•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。

研制抗菌药是永恒的主题, 发现青霉素80多年来, 不断上市的西林、头孢和巴坦等β-内酰胺药物和β-内酰胺酶抑制剂仍不能控制某些耐药的革兰阴性菌, 道高一尺, 魔高一丈。本文简要回顾第一、二代β-内酰胺酶抑制剂的化学特征及其复合制剂, 着重讨论了2023年5月上市的第三代抑制剂杜洛巴坦的研制, 这是基于结构分析和药物化学原理而成功的范例, 成为对因耐受已有药物而表达D类酶的致病菌感染的治疗药物。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0772

第三代β-内酰胺酶抑制剂杜洛巴坦的研制

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

1.1 β-内酰胺酶家族 由弗莱明发现、20世纪40年代上市的青霉素开创了抗生素药物的新领域, 后来研制的若干代半合成青霉素和头孢类抗生素构成了重要的β-内酰胺类抗菌药物。然而频用和滥用导致病原菌对西林和头孢类药物的耐药性, 降低了疗效。耐药的主要机制是细菌产生β-内酰胺酶, 催化水解分子中的内酰胺键而失去抗菌活性。

β-内酰胺酶是多种细菌产生的以内酰胺类抗菌药物为底物的降解酶, 是对β内酰胺类药物耐药的最常见机制。该家族由多种酶系组成, 酶的基因存在于细菌的染色体或质粒中。根据酶的特异性及其基因的核苷酸序列, β-内酰胺酶分为以下4类 (Ambler分类)。

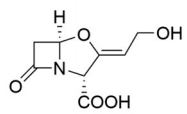
A类: 活性部位为丝氨酸残基, 包括多种质粒编码的青霉素酶, 如TEM1、SHV1、ROB1或PC1酶, 作用底物是天然和半合成青霉素 (西林类)。

B类: 为金属酶, 活性部位为半胱氨酸残基, Zn^{2+}参与催化反应。B类底物为碳青霉烯, 耐药的抗生素包括碳青霉烯、青霉素、第一、二、三代头孢菌素、氨曲南等。目前针对B类β-内酰胺酶尚无上市药物。

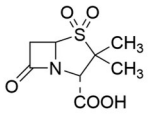
C类: 活性部位为丝氨酸残基, 它的产生与β-内酰胺酶诱导剂有关, 归因于调控基因突变, 主要是染色体编码的头孢菌素酶 (AmpC酶), 是由染色体上一组Amp基因介导的, 所以又称作头孢菌素酶。

D类: 即OXA系列酶, 例如苯唑西林酶OXA-48, 该酶对青霉素类水解能力很强, 对碳青霉烯类药物的水解活性较弱, 酶活性不能被现有β-内酰胺酶抑制剂抑制。

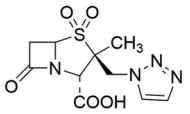
1.2 第一代β-内酰胺酶抑制剂克拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦 克拉维酸 (**1**, clavulanic acid) 是第一个发现的β-内酰胺酶抑制剂, 阿莫西林/克拉维酸 (钾盐) 复方制剂是全球第一个β-内酰胺酶抑制剂的复合制剂, 由葛兰素史克公司 (GSK) 研发, 于1981年在英国上市。第二个β-内酰胺酶抑制剂舒巴坦 (**2**, sulbactam), 与氨苄西林组成复方, 于1988年在德国上市。第三个他唑巴坦 (**3**, tazobactam) 与哌拉西林复方制剂最初为日本大鹏药业研制, 后由美国Lederle公司开发, 于1992年在法国上市。



1



2

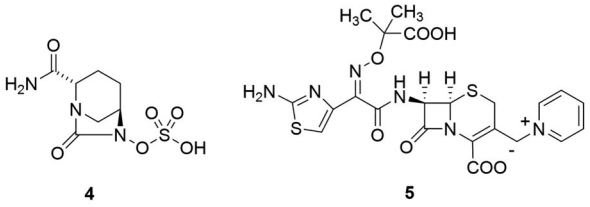


3

1～**3**都含有β-内酰胺结构, 并合于五元环的内酰胺具有化学张力, 本身抗菌作用弱, 却可强效抑制A类β-内酰胺酶, 起到延长青霉素类在体内的抗菌活性, 所以都是以复方形式应用。结构中亲电性的β-内酰胺环与靶标的亲核基团发生共价键结合, 构成了不可逆的自杀性抑制剂。然而**1**～**3**只抑制A类β-内酰胺酶, 对于B、C和D类诱发的耐药菌无能为力。

