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。

本项目的药物化学看点是基于蛋白三维结构的分子设计，从普筛中用晶体结构和核磁共振方法确定先导物，到结构演化与优化都是在SBDD指导下进行的，特别是利用了晶体结构中“空闲的”硫酸根，它本是缓冲液中的成分，却掺入了复合物的晶体结构，显然是有助于配体的结合，研制者将羧基嵌入到分子的适宜位置，得到了高活性和选择性的活性分子。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0117

首创性补体旁路途径B因子抑制剂伊普可泮的研制

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)

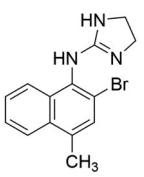
1 免疫性疾病和靶标

人体固有的免疫机制称作补体系统 (complement system), 主要功能是清除外来病原体, 后来也证明是人体非感染性疾病的致病因子。补体系统通过经典通路、凝集素以及旁路途径被激活, 产生蛋白水解功能, 形成膜攻击复合物 (MAC) 以增强免疫反应。这3个通路的关键节点是C3转化酶蛋白, 其中旁路途径平衡失调可引起人体多种疾病, 例如非典型溶血性尿毒症综合征 (atypical hemolytic uremic syndrome, HUS), 是一种罕见的严重疾病, 主要表现为溶血性贫血、血小板减少和急性肾损伤; 阵发性睡眠性血红蛋白尿 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)、黄斑变性 (macular degeneration) 等。旁路途径的关键蛋白是补体因子B (factor B, FB), 属于胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶, 它决定了后续的C3和C5的生成。FB过分激活引起上述疾病, 因而抑制FB可有效抑制MAC的生成, 进而减弱免疫反应, 控制上述疾病的发生与发展, 因此FB是本研究项目的靶标。诺华公司设定的目标是口服吸收的FB蛋白酶抑制剂, 旨在治疗上述除眼睛黄斑病变外的疾病, 因为眼部有血−视网膜屏障 (BRB), 对药物的理化性质有特殊要求。

2 苗头化合物

诺华从三个层面发现苗头化合物。① 高通量筛选公司的110万个化合物, 用ELISA方法评价化合物对形成膜攻击复合物MAC的抑制作用; ② 高通量筛选25万个化合物对眼镜蛇毒因子复合物 (CVF-Bb) 的研制活性, CVF-Bb作为C3转化酶稳定的代替物; ③ 用核磁共振和X射线方法作片段筛选。从中得到化合物**1**, IC_{50} 6.6 μmol·L^{-1}, 用表面等离子共振 (SPR) 测定的K_d = 10 μmol·L^{-1}, 表明不同测定方法的活性相近。

分析**1**与FB催化中心的晶体结构提示, 咪唑环进入由Glu97、Tyr99、Tyr172和Pro172组成的S3腔内, 但并未充满该腔穴, 而且有一个“空闲的”硫酸根 (在优化结构阶段极为重要)。环上的NH与Gly216羰基氧形成氢键, 萘环与Arg192的质子化的胍基发生阳离子−π相互作用, 萘环2-位的溴原子处于Pro172和Val218之间的沟槽内, 如图1所示。**1**的选择性作用不高, 对hERG钾通道有抑制作用, IC_{50} 7.1 μmol·L^{-1}, 对α肾上腺能受体有显著抑制作用 (Schubarta A, Andersonb K, Mainolfi N, et al. Small-molecule factor B inhibitor for the treatment of complement-mediated diseases. Proc Nat Acad Sci U S A, 2019, 116: 7926−7931)。



1

3 化合物1的二氢咪唑环的变换

1为2-溴萘化合物, 以氯置换溴的化合物**2**以提高分子的稳定性, 活性没有显著变化, 因而后面变化二氢咪唑环时都是2-氯取代。**3**和**4**为咪唑和苯并咪唑, 活

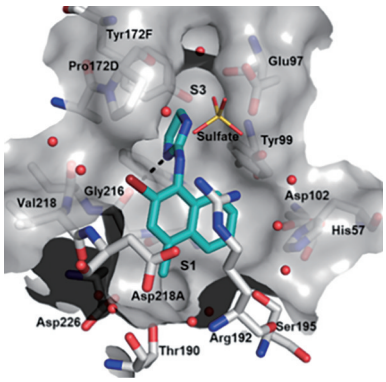


Figure 1 Cocrystal structure of human factor B (FB) in complex with compound **1**

