•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多重性质。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。

真菌感染对于免疫力低下的患者是致命的威胁, 需要有多种作用机制的药物预防和治疗。本文介绍的几个“芬净”药物是本世纪相继成功的新型抗真菌药, 它们的作用靶标都是真菌的β-(1,3)-*D*-葡聚糖合成酶, 阻断细胞壁的形成, 犹如β内酰胺类抑制细菌胞壁的合成。在化学结构上都是六肽形成的大环化合物, 并缀合了亲脂性的长链。虽然研制这4个芬净药物的天然先导物不尽相同, 但优化中修饰的位点和方法基本相同。大环的周边还有许多可以化学处置的位点和基团, 相信在不断地探索中会有更优良的药物涌现。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0751

芬净类抗真菌药物的研制

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 背景

致病性真菌感染对于免疫机能低下的患者构成严重的疾病, 例如艾滋病患者、癌症和器官移植的化疗和血液疾病等, 常常因真菌感染而危及生命。其中侵袭性真菌病 (IFD) 年发病率约27.2例/10万例, 病死率较高, 而且不同菌种所致IFD病死率存在一定差异。在21世纪前, 抗真菌药只有唑类、聚烯和氟胞嘧啶等, 图1是一些代表性抗真菌药物, 它们往往伴有肝肾功能损伤和其他不良反应, 还发生耐药性, 亟需新作用机制的药物。

1974年发现了构巢曲霉菌 (*Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*) 的一种代谢产物称作棘白菌素B (**1**, echinocandin B), 具有抗真菌作用 (Benz F, Knusel F, Nuesch J, et al. Echinocandin B, ein neuartiges polypeptid-antibiotikum aus *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: isolierung and bausteine. Helv Chim Acta, 1974, 57: 2459−2477), 其结构是由6个氨基酸组成的环肽, 其中两个是*L*-苏氨酸, 其余4个都是非人体氨基酸, 形成的环肽上还缀合了C_{18}脂肪链。**1**的作用靶标是抑制葡聚糖合成酶, 阻断真菌细胞壁的合成。抑制过程需要锚合在真菌的细胞上, 所以该疏水链也是必要的药效基团 (Patil A, Majumdar S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. J Pharm Pharmacol, 2017, 69: 1635−1660)。然而**1**有严重的溶血现象, 不能药用。最早的结构改造是半合成物西洛芬净 (**2**, cilofungin), 虽然保持了抗真菌活性, 也降低了溶血性, 但仍不适于临床应用, 未能上市。**2**的有效性提示疏水链可以变换。

2 卡泊美净的研制

2.1 活性评价

2.1.1 体外抑酶活性 真菌的细胞壁是由β-(1,3)-*D*-葡聚糖、β-(1,4)-*D*-葡聚糖、β-(1,6)-*D*-葡聚糖、α-葡聚糖、甲壳质、甘露聚糖和多种糖蛋白组成, 其中尤以β-(1,3)-*D*-葡聚糖在细胞壁占比较大, 而人体没有该组成成分, 因此抑制β-(1,3)-*D*-葡聚糖生成是抗真菌的有效而安全的环节。该葡聚糖的生物合成是由β-(1,3)-*D*-葡聚糖合成酶催化, 底物是二磷酸尿苷葡萄糖

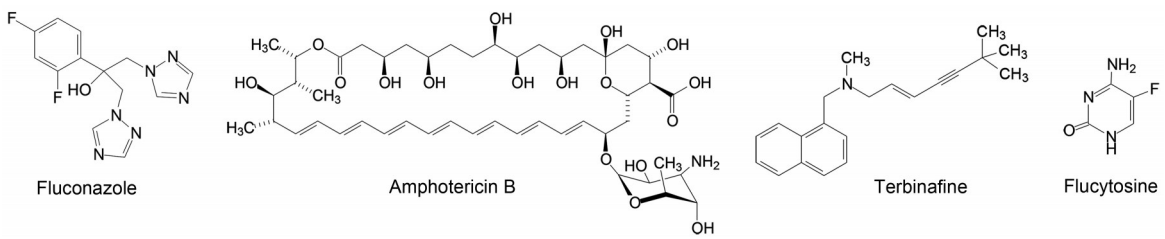
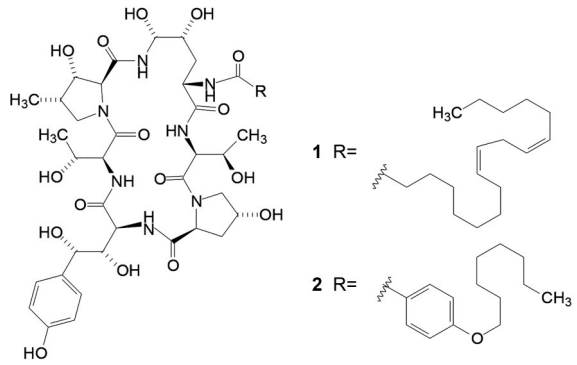


Figure 1 Typical antifungal medicines



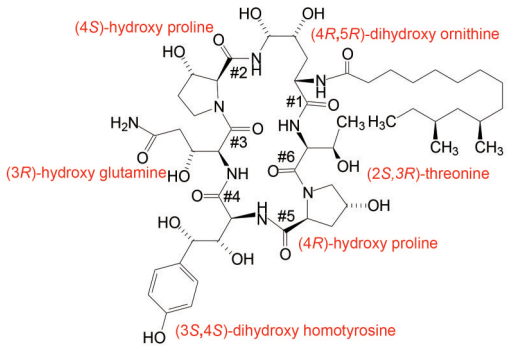
(UDP-glucose), 将葡萄糖连接成1,3-葡聚物, 如图2所示。棘白菌素B类环脂六肽选择性地抑制*β*-(1,3)-*D*-葡聚糖合成酶, 因而研制的目标化合物首先评价抑制白假丝酵母菌 (即白色念珠菌) 的*β*-(1,3)-*D*-葡聚糖合成酶活性。用半数抑制浓度IC_{50}表示 (方法从略)。