1.3 第二代β-内酰胺酶抑制剂 2015年在美国上市

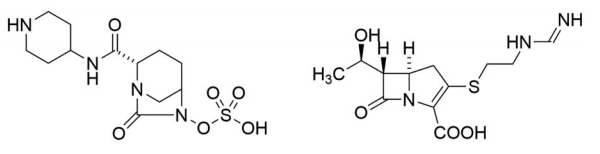
的阿维巴坦 (**4**, avibactam) 是新结构类型的β-内酰胺酶抑制剂, 化学结构中不含有β-内酰胺环, 而是以二氮杂双环辛酮为骨架结构, 在功能上**4**不仅抑制A类, 而且强效抑制C类和部分D类β-内酰胺酶。阿维巴坦与头孢他啶 (**5**, ceftazidime) 的复方制剂, 商品名Avycaz, 治疗复杂尿路感染和肾盂肾炎等 (Lahiri SD, Johnstone MR, Ross PS, et al. Avibactam and class C β-lactamases: mechanism of inhibition, conservation of the binding pocket, and implications for resistance. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58: 5704−5713)。



4 **5**

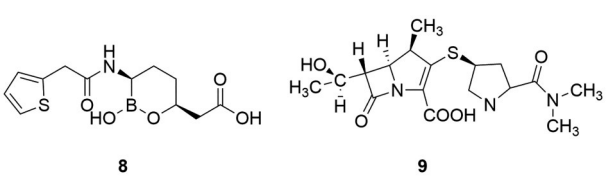
阿维巴坦抑制β-内酰胺酶的机制与前述不可逆共价结合不同, 如图1所示的历程。首先活性中心的Ser64在Tyr150和Lys67协同作用下, 羟基对羰基作亲核进攻 (1a) 形成二氮二氧的四面体结构 (1b), 电荷转移打开五员二氮杂环形成1c, 继之在Tyr150和Lys67的广义酸/碱作用下关环, 复原为阿维巴坦, 有别于前述开环裂解的不可逆抑制剂 (Ehmann DE, Jahic H, Ross PL, et al. Avibactam is a covalent, reversible, non-beta-lactam beta-lactamase inhibitor. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109: 11663−11668)。

2019年在美国上市的瑞莱巴坦 (**6**, relebactam) 是阿维巴坦的改构物, 结构中引入了哌啶环, 改变了物理和药代性质 (Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, et al. Imipenem-relebactam and meropenem-vaborbactam: two novel carbapenem-β-lactamase inhibitor combinations. Drugs, 2018, 78: 65−98), 也属于第二代β-内酰胺酶。瑞莱巴坦与亚胺培南 (**7**, imipenem) 复方制剂对耐碳青霉烯肠杆菌目 (CRE) 和铜绿假单胞菌有活性, 包括产生KPC和C类β-内酰胺酶的菌株。而且亚胺培南−瑞来巴坦对由于孔蛋白OprD的丢失以及ESBL或AmpC β-内酰胺酶的表达引起的亚胺培南耐药肺炎克雷伯菌和肠杆菌属也显示良好的活性。



6 **7**

法硼巴坦 (**8**, vaborbactam) 是属于含有环状硼酸酯药效团的β-内酰胺酶抑制剂, 与美罗培南 (**9**, meropenem) 按1∶1重量组成的复方制剂于2017年批准上市, 可抑制包括碳青霉烯酶在内的A类和C类β-内酰胺酶, 对B类和D类β-内酰胺酶无效。适应证为成人复杂性尿路感染 (Castanheira M, Rhomberg PR, Flamm RK, et al. Effect of the beta-lactamase inhibitor vaborbactam combined with meropenem against serine carbapenemase-producing enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother, 2016. 60: 5454−5458)。



