

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。

治疗艾滋病的上市药物有3类:核苷类或非核苷类抑制剂、蛋白酶抑制剂和整合酶抑制剂。利托那韦 (ritonavir) 是较早 (1996年) 应用针对蛋白酶的抑制剂,迄今仍在应用。本品基于HIV蛋白酶具有C2对称轴的二聚体结构和剪切底物蛋白位点的结构特征,设计水解肽键的过渡态类似物,由对称性分子作起始物,评价化合物的抑制酶活性、抑制感染HIV病毒细胞的活性、溶解性、代谢稳定性和包括口服生物利用度在内的药代性质,演变对称分子为非对称结构,引入极性的亲水基团 (有助于溶解性),调整疏水-亲水以利于过膜性,以及组成分子的结构元件的不同组合,优化体内外活性,最终成功于利托那韦的批准上市。利托那韦也是细胞色素P450 3A4的强效抑制剂,小剂量的利托那韦与另一个HIV蛋白酶抑制剂洛匹那韦制成固定的复方制剂 (商品名克力芝) 是治疗艾滋病的口服一线用药。此外,2021年12月FDA批准上市的抗新冠肺炎病毒药物帕洛韦 (paxlovid) 也是用小剂量的利托那韦作为CYP 3A4的抑制剂与首创药物奈玛特韦 (nirmatrevir) 合用,加强了治疗效果。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0140

基于蛋白酶结构的抗HIV药物利托那韦的研制

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 引言

人免疫缺陷病毒编码的天冬氨酸蛋白酶 (HIV protease), 其功能是对 *gag* 和 *gag-pol* 基因产物多聚蛋白进行裂解处理, 使成为成熟的功能性蛋白, 随之新生的病毒颗粒由无传染性的形态转化成熟。该蛋白酶中的天冬氨酸残基是催化中心, 对病毒的成熟和复制周期至关重要。这个蛋白酶的结构特征是具有C2对称轴的同二聚体, 活性中心是由每个单体提供一个 Asp-Thr-Gly 催化三元体 (triad)。HIV蛋白酶与抑制剂复合物的三维结构是研制抗艾滋病药物的重要依据。雅培公司研制本品的目标, 是可以口服吸收的抑制剂, 克服已有的拟肽类化合物口服吸收差和代谢不稳定的缺陷。

2 设计原理

HIV蛋白酶是具有C2对称轴的二聚体, 裂解的蛋白底物也具有对称性, 因而设计的抑制剂自然也具有对称性以适配活性中心的结构。分析肽键的水解机制, 是通过酶的三元体活化水分子向特定的肽键作亲核加成, 羰基形成偕二醇, 此过程是由 sp^2 杂化的羰基碳变成 sp^3 的四面体结构的过渡态。由于过渡态与活性中心结合力甚强, 研究者设计了模拟过渡态的羟基胺化合物 **1** 和 **2**, 如图 1 所示 (Kempf DJ, Codacovi L, Wang

XC, et al. Symmetry-based inhibitors of HIV protease. Structure-activity studies of acylated 2, 4-diamino-1, 5-diphenyl-3-hydroxypentane and 2, 5-diamino-1, 6-diphenyl-hexane-3,4-diol. J Med Chem, 1993, 36: 320-333)。

2.1 对称的拟肽化合物 含有单羟基 (**1**) 和双羟基 (**2**) 化合物的初始修饰是用苄氧羰基保护的缬氨酸 (Cbz-Val) 同时酰化两个氨基, 分别得到对称型化合物 **3**~**6**, 测定活性和溶解性列于表1。这4个化合物的抑制酶活性都很强, 但**3**对感染HIV细胞未显示活性, 而双羟基化合物的活性可达到亚纳摩尔水平, 并且手性碳的构型变化对细胞活性影响不大。细胞毒作用也很低。但化合物的溶解性很差, 可能是分子的对称性增强了晶格能难以溶解, 预示不利的药代动力学。

