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。

天然药物中有一些是大环化合物, 分子尺寸大而复杂, 但往往有独特的活性和选择性, 因而近年来合成大环化合物的药物化学受到重视, 本刊于2020年第6期曾刊登了“大环小分子药物”文章。本品帕瑞替尼完全是从药物化学设计合成的双靶标作用的药物, 在由非大环的苗头分子构建大环的连接部位、尺寸大小、嵌入杂原子和结构优化过程中, 分子模拟指导了设计与合成。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0585

双靶标作用的抗肿瘤大环药物帕瑞替尼的研制

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)

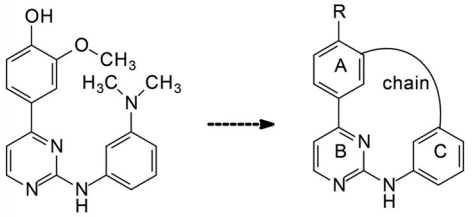
1 引言

Janus激酶家族包含有JAK1、JAK2、JAK3和TYK2等胞内非受体型酪氨酸激酶亚型, 功能是通过JAK-STAT通路转换细胞因子介导的信号, 在调控细胞增殖和分化起重要作用。其中当JAK2发生V617F突变($JAK2^{V617F}$)时会引起多种血癌和髓性增殖性肿瘤, 因而抑制$JAK2^{V617F}$是治疗药物的靶标。此时选择性非常重要, 因为若抑制JAK3, 则发生抑制免疫功能的严重不良反应。

另一方面, 急性髓性白血病通常发生另一激酶FLT3的突变, FLT3属于受体型酪氨酸激酶家族成员, 维持造血细胞和非造血细胞生长和发育。本品研制的目标是对突变的JAK2和FLT3双重选择性抑制剂。研制目标的化学结构定位于大环化合物, 旨在赋予分子一定的刚性和柔性, 降低构象变化的自由能, 从而提高活性和选择性及对介质的适配性。拟用关环复分解反应 (ring closing metathesis, RCM) 构建大环, 环中含有反式双键增加了刚性。

2 苗头化合物及其修饰策略

用细胞模型普筛公司内部化合物库发现**1**对多种激酶有一定的抑制活性, **1**的结构中含有2-氨基嘧啶环, 这在激酶抑制剂的专利中广泛存在, 导致研制的化学空间较窄。因而计划将**1**的两端苯环连接成大环化合物, 如**2**的类型所示。但这样的大环分子未必能够结合到激酶ATP结合域的铰链部位。考虑到天然大环化合物往往呈现不同的活性, 是因为环上有不同的杂原子或基团, 提高了与靶标结合的概率。为此, 拟在连接**2**的A/C环的链中不同位置含有杂原子。在A/B/C环上的取代基当然也需要优化。



1 **2**

3 大环合成的策略

3.1 关环复分解反应 关环复分解是分子内或分子间的烯烃复分解反应, 含有两个碳−碳不饱和键 (一般为末端烯烃) 的链状分子在金属卡宾的催化下发生复分解, 关环时失去一分子烯烃得到不饱和环系。关环复分解可以合成5至30元环烯烃。*E*/*Z*选择性取决于环的张力大小, 一般反式占优。如图1所示。常用的催化剂是含钌的有机配位化合物Grubbs催化剂 (Fu GC, Nguyen ST, Grubbs RH. Catalytic ring-closing metathesis of functionalized dienes by a ruthenium carbene complex. J Am Chem Soc, 1993, 115: 9856)。

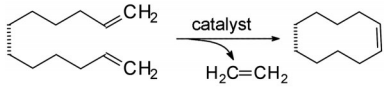


Figure 1 The general reaction of ring closing metathesis

3.2 首批化合物的合成和活性 首轮的合成是构建含有3个芳环的大环结构, 如图2所示, 合成的方法是连接苯环A/C的片段是含有两个氧原子和一个反式双键7～9个原子单元, 芳环上不作或只作简单取代。首先分别合成含有末端$CH=CH_2$双键侧链的A/B环和末端有乙烯基侧链的C环, 经关环复分解反应, 生成的大环产物以反式为主。