2.1.2 体外抑制真菌生长活性 化合物用多种真菌菌株评价活性, 包括白假丝酵母菌 (*Candida albicans*)、近平滑假丝酵母菌 (*Candida parapsilosis*)、念珠菌 (*Candida tropicalis*)、假念珠菌 (*Candida pseudotropicalis*) 等致病菌, 用最低杀真菌浓度 (MFC, $mg·mL^{-1}$) 表示活性。

2.1.3 体内抗真菌活性 用3种动物模型评价: ① TOKA是小鼠靶器官肾脏实验,评价化合物阻止真菌在肾脏克隆形成菌落。方法是将50%致死量的白假丝酵母菌感染天生免疫缺陷的DBA/2小鼠后, 每日腹腔注射受试物2次, 连续4天, 感染后的第7天解剖动物, 与对照组比较达到克隆数减少99.9%的剂量 ($ED_{99.9}$, $mg·kg^{-1}$)。② 用曲霉菌 (*Aspergillus fumigatus* 又称烟曲霉) 感染DBA/2小鼠, 0～4天腹腔注射受试物, 到第28天与对照组计算50%小鼠存活的剂量 (ED_{50}, $mg·kg^{-1}$)。③ PCP模型是用地塞米松造成大鼠免疫缺陷, 此时卡氏肺孢子菌引起肺部感染, 与对照组比较测定90%大鼠存活的化合物剂量 (ED_{90}, $mg·kg^{-1}$)。

2.2 先导物纽莫康定B_0的结构

构巢曲霉菌属的次级代谢产物脂环肽具有多样性结构, 1992年发现的另一个抗生素称作纽莫康定B_0 (**3**, pneumocandin B_0), 也是被疏水链修饰的环脂六肽 (Hensens OD, Liesch JM, Zink DL, et al. Pneumocandins from *Zalerion arboricola*. III. Structure elucidation. J Antibiot, 1992, 45: 1875−1885)。为了便于阐述修饰的位置, 本文将**3**的母核氨基酸编号, 缀合脂肪链的氨基酸为#1, #1是4-羟基鸟氨醛的半缩胺 (sp^3杂化碳经单键连接了羟基和仲胺), 这是很特殊的结构; #2是3-羟基-4-甲基脯氨酸; #3是3-羟基谷氨酰胺; #4是二羟基高酪氨酸 (hTyr); #5是3-羟基脯氨酸; #6是*L*-苏氨酸。所以纽莫康定B_0的环六肽中只有一个是人体天然氨基酸, 5个"异常氨基酸"对于抗真菌活性是非常重要的。形成大环结构, 稳定了分子的构象, 有助于化合物的抗真菌活性。



3

2.3 纽莫康定B_0的物化性质

纽莫康定B_0分子尺寸较大, 相对分子质量MW = 1 065.21, 结构中缺少助溶基团和片段, 水溶性低 (< 0.1 $mg·mL^{-1}$), 因而改善溶解性和吸收性是演化成药的主要内容。此外, #1的半缩醛胺化学上是不稳定的, pH > 8的碱性环境下, 大环在半缩醛胺处开环, 生成亲电性的醛基与#1的酰胺N原子发生加成反应, 生成新的五元吡咯烷环。在pH < 5的酸性条件下, 生成酰亚胺的中间体, 通过分子内加成或H^-离子还原生成新的大环肽。图3是上述酸或碱催化反应的简图。

2.3.1 结构初步修饰 起初的结构变换, 是探索不同位置的可修饰性 (表1), 分别是#1的半缩醛胺的羟基引伸出氨乙基, 碱性氮原子以提高分子的溶解性, #3的酰胺变换成氰基 (分子内脱水) 或还原成脂肪胺 (增

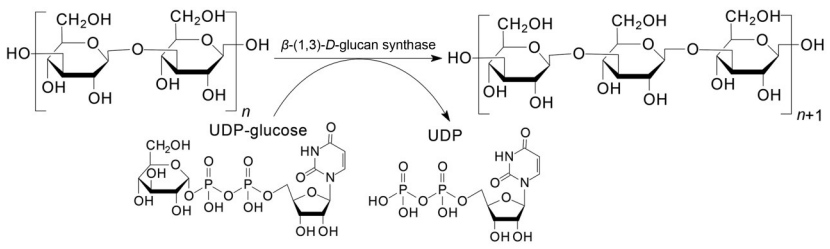


Figure 2 The synthesis of *β*-(1,3)-*D*-glucan catalyzed by *β*-(1,3)-*D*-glucan synthase

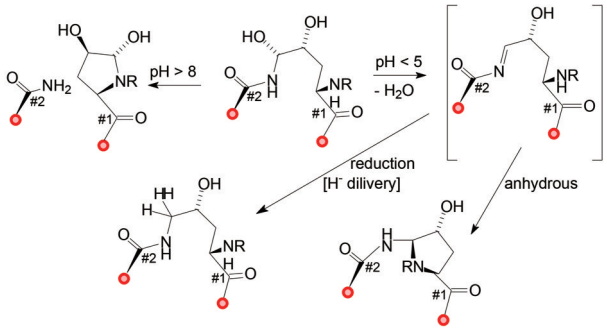
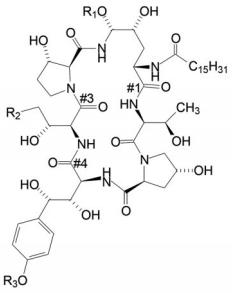


Figure 3 Acid and base degradation pathways of pneumocandin B_0

Table 1 The structure of the initially semisynthetic compounds



Compd.	R_1	R_2	R_3
3	H	$CONH_2$	H
4	H	$CONH_2$	$PO_3H^+Na^+$
5	$CH_2CH_2NH_2$	$CONH_2$	H
6	H	CN	H
7	H	CH_2NH_2	H
8	$CH_2CH_2NH_2$	CH_2NH_2	H

强碱性成盐), #4 的酚羟基磷酸酯化, 制成可溶性前药等。

表 2 列出的活性提示, 3 个水溶性的化合物 (**5** 为磷酸酯钠盐, **7** 为盐酸盐, **8** 为二盐酸盐) 抑制真菌的葡聚糖合成酶的活性强于纽莫康定 B_0 (**3**) 7 倍 (化合物 **5** 和 **7**) 和 70 倍 (**8**)。化合物 **8** 对多株真菌的体外抑制活性更为显著。**8** 含有两个碱性氨基, 体外细胞和抑酶活性强于单个氨基化合物。

