•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。

第一款异柠檬酸脱氢酶2 (IDH2) 抑制剂恩西地平 (enasidenib) 和IDH1抑制剂艾伏尼布 (ivosidenib) 分别在2017和2018年上市。本文介绍Forma Therapeutics公司2022年上市的奥卢特尼布 (olutasidenib) 也是独立研制的IDH1抑制剂, 治疗急性髓细胞白血病。从高通量筛选, 确定苗头化合物, 演化出先导化合物, 到基于IDH1结构的分子设计和优化, 到奥卢特尼布上市, 读者可以领略和借鉴研制者精致的药物化学过程和应用的各种技术。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0326

基于异柠檬酸脱氢酶结构研制的奥卢特尼布

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

1.1 三羧酸循环和异柠檬酸脱氢酶 需氧生物体内普遍存在的一种代谢途径称作三羧酸循环, 是将三大营养素 (糖/脂质/氨基酸) 的代谢产物乙酰辅酶A (Ac-CoA) 最后氧化成CO_2和水的通路, 三羧酸循环也是糖/脂质/氨基酸代谢联系的枢纽。该循环发生在细胞线粒体内。

三羧酸循环的名称源于主要的中间代谢物都含有3个羧基的有机酸, 例如柠檬酸和异柠檬酸等, 所以又称为柠檬酸循环。其中一个环节是含有叔醇基的柠檬酸在顺乌头酸酶催化下, 异构化为异柠檬酸, 后者为仲醇便于氧化, 下一步是在异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 和辅酶$NADP^+$催化下, 异柠檬酸发生氧化脱羧, 生成α-酮戊二酸 (α-KG)、CO_2和NADPH (图1)。

1.2 异柠檬酸脱氢酶的突变 异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 有两种亚型IDH1和IDH2, 一些肿瘤患者IDH1发生Arg132变异, R132H、R132C、R132G、R132S和R132L, 失去了野生型催化生成α-KG的功能, 而是生成*R*-2-羟基戊二酸 (2-HG), 过量的2-HG积累抑制了依赖于5-KG的表观遗传调控的酶系和细胞信号通路, 阻断了祖细胞的正常分化。所以抑制突变的IDH1从而降低2-HG的生成应是研制治疗某些肿瘤药物的靶标, 例如神经胶质瘤、软骨肉瘤、肝内胆管细胞癌、骨髓增生异常综合征和急性髓性白血病等。

2 化合物活性评价

2.1 抑制突变的异柠檬酸脱氢酶 用两种重组的酶蛋白 (IDH1-R132H和IDH1-R132C) 测定化合物活性。384孔板每孔加入定量的受试物和IDH1于缓冲液中, 之后加入定量的α-酮戊二酸和NADPH, 25 ℃温孵40 min, 加入黄递酶 (diaphorase) 溶液终止反应, 15 min后于535和590 nm波长测定每孔的激发光和发射光读数, 基于受试物浓度与抑制NADPH消耗量 (光读数) 用四参数方程拟合曲线计算化合物的IC_{50}。

2.2 抑制细胞中2-羟基戊二酸的生成 用IDH1-R132H或IDH1-R132C突变的同源HCT116细胞定量地加到96孔细胞培养板上, 5% CO_2于37 ℃温孵过夜, 加入定量的受试物, 5% CO_2于37 ℃温孵24 h, 去除各孔的培养液, 加入定量的甲醇/水溶液 (80/20, *v*/*v*), −80 ℃冷冻过夜使细胞完全溶解, 用高通量质谱仪测定上清液中的2-羟基戊二酸, 基于每个受试物浓度下与2-羟基戊二酸生成量用四参数方程拟合曲线计算化合物抑制细胞活性的IC_{50}。