表1列出的化合物活性是用生化反应测定酶活性, 目标是高强度抑制JAK2和FLT3活性, 对其余的激酶没有或低活性, 是脱靶的量度。这些化合物的分配系数相近。

分析构效关系, 含有8个原子和至少1个苄氧基的化合物**5**、**7**和**8**的活性显著强于其他化合物, 尤其是含有两个苄醚结构的**7**和**8**对JAK2和FLT具有高选择性活性。

化合物**7**分子对接到JAK2 ATP结合域 (图3) 结果显示, 大环适配于结合腔内, 氨基嘧啶与铰链的Leu932的两处发生氢键结合, 苄醚的氧原子与Ser936有氢键结合。R取代基处于伸向溶剂相的开口附近, 提示该位置既可以引入极性基团有助于溶解, 也可能增加与激酶结合的机会。

3.3 优化活性和选择性以及溶解性 化合物**7**的骨架呈现较高的活性和选择性, 以**7**为模板进行结构优化, 变换位点在苯环C的2或3位, 例如分别引入含氮的碱性侧链, 合成的化合物列于表2。构效关系显示, 吗啉和哌嗪化合物**9**～**11**提高了活性和选择性, 但溶解性差, 若哌嗪连接羟乙基 (**12**) 也提高了溶解性。哌嗪被酰化或磺酰化 (**13**和**14**) 抑制JAK2的活性显著减弱。**15**的柔性侧链对JAK2/FLT3活性虽然很高, 但抑制CDK2的活性也很强, 该化合物因脱靶作用不可取。2位

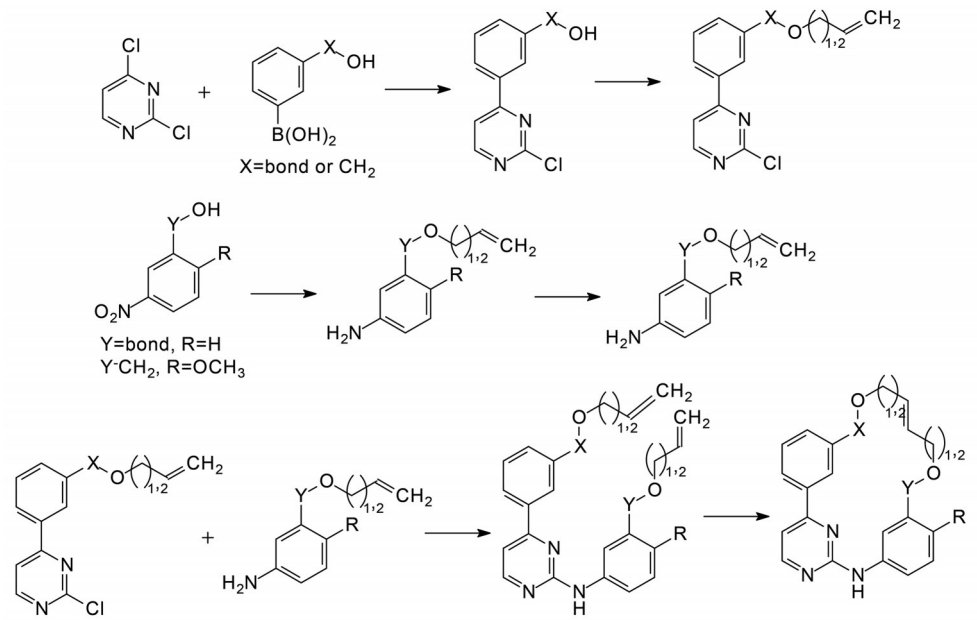
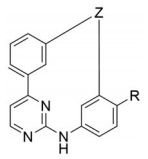
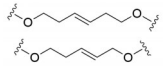
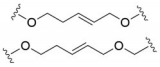
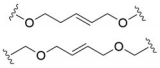
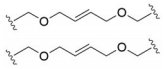


Figure 2 General scheme of synthetic route for compounds **3**–**8**

Table 1 SAR lead identification: search for a suitable linker for selectivity toward JAK2