2.2 不对称的单羟基化合物 化合物**3**的一侧苯基用含氮杂环置换, 使成为不对称分子, 氮原子还增加了溶解性, 化合物**7**~**9**的抑酶活性与**3**相当, 且呈现了抑制感染细胞的活性。**10**~**14**为饱和含氮杂环, 活性都不如芳香杂环吡啶系列。有代表性的化合物列于表2。

2.3 对称的双羟基化合物 双羟基化合物**4**~**6**的抑酶和细胞活性显著强于单羟基化合物**3**, 但因没有助溶基团, 溶解度很低。设计合成了含有助溶基团的对称

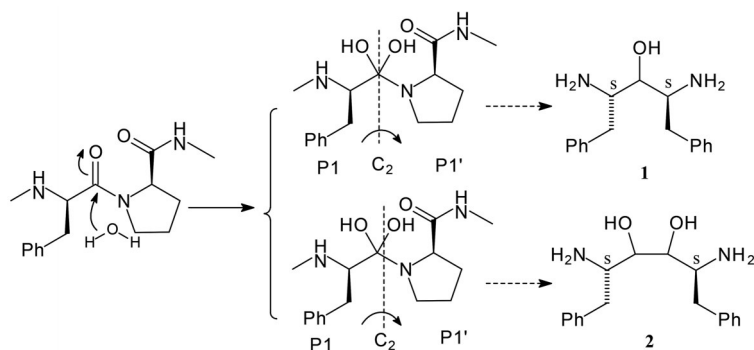
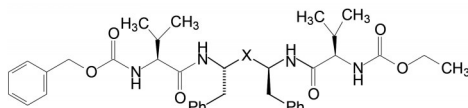


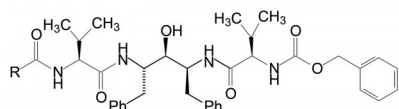
Figure 1 Initial design of HIV protease inhibitors

Table 1 Structures, activities, and solubility of compounds derived from 1 and 2. a: Test for the purified, recombinant HIV-1 protease upon a fluorogenic substrate; b: Concentration of test compound which inhibited 50% of the cytopathic effect of HIV-IgE in MT-4 lymphocytes *in vitro*; c: Concentration of test compound at which 50% cytotoxicity in MT-4 lymphocytes was observed *in vitro*, in the absence of HIV infection; d: Estimated solubility in pH 7.4 (phosphate) buffer; e: No effect, either up to 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or the cytotoxic concentration; f: Not test



Compd.	X	IC ₅₀ / $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^a	EC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^b	CC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^c	Solubility/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^d
3	CH(OH)	3	NE ^e	> 100	< 0.03
4	<i>R,R</i> -CH(OH)CH(OH)	< 1	0.08-0.11	> 100	< 0.03
5	<i>R,S</i> -CH(OH)CH(OH)	< 1	0.02-0.09	> 100	NT ^f
6	<i>S,S</i> -CH(OH)CH(OH)	< 1	0.05-0.07	> 100	NT

Table 2 Unsymmetrically substituted "mono-ol" inhibitors of HIV protease



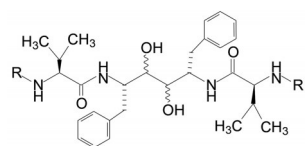
Compd.	R	IC ₅₀ / $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	EC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Solubility/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
3		3	NE	> 100	< 0.03
7		3	1.5-2.2	> 100	0.6
8		4	1.5-2.8	> 100	0.9
9		7	1.8-10	> 100	0.8
10		13	NE	17	31
11		63	NT	NT	19
12		9	5.4-6.9	> 100	6.8
13		14	NE	21	19
14		28	NE	55	141