3 苗头化合物的发现和结构演化

3.1 高通量筛选发现苗头物 Forma Therapeutics公司高通量筛选40万个化合物, 方法是每个化合物与

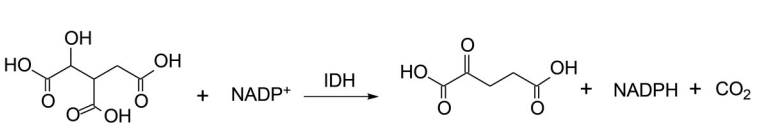
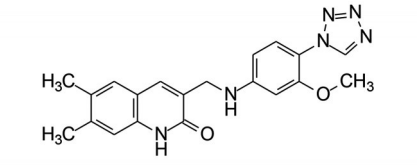


Figure 1 The biochemical reaction of isocitric acid to α-ketoglutaric acid under the catalysis of isocitric dehydrogenase

IDH1-R132H作用, 用黄递酶法测定8个浓度, 计算IC_{50}, 初步选出来的苗头化合物再用热转移测定法、表面等离子体共振法和高通量质谱法测定生化反应产生的2-羟基戊二酸方法作确证, 然后测定对野生型IDH1的选择性, 选出的化合物再通过结构相似性分析, 在5组中根据化合物的配体效率 (LE)、配体亲脂性效率 (LLE)、相对分子质量 (MW) 和计算分配系数 (*C*Log*P*) 进行选择, 确定了化合物**1**为优选出的苗头分子。



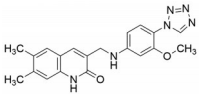
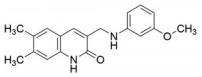
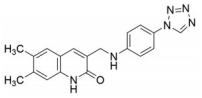
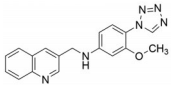
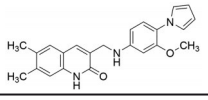
1

IDH1-R132H Diaphorase IC_{50} = 0.704 μmol·L^{-1}
IDH1-Wt Diaphorase IC_{50} > 100 μmol·L^{-1}
IDH1-R132H RapidFire 2-HG IC_{50} = 0.097 μmol·L^{-1}
*C*Log*P* = 2.33, MW =376, LE = 0.31, LLE = 3.90

3.2 喹啉酮的取代基变换 化合物**1**的结构可视作喹啉酮和苯基四唑两个片段经连接基-CH_2-NH-相连。首先是对喹啉酮环上3个位置作简单取代基变换, 比较化合物的活性和代谢稳定性。表1列出的构效关系表明: ① 6或7位去除1个甲基 (**2**或**3**) 可使抑制突变株DH1-R132H酶活性提高2～3倍, 但**1**～**3**对人或小鼠肝微粒体的稳定性都较低; ② 6-甲基用Cl取代 (**4**), 不仅活性提高, 也增加了代谢稳定性; ③ 苯环上有取代基的化合物**5**活性显著降低; ④ 氮上的氢原子非常重要, 甲基取代后**6**的活性殆尽, 预示此处氢键结合的重要性。

3.3 重要基团的变换 审视整个分子, 考察四唑基、甲氧基和喹啉酮的羰基等具有结合功能的极性基团对活性的影响, 合成的化合物列于表2。去除四唑片段 (**7**) 或甲氧基 (**8**), 活性都显著下降, 提示两个片段的重要性。去除羰基成喹啉母核 (**9**) 或吡咯替换四唑 (**10**), 完全失去活性, 说明在结构变换或优化中这三个极性基团需予以保持或作等排变换。

Table 2 SAR of critical components

Compd.	Structure	DH1-R132H IC_{50}/μmol·L^{-1}
1		0.704
7		5.14
8		3.11
9		> 100
10		> 200

3.4 组合库的合成与SAR 下一步是用4个3-甲酰基-6/7-取代的喹啉 (酮) (图2) 同44个取代的苯胺和11个脂肪伯/仲胺缩合成亚胺再经$NaBH(OAc)_3$还原而得的化合物。

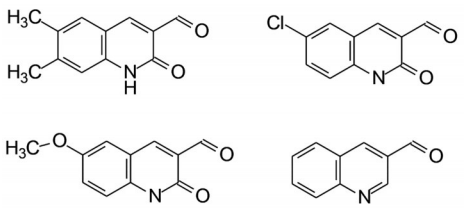
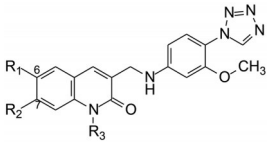


