•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。

由阿斯利康研制、美国Insmed公司开发成功的二肽基肽酶1抑制剂, 是口服治疗支气管扩张症、无鼻息肉的慢性鼻窦炎、化脓性汗腺炎及其他中性粒细胞介导的疾病首创性药物, 全球第一个。本品的研制路径分为两段: 前一阶段是基于靶标结构的分子设计 (SBDD) 获得了候选物, 在即将进入临床时, 经影像观察发现候选物可能对主动脉有潜在的安全性问题, 遂深入分析该表型变化的生理/病理内涵, 通过生物化学的逻辑推理, 实验证实了不良反应的化学机制, 遂在后一阶段经药物化学构效关系 (SAR) 方法修正和优化结构, 最终研制成功了本品。两阶段的SBDD和SAR饱含了生物化学和有机化学的考量。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1185

首创性治疗支气管扩张病的口服药物布伦索卡替的研制

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 靶标二肽基肽酶1

1.1 生理功能 本研制项目的靶标二肽基肽酶1 (DPP1), 又称组织蛋白酶C (Cat C), 是一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶, 在中性粒细胞丝氨酸蛋白酶 (NSP) 的激活过程中起关键作用。NSP包括中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、蛋白酶3 (Pr3) 和组织蛋白酶G (Cat G) 等。抑制DPP1活性, 是治疗中性粒细胞负荷过高性疾病的靶标, 例如治疗慢性阻塞性肺疾病。中性粒细胞在骨髓中生成, 当其成熟阶段DPP1切割N端二肽以激活NSP。因而抑制骨髓中DPP1, 会导致中性粒细胞无法储存具有活性的NE、Pr3或Cat G, 从而减少肺部局部高活性的NSP释放, 降低炎症和肺损伤。

1.2 结构特征 DPP1是一种同四聚体酶, 四个相同亚基包含三条独立的蛋白链: 轻链、重链和排斥域 (exclusion domain)。酶的催化位点半胱氨酸残基 (Cys234) 处于三条蛋白链的界面处。DPP1活性位点入口处为开放性S1位点; S2腔虽然空间较大但被包裹在蛋白质内部; 排斥域是DPP1特有的结构单元, 它阻断底物越过S2位点的通路, 这体现了DPP1的外切肽酶活性机制。此外, 排斥域中的Asp1侧链通过与底物肽链的α-氨基互作—静电引力, 主导着底物识别过程。图1是DPP1活性部位与底物互作的示意图, 并标示出Cys234的催化位点和排斥域的Asp1残基。

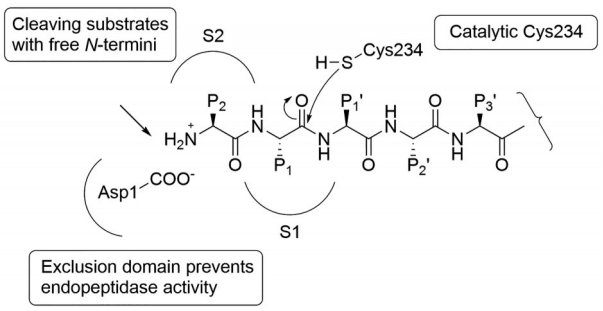


Figure 1 Schematic picture of the DPP1 active site, specifically showing the catalytic Cys234 and the Asp1 in the exclusion domain

2 抑制剂的前期研制

研制者从文献得知含脂肪族氰基的二肽类化合物是DPP1的可逆性共价结合抑制剂 (Bondebjerg J, Fuglsang H, Valeur KR, et al. Dipeptidyl nitriles as human dipeptidyl peptidase I inhibitors. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16: 3614−3617), 这与降糖药DPP4抑制剂“列汀”类药物许多也是含氰基的拟二肽相似。几经设计优化得到化合物**1**是DPP1酶强效抑制剂, pIC_{50} = 8.7, 但细胞活性pIC_{50} = 7.2, 相差1.5数量级, 虽然碱性胺有利于在酸性溶酶体中富集, 但细胞活性锐减的原因是肽键易被水解的不稳定性和伯胺的强碱性阻碍了过膜。