8 **9**

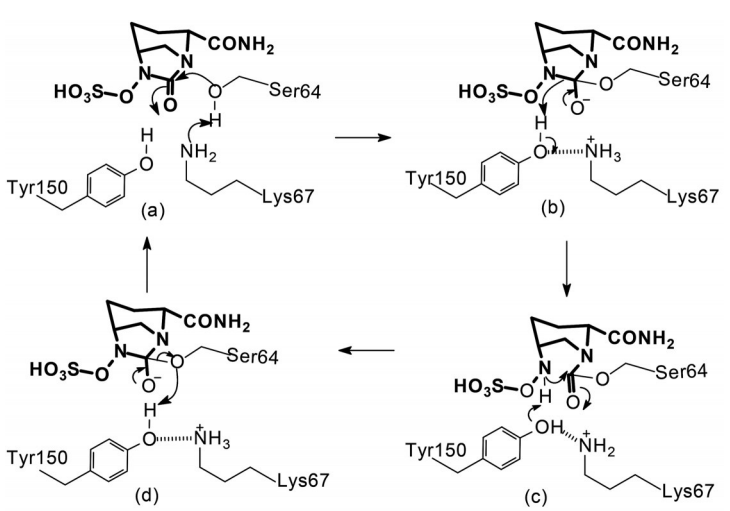


Figure 1 Scheme of the proposed mechanism of avibactam for inhibiting β lactamase. Acylation proceeds *via* a two-base (Tyr150 and Lys67) mechanism as the general acids-general bases to acylate followed by diacylation *via* recyclization

2 第三代β-内酰胺酶抑制剂杜洛巴坦的研制

2.1 D类β-内酰胺酶的特征和活性评价 研制第三代β-内酰胺酶抑制剂的目标是保持对A和C类β-内酰胺酶的抑制活性, 对多数阴性菌产生的D类β-内酰胺酶需呈现广谱活性, 而且还希望能够结合青霉素转运蛋白 (PBPs), 使本身有抑菌作用。为此, 以第二代的阿维巴坦母核为基础, 变换结构使设计的化合物对第二代产生耐药的鲍曼不动杆菌 (*A. baumannii*) 和绿脓杆菌 (*P. aeruginosa*) 有抑制活性。

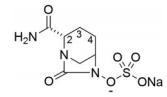
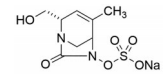
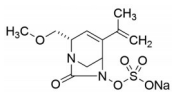
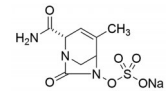
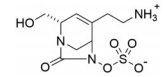
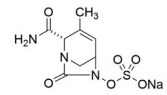
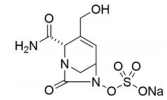
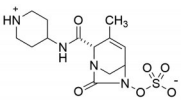
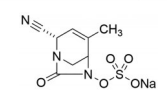
基于D类β-内酰胺酶蛋白的晶体结构, 分子结构的变换围绕基团的尺寸、极性和化学反应性, 使化合物能够与A、C和D酶活性中心的丝氨酸发生共价结合反应, D类的苯唑西林酶 (oxacillinase, OXA) 是水解碳青霉烯最难治的耐药菌的根源。还希望新一代的抑制剂与青霉素结合蛋白也有反应性, 从而扩大抗菌模式 (King AM, King DT, French S, et al. Structural and kinetic characterization of diazabicyclooctanes as dual inhibitors of both serine-β-lactamases and penicillin-binding proteins. ACS Chem Biol, 2016, 11: 864−868)。

分析多种OXA酶 (包括OXA-23、OXA-24、OXA-51和OXA-58) 的序列和结构, 发现围绕于活性位点丝氨酸大都含有疏水性和芳香性氨基酸残基, 这是水解β-内酰胺药物的位置, 但第一和第二代β-内酰胺酶抑制剂都不能干扰该活性中心 (OXA-48除外, 因其活性部位是一些极性氨基酸残基)。

2.2 活性评价 评价化合物抑制β-内酰胺酶A、C和D的活性分别是测定对KPC-2、Amp C和OXA-24等酶的半数抑制浓度 (IC_{50}); 对细菌的活性是受试物与4 mg哌拉西林合用, 测定对等位基因高表达KPC-2、Amp C和OXA-2酶的绿脓杆菌最低抑菌浓度 (MIC)。

2.3 化合物的设计和构效关系 分子设计的要点有3个: ① 在吡啶环中引入双键以提高环的张力和反应性能。② 契合D类活性中心的疏水性, 环上引入烷基以提高疏水性, 有利于疏水–疏水相互作用。③ 变换功能基以发现活性高抗菌谱广的分子。合成的代表性化合物列于表1。构效关系提示如下: ① 化合物**10**的C1缺少阿维巴坦 (**4**) 的羧酰氨基, 但在C2引入双键, 化学反应性强于**4**, 对酶的水解速率常数高于**4**。**10**抑

