•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。

本刊2014年49卷第11期介绍了硼替佐米的研制历程 (含有机硼的小分子药物硼替佐米. 药学学报, 2014, 49: 1621−1624), 硼替佐米是首创的蛋白酶体抑制剂, 临床用作治疗多发性骨髓瘤。本品是针对蛋白酶体靶标的第二代药物, 治疗对硼替佐米产生耐药的复发难治的多发性骨髓瘤。两个“佐米”都是共价药物, 亲电基团 (弹头) 分别是有机硼酸和 α,β-酮基环氧乙烯, 前者形成配位键, 后者形成两个共价键。本品在由天然产物的结构演化中, 弹头的结构和位置不变, 优化的内容是其他药效团的适配, 而硼替佐米的先导物优化也涉及了亲电基团的变换。在与靶标结合的微观层面上, 共价键药物可视作双功能分子, 发生共价键合的弹头决定了作用强度, 其余弱作用结合的药效团除有强度贡献外, 更体现了对靶标的选择性。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0197

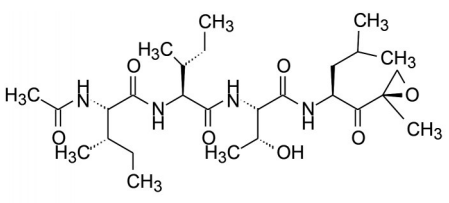
蛋白酶体抑制剂卡非佐米的研制

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 先导化合物

1.1 天然产物环氧霉素的抗癌活性 BMS公司在日本的研究所于1992年从一种放线菌 (No. Q996-17) 分离出抗生素环氧霉素 (**1**, epoxomicin), 为四肽化合物, C端含有 α,β-酮基环氧乙烷结构。用黑色素瘤B16移植小鼠体内实验表明**1**有显著抗癌活性 (Hanada M, Sugawara K, Kaneta K, et al. Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. J Antibiot, 1992, 45: 1746−1752), 然而这并没有引起重视, 原因是肽类骨架的不稳定性和成药性差; 酮基环氧乙烷是亲电性基团, 可能缺乏选择性作用; 作用机制不清楚, 因而没有进一步研究。



1

1.2 化学生物学确定靶标 耶鲁大学Crews等出于对该天然产物的抗癌活性的好奇心, 当时也正是化学生物学兴起的时代, 就以**1**作为化学探针研究其作用靶标。他们用生物素标记的环氧霉素与细胞温孵, 利用环氧乙烷的亲电性共价键结合于靶标蛋白上, 经与链霉亲和素涂层树脂处理后, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 (SDS-PAGE)、免疫印迹 (Western blotting) 和质谱鉴定, 证明结合的靶标蛋白是蛋白酶体, 活性极强, 而对其他蛋白酶较少抑制作用, 这与其他蛋白酶体抑制剂例如硼替佐米不同 (Meng LH, Mohan R, Kwok BHB, et al. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo* antiinflammatory activity. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: 10403−10408)。

解析**1**同蛋白酶体复合物的晶体结构, 发现**1**与N端催化亚基的苏氨酸残基发生双重共价结合, 如图1所示, 羟基对**1**的酮基作亲核加成, 发生羟醛缩合; 氨基向环氧乙烷作SN2取代开环, 复合物形成牢固的吗啉环使结合呈不可逆性。由于通常的蛋白酶的活性中心处于分子的中部难以形成如此的结合模式, **1**表现出对蛋白酶体的特异性抑制 (Groll M, Kim KB, Kairies N, et al. Crystal structure of epoxomicin: 20S proteasome reveals a molecular basis for selectivity of alpha, beta-epoxyketone proteasome inhibitors. J Am Chem Soc, 2000, 122: 1237−1238)。