分子,代表性的化合物列于表3。构效关系提示,① 两端引入极性适度的杂环可提高溶解性和有利于药代而不减弱抗病毒活性;② 极性强的基团(例如含磺酰胺的21和22)不利于过膜(数据省略);③ 手性的乙二醇基的*R,S*构型一般强于相应的*R,R*或*S,S*构型;④ 化合物19、28和31活性和溶解性都比较好,但给药大鼠都没有测出口服生物利用度。下一步是合成含有双羟基的不对称分子。

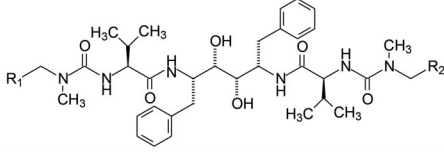
2.4 不对称的双羟基化合物 上面所述的对称性分子是活性较高但溶解性差的化合物,2-吡啶基、2-或4-噻唑基是优选的片段。在双羟基化合物的两端若连接不同的片段以造成不对称性可能有助于改善溶解性。表4的化合物显示不同芳杂环的组合确实有利于活性和溶解性。化合物33两端分别为2-吡啶和3-吡啶基,与19的对称分子(两个2-吡啶基)的活性相同,但溶解性提高了近1倍。34和35的活性很高,但溶解性低。然而2-氨基噻唑化合物36~38的溶解度增高。

2.5 保持高活性优化药动学性质 对代表性的化合物灌胃大鼠测定生物利用度,表明口服吸收度与溶解度不呈平行关系,例如溶解性偏低的26(90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)生

Table 3 Symmetrical diol substituted inhibitors of HIV protease



Compd.	R	Diol configuration	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	EC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	CC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	Solubility/μg·mL ⁻¹
15		<i>R, R</i>	< 1	0.27–0.45	> 100	5.4
16		<i>R, S</i>	< 1	0.05–0.06	> 100	2.4
17		<i>S, S</i>	< 1	0.21–0.23	> 100	0.21
18		<i>R, R</i>	1.66	1.1–1.5	> 100	225
19		<i>R, S</i>	< 1	0.20–0.27	> 100	297
20		<i>S, S</i>	< 1	0.17	> 100	3.6
21		<i>R, R</i>	240	NE	52	23
22		<i>R, S</i>	71	NE	56	30
23		<i>S, S</i>	38	43	65	40
24		<i>R, R</i>	1.6	3.8–5.7	> 100	338
25		<i>R, S</i>	< 1	0.97–1.7	> 100	153
26		<i>S, S</i>	< 1	0.86–1.4	> 100	91
27		<i>R, R</i>	< 1	0.59–0.63	> 100	286
28		<i>R, S</i>	< 1	0.18–0.19	> 100	159
29		<i>S, S</i>	< 1	0.40–0.50	> 100	6.5
30		<i>R, R</i>	1.0	1.5–1.7	> 100	137
31		<i>R, S</i>	< 1	0.24–0.39	> 100	101
32		<i>S, S</i>	< 1	0.21–0.30	> 100	57

Table 4 Unsymmetrically substituted "di-ol" inhibitors of HIV protease


Compd.	R ₁	R ₂	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	EC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	CC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	Solubility/μg·mL ⁻¹
33			< 1	0.27–0.48	> 100	420
34			< 1	0.17–0.20	> 100	1.0
35			< 1	0.17–0.22	> 100	10.9
36			< 1	0.56	> 100	386
37			< 1	0.83–1.6	> 100	196
38			< 1	1.1–1.5	> 100	331

物利用度却较高, $F = 17\%$, 而且口服吸收较好的二羟基化合物为 *S,S* 构型, 也与高溶解性的 *R,S* 相悖。所以影响口服吸收的应是复杂因素 (Kempf DJ, Codacovi L, Wang XC, et al. Symmetry-based inhibitors of HIV protease. Structure-activity studies of acylated 2,4-diamino-1,5-diphenyl-3-hydroxypentane and 2,5-diamino-1,6-diphenylhexane-3,4-diol. J Med Chem, 1993, 36: 320–330)。