下一步是评价含有游离氨基的化合物 **5**、**7** 和 **8** 体内抗真菌活性, 表 3 中列出了 3 种化合物对动物模型的活性。结果表明, 对曲霉菌感染的小鼠只有化合物 **5** 和 **8** 有治疗作用, 而 **3** 和 **7** 没有。**8** 的活性最强, 与体外高细胞活性是一致的 (Bouffard FA, Zambias RA, Dropinski JF, et al. Synthesis and antifungal activity of novel cationic pneumocandin B_0 derivatives. J Med Chem, 1994, 37: 222−225)。

2.3.2 #3 谷氨酰胺片段的变换 前已述及, #1 的半缩醛胺在碱性环境下是不稳定的, 为减低合成反应的复杂性, 首先合成了双去羟基化合物 **9**, 是天然物 **3** 的#1 去羟基 (半缩醛胺变成酰胺) 和#4 的二羟基高酪氨酸去除 α-羟基。这样就形成两个母核系列的化合物: **9** 为起始物的序列 A 和 **3** 为起始物的序列 B。表 4 列出了 A 和 B 系列的化合物结构和活性。构效关系简述如下: ① **9** 与 **3** 虽然有两个羟基的差别, 但抑制酶和细胞活性相近, 没有显著性差异。② 化合物 **12** 和 **13** 与 **6** 和 **7** 分别是 A 和 B 系列的氰基和氨甲基, 活性也相近, 也提示这两个羟基的有无对活性影响不大。③ 含有碱性氨基的化合物如 **7**、**18**、**23**～**26** 的活性都强于 **3** 和 **9**, 而且活性强弱大体与碱性强弱相关。其中含有胍基的 **26** 活性强于 **3** 大约 28 倍, 比 **7** 的活性强 10 倍。④ 化合物 **7** 乙酰化物 **21** 的活性低于 **3**, 提示此处的酰基不利于活性。⑤ 对抑制真菌生长的功能性评价表明, 虽然与抑酶活性不完全平行, 但 B 序列的碱性化合物 **7**、**25** 和 **28** 的活性强于化合物 **3**。氮原子甲基化或二甲基化都使抑菌作用减弱。⑥ 体内抗真菌活性与抑酶活性大体平行。化合物 **7** 活性强于 **13**, 提示 B 系列优于 A 系列, 二去氧化合物的结构不利于体内抗菌作用, 佐证了天然物为抑制其他真菌所构建结构的“严格性”; ⑦ 化合物 **7** 和 **25** 是体内活性最强的分子 (Zambias RA, James C, Harmmond ML, et al. Antifungal lipopeptides: structure-activity relationships of 3-hydroxyglutamine-modified pneumocandin B_0 derivatives. Bioorg Med Chem Lett, 1995, 5: 2357−2362)。

2.3.3 #3 还原成 3-羟基鸟氨酸的结构修饰 先导物 **3** 的#3 号氨基酸是 3-羟基谷氨酰胺, 将酰胺还原成伯胺, 则#3 成为 3-羟基鸟氨酸, 化合物 **7** 活性提高, 推测是酰胺变成伯胺增加碱性的缘故, 因为被乙酰化成 **21** 后活性锐减, 也证明游离氨基与酶结合的重要性。下面是在乙酰基上引入不同长度的氨烷基, 或多胺基结构, 以优化溶解性和活性。合成的化合物列于表 5。构效关系简述如下: ① 这些化合物抑制葡聚糖合成酶的活性与抑制真菌的功能活性没有平行关系, 推测是过膜吸收或未知因素所致。② **27** 是在 **21** 的乙酰基

Table 2 *In vitro* activity comparison of pneumocandin B_0 (**3**) and amines (**5**, **7** and **8**)

Compd.	*β*-(1,3)-*D*-Glucan synthase IC_{50}/nmol·L^{-1}	*C. albicans* MFC/μg·mL^{-1}	*C. tropicalis* MFC/μg·mL^{-1}	*C. parapsilosis* MIC/μg·mL^{-1}	*C. pseudotropicalis* MFC/μg·mL^{-1}
3	70	0.25	0.125	2	1
5	11	0.125	0.25	1	1
7	10	< 0.06	< 0.06	0.125	0.125
8	1	< 0.06	< 0.06	0.125	< 0.06

Table 3 *In vivo* efficacy of pneumocandin B_0 (**3**) and amine derivatives **5**, **7** and **8** in rodent models of candidiasis, aspergillosis, and Pneumocystis carinii pneumonia (PCP)

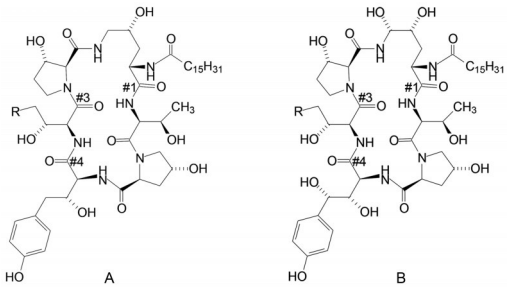
Compd.	Candidiasis ED_{99}/mg·kg^{-1}	Aspergillosis ED_{50}/mg·kg^{-1}	PCP ED_{90}/mg·kg^{-1}
3	6.0	> 20	0.15
5	0.78	0.06	0.037
7	0.375	> 20	0.037
8	0.09	0.03	0.019

上连接烷氨基, 恢复了活性, 提示碱性对于活性的重要性。③ 随着氨烷基碳链的延长, 活性下降。④ 含有两个氨基特别是 3 个氨基 (在#1 的半缩醛胺引入伯氨基如化合物**37**～**40**) 抗真菌活性显著提高。**39** 是在化合物**8** 缀合了鸟氨酸 (碱性很强), 体外和体内抗真菌作用都很强而且安全性也较好 (Zambias RA, James C, Abruzzo GK, et al. Lipopeptide antifungal agents: amine conjugates of the semi-synthetic pneumocandins L-731373 and L-733560. Bioorg Med Chem Lett, 1997, 7: 2021−2026)。