Table 1 Structure and *in vitro* activity of diazabicyclooctane compounds

Compd.	Structure	β-Lactamase IC_{50}/μmol·L^{-1}			Piperacillin MIC/mg·L^{-1} ± 4 mg·L^{-1} cpd				Hydrolysis, rate constant /h^{-1}
		Class A KPC-2	Class C Amp C	Class D OXO-24	Parent ampC$^-$pox$^-$	Class A KPC-2	Class C Amp C	Class D OXO-24	
4		0.17	0.54	16	4	8	8	64	0.042
10		0.10	2.2	2.2	4	8	32	64	0.084
11		0.66	3.0	0.014	4	>64	>64	>64	0.054
12		0.005	0.076	0.36	4	4	8	16	0.572
13		0.006	0.78	5.4	Not test	Not test	Not test	Not test	Not test
14		0.004	0.014	0.19	4	4	2	8	0.365
15		0.002	0.008	1.6	Not test	Not test	Not test	Not test	Not test
16		0.43	0.054	70	Not test	Not test	Not test	Not test	Not test
17		0.17	1.2	0.013	4	64	>64	8	Not test

制A和C类酶的活性与**4**相同, 而抑制D类OXA-24活性提高了6倍, 提示引入双键和疏水性的3-甲基有助于同疏水性的OXA-24结合。② **11**的C2为甲氧基, C4为异丙烯基, 增加疏水性, 对OXA-24酶的抑制活性显著强于**4**和**10**, 但并未提高对细菌的活性, 可能是细菌的外排作用所致。③ C2恢复羧酰氨基的化合物(**12**、**14**和**15**) 抑制A、C和D的酶活性都较强, **13**和**16**含有正电荷, 对D类的OXA-24酶尤其不利, 活性很低, 甚至**13**对C类Amp C的活性也降低很多。④ 化合物**15**的C3连接极性的羟甲基, 虽保持了对A和C酶的活性, 但对D类活性很弱。**17**与**15**相反, 对D酶有活性而抑制A和C活性低。⑤ 化合物**14**集合了优化的结构因素, 成为对A、C和D类酶和细菌最强的广谱抑制剂。

2.4 化合物14对β-内酰胺酶的抑制活性 为了比较化合物**14**和**4**对A、C和D类β-内酰胺酶的活性, 分别与哌拉西林、美罗培南或舒巴坦合用, 固定**14**和**4**的剂量为4 mg (以及不加β-内酰胺酶抑制剂), 评价这3个β-内酰胺药物对高表达A、C和D类酶的绿脓杆菌最低有效浓度, 表2列出的数据表明, 对高表达A、C和D酶的绿脓杆菌3个药物的MIC都较高 (不加**4**和**14**), 而与**4**合用组降低了对高表达A和C酶的MIC值, 而与**14**合用的3个药物组对A、C和D高表达的细菌MIC值最低, 说明**14**是广谱β-内酰胺酶抑制剂。

化合物**14**本身对大肠杆菌、产酸克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、嗜麦芽寡养单胞菌和柠檬杆菌等有抑制活性, 特别是对耐受碳青霉烯的肠杆菌科细菌 (包括B类金属β-内酰胺酶的阳性菌) 也有活性 (数据从略)。

作为第三代的**14**对8种丝氨酸为活性中心的A和C型β-内酰胺酶的酰化反应的二级速率出常数(k_{inact}/K_i) 为10^6～10^7 $(mol·L^{-1})^{-1}$ s^{-1}, 对D型速率常数为10^4～10^6 $(mol·L^{-1})^{-1}$ s^{-1}, 比第二代的阿维巴坦的酰化能力分别高100和1 000倍。

14也对青霉素结合蛋白 (PBPs) 发生酰化作用而发挥抗菌活性, 对大肠杆菌PBP2有选择性抑制作用, 对鲍氏不动杆菌的PBP1a作用较弱, PBP3很弱。对铜绿假单胞杆菌的3种结合蛋白都有中等强度的活性 (数据省略)。

2.5 候选物的确定和杜洛巴坦–舒巴坦的上市 通过全面评价化合物**14**对多种耐药菌的体内外实验和安全性评价, 确定**14**为候选化合物, 定名为杜洛巴坦 (durlobactam), 临床试验与舒巴坦合用, 静脉输注用于治疗由鲍曼不动杆菌–醋酸钙复合体的敏感分离株引起的医院获得性细菌性肺炎和呼吸机相关性细菌性肺炎有效, 于2023年美国FDA批准上市 (Durand-Reville TF, Guler S, Comita-Prevoir J, et al. ETX2514 is a broad-spectrum β-lactamase inhibitor for the treatment of drug resistant Gram-negative bacteria including *Acinetobacter baumannii*. Nat Microbiol, 2017, 2: e17104)。