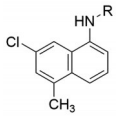
性显著降低, 提示或许芳香化的平面性和π电荷的均匀化不利于结合, 二氢噁唑 (**5**) 和四氢嘧啶 (**6**) 的活性都低于**1**和**2**。表1列出了化合物的结构和活性。

4 萘环的变换

FB作为酶原被激活过程中, N端降解出NH_3^+, 以与底物S1处保守残基Asp-COO^-形成盐键, 从而在催化中心形成氧负离子穴 (oxyanion hole), 以适配底物的活性构象。**1**的萘环占据S1位置, 但缺乏极性基团, 因而结合力和活性不强。将萘环骨架迁越为吲哚, 以期提高活性。合成的化合物列于表2。

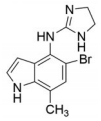
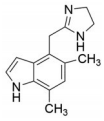
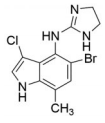
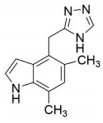
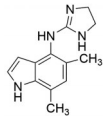
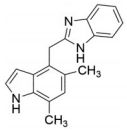
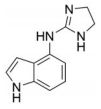
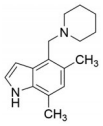
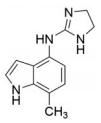
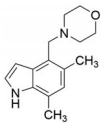
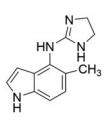
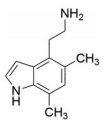
分析表2的构效关系, 吲哚替换萘环 (**7**) 仍保持活性。环上2-位引入氯原子 (**8**) 活性略降, 提示不宜有取代基。5-和7-位的取代非常重要, 例如**10**～**12**因缺少任何一处的甲基都失去活性。氨基二氢咪唑换成亚甲基苯并咪唑 (**15**) 仍保持活性, 但换成三唑或哌啶或吗啉 (**14**、**16**、**17**) 都显著降低活性。链胺化合物**18**的活性虽然较弱, 但结构简单, 分子尺寸小, 有优化空间。化合物**7**消除了萘系列的抑制hERG的脱靶作用, 但仍

Table 1 SAR exploration related replacement of the imidazoline of 2-chloro-compound **1**. a: Half-maximal inhibition of cobra venom factor Bb complex (CVF-Bb) in an ELISA format



Compd.	R	CV-FB/ IC_{50}/μmol·L^{-1}[a]
1	–	6.6
2		8.8
3		>100
4		>100
5		33
6		65

Table 2 Initial SAR exploration of compound with indole scaffold

Compd.	Structure	CV-FB/ IC_{50}/μmol·L^{-1}	Compd.	Structure	CV-FB/ IC_{50}/μmol·L^{-1}
7		8.0	**13**		6.3
8		11	**14**		>100
9		6.6	**15**		6.7
10		>100	**16**		>100
11		>100	**17**		>100
12		>100	**18**		50

显示抑制α受体的活性, 下一步是优化二氢咪唑片段。

图2是化合物**1**和**8**的晶体结构叠合图, 吲哚环处于S1腔, 环中NH与Thr190侧链的C=O发生氢键结合, **8**的2-Cl与**1**的2-Br处于相同的位置, 都在FB的Pro172和Val218沟槽之间。分子模拟提示, **16**的哌啶环恰好作为载体或抓手连接基团或片段以占据未充满的S3腔和Pro172D/Val218沟槽, 哌啶的2-位取代基则是连接的位点。

5 二氢咪唑片段的优化

以化合物**18**为新的起点, 基于结构生物学的引导, 在2-位或2,4-位连接苯环和 (或) 极性基团, 合成的化合物列于表3。

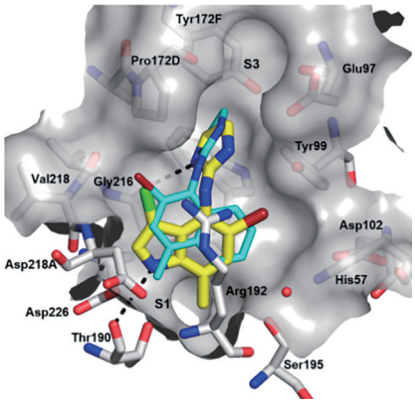


Figure 2 Cocrystal structure of **8** (yellow) with the catalytic domain of FB overlaid with **1** (cyan)