关于前期研究的结构优化不拟系统展开, 只对重要节点的化合物 (**2**～**4**) 设计原则作简要说明。表1列

出了关键化合物的活性等性质的比较。

2.1 化合物1 化合物**1**的氰基碳为sp^1杂化态, 具有不饱和亲电性 (与芳环相连则因共轭而离域化, 亲电性很弱), 可与亲核性基团如Cys234的巯基发生亲核取代反应, 形成可逆性共价键合, 类似于有机Pinner反应。如图2所示。

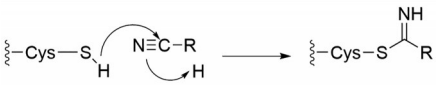


Figure 2 Nucleophilic substitution of aliphatic nitrile with mercapto group of cysteine residue

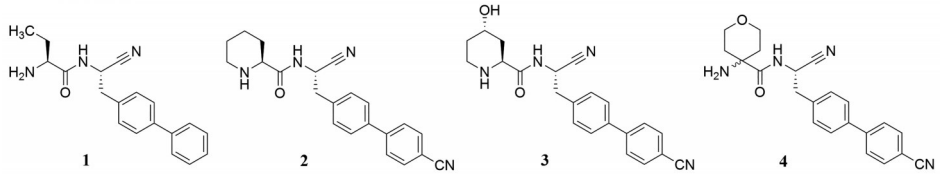
1的联苯基是由苯基演化而来, 单一苯基没有进入完全排斥腔, 因而活性弱, 联苯基增强了疏水结合。图3a是**1**与DPP1的晶体结构图, 氰基已与Cys234巯基形成共价键结合。伯氨基与Asp1羧基形成盐桥, 一个结构水分子 (小红球) 将Thr379的末端羟基与骨架羰基氧同**1**的酰基氧构成氢键网络, 对结合能的贡献大。**1**的酰氨NH与Asn380也发生氢键结合。

2.2 化合物2 结构演化到化合物**2**氨基参入到哌啶环成为仲胺, 属于取代的α-氨基酸片段。抑酶活性降低, 是由于哌啶环占据了S2腔, “挤走”了前述的结构水, 失去了氢键网络而结合能下降, 丢失一些活性, 但由于分子的疏水性提高有利于过膜, 因而细胞活性增高。联苯基引入4-氰基是为了降低芳环的电子与密度, 减少了**1**的芳环氧化代谢, 提高了稳定性。图3b为其晶体结构图, 哌啶环上NH与Asp1静电/氢键结合, 骨架的NH与Asn380氢键结合 (化合物**3**和**4**亦是, 下同), 形成共价键合的硫代脒基的NH与Gln228结合。

2.3 化合物3 进而优化成的化合物**3**是在哌啶4-位引入*S*-羟基 (没有合成*R*-羟基), 以提高分子的亲水性和降低碱性 (表1数据), 结果表明, 对DPP1酶活性提高了10倍, 细胞活性基本未变。对hERG通道的作用也显著降低 (与碱性降低有关)。羟基对活性的贡献是履行了化合物**1**中结构水介导的氢键结合, **3**的羟基与Thr379残基的骨架NH和侧链羟基形成两组氢键 (图3c), 贡献了结合能和活性。

2.4 化合物4 化合物**4**并非由**3**演化而来, 而是另一设计策略合成的。为了克服**1**的肽键发生被酶促水解而导致不稳定性, 设计了一系列将α-碳原子纳入环状结构的化合物。最初是环己基取代化合物, 在细胞实验和人血浆中确实表现出稳定性, 但因脂溶性强, 对hERG有明显抑制活性。经优化得到四氢吡喃骨架的化合物, **4**对DPP1酶和细胞活性及稳定性和对hERG通道的惰性都显著超越其他类似物。**4**与DPP1晶体结构提示 (图3d), 环中的氧原子相当于**3**的羟基, 氧原子与Thr379残基的骨架NH和侧链羟基生成两组氢键, 环外的伯胺与Asp1形成盐桥。全面评价化合物**4**的体内外活性和选择性、药代动力学性质以及安全性等, 一度曾确定为候选分子拟进入临床研究 (Furber M, Tiden A, Gardiner P, et al. Cathepsin C inhibitors:

Table 1 Structure, activity and some properties of key compounds in preliminary optimization



Compd.	DPP1 enz pIC_{50}	DPP1 cell pIC_{50}	HLM /μL·min^{-1}·mg^{-1}	hERG IC_{50}/μmol·L^{-1}	LogD	Base pK_a
1	8.7	7.2	−	−	−	
2	7.4	8.0	< 4	1.4	2.7	8.4
3	8.3	7.9	< 3	>33	1.4	7.6
4	9.0	8.3	3.6	26	1.9	5.8

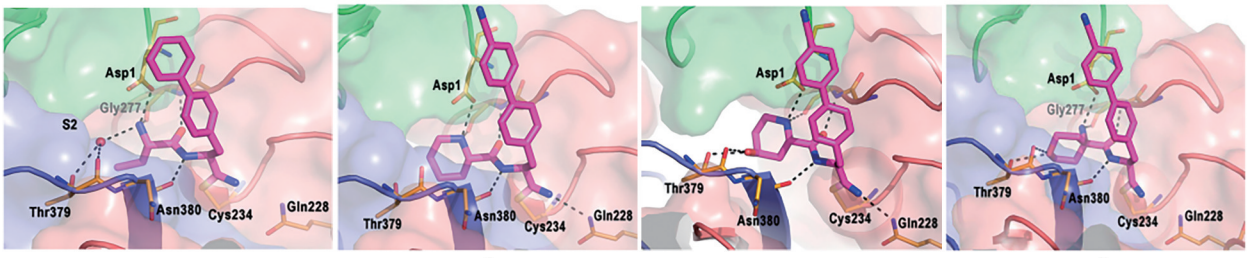


Figure 3 X-ray structures of compound **1**−**4** (magenta) bound to the active site of DPP1

Property optimization and identification of a clinical candidate. J Med Chem, 2014, 57: 2357−2367)。

2.5 化合物4的不安全性的由来 **4**终究没有进入临床试验, 是由于**4**在大鼠定量全身放射自显影 (QWBA) 研究中, 发现与主动脉部位有结合作用, 出于安全考虑, 终止继续开发。针对这一发现, 研究者建立了机制性设想 (这是非常可贵的深化逻辑推理): 即**4**可能与参同弹性蛋白 (主动脉组织的主要成分) 交联的醛赖氨酸 (allysine) 侧链的醛基发生反应。肽链中的赖氨酸残基经赖氨酸氧化酶催化发生氧化脱氨反应形成醛赖氨酸, 是体内的正常成分, 属于胶原蛋白生物合成过程中的中间产物。**4**通过与醛赖氨酸的醛基形成稳定的五元环咪唑烷-4-酮结构, 这显然是**4**的不良性质。后续实验证实**4**与丙醛反应也生成咪唑烷-4-酮。为此, 研究者设置了体外检测化合物对此反应活性的筛选体系, 体外用丙醛测定化合物的半衰期以评价潜在的不良反应活性。实验表明化合物**4**的半衰期不足 1 h, 消耗成咪唑烷-4-酮类化合物。图4是化合物**4**与弹性蛋白中醛赖氨酸残基的亲核取代反应生成的咪唑烷-4-酮的过程。

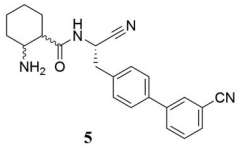
3 骨架为β-氨基酸的结构类型

3.1 氨基在脂环外的β-氨基酸 为避免与弹性蛋白结合引发主动脉的不良反应, 研究者对曾合成过的含有β-氨基酸片段的化合物**5**加以测试, 虽然抑制DPP1的活性不高 (pIC_{50} = 6.0), 但未见与醛类发生化学反应, 从而设计了一系列含β-氨基酸片段的化合物, 列于表2。**6**～**9**是互为对映体或差向异构体, 都有一定的活性, 其中化合物**6** (1*R*,2*S*) 的活性最强, 而且氨基在环外, 处于羧基 (酰基) 的β-位置不发生与醛基缩合, 预示对主动脉是无碍的。