3 杜洛巴坦与OXA-24结合模式

杜洛巴坦与D型β-内酰胺酶OXA-24的单晶未获成功, 因而动力学模拟借助化合物**12**与OXA-24的单晶结构的结合模式。**12**的五元环开环与Ser81共价键结合, 羟基被酰化。羧酰氨基的NH与Trp221的骨架羰基形成氢键, 硫酸基与Lys218、Ser219和Arg261发生静电相互作用。无配体酶 (apo) 的Tyr112与Met223之间疏水桥连 (hydrophobic bridge) 在与**12**结合后依然存在, 而且更加紧密了。但Lys84与羧基的静电引力, 在阿维巴坦的复合物中是没有的。

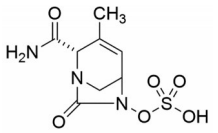
基于化合物**12**-OXA-24的晶体结构, 对阿维巴坦(**4**)、**12**和杜洛巴坦 (**14**) 分别于OXA-24作复合物动力学模拟, 结果表明, Tyr112与Met223之间疏水桥连在阿维巴坦的稳定性较低, 而**12**和杜洛巴坦比较稳定。图2的a、b和c分别是时间平均的结构图 (time-averaged structures)。

图2是化合物**4**、**12**和**14**与OXA-24分子动力学模拟图。化合物**4**与OXA-24共价结合的动力学模拟时间平均的结构 (图2a, 青色) 与复合物晶体结构 (图2a, 紫色) 的叠合图提示, **4**的结合模式和构象可以重合, 都与Ser81发生共价结合, 但Tyr112与Met223之间疏水桥连距离差别很大, 动力学模拟的疏水结合距离为7.8 Å, 而晶体结构距离为3.9 Å, 相差2倍, 说明**4**在结合过程中使Tyr112与Met223之间疏水作用的稳定性减弱。而**12**的动力学模拟 (图2b, 青色) 与晶

Table 2 Compound **14** restores β-lactam sensitivity in *A. baumannii* overexpressing individual class A, C or D β-lactamases

β-Lactamase	Piperacillin MIC/mg·L^{-1}			Meropenem MIC/mg·L^{-1}			Sulbactam MIC/mg·L^{-1}		
	None	+**4**/4 mg	+**14**/4 mg	None	+**4**/4 mg	+**14**/4 mg	None	+**4**/4 mg	+**14**/4 mg
None	8	8	4	0.25	0.25	0.125	1	2	0.5
TEM-1	>64	8	2	0.25	0.125	0.125	16	2	0.5
KPC-2	>64	8	2	32	0.5	0.125	32	2	0.5
ADC-30	32	8	2	0.25	0.25	0.125	1	1	0.5
OXA-23	>64	>64	2	16	16	0.25	4	2	0.5
OXA-24	>64	>64	4	64	64	0.5	4	4	0.5

体结构 (图 2b, 紫色) 的两个疏水性氨基酸残基的距离变化不大, 分别为 4.7 Å 和 4.1 Å, **14** 的动力学模型的距离为 4.3 Å (图 2c, 青色), 说明 **12** 和 **14** 在 C4 和 C3 的甲基存在, 有助于 Tyr112 与 Met223 疏水作用的稳定化。



Durlobactam

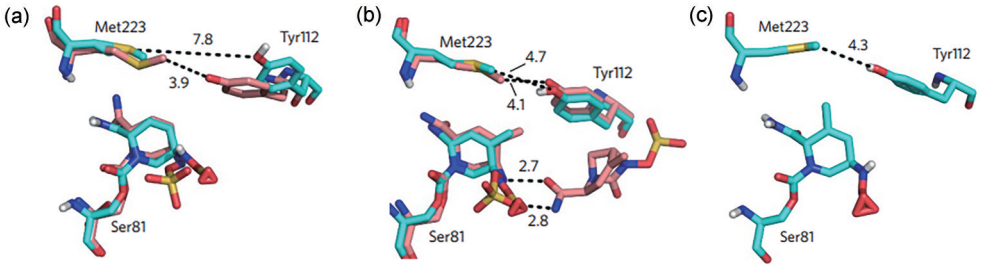


Figure 2 Time-averaged solution structures of avibactam (**4**), **12** and durlobactam (**14**) covalently bound to Ser81 of OXA-24, from MD simulations. (a) Model of **4**-OXA-24 (light blue) overlaid onto its corresponding crystal (pink); (b) Model of **12**-OXA-24 (light blue) overlaid onto its corresponding crystal (pink). Also shown is a second copy of the ligand, which was found to be non-covalently bound to the protein and the ligand; (c) Model of **14**-OXA-24