Figure 2 The four building blocks for library synthesis

组合合成的构效关系表明, 改为喹啉作母核的化合物都没有活性, 再次表明羰基和 (或) NH是必需基团。另外3种喹啉酮母核中6-氯取代活性最强, 因而表3列出的6-氯喹啉酮多是与芳香伯胺的缩合/还原的化合物, 总结构效关系如下: ① 与脂肪族伯/仲胺合成

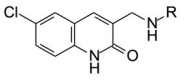
Table 1 Structure and biochemical activity of quinolinone fragments. a: Human liver microsome; b: Mouse liver microsome

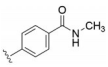


Compd.	R_1	R_2	R_3	DH1-R132H IC_{50}/μmol·L^{-1}	HLM[a] left %/30 min	MLM[b] left %/30 min	Solubility /μmol·L^{-1}
1	CH_3	CH_3	H	0.704	17.6	27.9	0.04
2	CH_3	H	H	0.238	30.8	42.3	< 0.01
3	H	CH_3	H	0.303	9.6	17.8	< 0.01
4	Cl	H	H	0.267	93.9	89.9	< 0.01
5	H	H	H	3.32	88.0	69.4	0.93
6	Cl	H	CH_3	> 25	63.7	22.0	< 0.01

的化合物都没有活性, 例如化合物 **11**; ② 氰基替换四唑基仍保持活性 (**12**、**14**～**16**), 但氰基须在对位, 间位氰基 (**13**) 无活性; ③ 吡啶代替苯环活性有所提高, 如 **14** 和 **16** 分别强于 **12** 和 **15**。吡啶的氮原子可能提供利于酶的结合, 因为 **21** 没有氰基却仍有一定的活性; ④ 用咪唑 (**18**) 噻二唑 (**19**) 或吗啉 (**20**) 置换四唑基活性都有不同程度的丢失, 说明氮原子的位置很重要; ⑤ 化合物 **22** 和 **23** 的酰基或磺酰基的氧原子 (氢键接受体) 与苯环共平面, 因而有一定的活性。

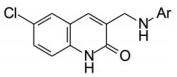
Table 3 SAR of compounds of 6-chloroqinolinone series

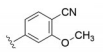
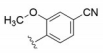
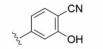
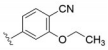
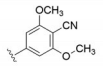
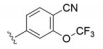
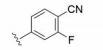
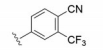
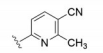
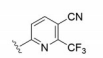
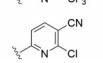


Compd.	R	DH1-R132H IC_{50}/μmol·L^{-1}	HLM left %/ 30 min	MLM left %/ 30 min	Solubility /μmol·L^{-1}
11		> 100	NT	NT	NT
12		0.668	6.5	5.3	0.21
13		> 100	NT	NT	NT
14		0.365	91	75	0.42
15		0.481	75	49	< 0.1
16		0.344	99	75	0.8
17		0.998	100	85	1.2
18		1.71	98	93	1.57
19		45.3	82	57	NT
20		> 100	NT	NT	NT
21		5.2	76	0.6	0.88
22		6.3	NT	NT	NT
23		9.67	100	81	32.5

3.5 芳腈片段的优化 上一节高活性的 4-氰基化合物是 **12** 和 **14**, 由于四唑化合物系列中含有 3-甲氧基的 **1** 的活性比没有甲氧基的 **8** 高 4 倍, 推论加入甲氧基团会提高活性, 合成的苯腈系列的 *o*-OCH_3 (**24**)、*m*-OCH_3 (**25**)、*o*-OC_2H_5 (**27**)、2, 6- $(OCH_3)_2$ (**28**)、*o*-OCF_3 (**29**)、*o*-CF_3 (**31**) 及 *o*-CH_3 (**15**) 的活性都强于 **12**, 吡啶系列的化合物 **32** 活性 0.072 μmol·L^{-1}, 强于所有的化合物, 而且对人和小鼠肝微粒体的稳定性也很高, 但溶解性较差 (表 4)。