2.3.4 半缩醛胺片段的变换 在酸性条件下**3** 与甲醇发生交换反应生成甲醚**41**, 体内外活性虽然低于**3**, 但对曲霉菌感染 DBA/2 小鼠的体内活性显著强于**3**, 遂改换其他烷氧基化合物, 表 6 列出代表性目标物。结果提示, 乙氧基 (**42**) 和羟乙氧基 (**43**) 抑制葡聚糖合成酶的活性显著降低, 对真菌的抑制活性 (细胞生长或感染动物)都非常低, 而氨乙氧基化合物**5** 的抑制酶、细胞和感染动物的活性显著强于**3** 和**41**, 这对上一节的结果作了一定程度构效关系的补充解释。

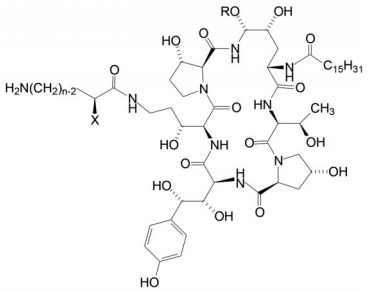
2.3.5 双胺类化合物—同时修饰#1 和#4 的化合物—卡泊芬净上市 纽莫康定 B_0 (**3**) 的#1 半缩醛胺和#4 的 3-羟基谷氨酰胺同时变换成含有游离氨基的化合物, 表明比单一处的变换活性更强, 提示多个氨基存在对活性贡献有叠加作用。表 7 比较了天然物**3** 与各里程碑化合物和含有 3 个氨基的化合物**44** 的活性。

Table 4 Biological data for dideoxy-pneumugandin B_0 (series A) and pneumugandin B_0 (series B) analogs. a: MFC means minimum fungicidal concentration; b: Log reduction in CFU at indicated dose



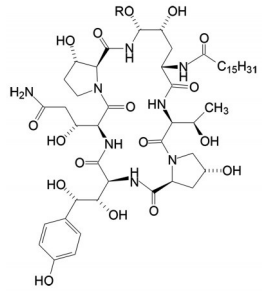
Compd.	R	*β*-(1,3)-*D*-Glucan synthase IC_{50}/nmol·L^{-1}	*C. albicans* MFC[a]/μg·mL^{-1}	*C. parapsilosis* MFC[a]/μg·mL^{-1}	TOKA $ED_{99.9}$/mg·kg^{-1}
A					
9	$CONH_2$	0.07	0.25	2	> 6
10	CO_2CH_3	0.18	0.5	4	> 6
11	CO_2H	0.4	0.25	8	> 6
12	CN	0.1	1	4	−
13	CH_2NH_2	0.01	0.125	−	1.5
14	CH_2NOH	0.08	0.25	4	6
15	CH_2NHNH_2	0.11	4	8	−
16	CH_2OH	0.2	1	8	−
17	$CSNH_2$	0.12	0.25	4	> 6
18	$CONH(CH_2)_4NH_2$	0.038	0.5	−	> 6
19	$CONH(CH_2)_5CO_2Me$	0.25	4	128	−
20	$CONH(CH_2)_5CO_2H$	0.9	2	64	−
B					
3	$CONH_2$	0.07	0.25	1	6
6	CN	0.1	2	2	−
7	CH_2NH_2	0.01	< 0.06	0.125	0.375
21	CH_2NHAc	0.3	4	8	12
22	$CH_2N(CH_2CN)_2$	> 2	4	8	> 1.5 (0.94)[b]
23	CH_2NHMe	0.007	2	2	0.375
24	CH_2NMe_2	0.005	1	2	1.5
25	$CH_2NMe_3^+$	0.009	0.125	0.5	0.375
26	$CH_2NH(=NH)NH_2$	0.007	< 0.06	0.5	1.5

Table 5 Effect of tether length and charge at #3 residue on antifungal activity and mouse acute toxicity



Compd.	*n*	R	X	Glucan synthase IC_{50}/nmol·L^{-1}	TOKA $ED_{99.9}$/mg·kg^{-1}	TOKA %mice sterilized	Aspergillosis ED_{50}/mg·kg^{-1}	Acute toxicity /mg·kg^{-1}
7		–		10	< 0.06	70	> 20	100
21		–		300	2	0	–	> 250
27	2	H	H	15	0.5	20	–	250
28	3	H	H	25	0.125	100	–	250
29	4	H	H	50	< 0.06	40	–	> 100
30	5	H	H	20	0.5	0	–	250
31	6	H	H	90	0.5	0	–	250
32	7	H	H	–	2	0	–	250
33	3	H	NH_2	3	1	100	> 1.25	> 250
34	4	H	NH_2	60	0.25	60	–	> 250
35	5	H	NH_2	30	< 0.06	20	–	> 200
36	6	H	NH_2	10	< 0.06	20	–	150
8		–		1	0.25	80	0.03	30
37	3		NH_2	4	1	100	0.07	> 100
38	4		NH_2	6	0.5	0	–	100
39	5		NH_2	1.5	< 0.06	70	0.03	80
40	6		NH_2	3	0.125	0	0.02	60

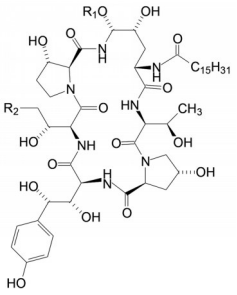
Table 6 Antifungal activity of hemiaminal derivatives of pneumocandin B_0