化合物 **19** (代号 A-77003) 有良好的体外活性和较高的水溶性, 曾静脉注射进行临床试验, 但仍未成功。与此同时, 为改善药代动力学性质, 着手从降低拟肽的分子尺寸、减少氢键数和提高溶解性入手, 例如去除结构中的部分片段、减少羟基数、变酰胺为醇酯等。

在构效关系的研究中, **39** (代号 A-80987) 去除了 **19** 的一个缬氨酸和一个羟基, 并将两端的酰胺变换成酯, 细胞活性 (EC₅₀)、脱靶性 (CC₅₀)、大鼠口服利用度 (F) 及体内预示的效率 (C_{\max}/EC_{50}) 都有较好的表现 (Kempf DJ, Marsh KC, Fino LC, et al. Design of orally bioavailable, symmetry-based inhibitors of HIV protease. Bioorg Med Chem, 1994, 2: 847–858; Kempf DJ, Marsh KC, Denissen JF, et al. ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92: 2484–2488)。

39 是新阶段的先导物。下一步结构优化的位点有 3 处: ① P3 和 P2' 端基, 连接相同或不同极性的芳杂环; ② 变换 P2 或 P1' 处的酰胺连接基, 例如酯或脲; ③ P1 处的邻二醇去除一个羟基。合成这 3 个不同要素组装成更加不对称的化合物, 旨在优化出抗 HIV 感

染细胞的增殖、溶解性、生物利用度和药代的其他性质的最佳组合 (Kempf DJ, Sham HL, Marsh KC, et al. Discovery of ritonavir, a potent inhibitor of HIV protease with high oral bioavailability and clinical efficacy. J Med Chem, 1998, 41: 602–617)。

将 P2' 处的 3-吡啶换成 5-噻唑, 化合物 **40** 与 **39** 的活性相近, 损失了一些溶解度, 但提高了生物利用度。**41** 是将 **40** 的两个芳杂环对调, 同时将 P2 和 P3 间的氢甲酸酯换成 *N*-甲基脲连接, 溶解度显著提高, F 值略有降低, 再一次提示溶解性与口服吸收性并不正向相关。**41** 的 P3 处噻唑环上引入 2-烷基, 发现活性次序是 $i\text{-Pr} \approx t\text{-Bu} > \text{Et} > \text{Me} > \text{H}$, **42** 的活性明显提高, 但溶解性和 F 值都有损失。化合物 **43** (ABT-538) 的 P3 和 P2' 都是碱性很弱的噻唑基, 活性和口服生物利用度却最强, 后面将进一步展开 **43** 周边化合物的构效关系。表 5a 和 5b 分别列出了 5 个优质化合物的抗 HIV 活性和溶解度与药代性质。

化合物 **43** 的 P2 处噻唑环上 2-异丙基的重要性可由复合物晶体结构加以诠释。图 2 是 **43** 与 HIV 蛋白酶

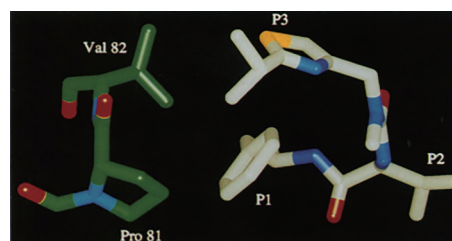
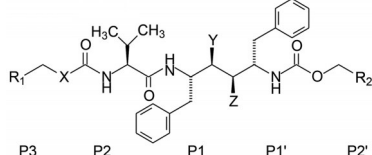


Figure 2 X-ray crystal structure of **43**/HIV-1 protease, showing a hydrophobic cluster between Pro-81, Val-82, and the P3 isopropylthiazolyl and P1 benzyl groups of **43**