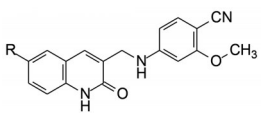
Table 4 Optimization of compounds **12** and **14**



Compd.	Ar	DH1-R132H IC_{50}/μmol·L^{-1}	HLM left %/ 30 min	MLM left %/ 30 min	Solubility /μmol·L^{-1}
24		0.127	81	42	0.43
25		0.147	79	2.1	< 0.1
26		0.382	75	85	20.9
27		0.188	78	29	< 0.1
28		0.464	80	59	< 0.1
29		0.487	72	72	< 0.1
30		0.995	100	49	< 0.1
31		0.231	100	100	< 0.1
32		0.072	84	69	0.64
33		1.26	94	100	< 0.1
34		25	NT	NT	NT

3.6 化合物 24 的喹啉酮环上取代基的优化 以 **24** 为新的起点, 只变换喹啉酮 6 位基团, 合成的化合物列于表 5。构效关系显示: ① 较大的取代基如 Br (**35**)、叔丁基 (**36**) 和 CF_3 (**37**) 由于更适配于所处的疏水腔内, 所以活性很强; ② 较小的基团或原子如甲基 (**38**)、F (**40**) 或 H (**41**) 活性降低, 比 **35** 低 7～17 倍; ③ 拉电子基团如 (Cl、Br、CF_3 和 F) 可提高代谢稳定性, 显然是由于电荷密度降低难于氧化代谢的缘故。综合考虑活性强度、代谢稳定性和溶解性等因素, 仍认为化合物 **24** 是优良分子。笔者认为 6-氟 (**40**) 也是均衡的化合物。

Table 5 Optimization of quinolinone part of compound **24**



Compd.	R	DH1-R132H IC_{50}/μmol·L^{-1}	HLM left %/ 30 min	MLM left %/ 30 min	Solubility /μmol·L^{-1}
24	Cl	0.127	81	42	0.43
35	Br	0.054	89	39	0.18
36	$C(CH_3)_3$	0.076	6	3.9	< 0.1
37	CF_3	0.053	76	89	< 0.1
38	CH_3	0.132	1.2	0.49	1.33
39	OCH_3	0.140	21.6	10.5	0.67
40	F	0.138	81	46	3.32
41	H	0.913	35	4.6	6.33

4 化合物 24 与 DH1-R132H 的结合模式

化合物 **24** 与 DH1-R132H 二聚体和 NADPH 复合物单晶 X-射线衍射分析, 表明每个酶单体结合一个 **24** (绿色) 和 NADPH (黄色) (图 3A), 由于结合腔的诱导契合, **24** 与 NADPH 的距离大约 15 Å, **24** 的结合也引起中央 α-螺旋的移动, 占据了底物结合腔的一部分 (图 3B), 也导致 Arg 三个残基重排成变构位点而接近 **24**, 使得喹啉酮的 7-和 8-位具有可引入基团的空间 (图 3C)。氰基与 Leu120 骨架酰胺的 NH 形成氢键, 连接基的 NH 与 Ile128 的骨架羰基形成氢键, 但距离 **24** 的苯环较近的 Ile128 骨架 NH 却闲置未被利用 (留待 5.3 节叙述)。2-甲氧基处于 Trp124 和 Ile113 形成的疏水裂隙间。喹啉酮的羰基 C=O 和 NH 分别与 Arg109 和 Asp279 形成氢键 (图 3D)。氯原子也占据到喹啉酮占据的由 Trp267、Ala258、Ile130 和 Ile128 构成的疏水腔中。