1.3 化学合成 以天然产物为先导物的药物研发, 一个关键环节是建立全合成的方法, 以保障实验用样品, 制备类似物以优化结构, 以及结构 (包括构型) 的

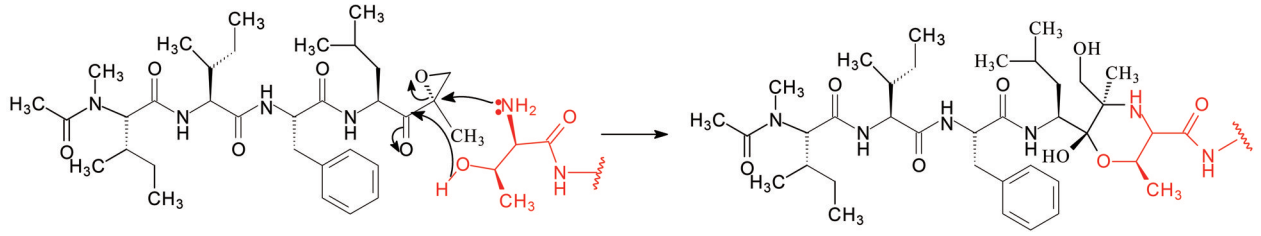


Figure 1 Process of formation of morpholine moiety between epoxomicin and proteasome

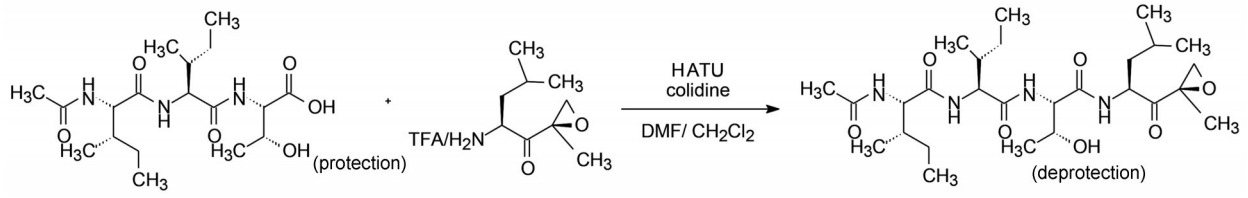


Figure 2 Critical synthetic step of epoxomicin

确证。本项目包含的化学生物学研究, 还合成了生物素标记的环氧霉素, 以及^{3}H-标记样品等。合成的方法是左侧的三肽用常规的固相合成方法, 三肽与右侧的含环氧乙烷的亮氨酸片段缩合, 脱保护基而得, 如图2所示 (Sin N, Kim KB, Elofsson M, et al. Total synthesis of the potent proteasome inhibitor epoxomicin: a useful tool for understanding proteasome biology. Bioorg Med Chem Lett, 1999, 9: 2283−2288)。

2 结构优化与构效关系

2.1 活性评价 一些肿瘤和炎症细胞高表达的蛋白酶体是类复合酶体, 具有多种蛋白酶水解活性, 包括糜蛋白酶样 (Chym-like) 活性、胰蛋白酶样 (Tryp-like) 活性和谷氨酰多肽水解酶 (PGPH) 活性。本项目在阐明**1**的作用特征的基础上, 通过结构修饰, 使目标只对这些酶亚基有抑制活性。

评价受试化合物的活性是测定蛋白酶体的酶活性动力学。用肽−胺甲基香豆素 Suc-LLVY-AMC 作为糜蛋白酶样的水解底物, Boc-LRR-AMC 为胰蛋白酶样底物, Z-LLE-MAC 为谷氨酰多肽水解酶的底物。方法是将不同浓度的受试物分别与3种底物和牛红细胞20S蛋白酶体置于96孔板中, 根据水解反应初始与结束时测定的460 nm处荧光发射值, 经非线性最小二乘拟合, 计算k_{obs}/[*I*]值 (测定3次的均值)。k_{obs}为速率常数, [*I*]为受试物浓度。受试物在150 μmol·L^{-1}浓度下未呈现抑制作用的化合物视作无活性。

评价受试物抑制细胞增殖活性是用大约1 000个BEA细胞在96孔板温孵过夜, 加入不同浓度受试物, 温孵5天, 加入^{3}H-胸腺嘧啶, 温孵4 h, 收获细胞, 液闪测定细胞的放射活性, 计算化合物的IC_{50}。