Table 5a Anti-HIV activity of HIV protease unsymmetrical inhibitors in MT4 cells


Compd.	Code number	R ₁	X	Y	Z	R ₂	EC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	CC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
39	A-80987		O	OH	H		0.22	> 100
40	A-81525		O	H	OH		0.54	> 100
41	A-82200		NCH ₃	OH	H		0.73	83
42	A-83962		NCH ₃	H	OH		0.028	47
43	ABT-538		NCH ₃	H	OH		0.025	57

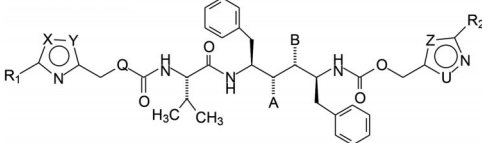
Table 5b The solubility and pharmacokinetic properties of compounds 39–43

Compd.	Solubility /μg·mL ⁻¹	t _{1/2} /h	C _{max} /μmol·L ⁻¹	t _{max} /h	F/%	C _{max} /EC ₅₀
39	8.6	1.9	4.11	0.25	26	19
40	4.2	0.7	2.04	0.4	47	3.8
41	53	1.4	3.13	0.4	35	4.3
42	7.9	1.0	0.98	0.3	12	35
43	5.3	1.2	2.62	2.0	78	105

复合物的局部图,显示2-异丙基噻唑基和P1处的苄基与酶的Pro81和Val82的疏水簇发生疏水-疏水相互作用,提高了与酶的结合能力和细胞活性。

其实,前述的优质化合物39~43是从众多的化合物构效关系研究中得到的,下面重点围绕着化合物43的发现讨论优化历程(表6)。**44**和**45**(二者互为差向异

构)的体外抗病毒活性都很好,但水溶性极低,难以制成用于静脉滴注(即或经助溶剂制成的分散液)的注射液。将P2-P3处的酯基换成N-甲基脒基,与P1'-P2'间的氨基甲酸酯构成不对称结构,化合物**43**的溶解性有所提高。**46**是**43**的差向异构体,它的活性、溶解性和口服生物利用度都不如**43**(半衰期略长于**43**)。将**43**的异丙基噻唑换成异丙基噁唑,**47**的活性相近,溶解性提高,但在血浆中存留时间短,不能维持必要的血药浓度。将**43**的P2'处噻唑换成噁唑(**48**),活性不变,溶解性提高,但半衰期也短,口服利用度降低。P3和P2'都换成噁唑环,**49**的活性与溶解性都提高(噁唑强于噻唑),但半衰期和口服利用度降低。将噻唑环上的异丙基换成乙基(**50**)、环丙基(**51**)或环丁基(**52**)等,活性虽与**43**相近,但口服吸收逊色。P2'的噻唑环用异

Table 6 SAR of typical compounds related to 43


Compd.	R ₁	X	Y	Q	Z	U	R ₂	A	B	EC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	CC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	Sol. /μg·mL ⁻¹	t _{1/2} /h	F/%	C _{max} /EC ₅₀
43	<i>i</i> -Pr	S	CH	NCH ₃	S	CH	H	H	OH	0.025	57	5.3	1.2	78	105
44	<i>i</i> -Pr	S	CH	O	S	CH	H	H	OH	0.005	51	1.9	-	-	10
45	<i>i</i> -Pr	S	CH	O	S	CH	H	OH	H	0.010	100	0.01	=	0	0
46	<i>i</i> -Pr	S	CH	NCH ₃	S	CH	H	OH	H	0.19	56	3.7	2.0	16	12
47	<i>i</i> -Pr	O	CH	NCH ₃	S	CH	H	H	OH	0.043	61	21	-	-	-
48	<i>i</i> -Pr	S	CH	NCH ₃	O	CH	H	H	OH	0.013	61	9.3	0.56	23	127
49	<i>i</i> -Pr	O	CH	NCH ₃	O	CH	H	H	OH	< 0.032	> 100	32	0.26	35	>64
50	Et	S	CH	NCH ₃	S	CH	H	H	OH	0.018	100	-	2.0	57	458
51	<i>c</i> -Pr	S	CH	NCH ₃	O	CH	H	H	OH	0.047	48	-	1.1	58	148
52	<i>c</i> -Bu	S	CH	NCH ₃	O	CH	H	H	OH	0.039	26	-	0.40	60	64
53	<i>i</i> -Pr	S	CH	NEt	S	CH	H	H	OH	0.25	24	2.8	-	-	14
54	<i>i</i> -Pr	S	CH	NCH ₃	CH	O	H	H	OH	0.009	28	4.6	0.59	7.7	44