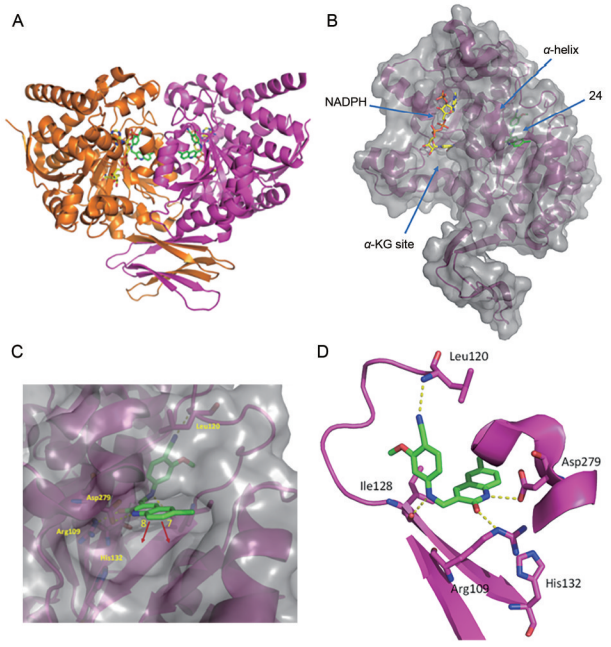


Figure 3 A: Overview of the X-ray crystal structure of mIDH1-R132H dimer and inhibitor **24**. B: View of a single IDH1 monomer, rotated 90° relative to -A-. Inhibitor **24** binds in a site that is toward the right side of the picture. C: Close-up view of the allosteric binding site of IDH1-R132H and inhibitor **24**. Positions 7 and 8 of the quinolinone ring are the only portion of compound **24** that appears to be exposed. D: View of the binding site of compound **24**

5 进一步结构修饰

5.1 喹啉酮 7-和 8-位引入基团 在上一节分析化合物 **24** 与 DH1-R132H 的复合物晶体结构, 确定喹啉酮 7-和 8-位可连接取代基以提高活性, 而且这一区域在结合腔的开口处, 因而在 7-或 8-位连接极性基团可改善物理化学性质, 表 6 化合物构效关系提示, 7-位取代的部分化合物如 **42**、**44**、**46**、**48**～**53** 的活性很强, 然而仍存在溶解性和代谢稳定性问题, 8-位取代的化合物如 **43**、**45** 和 **47** 对 DH1-R132H 保持了活性但对 DH1-R132C 活性低。

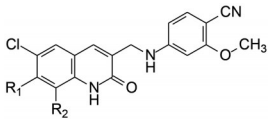
5.2 喹啉酮与苯腈连接基-CH_2-NH-的修饰 连接喹啉酮和苯腈的-CH_2-NH-含有 3 个单键, 旋转自由度较多, 对分子采取最佳的药效构象是不利因素, 因而应化学修饰此连接基以优化出优势构象, 降低熵损失而提高结合力和活性。**24** 晶体复合物中的-CH_2-NH-扭转角 φ1 和 φ2 分别是 305°和 160°, 这种构象使得喹啉酮与苯腈平面呈垂直取向, 通过对 **24** (连接基为 CH_2-NH) 和连接基为 $CH(CH_3)$-NH 的化合物作从头计算扭转扫描, 发现没有甲基取代的连接基分子存在有多个最低能量构象, 其中包括晶体结构的构象。而连接基为 *S*-$CH(CH_3)$-NH 的分子构象受到显著限制, 其最低能量构象近似晶体复合物中 **24** 的构象。而 *R*-对映体的最低能量构象与晶体的活性构象无相似性, 若旋转单键成活性构象, 会发生甲基与喹啉酮羰基氧原子的碰撞, 预示 *R*-对映体活性很低。基于上述计算和推论, 合成了在连接基上有不同取代的化合物列于表 7 中。

表 7 的构效关系提示, 连接基上 α-甲基取代的混旋化合物仍保持与 **32** 相近的活性和代谢稳定性, 但溶解性提高了 19 倍, 可能是甲基打破了 **32** 的分子共面性。