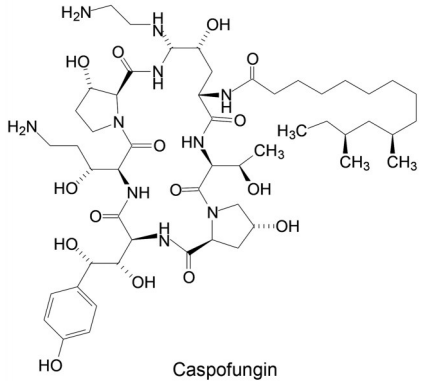
Compd.	R	*β*-(1,3)-*D*-Glucan synthase IC_{50}/nmol·L^{-1}	*C. albicans* MIC/μg·mL^{-1}	TOKA ED_{99}/mg·kg^{-1}	Aspergillosis ED_{50}/mg·kg^{-1}
3	H	70	0.25	3	> 20
41	CH_3	100	2	> 6	1.8
42	CH_3CH_2	800	4	–	–
43	$HOCH_2CH_2$	400	2	–	–
5	$H_2NCH_2CH_2$	10	0.125	0.03	0.06

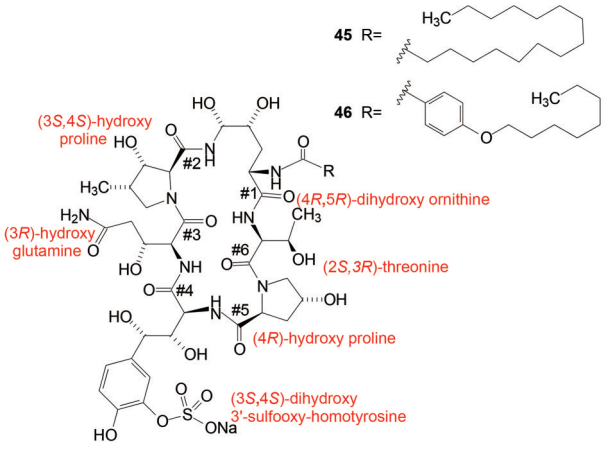
化合物**44**是将**8**的#1处氨乙醚基变换为氨乙胺基, 结构中有3个碱性氨基, 增强了溶解性、抑酶和体内外活性, 显著强于或相当于化合物**8**, **44**的安全性也优于**8** (LD_{50}分别为50 mg·kg^{-1}和30 mg·kg^{-1})。综合评价各里程碑化合物, 确定**44**为临床候选物, 定名为卡泊芬净 (caspofungin), 默克公司经III期临床试验研究证明对感染曲霉菌患者有治疗作用, 于2001年经FDA批准上市。从1990年开始立项, 1992年合成出本品, 1995年开始临床研究, 历时11年上市 (Balkovec JM, Hughes DL, Masurekar PS, et al. Discovery and development of first in class antifungal caspofungin (CANCIDAS®)—a case study. Nat Prod Rep, 2014, 31: 15−34)。

Table 7 Comparative activities of semisynthetic pneumocandins and pneumocandin B_0



Compd.	R_1	R_2	β-(1,3)-*D*-Glucan synthase IC_{50}/nmol·L^{-1}	*C. albicans* MIC/μg·mL^{-1}	*A.fumigatus* MIC/μg·mL^{-1}	TOKA ED_{99}/mg·kg^{-1} (%MB cure)	Aspergillosis ED_{50}/mg·kg^{-1}
3	OH	$CONH_2$	70	0.25	1	6 (20%)	> 20
5	$OCH_2CH_2NH_2$	$CONH_2$	10	0.125	0.015	0.75 (80%)	0.06
7	OH	CH_2NH_2	10	0.125	2	0.375 (70%)	> 20
8	$OCH_2CH_2NH_2$	CH_2NH_2	1	< 0.06	0.015	0.015 (80%)	0.03
44	$NHCH_2CH_2NH_2$	CH_2NH_2	0.60	0.125	0.008	0.027 (90%)	0.05





3 米卡芬净

3.1 先导物FR901379

日本Astellas公司从6 000培养液中发现了一组脂肽, 都属于棘白菌素类抗生素, 其中FR901379 (**45**) 抗真菌作用最强 (Iwamoto T, Fujie A, Sakamoto K, et al. WF11899 A, B and C, novel antifungal lipopeptides. J Antibiot, 1994, 47: 1084−1091), **45** 与纽莫康定 B_0 (**3**) 的结构相似, 只是在环六肽中#1的脂肪链为正十六烷酸 (棕榈酸); #2的羟脯氨酸上多一个4-*S*-甲基; #4的苯环上多一个羟基, 而且成硫酸半酯化的钠盐, 因而 **45** 水溶性很强 (50 mg·mL^{-1}), 是先天的优点。水解掉硫酸基, 溶解度降到1 mg·mL^{-1}, 而抗菌活性不变, 提示该硫酸基对改善物理化学性质非常有利。**45** 的作用靶标也是真菌合成细胞壁的关键酶 β-(1,3)-*D*-葡聚酶, IC_{50} = 0.2 μg·mL^{-1}。然而 **45** 有显著的溶血作用。为消除此不良反应, 结构修饰的位点是#1处的脂肪链, 参照并移植了西洛芬净 (**2**) 的侧链。合成了化合物 **46**, 活性和溶血作用列于表8。

表8的数据提示, **46** 对白色假丝酵母菌的活性与 **45** 比较虽然有所减弱, 但对烟曲霉菌的活性显著提高, 而且对小鼠的溶血作用也大幅度降低, 提示加入芳香环可能是优化的方向。

Table 8 Influence of acyl side-chain group of **45** on the antifungal activity and hemolysis

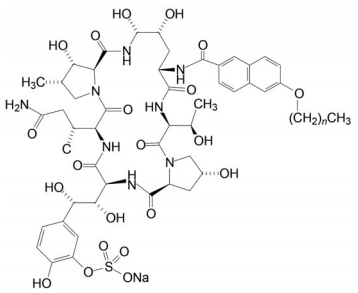
Compd.	*C. albicans*		*A. fumigatus*	Hemolysis
	MFC/μg·mL^{-1}	EC_{50}/mg·kg^{-1}	EC_{50}/mg·kg^{-1}	LC_{30}/mg·kg^{-1}
45	0.2	1.8	70	0.456
46	0.78	3.7	4.3	> 8

3.2 萘氧烷基链的变换

将 **46** 的苯环换作2-萘基, 并于6-位连接烷氧基, 调节链长度以探索结构−活性−溶血性之间的关系。表9列出了合成的化合物和相应的生物学性质。

表9的构效关系显示, 随着脂肪链碳数的增加, 体外抗真菌活性增强, C8的活性最强, 再加长碳链, 由于疏水性超过最适值而使活性下降 (Clog*P* 值可作为化合物疏水性量度)。图4是 **47**～**52** 对感染小鼠的体内抗菌活性与Clog*P* 作图, 曲线呈倒置的抛物线关系, 从