2.2 结构修饰原则 既往研究表明, 20S蛋白酶体的催化域可适配于多种氨基酸侧链, 在结构上具有容纳剪切键两边氨基酸侧链的腔穴, P1是关键位置, 对糜蛋白酶样抑制剂的P1处宜为Leu或Phe, 而作用于胰蛋白酶样抑制剂的P1处为碱性氨基酸如Lys或Arg, 变换P2～P4残基可影响P1的选择性和抑制强度 (Bogyo M, Shin S, McMaster JS, et al. Substrate binding and sequence preference of the proteasome revealed by active-site-directed affinity probes. Chem Biol, 1998, 5: 307−320), 图3是基于底物的结构设计抑制剂的位点, 棕色圈是重要位点, 蓝色圈也是优化区域。

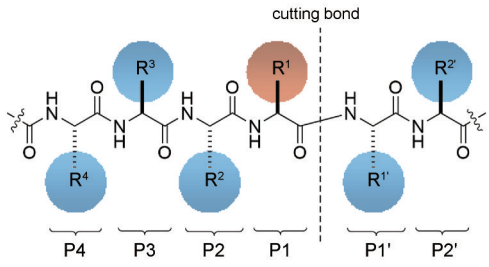


Figure 3 Scissoring bond and modified sites of substrate by proteasome

2.3 变换肽尺寸 由4个完全是Leu组成的四肽酮基环氧乙烷 (**2**) 为起始物, 缩短成三肽、二肽和一个氨基酸, 评价活性和选择性, 结果列于表1。构效关系显示全部为Leu的四肽 (**2**) 抑制糜蛋白酶样活性虽低于**1**, 但仍具有较高的选择性抑制作用。减小成三肽 (**3**) 活性显著下降, 而二肽**4**和**5**失去活性, 提示分子须要有足够的尺寸。遂以**2**为先导物, 对氨基酸类型加以变换。

2.4 变换中间的氨基酸残基 固定N端和C端的氨基酸为Leu, 变换中间两个氨基酸 (对应于P2和P3), 合成的四肽化合物列于表2。在P2和P3的氨基酸是

Table 1 *α*,*β*-Keto-epoxide compounds with different length of peptides. a: Chymotrypsin-like activity; b: Trypsin-like activity; c: Polyglutamate peptide hydrolase

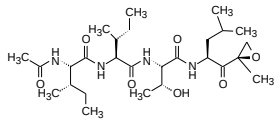
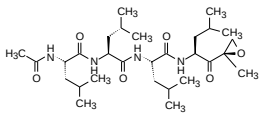
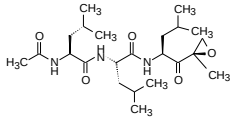
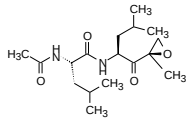
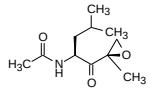
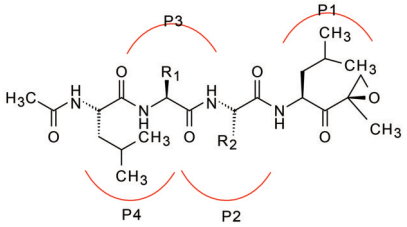
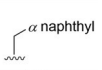
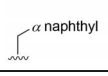
Compd.	Structure	$k/[I]/(mol\cdot L^{-1})^{-1}\cdot s^{-1}$		
		Chym-like[a]	Tryp-like[b]	PGPH[c]
1		37 000 (30−80 nmol·L^{-1})	79 (8−12 μmol·L^{-1})	37 (50−100 μmol·L^{-1})
2		14 000 (50−150 nmol·L^{-1})	Inactive	9.2 (100−160 μmol·L^{-1})
3		780 (1−2.5 μmol·L^{-1})	5.1 (100−150 μmol·L^{-1})	120 (8−12 μmol·L^{-1})
4		3.1 (100−160 μmol·L^{-1})	Inactive	Inactive
5		Inactive	Inactive	Inactive