进而以 **56** 为起点合成了吡啶 2-位是甲氧基的 *S*-光活体和改变与吡啶环连接的位置, 有限数量的化合物都显示高活性 (DH1-R132H 和 DH1-R132C 酶和表达的细胞活性), 代谢稳定性和溶解性大都符合成药性要求 (结构和数据省略)。另外还在 7-位引入助溶基团, 效果也是不错的, 但这些化合物都没有进一步开发, 原因见后 (Lin J, Lu W, Caravella JA, et al. Discovery and optimization of quinoline derivatives as potent, selective, and orally bioavailable mutant isocitrate dehydrogenase 1 (mIDH1) Inhibitors. J Med Chem, 2019, 62: 6575−6596)。

5.3 优化 24 另一路径—氰基吡啶的变换 第 4 节讨论 **24** 与 DH1-R132H 结合模式提及酶的 Ile128 骨架 NH 距离 **24** 的苯环较近却闲置未加利用, 下面叙述基于此结构特征进行的分子设计, 即在苯环处引入氢键接受体的原子或基团。为考察构效关系和合成方便, 表 8 列出的化合物省去了氰基。**59** 缺少氰基几乎没有活性, 只将苯甲醚换成吡啶酮 (**60**) 活性恢复, IC_{50} = 0.356 μmol·L^{-1}, 推论吡啶酮的羰基与 Ile128 骨架上的 NH 形成氢键, 弥补了缺少氰基的损失。**61**～**63** 同样都有活性, 只是 *N*-环丙基体积大于原甲氧基占据的小

Table 6 7- and 8-substitution SAR on the quizolinone ring



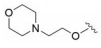
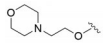
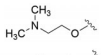
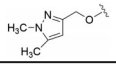
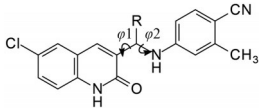
Compd.	R_1	R_2	DH1-R132H IC_{50}/μmol·L^{-1}	DH1-R132C IC_{50}/μmol·L^{-1}	HLM/MLM left %/30 min	Solubility /μmol·L^{-1}
42	OCH_3	H	0.127	0.667	1/94.9	< 0.1
43	H	OCH_3	0.455	88.6	53/3.4	< 0.1
44		H	0.006	0.225	30/73.4	< 0.1
45	H		0.022	3.48	NT	NT
46		H	0.016	0.932	1.1/13.1	0.385
47	H		0.341	3.71	0/2.4	< 0.1
48		H	0.013	1.28	0/10.7	1.35
49		H	0.023	2.67	2.5/14.3	0.53
50		H	0.032	5.1	4.3/78.8	0.41
51		H	0.056	5.87	6.3/48.8	0.72
52		H	0.069	6.25	NT	1.00
53		H	0.077	0.317	32.7/52.7	< 0.01

Table 7 SAR of compounds with different linkers



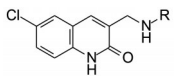
Compd.	R	DH1-R132H IC_{50}/μmol·L^{-1}	DH1-R132C IC_{50}/μmol·L^{-1}	HLM/MLM left %/30 min	Solubility /μmol·L^{-1}
32	H	0.076	0.82	84/69	0.64
54	(*RS*)-CH_3	0.147	0.606	100/96	12.2
55	(*R*)-CH_3	19.3	NT	100/89	8.0
56	(*S*)-CH_3	0.020	0.183	98/94	5.7
57		0.295	NT	81/67	< 0.1
58		0.100 2	NT	91/77	< 0.1

疏水腔的容积, 所以活性显著低于*N*-甲基**60**。而且**60**～**62**的溶解性也明显提高, 但对小鼠肝微粒体的稳定性低。

5.4 氰基吡啶酮和连接基变换的再探索 优化至此, 6-氯喹啉酮、连接基*S*-CH(CH_3)-NH、吡啶环的氰基取代和吡啶酮是参与结合的重要片段和基团, 用基团组合的方式设计了表9中化合物。化合物**60**加入氰基得到**65**, 活性提高了9倍, 也提高了对人肝微粒体的稳定性, 但降低了溶解度。**66**是**65**去除*N*-甲基, 活性与稳定性与**65**相近, 而溶解度提高了。**65**和**66**的连接基上都没有*S*-甲基取代, 而**67**的连接基为*S*-CH(CH_3)-NH, 集优化片段于大成, 活性强于**65**和**66**大约2～3倍, 显著的代谢稳定性, 溶解度大幅度提高, 是个优良的化合物。

