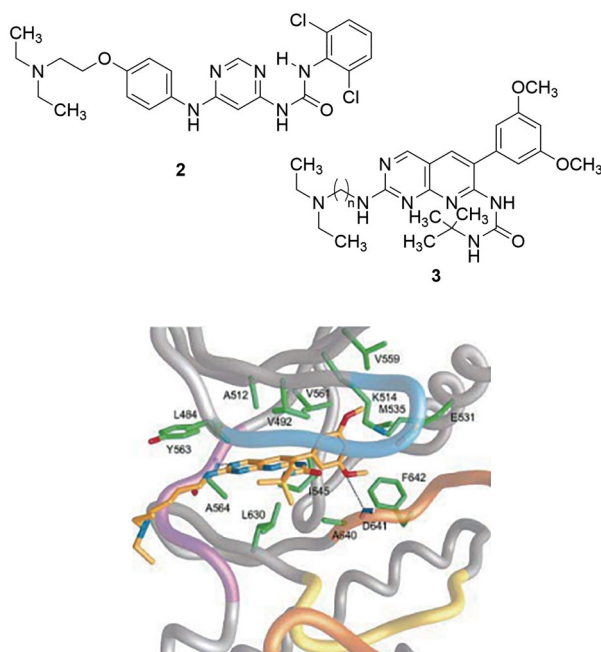


Figure 2 Crystallography of compound **3** with FGFR1

2,6 位没有取代基, 虽然引入了 3,5-二甲氧基, 但该片段可以自由转动, 为固定成与脲基嘧啶 (分子内氢键形成假并环) 垂直构象, 实现二甲氧基苯发生疏水性结合需要耗费能量, 量子化学计算能耗为 $1.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 因而活性显著降低是预料到的。② 在 2-位引入氯原

Table 1 Structures and FGFR3 biochemical and cellular potencies of *N*-aryl-*N*-pyrimidin-4-yl ureas. a: GFGR3-K650E kinase inhibition; b: BaF3-TEK FGFR cell proliferation inhibition

Compd.	Structure	$IC_{50} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		Compd.	Structure	$IC_{50} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
		FGFR3 ^a	Cell ^b			FGFR3 ^a	Cell ^b
4		505	1 512	11		5	2
5		125	635	12		9	2
6		66	832	13		16	28
7		115	750	14		11	27
8		840	2 223	15		7	14
9		51	126	16		20	14
10		54	118	17		19	11

子的化合物 **5**, 一定程度改善了垂直取向和提高了疏水结合, 因而生化和细胞活性分别提高了 4 和 2.5 倍。
 ③ 化合物 **5** 脲基上的 N-CH₃ 换成 N-H (**6**) 或 N-C₂H₅ (**7**), 虽然生化活性有所提高, 但细胞活性与 **5** 差不多。
 ④ 化合物 **8** 是去除 **6** 的 3-甲氧基, 即苯环上只有一个氯和一个甲氧基取代, 对蛋白和细胞活性都显著降低, 而再引入 6-氯 (**9**) 或 6-氯-N-甲基 (**10**) 活性明显提高, 说明 2,6-二氯取代, 有助于维持苯环的垂直取向, 增加了活性, 对细胞增殖的抑制活性达到 100 nmol·L⁻¹。
 ⑤ 当苯环为 2,6-二氯-3,5-二甲氧基取代时, 化合物 **11**~**17** 的活性都很强, 即或改变助溶基团的连接位置也不影响活性, 这是因为既维持了苯环对脲基嘧啶(假并芳杂环)的垂直构象, 降低了去共面的能耗, 也增加了疏水性作用和氢键结合。

4 评价高活性化合物对氧化酶的影响

评价高活性化合物 **11**~**17** 对 5 种重要的药物代谢酶 (CYP) 的抑制作用, 选择不会引起药物-药物相互作用的化合物, 方法是在各自底物的存在下, 实验化合物的半数抑制浓度, 其中 CYP3A4 用两种底物测定, 是因为这个最常见的药物代谢酶有两个代谢位点。实验结果列于表 2。

表 2 结果显示, 只有化合物 **11** 对这 5 种 CYP 亚型

Table 2 Profile of compounds **11**–**17** in a panel of human cytochrome P450 isozymes. BFC: 7-Benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin; DBF: Dibenzylfluorescein; MFC: 7-Methoxy-4-trifluoromethylcoumarin; CEC: 3-Cyano-7-ethoxycoumarin; AMMC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin

Compd.	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹					
	3A4/BFC	3A4/DBF	2C9/MFC	2C19/CEC	2D6/MMFC	1A2/CEC
11	>10	>10	>10	>10	>10	>10
12	1.1	>10	1.7	0.9	>10	>10
13	>10	2.5	>10	>10	>10	>10
14	1.0	>10	>10	3.6	>10	>10
15	1.2	6.0	4.0	1.1	>10	>10
16	0.5	>10	>10	0.3	>10	7.0
17	<0.1	2.5	>10	1.4	>10	>10