Table 9 The structure and antifungal activity and hemolysis of naphthyl-alkoxy side-chain compounds



Compd.	*n*	*C. albicans* MFC/mg·mL^{-1}	Hemolysis %/2 mg·mL^{-1}
47	3	12.5	1
48	5	0.78	5
49	6	0.39	−
50	7	0.1	34
51	9	0.2	100
52	11	0.78	100

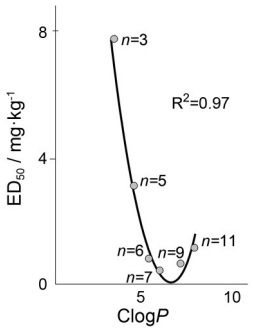


Figure 4 The relationship of efficacy with hydrophobicity of side-chain

n = 3 开始, 随着碳原子数的增加而活性提高, *n* = 8 达到最大值, 再增长碳链, 活性下降。曲线方程的相关系数 R^2 值 0.92, 呈良好的相关性。此外, 溶血作用与侧链碳数呈正相关, 提示亲脂性 (或疏水性) 越强, 溶血作用越甚, 所以进一步结构优化需要找到侧链的结构与活性/溶血性之间的最适配关系。

3.3 芳链烷基和联芳基

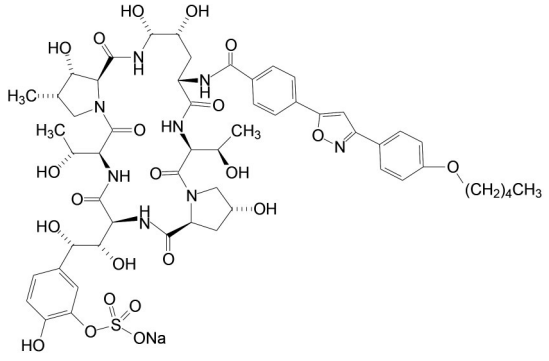
以化合物 **46** 为新的起始物, 增加两个碳原子 Clog*P* 值为 5.80, 疏水性提高了 1 个对数单位, 即亲脂性提高 10 倍, 抗白色假丝酵母菌的活性 (*C. albicans*) 和体内活性都提高, 反映在 MFC 和 EC_{50} 与 **46** 的比值都小于 1 (括弧内数值), 但 **53** 对烟曲霉菌感染小鼠的治疗作用弱于 **46**, **55** 是萘-C8 醚, Clog*P* 值与 **53** 相同, 对抗两种真菌感染的活性都显著增强。将萘环“拆开”成联苯 (这是药物设计中经常实施的探索), 化合物 **56** 的 Clog*P* 值降低 0.43, 而抗菌活性基本未变, 再增加一个苯基 **58** 是三联苯基丁醚, Clog*P* 值 6.14, 体内外抗白色假丝酵母菌活性显著增强, 与 **46** 的比值分别为 0.02 和 0.14, 但溶血作用仍然显著 (表 10)。

将 **58** 的三联苯中间的苯基换成脂杂环 (**59**、**60**) 或芳杂环 (**61**～**63**), 多数化合物的抗菌活性相当于或优于 **58**, 其中含异噁唑的三联芳基化合物 **61** 的 Clog*P* 值 5.31, 对白色假丝酵母菌和烟曲霉菌感染小鼠的抗菌活性很强, 而且消除了溶血作用, 而与 **61** 成区域异构的化合物 **62** 却有显著的溶血作用, 显示出溶血的脱靶作用构效关系也很严格。

3.4 候选物的确定和米卡芬净的上市

综合高活性化合物的抗真菌谱、物化性质和安全性 (溶血作用), **61** 的抗菌谱优于氟康唑 (fluconazole), 而且对氟康唑耐药的菌株仍有抑制活性 (表 11), 因而确定了化合物 **61** 为候选物, 定名为米卡芬净 (micafungin) (Fujie A. Discovery of micafungin (FK463): a novel antifungal drug derived from a natural product lead. Pure Appl Chem, 2007. 79: 603−614)。

经III期临床研究, 米卡芬净于 2002 年在日本上市, 并于 2005 和 2006 年分别在美国和我国获批上市, 用于治疗由于曲霉菌和念珠菌感染引起的真菌血症、呼吸道真菌病、胃肠道真菌病。米卡芬净钠为冻干粉针剂, 静脉滴注, 半衰期 11～17 h, 主要在肝中代谢, 大约 40% 在胆汁中以原形和代谢物的形式清除, 被硫酸酚酯酶和儿茶酚-*O*-甲基转移酶以及细胞色素 P450 代谢, 代谢产物有 10 多种。

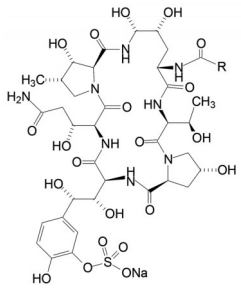


Micafungin

4 阿尼芬净

阿尼芬净 (**64**, anidulafungin) 是先导物棘白菌素 B (**1**) 的半合成抗生素, 只变换了一个位点, 即#1 的脂肪酰基换成正戊氧基三联苯甲酰基。该药物早期研究是在礼来公司进行的, 代号为 LY303366, 2006 年由辉瑞公司生产, 并通过了美国 FDA 授予的合格传染病产品 (QIDP) 认证, 本品后来在韩国批准上市, 用于治疗食管等部位的念珠菌感染 (Debono M, Turner WW, LaGrandeur L, et al. Semisynthetic chemical modifica-

Table 10 Side-chain modification of the compound **46**. a: Figures in parentheses indicate the ratio of MFC (EC_{50}) (Compd.) / MFC (EC_{50}) (**46**)