Compd.	Z	R	IC_{50}/μmol·L^{-1}						Clog *P*
			JAK2	FLT3	JAK3	TYK2	JAK1	CDK2	
3		H	1.2	1.1	>10	5.2	>10	>10	4.7
4		H	0.23	0.88	>10	0.07	>10	0.33	4.3
5		OCH_3	0.13	0.31	NT	0.15	3.0	>10	4.6
6		OCH_3	0.26	0.078	NT	0.12	5.8	0.36	4.0
7		OCH_3	0.070	0.19	1.2	0.21	1.9	0.86	4.1
8		OH	0.053	0.17	1.1	0.17	0.4	0.21	4.4

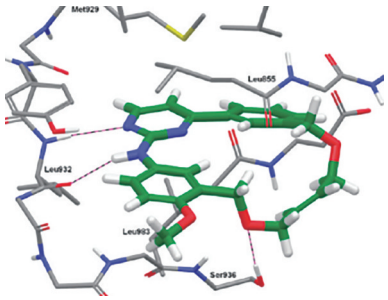


Figure 3 Compound **7** docked into the ATP-binding site of JAK2

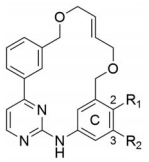
由氧原子引出的非碱性侧链**16**, JAK2活性弱, 溶解度也不好, 而碱性链对JAK2/FLT3活性选择性都较强, 例如化合物**17**～**19**、**21**等, 化合物**20**为内酰胺, 降低了对JAK2/FLT3活性, 溶解性也不会好 (未测)。氨基或碱性侧链连接在3位的化合物**22**～**25**对JAK2/FLT3活性很高, 但对CDK2有脱靶作用, 因此确定在2位连接侧链。

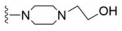
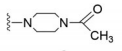
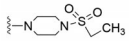
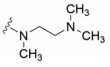
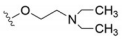
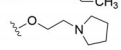
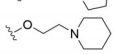
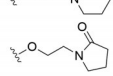
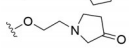
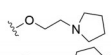
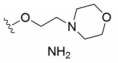
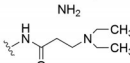
3.4 化合物18与JAK2的结合特征 图4a是化合物**18**分子对接于JAK2的ATP结合域, 分析结合模式显示, ① 酶骨架的Leu932与嘧啶N1和A/C环之间的NH形成两个氢键; ② Ser936的羟基与C环苄氧基的氧原子形成氢键; ③ Asp939的游离羧基与助溶基团四氢吡咯形成静电结合; ④ 在结合部位的底部由Leu855、Val863、Ala880和Leu983构成的疏水腔与芳环形成疏水性结合; ⑤ 在嘧啶的5位附近有疏水性的Met929残基, 可与连接基团有结合作用。图4b是变换对接图的方向, 可以看到A环附近有Gly993、Asp994和Lys85残基, 提示也可引入基团增强结合力。

3.5 芳环上的简单修饰 上一节预测到A和B在结合腔所处的位置尚有小的空间, 本节在A/B/C环的不同位置作小基团取代, 合成的化合物及其活性列于表3。

化合物**26**是在C环R_2连接甲氧基, 活性和选择性 (包括脱靶酶的作用) 都强于**18**。**27**是5-甲基嘧啶化合物, 对JAK2的活性强于**18**大约4倍, 但对JAK3活性提高了15倍, 可能是5位甲基的阻转效应改变了两个芳环的两面角, 促进了同JAK3结合, 所以**27**的选择性差。**28**是5-F取代, 拉电子作用不利于结合, 使抑制JAK2活性降低。在A环R_4的甲氧基取代, **29**抑制

Table 2 SAR of optimization of activity, selectivity and solubility. a: High throughput solubility in PBS buffered at pH 7.0; b: Not determined