都未显示抑制作用, IC₅₀ > 10 μmol·L⁻¹, 预示 **11** 在体内较少引起药物-药物相互作用。

5 候选化合物的选择和英菲格拉替尼上市

化合物 **11** 的活性强, 对重要 CYP450 无抑制作用, 进而在细胞水平上评价 **11** 对 FGFR1~3 的选择性抑制作用, 表 3 列出了对高表达相关激酶的 BaF3 细胞抑制活性。结果显示化合物 **11** 只对包括变异和近膜区在内的 FGFR1~3 高表达的 BaF3 细胞有抑制活性, 而对其他激酶高表达的细胞活性很弱, 提示在细胞水平 **11** 也具有选择性。

Table 3 Selectivity of **11** in a panel of BaF3 cells. Q indicates presence of juxtamembrane domain in the TEL-kinase construct

BaF3 cell	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	BaF3 cell	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
FDFR3	2.0	VEGFR2-Q	938
FGFR3-Q	0.7	VEGFR1-Q	1 510
FGFR ^{K650E}	52.2	VEGFR3-Q	2 072
FDFR1	2.9	BCR-ABL	2 192
FGFR2-Q	2.0	KIT-Q	2 501
VEGFR2	1 449	LYN	3 019

11 的大鼠药代动力学研究提示, 口服生物利用度 $F = 51%$, 血浆消除半衰期 $t_{1/2} = 4.8$ h, 清除率 $CL = 3.6$ L·h⁻¹·kg⁻¹ (其余数据从略)。

化合物 **11** 确定为候选化合物, 定名为英菲格拉替尼 (infigratinib), 经系统的临床前和临床研究, 表明是治疗不可切除的局部晚期或转移性成人胆管癌的口服药物, 于 2020 年 11 月经 FDA 批准上市, 是继 2020 年 4 月美国 FDA 批准培米替尼 (pemigatinib) 后第二个治疗胆管癌的靶向口服向药物。

6 英菲格拉替尼与 FGFR3 的结合模式

基于英菲格拉替尼 (图 3a) 与 FGFR1 的晶体结构 (图 3b) 和 FGFR3 与 FGFR1 的较强同源性, 将英菲格拉替尼与 FGFR3 作分子对接 (图 3c), 与 FGFR1 的结合模式基本相同, 概述如下: ① 四取代苯与脲基嘧啶假环 A 呈垂直构象, 这样稳固的构象是 2,6-二氯阻碍了芳环的共轭趋向所致。② 两个氯原子分别与门户氨基

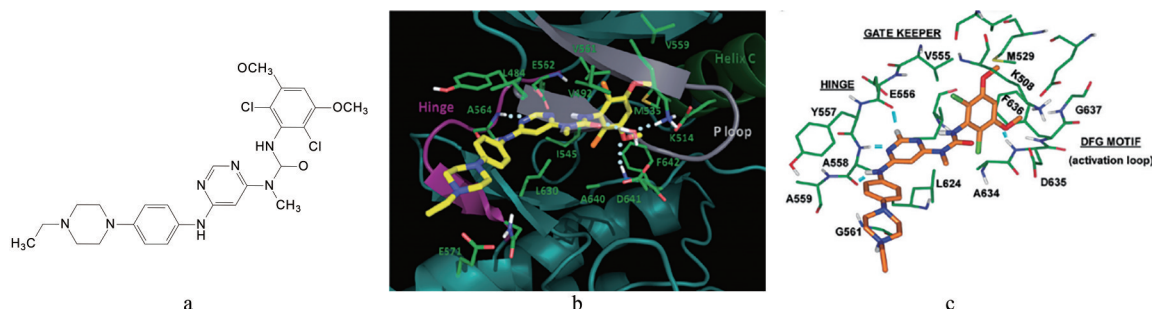


Figure 3 a: Structure of infigratinib; b: Crystallography of infigratinib with FGFR1; c: Docking of infigratinib to FGFR3. The dotted lines denote hydrogen bindings

酸 Val555 和 Ala634 发生有利的接触, 而 VEGF 相当于 Ala634 的残基是半胱氨酸, 后者体积过大, 与氯原子发生碰撞, 耗费的能量导致难以与 VEGFR 结合, 提高了抑制剂的选择性。③ 5-甲氧基的氧原子与活化态的 DFG 环套的 Asp635 形成氢键, 甲基与 Phe636 的芳环发生疏水作用。3-甲氧基与 Met629 接近, 发生疏水相互作用。④ 甲基哌嗪环伸向溶剂相, 是没有参与结

合的助溶基团 (Guagnano V, Furet P, Spanka C, et al. Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea(NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. J Med Chem, 2021, 54: 7066-7083)。