为了治疗中枢的肿瘤, 希望化合物能通过血脑屏障, 研制者对设计的化合物采用中枢多参数优化 (MPO) 打分, 计算化合物的通过BBB的可能性 (Wager TT, Hou X, Verhoest PR, et al. Moving beyond rules: the development of a central nervous system multi-parameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. ACS Chem Neurosci, 2010, 1: 435−449), MPO是通过对多参数统计处理得到的穿越血脑屏障的计算参数, 主要取决于化合物的分布系数 (*c*log *D*) 和分子尺寸, 化合物**67**的MPO具有

Table 8 SAR of analogs of compound **24**



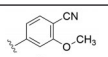
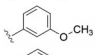
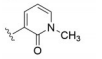
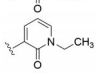
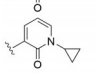
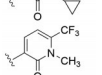
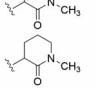
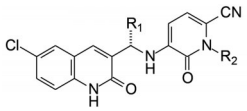
Compd.	R	DH1-R132H IC_{50}/μmol·L^{-1}	HLM left %/ 30 min	MLM left %/ 30 min	Solubility /μmol·L^{-1}
24		0.127	81	42	0.43
59		> 25	78	19	0.28
60		0.356	90	26	54
61		0.223	72	7	10
62		0.694	78	7	56
63		0.160	85	67	< 0.1
64		25	99	83	94

Table 9 SAR of quinolinone inhibitors of IDH1-R132H bearing a pyridinone moiety



Compd.	R_1	R_2	DH1-R132H IC_{50}/μmol·L^{-1}	HLM/MLM left %/30 min	Solubility /μmol·L^{-1}
65	H	CH_3	0.040 3	99/73	0.295
66	H	H	0.064 7	100/86	2.21
67	CH_3	CH_3	0.021 2	100/92	34.5

透过血脑屏障的高分值 (MPO = 5.2)。

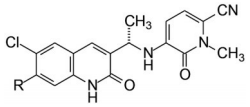
5.5 探索新结构类型的喹啉酮7-位取代基效应 前已述及, 喹啉酮7-位处于酶的开口处, 引入极性基团可提高溶解性, 降低分布系数, 故而在化合物**67**的基础上进行修饰, 合成的化合物列于表10。化合物**68**和**69**是甲氧基和氟取代, 活性没有变化, 简单的取代基**70**和**71**的活性显著提高, 但溶解度降低了。**71**作分子对接, 发现吡啶甲氧基只部分地处于结合腔, 吡啶环未能结合, 倘若在醚链上加入*R*-甲基, 则限制了链的自由度使吡啶朝向结合腔内的His132而发生π-π堆积作用, 而*S*-甲基由于碰撞而难以发生 (对接图省略)。化合物**72**酶和细胞活性都非凡的高, 然而溶解度低, 并且代谢稳定性和穿越血脑屏障数据 (MPO) 较差, 未能进入候选化合物 (Caravella JA, Lin J, Diebold RB, et al. Structure-based design and identification of FT-2102 (olutasidenib), a potent mutant-selective IDH1 inhibitor. J Med Chem, 2020, 63: 1612−1623)。