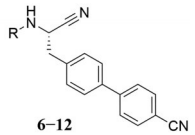
化合物**10**和**11**分别是1*R*,2*S*-取代的环戊基和环庚基, 与**6**的活性比较, 呈现随着环的扩大活性增强, 可能是亲脂性提高有利于活性。

3.2 氮原子在饱和杂环内的β-氨基酸骨架 将氮原子融入到环中是一种降低与hERG蛋白互作的探索, 并且若在环中再镶嵌氧原子以增加极性进而降低与hERG结合, 合成的化合物列于表3。吗啉环或哌啶环的β-氨基酸骨架化合物**12**～**16**活性低或无活性 (pIC_{50} < 5), 1,4-高吗啉 (七元环) **17**为差向异构体混合化合物, 活性

Table 2 Exocyclic β-amino acid-containing compounds



5



6–12

Compd.	R	DPP1 enz pIC_{50}	DPP1 cell pIC_{50}	Aldehyde activity assay / $t_{1/2}$/h
4		9.1	8.1	< 1
6		7.4	7.4	> 50
7		6.3	6.4	> 50
8		< 5	Not test	> 50
9		6.5	6.8	> 50
10		6.0	5.9	> 50
11		7.4	7.5	> 50

显著高于吗啉系列, 分离成单体**18**和**19**的活性差别显著, **18**-*S*-优映体强于**19**-*R*-劣映体逾百倍, 提示环在结合腔的方向性与靶标的结合的强度变化很大。**18**没有与醛的化学反应, 例如与丙醛的混合液半衰期大于50 h, 该化合物对人肝微粒体和肝细胞稳定性试验都表现出良好的代谢稳定性。也有良好的动力学和溶解度, 对hERG通道具有微弱抑制作用 (IC_{50} = 17 μmol·L^{-1})。大鼠和犬的体内药代动力学表明有较低的清除率, 口服生物利用度分别为25%和71%。^{14}C-标记的**18**大鼠QWBA试验表明, 24 h后主动脉的放射性活性很弱, 与丙醛体外实验一致。

3.3 右端苯环的优化 优化至此, 左端的高吗啉环、β-氨基酸骨架、氰基的位置以及两个手性碳的*S*构型都已确认为优化配置, 所余位点是右端苯环, 除保持苯环低电荷密度以避免代谢, 尚须考虑其他结合因素, 例

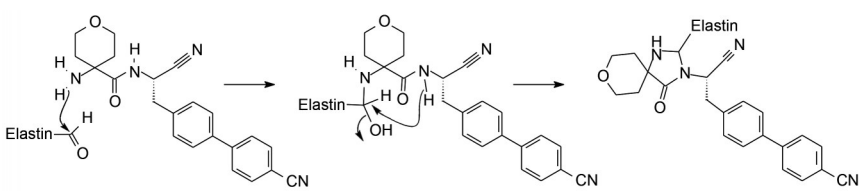
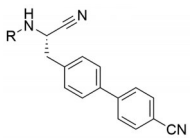
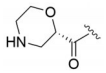
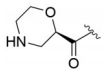
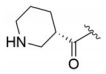
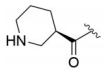
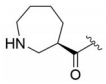
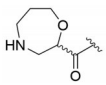
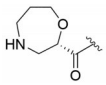
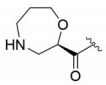


Figure 4 Proposed mechanism for chemical reactivity of compound **4** with reactive aldehyde functions in allysine *via* formation of a stable five-membered imidazolidin-4-one