Table 2 Effect of change in two amino acids on the activity



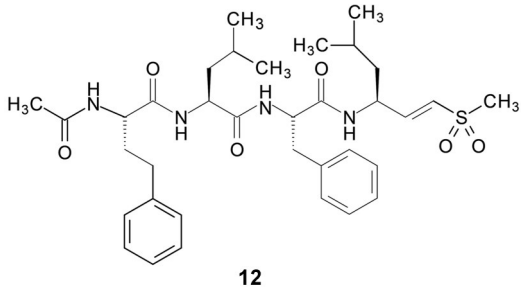
Compd.	R_1	R_2	$k/[I]/(mol\cdot L^{-1})^{-1}\cdot s^{-1}$		
			Chym-like	Tryp-like	PGPH
2			14 000 (50−150 nmol·L^{-1})	Inactive	9.2 (100−160 μmol·L^{-1})
6			16 000 (80−120 nmol·L^{-1})	4.1 (100−150 μmol·L^{-1})	20 (60−80 μmol·L^{-1})
7			54 000 (40−60 nmol·L^{-1})	Inactive	Inactive
8			29 000 (60−120 nmol·L^{-1})	Inactive	Inactive
9			1 300 (500−1 000 nmol·L^{-1})	2.0 (120−150 μmol·L^{-1})	130 (10−16 μmol·L^{-1})
10			8 500 (200−400 nmol·L^{-1})	Inactive	Inactive
11			31 000 (40−100 nmol·L^{-1})	Inactive	Inactive

Pro、Phe或萘基丙氨酸 (**6**～**11**), 当P2或P3为芳香性氨基酸, 提高了抑制糜蛋白酶样活性, 尤其是化合物**7** (P2为Phe), 活性与选择性都很高, 其实其他系列化合物 (例如二肽或三肽类醛或硼酸) 的抗蛋白酶体活性

也是以苯丙氨酸的活性贡献最高 (Adams J, Behnke M, Chen S, et al. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. Bioorg Med Chem Lett, 1998, 8: 333−338)。化合物**10**是将**7**的两个氨基酸交换位置 (区域异构), 活性降低数倍, 提示P2位置为Phe的必要性。换成体积较小的丙氨酸如**6**和**9**的活性下降。

2.5 P4部位的变换 为了考察邻近N端的P4侧链的尺寸对3个催化位点的影响, 参考了Bogyo等报道的含有乙烯砜 (也是亲电基团) 的肽化合物**12**对蛋白酶体的构效关系 (Bogyo M, Shin S, McMaster JS, et al. Substrate binding and sequence preference of the proteasome revealed by active-site-directed affinity probes. Chen Biol, 1998, 5: 307−320), 认为P4位置有较大的结合腔, 因而在P4设计了较大侧链的氨基酸, 为了避免其他位置的不同对活性的影响, 其余三处都固定为Leu。结果列于表3。构效关系显示P4的尺寸对抑制糜蛋白酶样活性有显著影响。以四肽全为亮氨酸的**2**为基准, R变为甲基的丙氨酸 (**13**), 活性显著降低, 而其余较大疏水基团的芳香性基团的化合物 (**14**～**17**) 抑制糜蛋白酶样的活性都强于**2**, 而对胰蛋白酶和PGPH没有或较弱活性, 提示该位置呈现较强的选择性。其中R为高苯丙氨酸的化合物**15**抑制糜蛋白酶样活性非常的高, 说明苯乙基侧链对酶的结合腔为最佳适配。

以上三轮的构效关系研究得到了化合物**7**和**15**,



12

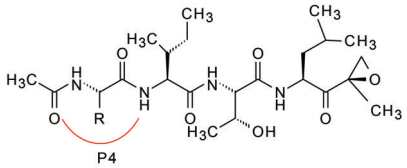
具有强效和高选择性抑制糜蛋白酶样的活性, P1位置始终是亮氨酸残基。这些化合物对胰蛋白酶和PGPH的抑制作用较弱, 而指望改变P1提高后两种活性又会影响对糜蛋白酶的活性, 因而未对P1作变换。而拟解决的问题是同时抑制蛋白酶体的3个催化位点, 下一步是调整氨基酸残基以兼顾对3个活性位点的抑制。