在2位连接苯环 (**19**) 或羟甲基 (**20**) 的意图分别是充满S1腔的空间或极性基团以提高结合力, 结果提示都能提高化合物活性, 但2-位的立体专属性特强, *S*构型为优映体, *R*活性极弱 (**20**的绝对构型未定, 推测*S*也是优映体)。

图3是*S*-**19**与FB的复合物晶体结构, 提示苯环确实处于Pro172和Val218沟槽中, 而且进入到S1腔的更深部, 吲哚的NH与Thr190的侧链形成氢键, 而不是化合物**8**的NH与FB骨架C=O之间形成。哌啶氮原子经质子化与Gly216形成氢键, 与**8**的二氢咪唑相似。

图3还显示出哌啶的4-位可以连接基团伸入S3腔。因而合成了2,4双取代的消旋或差向异构化合物

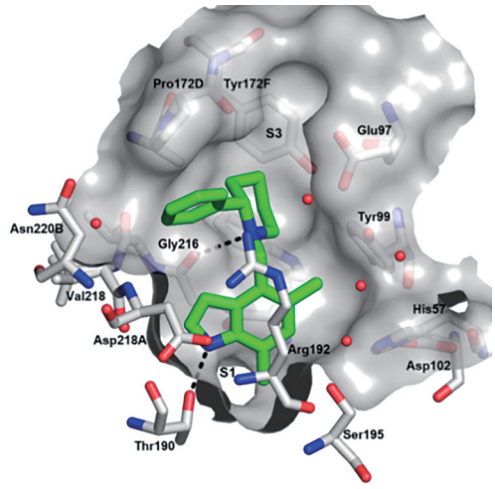
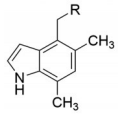
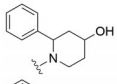
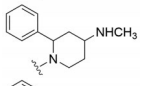
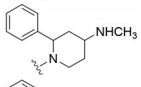
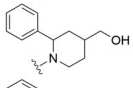
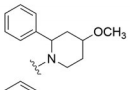
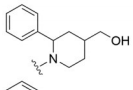
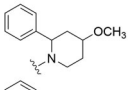
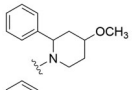
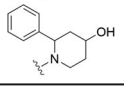
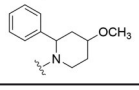


Figure 3 Cocrystal structure of indole *S*-**19** (green) with the catalytic domain of FB

Table 3 SAR related to the 2- and 4- positions of the piperidine moiety

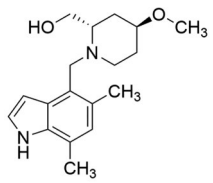


Compd.	Structure	CV-FB/ IC_{50}/μmol·L^{-1}	Compd.	Structure	CV-FB/ IC_{50}/μmol·L^{-1}
S-**19**		5.9	(±)**24**(*cis*)		>100
R-**19**		>100	(±)**25**(*trans*)		36
20-entA		6.0	(±)**26**(*cis*)		6.8
20-entB		>100	(±)**27**(*trans*)		2.5
(±)**21**(*trans*)		1.4	(±)**28**(*cis*)		7.3
(±)**22**(*cis*)		11	(+)**21**(*trans*)		6.8
(±)**23**(*trans*)		14	(−)**21**(*trans*)		0.72

21～**28**, 此时化合物的活性评价改用更灵敏的时间分辨荧光共振能量转移方法 (TR-FRET), 测定化合物对FB的竞争性结合作用。**21**和**22**分别是2-苯基-4-甲氧基化合物的反式和顺式消旋物, **27**和**28**分别是2-苯基-4-羟甲基的反式和顺式消旋物, 两对化合物的活性(顺/反和化合物之间) 相差不大, 而2-苯基-4-羟基化合物**23**和**24**的顺/反异构的活性相差很大, 4-甲氨基顺/反之间也有较大差异。考虑到**21**和**22**的代谢性质比羟甲基**27**和**28**更稳定, 因而对**21**拆分, 揭示 (−)-反式**21**的活性最强, IC_{50} 为0.72 μmol·L^{-1}。