Compd.	R_1	R_2	IC_{50}/μmol·L^{-1}						Solubility[a] /μg·mL^{-1}
			JAK2	FLT3	JAK3	TYK2	JAK1	CDK2	
7	OCH_3	H	0.070	0.19	1.2	0.21	1.9	0.86	
9		H	0.069	0.032	NT[b]	0.16	8.7	>10	NT
10		H	0.083	0.049	1.6	0.19	2.5	3.4	8.79
11		H	0.041	0.030	NT	0.14	3.6	>10	26.43
12		H	0.084	0.070	2.5	0.16	3.1	3.7	150
13		H	0.12	0.038	6	0.11	2.8	6.2	NT
14		H	0.15	0.15	>10	0.14	>10	>10	NT
15		H	0.077	0.031	NT	0.071	3.6	0.088	171
16		H	0.22	0.076	>10	0.47	>10	>10	NT
17		H	0.024	0.029	0.62	0.079	3.5	4.7	147
18		H	0.023	0.022	0.52	0.050	1.28	3.9	>150
19		H	0.015	0.034	0.75	0.084	0.95	2.7	NT
20		H	0.022	0.14	0.50	0.18	1.3	9.4	NT
21		H	0.022	0.067	0.38	0.14	0.94	5.8	NT
22	H		0.048	0.022	0.83	0.080	2.1	0.57	145
23	H		0.096	0.019	3.3	0.081	2.4	2.7	40
24	H		0.035	0.052	NT	NT	NT	0.24	25
25	H		0.044	0.078	0.39	0.018	1.9	0.40	NT

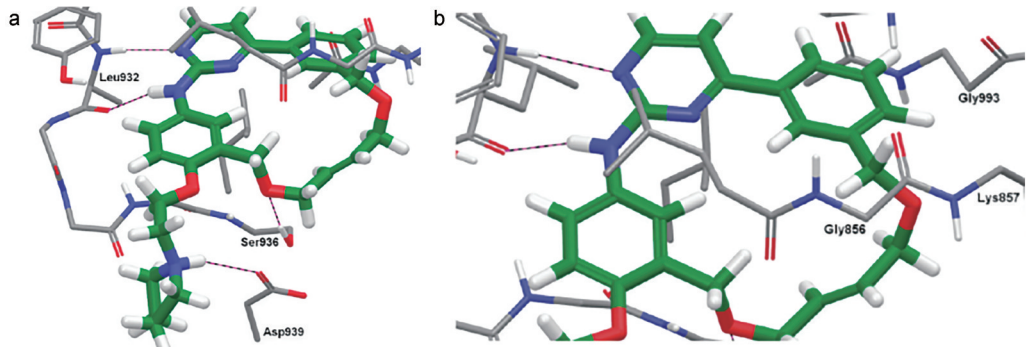
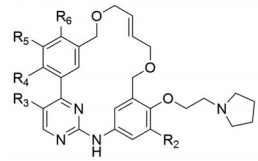


Figure 4 Compound **18** docked into the ATP-binding site of JAK2 (a, b)

Table 3 SAR of compounds with varied substituents at aromatic rings



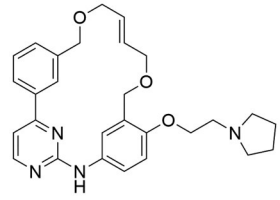
Compd.	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	IC_{50} / μmol·L^{-1}					
						JAK2	FLT3	JAK3	TYK2	JAK1	CDK2
26	OCH_3	H	H	H	H	0.036	0.009	NT	0.17	1.7	3.4
27	H	CH_3	H	H	H	0.007	0.019	0.089	0.057	1.0	>10
28	H	F	H	H	H	0.017	0.015	1.0	0.14	0.83	1.55
29	H	H	OCH_3	H	H	0.33	0.012	7.2	0/62	4.9	>10
30	H	H	H	F	H	0.024	0.008	NT	0.036	0.38	2.0
31	H	H	H	H	OCH_3	0.019	0.092	0.89	0.218	>10	>10
32	H	H	H	H	F	0.025	0.040	0.72	NT	4.6	3.55