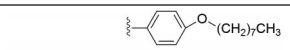
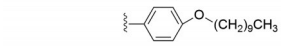
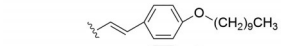
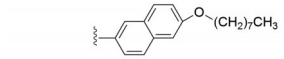
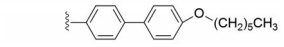
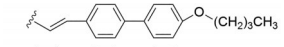
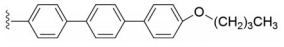
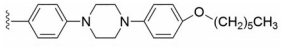
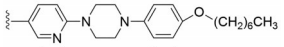
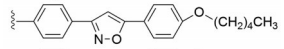
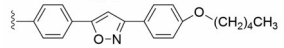
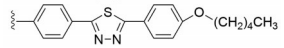
Compd.	R	Clog*P*	*C. albicans*		*A. fumigatus*	Hemolysis
			MFC/μg·mL^{-1} [a]	EC_{50}/mg·kg^{-1} [a]	EC_{50}/mg·kg^{-1}	LC_{30}/mg·kg^{-1}
46		4.77	0.78 (1)	1.5−4.3 (1)	4.31	> 10
53		5.80	0.2 (0.26)	1 (0.7)	22.9	> 10
54		5.38	0.78 (1)	4.3 (1)	−	> 10
55		5.80	0.1 (0.13)	0.74 (0.23)	0.79	10
56		5.37	0.2 (0.26)	0.66 (0.2)	−	1.74
57		5.68	0.05 (0.06)	0.56 (0.3)	0.89	3.95
58		6.14	0.012 5 (0.02)	0.45 (0.14)	−	0.37
59		6.16	0.78 (1)	4.3 (1)	0.53 (0.15)	< 20
60		6.29	0.1 (0.13)	0.742 (0.23)	−	< 20
61		5.31	0.2 (0.26)	0.658 (0.2)	0.228 (0.06)	< 20
62		5.31	0.05 (0.06)	0.563 (0.3)	−	38
63		6.24	0.012 5 (0.02)	0.447 (0.14)	−	82

Table 11 Comparison of *in vivo* efficacy of **61** with fluconazole in neutropenic mouse model of disseminated candidiasis and aspergillosis. a: Once-daily treatment for 4 days, starting at 1 h after infection; b: Fluconazole-resistant

Organism	ED_{50}/mg·kg^{-1} [a]		
	61	Fluconazole	Amphotericin B
C. albicans FP633	0.14	2.15	0.08
C. albicans 16010	0.21	4.51	0.12
C. albicans FP1839[b]	0.26	> 20.0	0.18
C. glabrata 13002	0.30	6.27	0.11
C. tropicalis 16009	0.28	3.71	0.09
C. krusei FP1866	0.77	9.52	0.26
C. parapsilosis FP1946	1.00	10.9	0.06
A. fumigatus TIMM0063	0.25	> 20.0	0.11
A. fumigatus IFM41209	0.50	> 20.0	0.29

tion of the antifungal lipopeptide echinocandin B (ECB): structure-activity studies of the lipophilic and geometric parameters of polyarylated acyl analogs of ECB. J Med Chem, 1995, 38: 3271−3281)。

上述变换**1**的脂质链为三联苯基并非一蹴而就，而是经过烷酰基、烷芳酰基、芳烷酰基、联芳基等系统性研究，最后优化出三联苯基。图5列出了代表性的化合物。

阿尼芬净的特点是，由于分子的疏水性很强，与血浆蛋白的结合律很高，达到99%，因而在人体内消除半衰期可长达24～26 h，每日用药一次。其非酶促代谢产物是肽环打开，自粪便中排出。阿尼芬净对曲霉菌感染有较好疗效 (Murdoch D, Plosker GL. Anidulafungin. Drugs, 2004, 64: 2249−2258)。

5 雷扎芬净

雷扎芬净 (**65**, rezafungin, CD-101) 是 Cidara Therapeutics 公司研制的棘白菌素衍生物，在2018年FDA授予雷扎芬净合格传染病产品 (QIDP) 和快速通道地位，2023年美国FDA批准上市。雷扎芬净的化学结构与阿尼芬净 (**64**) 的只是一个基团之差。即在#1的半缩醛胺的羟基被三甲铵乙基醚化，该季铵离子的引入与上述“芬净”有很大的区别，首先是良好的溶解性，在缓冲液中溶解度达到45 mg·mL^{-1}。化学和代谢稳定性强，半衰期80 h (一次给药) 和150 h (持续给药)，因而治疗过程是每周静脉输注一次。持久的季铵离子还体现在广谱抗真菌活性上，对念珠菌属、曲霉菌属、毛癣菌和小孢子菌都有较强的抑制活性，而且对耐药菌也有活性。雷扎芬净的安全性也较高，一次剂量