6 硫酸根的启示和结构优化

化合物**20**-entA与*S*-**19**活性相近, 说明2-苯基与2-羟甲基对活性的贡献相当, 因而整合了**20**-entA和(−)反式**21**的2-羟甲基-4-甲氧基的构型合成了2*S*,4*S*-**29**, 抑制FB活性IC_{50} 3.35 μmol·L^{-1}, 提示拼合基团及其构型的有效性。



29

图4是**29**与FB复合物晶体结构, 显示2*S*-羟甲基与硫酸根形成氢键, 后者还与Arg192、Val218和Asn220结成氢键网络, 是提高活性的重要因素。下一步是将硫酸根的活性贡献整合到2-位的取代基中, 以使三元复合物换成二元结合, 有利于熵效应。表4列出了合成的化合物结构与活性。

消旋物**30**～**33**活性都不高, 推测磺酰氨基的位置与复合物的硫酸根相差较大, 检查图4右侧的*S*-**29**与

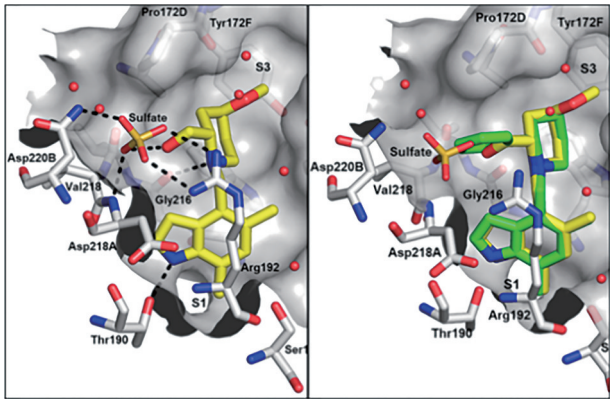
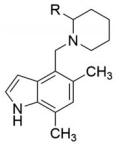


Figure 4 Cocrystal structure of 2*S*,4*S*-**29** (yellow) bound to the catalytic domain of human FB, highlighting an interaction with a sulfate ion from the crystallization buffer (left). The overlay of 2*S*, 4*S*-**29** with *S*-**19** (green) from its cocrystal structure (right)

FB复合物的硫酸根位置, 是在苯环的对位, 因而合成了消旋的**34**和**35**, 活性分别是*S*-**29**的4、8倍, 证明模拟整合硫酸根的策略是正确的。拆分**35**左旋体活性达到IC_{50} 0.033 μmol·L^{-1}, 强于右旋体500多倍。(−)-**35**对hERG离子通道和肾上腺α受体没有脱靶作用, 然而(−)-**35**对小鼠功能性实验活性不够强, IC_{50} 2.28 μmol·L^{-1}, 可能是因为小鼠与人的FB蛋白结构的差异, 因为小鼠与人序列等同性只有80%。尤其是构成与配体结合腔的3个残基Pro172、Arg192和Asn220不同, 因而难以确定对人体FB的功能活性。

借鉴 (−)-**21**和**29**的哌啶4-CH_3O进入S3腔对活性的贡献因素, 在哌啶的4-位和吲哚的5-位作基团变换, 合成的化合物列于表5。全部化合物对体外FB蛋白酶的抑制活性都非常高, 对小鼠和人体外血清中FB功能性抑制作用活性也近似, 但体内小鼠灌胃8 h后对血液和眼内抑制FB的活性以**38**和**41**显示高活性, 这两

Table 4 SAR related to efforts to mimic the interactions of the sulfate ion observed in the cocrystal structure of **29** with FB



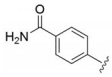
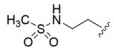
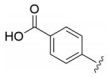
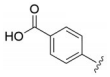
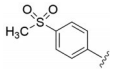
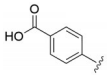
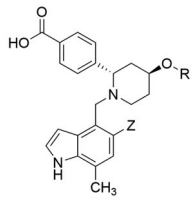
Compd.	Structure	FB-comp/ IC_{50}/μmol·L^{-1}	Compd.	Structure	FB-comp/IC_{50}/μmol·L^{-1}
30(±)		>100	**34**(±)		0.71
31(±)		12	**35**(±)		0.062
32(±)		27	**35**(+)		17
33(±)		1.3	**35**(−)		0.033