噻唑置换, **54** 的活性虽然高于 **43**, 但半衰期短, 口服利用度低, 所以 **43** 是优质化合物中优选出的分子。

以上密集的探索构效/构代关系只是选择了代表性的化合物, 合成和评价的化合物数量远多于此。表 5 列的化合物 **39**~**43** 是优化过程的重要节点, 是在组成分子的不同部分的不同组合中的优质分子, 在抗 HIV 活性-吸收性-代谢稳定性-口服生物利用度-溶解性等多维性质中找到最佳匹配, 图 3 列出了这 5 个化合物的结构变迁特征和重要参数。

3 候选化合物的确定和利托那韦的上市

化合物 **43** 体外抗 HIV 感染细胞增殖活性虽然不是最强的分子, 但适度的溶解性和亲脂性, 保障了它具有最高的口服生物利用度和预示体内良好的治疗效果, 遂确定 **43** 为候选化合物, 定名利托那韦 (ritonavir), 经临床前和临床研究表明, 利托那韦是一种口服抗 HIV-1 和 HIV-2 病毒的蛋白酶抑制剂, 1996 年 3 月经美国 FDA 批准上市。2020 年 FDA 批准利托那韦 (50 mg) 与洛匹那韦 (lopinavir) (200 mg) 合用 (商品名克力芝), 治疗成人晚期艾滋病。

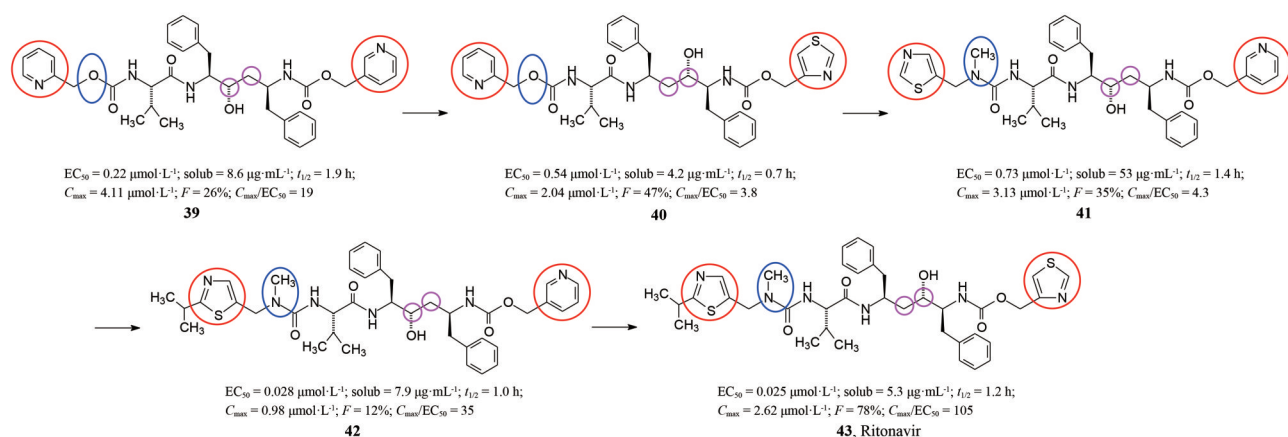


Figure 3 Evolution of milestone molecules in structure optimization