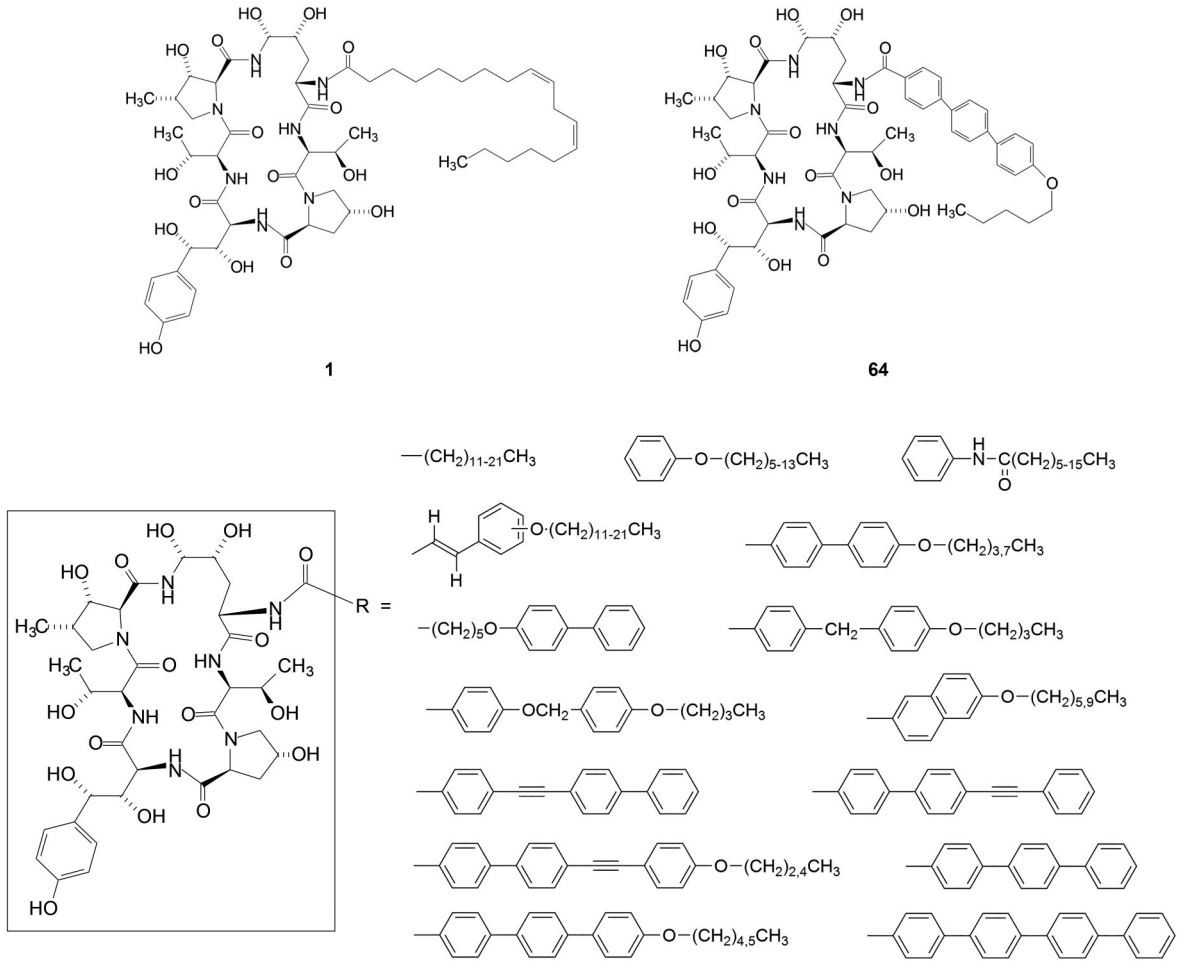
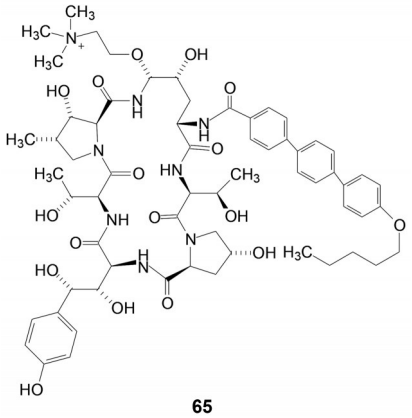


Figure 5 Typical side chains for evolution of anidulafungin



高达400 mg未见不良反应, 因而被业界认为是第二代抗真菌芬净药物。表12列出了雷扎芬净与其他同类产品的药代参数, 有望成为同类最佳 (BIC) 的创新药物 (Krishnan BR, James KD, Polowy K, et al. CD101, a novel echinocandin with exceptional stability properties and enhanced aqueous solubility. J Antibiot, 2017, 70: 130–135; Garcia-Effron G. Rezafungin-mechanisms of action, susceptibility and resistance: similarities and differences with the other echinocandins. J Fungi, 2020, 6: 262)。

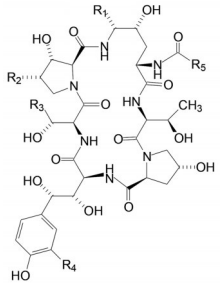
6 后记

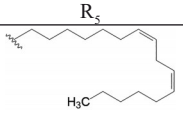
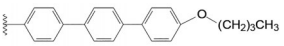
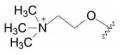
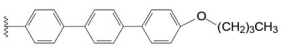
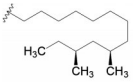
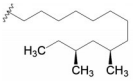
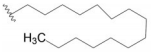
许多抗生素是大环化合物, 例如大环内酯类的红霉素和雷帕霉素, 肽类如环孢菌素A和万古霉素等, 功能大都是抵御微环境中的其他物种。大环结构的构象相对稳定, 有利于维持活性构象, 降低了熵损失。本文讨论的棘白菌素类大环脂肽, 结构类似而多样, 多样性结构也是为自身生存演化而生成的。产生菌合成出结构大同小异的脂六环肽, 其共性与差异性或许是为了抵御其他真菌所“应运而生”, 因而作为先导物, 可创制出不同结构和适应症的杀菌剂。本文讨论的药物来自不同的先导物, 修饰的内容不同, 研制出的药物也不断更新与优化, 但这只是初步的。表13列出了先导物和对应的药物, 反映出分子设计上可有不同修饰内容和位点的组合。审视环肽结构, 尚有多处可作化学修饰的位点与基团变换, 例如季铵离子的引入开启了二代芬净, 所以进一步探索或许能够研制出更加优良的药物。

Table 12 Pharmacokinetics of rezafungin with other fungins for adult patients

Drug	Dose/mg	C_{max}/mg·L^{-1}	$AUC_{0\text{-}24}$/mg·L^{-1}·h	$t_{1/2}$/h	Cl/L·h^{-1}	*Vd*/L	Protein binding/%
Casp (**44**)	70	12.09	97.63	9−11	0.63	9.67	97
Mica (**61**)	100	7.20	132.60	11−17	1.30	25.60	99
Anid (**64**)	200	7.20	110.30	24−26	0.96	35.20	99
Reza (**65**)	400	22.70	1 160	129−133	0.23	35.90	99

Table 13 The list of natural cyclic lipopeptides and the corresponding antifungal medicines



No.	Name	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
1	Echinocandin B	OH	CH_3	CH_3	H	
64	Anidulafungin	OH	CH_3	CH_3	H	
65	Rezafungin		CH_3	CH_3	H	
3	Pneumocandin B_0	OH	H		H	
44	Caspofungin		H		H	
45	FR901379	OH	CH_3		OSO_3Na	
61	Micafungin	OH	CH_3		OSO_3Na	