Table 5 *In vitro* and *in vivo* profiles of advanced FB inhibitors. a: For human, serum IC_{50} values reflect inhibition of MAC deposition, and for mouse C3b deposition; b: % Inhibition of C3d+iC3b formation at 8 h after orally 30 ng·kg^{-1}



Compd.	R	Z	FB-comp/ IC_{50}/μmol·L^{-1}	50% H/M serum IC_{50}/μmol·L^{-1} [a]	Mouse plasma PD inh./%[b]	Mouse ocular PD inh./%[b]	Mouse PK $t_{1/2}$/h / *F*/%
36	Me	Me	0.024	0.15/0.16	43	35	6.6/41
37	Me	*c*-Pr	0.018	0.24/0.12	35	43	5.6/83
38	Me	OMe	0.018	0.18/0.15	85	60	2.4/37
39	Et	Me	0.018	0.11/0.12	37	10	NA
40	Et	*c*-Pr	0.006	0.14/0.08	71	23	9.6/15
41	Et	OMe	0.012	0.13/0.11	83	83	7.2/46

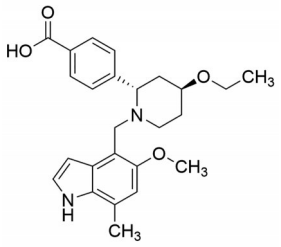
个化合物的吲哚5-位都是甲氧基, 对小鼠血浆和眼部的FB蛋白酶的活性显著强于5-甲基或环丙基。进而对**38**和**41**作进一步研究, 结合生物利用度和半衰期等药动学性质 (表5), 确定了**41**为候选物 (Mainolfi N, Ehara T, Karki RG, et al. Discovery of 4-((2*S*,4*S*)-4-ethoxy-1-((5-methoxy-7-methyl-1*H*-indol-4-yl)methyl) piperidin-2-yl)benzoic acid (LNP023), a factor B inhibitor specifically designed to be applicable to treating a diverse array of complement mediated diseases. J Med Chem, 2020, 63: 5697−5722)。

7 伊普可泮的批准上市

化合物**41**以3～30 mg·kg^{-1}灌胃小鼠, 呈现剂量依赖性地抑制补体旁路途径的功能, 单次30 mg·kg^{-1}灌胃8 h后完全抑制血浆和眼部的旁路途径。对41种人体蛋白酶没有脱靶性 (IC_{50} > 30 μmol·L^{-1})。对110种酶、受体、离子通道 (hERG、肾上腺能受体α1a和α2c亚型)都未显示脱靶作用。遂定名为伊普可泮 (iptacopan), 经III期临床试验, 美国FDA于2023年批准上市, 治疗成人阵发性睡眠性血红蛋白尿疾病。

8 伊普可泮与靶标FB的结合特征

图5是伊普可泮与FB催化部位复合物的晶体结构图, 最显著的特征是苯环4-位羧基与Asn220侧链和Asp218的NH形成氢键网络, 哌啶N原子与Gly216氢键结合, 乙氧基进入S3腔发生疏水作用, 吲哚环处于S1腔内, NH与The190氢键结合。



Iptacopan

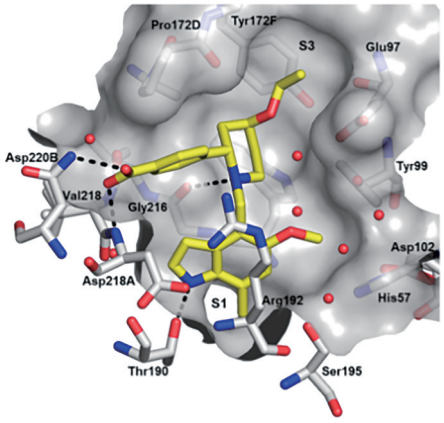


Figure 5 Cocrystal of iptacopan (**41**) within the catalytic domain of FB