JAK2活性降低，**30**是A环R_5的氟取代，对TYK2激酶呈现活性。**31**也是不错的化合物。

3.6 高活性/选择性化合物的比较和候选物的确定 选择活性和选择性较高的化合物比较它们的溶解性、对CYP的作用和代谢稳定性等性质，结果列于表4。权衡各个参数与活性和选择性，化合物**18**是优良的化合物 (William AD, Lee AC, Blanchard S, et al. Discovery of the macrocycle 11- (2-pyrrolidin-1-yl-ethoxy) -14, 19-dioxa-5,7,26-triazat-etracyclo[19.3.1.1(2,6).1(8,12)]hep-tacosa1(25), 2(26), 3, 5, 8, 10, 12(27), 16, 21, 23-decaene (SB1518), a potent Janus kinase 2/fms-like tyrosine kinase-3 (JAK2/FLT3) inhibitor for the treatment of myelofibrosis and lymphoma. J Med Chem, 2011, 54: 4638−4658)。

4 帕瑞替尼的批准上市

研制公司CTI BioPharma综合体外活性、选择性、药代和溶解性，确定了**18**为候选物，定名帕瑞替尼(pacritinib)，经临床前研究和临床试验，美国FDA于2022年批准上市，临床用于治疗骨髓纤维化和严重血小板减少症 (Jayaraman R, Pasha MK, Williams A, et



Pacritinib

Table 4 *In vitro* profiling leading to selection of *in vivo* candidate **18**. a: Human liver microsome; b: Mouse liver microsome; c: Parallel artificial membrane permeability assay; d: 20% inhibition at 5 μmol·L^{-1}

Compd.	Solubility /μg·mL^{-1}	CYP3A64 IC_{50}/μmol·L^{-1}	CYP2D6 IC_{50}/μmol·L^{-1}	HLM[a] $t_{1/2}$/min	MLM[b] $t_{1/2}$/min	PAMPA Papp[c] (×10^{-6} cm·s^{-1})
17	147	2.8	>10	44	16	15.8
18	>150	>5[d]	>5[d]	>60	22	9.3
19	NT	0.37	>10	>60	11	39.3
27	>150	2.5	>10	>60	40	16.8
31	60.83	>10	>10	>60	29	16.1

al. Metabolism and disposition of pacritinib (SB1518), an orally active Janus kinase 2 inhibitor in preclinical species and humans. Drug Metab Lett, 2015, 9: 28−47)。

5 后记

研制本品为大环化合物, 一个重要考虑是规避芳氨基嘧啶骨架的专利限制, 因为相当多的激酶抑制剂含有这个片段。其实12元环以上的大环分子有许多优点: 在半刚性的骨架上可以预构多样的功能基, 从而比相应的开链分子有更强的靶标结合力和选择性, 即使平坦或表浅的结合域也能够发生有效的结合 (Marsault E, Peterson ML. Macrocycles are great cycles: applications, opportunities, and challenges of synthetic macrocycles in drug discovery. J Med Chem, 2011, 54: 1961−2004)。虽然分子尺寸较大, 但仍有足够的口服生物利用度和透入细胞能力, 从而在靶标处达到足够的有效浓度。有些大环分子犹如“分子变色龙”, 其半刚/半柔的特征, 使得构象转换的能垒较低, 以致随着环境 (介质) 的变化而采取不同的适配构象, 例如在水相中取有利于水合溶解的构象, 穿越脂质性细胞膜则取另种构象 (Whitty A, Zhong M, Viarengo L, et al. Quantifying the chameleonic properties of macrocycles and other high-molecular-weight drugs. Drug Discov Today, 2016, 21: 712−717), 这样构象的变化有利于在水相和脂相迅速达到平衡 (Yang MG, Xiao Z, Cherney RJ, et al. Use of a conformational-switching mechanism to modulate exposed polarity: discovery of CCR2 antagonist BMS-741672. ACS Med Chem Lett, 2019, 10: 300−305)。虽然设计大环药物的理论根据还有待于探索, 但对经验归纳的描述符通过计算方法的确可改善大环的药代动力学性质 (Cummings MD, Sekharan S. Structure-based macrocycle design in small-molecule drug discovery and simple metrics to identify opportunities for macrocyclization of small-molecule ligands. J Med Chem, 2019, 62: 6843−6853)。瑞典 Kihlberg 等对大环化合物做了较全面的药物化学分析 (Jimenez DG, Poongavanam V, Kihlberg J. Macrocycles in drug discovery learning from the past for the future. J Med Chem, 2023, 66: 5377−5396)。