6 候选化合物的确定和奥卢特尼布上市

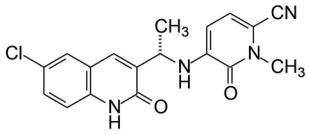
综合评价高活性的选择性、代谢稳定性、穿越血脑屏障能力、溶解性, 最终确定了化合物**67**为候选化合物, **67**对多种突变的异柠檬酸脱氢酶1转染的细胞呈现高活性, IC_{50}在6～94 nmol·L^{-1}之间, 而对野生型和相关的正常脱氢酶的活性很低, IC_{50}在22～>100 μmol·L^{-1}之间。灌胃移植DH1-R132H癌细胞裸鼠, 血中**67**浓度与癌组织中浓度相近, 具有剂量依赖和时间依赖的抑制瘤中2-HG的生成作用。移植HCT116-IDH1-R132H/+或HCT116-IDH1-R132C/+细胞的小鼠灌胃50 mg·kg^{-1}, 抑制2-HG生成率>90%分别持续24和12 h, 基于此抑制率计算的体内的IC_{50}值分别为26和36 nmol·L^{-1}。穿越小鼠血脑屏障的实验是灌胃**67** 5 mg·kg^{-1}, 脑/血浆药物浓度比为0.24, 说明低剂量有24%进入中枢中。灌胃100 mg·kg^{-1}, 比值达0.38, 给药后游离的**67** C_{max}约200 nmol·L^{-1}, 近10倍于IC_{50}, 7 h后血药浓度为130 nmol·L^{-1}, 6倍于IC_{50}, 提示**67**有良好的PD/PK性质。

研制公司FORMA Therapeutics定名化合物**67**为奥卢特尼布 (olutasidenib), 经三期临床研究, 表明**67**可用于治疗成人复发或难治性急性髓细胞白血病, 于2022年FDA批准上市, 同时FDA还批准了雅

Table 10 SAR of 7-substituted compounds of **67**



Compd.	R	Cell / IC_{50}/μmol·L^{-1}		HLM left %/30 min	Solubility /μmol·L^{-1}	MPO score
		Enzyme	Cell/HCT116 2HG			
		DH1-R132H/DH1-R132C	DH1-R132H/DH1-R132C			
67	H	0.021/0.114	0.021/0.094	100	34.5	5.2
68	OCH_3	0.011/0.040	0.004/0.014	83	11.6	4.9
69	F	0.025/0.159	0.022/0.104	100	18.0	5.1
70		0.008/0.024	0.002/0.017	82	0.53	4.4
71		0.011/0.011	< 0.002/0.006	66	2.5	4.0
72		0.008/0.004	< 0.002/< 0.002	70	1.6	3.8



Olutasidenib

培公司研制的实时 IDH1 检测方法, 以筛选适合使用本品的患者。

7 化合物 67 与 IDH1-R132H 酶的结合模式

化合物 **67** 与 IDH1-R132H 酶复合物的晶体结构显示, His132 突变的异柠檬酸脱氢酶 1 (IDH1-R132H) 是以同二聚体存在, 每个单体与一个 **67** 分子相结合, 所处的位置是接近于二聚体结合界面的变构腔内。图 4 是与 IDH1-R132H 复合物单晶结构图。喹啉酮的 C=O 和 NH 分别与 Arg109 和 Asp279 形成氢键; 吡啶酮环上的氰基与 Leu120 骨架 NH 氢键结合; 连接基的 NH 与 Ile128 羰基形成氢键; 吡啶酮的羰基也与 Ile128 骨架 NH 氢键结合, 后者提供的结合使活性强度和选择性显著提高。

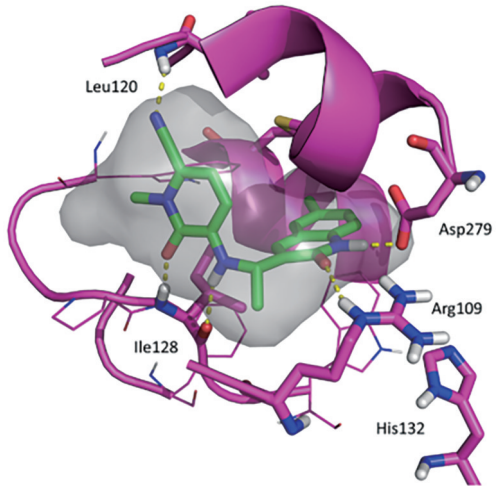


Figure 4 Crystal structure of **67** in complex with mIDH1-R132H