3 进一步优化四肽和卡非佐米上市

保持P1为亮氨酸和酮基环氧乙烯不变, 变换其余位置的侧链合成了上百个化合物, 其中也整合化合物**7**和**15**的苄基与苯乙基, 得到化合物**18**以及脱乙酰基化合物**19**对3个活性位点的抑制活性较好, 与先导物环氧霉素 (**1**) 和硼替佐米 (**20**, bortezomib) 的活性比较列于表4, 化合物**19**抑制3种酶活性显示良好, 但因溶解性差, 会限制剂量窗口。

随后引入含有吗啉片段的助溶基团, 化合物**21**仍保持对蛋白酶体的抑制活性, 对糜蛋白酶样、胰蛋白酶样和谷氨酰多肽水解酶活性 (IC_{50}) 分别为0.000 28、0.63和2.42 μmol·L^{-1}, 对耐受硼替佐米的肿瘤细胞保持

Table 3 Structure and activity of compounds with varied P4 position



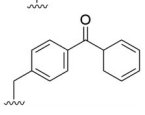
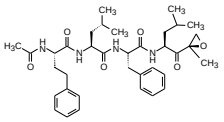
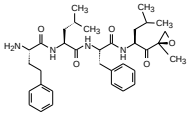
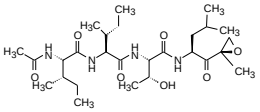
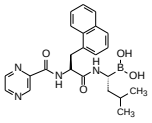
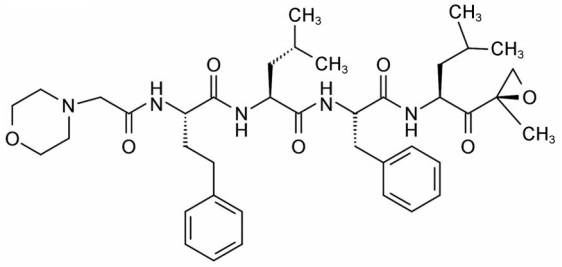
Compd.	R	$k/[I]$/(mol·L^{-1})$^{-1}$·s^{-1}		
		Chym-like	Tryp-like	PGPH
2		14 000 (50−100 nmol·L^{-1})	Inactive	9.2 (100−160 μmol·L^{-1})
13		5 300 (400−800 nmol·L^{-1})	3.8 (100−150 μmol·L^{-1})	220 (8−12 μmol·L^{-1})
14		37 000 (40−80 nmol·L^{-1})	5.5 (100−150 μmol·L^{-1})	78 (20−40 μmol·L^{-1})
15		63 000 (40−80 nmol·L^{-1})	5.4 (120−150 μmol·L^{-1})	50 (30−50 μmol·L^{-1})
16		29 000 (60−120 nmol·L^{-1})	Inactive	Inactive
17		23 000 (90−150 nmol·L^{-1})	Inactive	Inactive

Table 4 Structure and activity of compounds with varied P4 and P2 positions

Compd.	Structure	$k/[I]/(mol\cdot L^{-1})^{-1}\cdot s^{-1}$		
		Chym-like	Tryp-like	PGPH
18		166 000 (5−12 nmol·L^{-1})	7.1 (80−130 μmol·L^{-1})	21 (80−150 μmol·L^{-1})
19		5 200 (0.11 μmol·L^{-1})	580 (0.5−5 μmol·L^{-1})	11 (10−150 μmol·L^{-1})
1		37 000 (30−80 nmol·L^{-1})	79 (8−12 μmol·L^{-1})	37 (50−100 μmol·L^{-1})
20		53 000 (10−30 nmol·L^{-1})	150 (5−35 μmol·L^{-1})	21 (80−150 μmol·L^{-1})

高活性, 水溶解性明显优于**19**。经临床前研究, 呈现选择性作用和适宜药代动力学性质, 定名为卡非佐米(carfilzomib), 经临床试验, 表明卡非佐米对硼替佐米耐药的复发难治的多发性骨髓瘤有良好效果, 于2012年批准上市 (Elofsson M, Splittgerber U, Myung J, et al. Towards subunit-specific proteasome inhibitors: synthesis and evaluation of peptide alpha, beta-epoxyketones. Chem Biol, 1999, 6: 811−822)。



Carfilzomib (**21**)