Table 3 SAR for six- and seven-membered heterocyclic β-amino acids



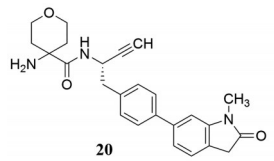
Compd.	R	DPP1 enz pIC_{50}	DPP1 cell pIC_{50}	Aldehyde activity assay /$t_{1/2}$/h	LogD	Base pK_a
12		6.4	6.3	> 50	1.2	7.4
13		< 5	Not test	> 50	1.6	Not test
14		< 5	Not test	Not test	0.2	9.5
15		< 5	Not test	Not test	0.6	Not test
16		5.9	6.3	> 50	1.6	Not test
17		7.2	Not test	> 50	1.1	Not test
18		7.4	7.5	> 50	1.1	8.0
19		5.2	Not test	> 50	1.2	Not test

如优化对排斥域的互补性结合。研制者参考在初始研究β-氨基酸骨架化合物时, 合成的**20**表现有高活性, 抑制酶和细胞活性 (pIC_{50}) 分别为9.6和8.8, 这启示了合成了表4化合物。

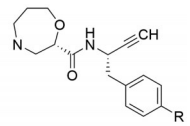
表4中2-氧代-1,3-苯并噻唑 (**29**) 及其等排体2-氧代-1,3-苯并噁唑 (**30**) 对DPP1酶抑制活性pIC_{50}分别为8.6和8.4, 细胞水平的pIC_{50}值分别为8.5和8.4。化合物**30**的logD值较低 (0.8), 使**30**的配体亲脂性效率 (LLE值) 高达7.6, 优于**29**的7.1。基于**30**的结构, 设计合成的类似物**31**～**33**, 都呈现良好的DPP1酶和细胞水平的抑制活性。

优良化合物**29**～**33**作了全面比较, 例如大鼠和犬的药代实验, 包括清除率/分布容积/生物利用度等, 测定人/大鼠/犬的肝微粒体和细胞的清除率, 与血浆结合率, Caco过膜值, 动力学溶解性 (kinetic solubility), 以及对hERG通道的抑制性等 (数据省略), 最终确定**30**为候选化合物, 定名布伦索卡替 (Brensocatib), 经临床试验, 表明口服布伦索卡替可治疗成人非囊性纤维化支气管扩张症 (NCFB), 作为首创性药物于2025年被FDA批准上市, 布伦索卡替也是全球首个获批的二

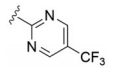
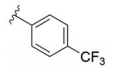
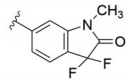
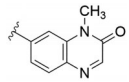
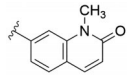
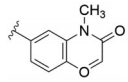
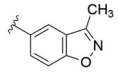
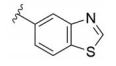
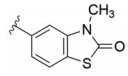
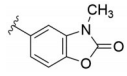
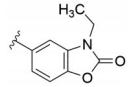
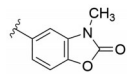
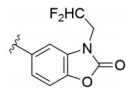
Table 4 Distal phenyl ring substituent examples



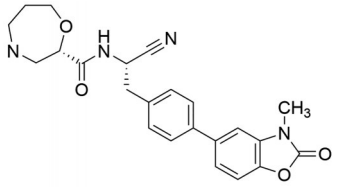
20



21−**33**

Compd.	R	DPP1 enz pIC_{50}	DPP1 cell pIC_{50}	LogD	LLE
21		7.4	6.7	1.1	5.6
22		7.8	Not test	2.8	4.6
23		7.6	7.8	1.4	8.4
24		7.9	Not test	0.6	7.0
25		7.9	7.9	1.1	6.8
26		7.9	7.9	1.1	6.8
27		7.8	7.8	1.5	6.3
28		7.2	Hot test	1.5	5.7
29		8.6	8.5	1.5	7.1
30		8.4	8.4	0.8	7.6
31		8.3	8.3	1.3	7.0
32		8.0	8.1	1.5	6.5
33		8.2	8.2	1.0	7.2

肽基肽酶1抑制剂 (Doyle K, Loenn K, Kaečk H, et al. Discovery of second generation reversible covalent DPP1 inhibitors leading to an oxazepane amidoacetonitrile based clinical candidate (AZD7986). J Med Chem, 2016, 59: 9457−9472)。



Brensocatib