复旦大学 2010-2011 学年第一学期期末考试试卷

课程名称：药物设计　　课程代码：PHAR130011

开课院系：药学院　　考试形式：读书报告

学生姓名：孙域　　学号：07301030032　　专业：药学

得分：

标题

论一个成功 SBDD 案例背后的必然性与偶然性（嫁接的技术）

《以吡啶并噻吩并[2,3-d]嘧啶为基本构架的表皮生长因子受体激酶抑制剂的设计和合成——如何发挥手性侧链和迈克尔受体基团的最大效应》读书报告

活性　　抗耐药

本文作者选取了2010年发表在J Med Chem杂志上的文献撰写的读书报告，原文内容就比较精彩，从高通量筛选的化合物hit出发，利analogue Based Drug Design，主动拼合基工酵氨基化构，获得了活性较好的化合物（先导），再利用EGFR耐药性配基的化构特征，引入Michael受体的α,β不饱合酰氨基，提高了对耐药性受体的活性。作者第三次进行化构改造又一次优化了本已优化化构的药代动力学性质。本文作者在充分理解原作者的意图基础上，认真归纳，总结并有一定的见解，是一篇较优秀的读书报告。

A-

李

2011.1.22

论一个成功 SBDD 案例背后的必然性与偶然性

《以吡啶并噻吩并[2,3-d]嘧啶为基本构架的表皮生长因子受体激酶抑制剂的设计和合成——如何发挥手性侧链和迈克尔受体基团的最大效应》读书报告

孙域 07301030032

【概括综述】

该文章详细记述了研究人员发现、改进一个新型表皮生长因子受体激酶抑制性化合物的过程。整个过程涉及了筛选模型构建、高通量筛选过程、MBDD 和 PBDD 的应用。最关键的是，该文章充分体现了一个 SBDD 成功案例的方方面面，有多次 SAR 的分析，有合理的判断，有预料之外的失败，有针对失败的思考，有改进之后的成功等等。认真学习了这个案例，我对基于结构的药物设计有了新的认识，新的思考。

鉴于本文主要目的主要为学习药物设计的思想，阐述药物设计方面的思考与体会，所以关于该结构的化学合成方法部分将不作为读书报告的核心论述。

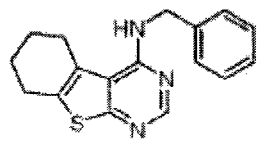
【背景资料】

肺癌是人类最常见的癌症之一，其中 85%的肺癌为非小细胞肺癌（以下简称 **NSCLC**）。在近 50%的 NSCLC 患者中表皮生长因子受体（以下简称 **EGFR**）过度表达，伴随着下游信号传导通路的失调，且此过度表达往往难以诊断。EGFR 是一个具有细胞外配体受体结合域和细胞内酪氨酸激酶活性域的跨膜蛋白。一旦相应配体结合在它的外部结合域，它便与另一种 EGFR 家族成员（比如 EGFR，HER2 基因）发生二聚化，从而导致细胞内酪氨酸激酶（以下简称 **TK**）的激活。这引起了 EGFR 的自磷酸化，而下游信号传导通路得进一步激活影响了细胞的存活和繁殖。

吉非替尼和埃罗替尼在 2002 年和 2004 年分别得到美国食品药品监督局的批准，用于治疗 NSCLC。吉非替尼和埃罗替尼的作用原理在于两者能竞争性结合于细胞内 EGFR 的 TK 结合域的三磷酸腺苷结合口袋，从而阻断对肿瘤存活和增生至关重要的异常的 EGFR 下游信号。尽管两种药对 NSCLC 型的病人显示了较高的响应率，但对绝大部分患者，该病经常在二次突变（比如 T790M 型突变）后产生对该药的耐药性，治疗效果因此受限。因此，研制第二代 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂对吉非替尼和埃罗替尼耐药性的 NSCLC 患者具有重要意义。本文中的研究人员便是努力制备这样一种第二代 EGFR 激酶抑制剂，供吉非替尼和埃罗替尼耐药的病人使用。

【文献简介】

撰写本文的研究人员通过使用 EGFR 转染的 32D 细胞高通量筛选装置浓缩收集到了对 EGFR 或 EGFR 调节的下游信号通路具有抑制作用的物质。这种以细胞为基础的监测手段使研究人员发现了几种新化合物，他们通过 EGFR 异常信号的调节来打断奥细胞的增生。在这其中，一个新型的以四氢本并噻吩并[2,3-d]嘧啶为核心的三环化合物被认为具有相当的针对性酶抑制活性，被研究人员暂定为化合物 7。



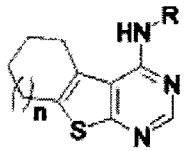
化合物 7 结构

化合物 7 的活性尚不足以成药。经过一系列的研究，化合物 7 通过杂交设计策略引入手性侧链及迈克尔受体基团，又得到了具有 EGFR 激酶抑制活性的产物 11 和产物 19。两者比原高通量筛选配体 7 在对 HCC827 菌株的活性抑制能力方面提高了三个数量级，并且在纳摩尔浓度下抑制了吉非替尼耐药型双突变体的 EGFR 激酶活性。此外，产物 19 在裸鼠移植瘤模型的治疗中成功缩小了肿瘤的大小，证明了其成药的潜力。

【文献概述】

根据我对文章的认识和思考，该案例的 SBDD 过程可划分为四个阶段。

第一阶段，如上所述，研究人员分离得到了具有一定 EGFR 激酶抑制活性的化合物 7，并以此作为研究对象，开始了第一次的 SAR 分析。



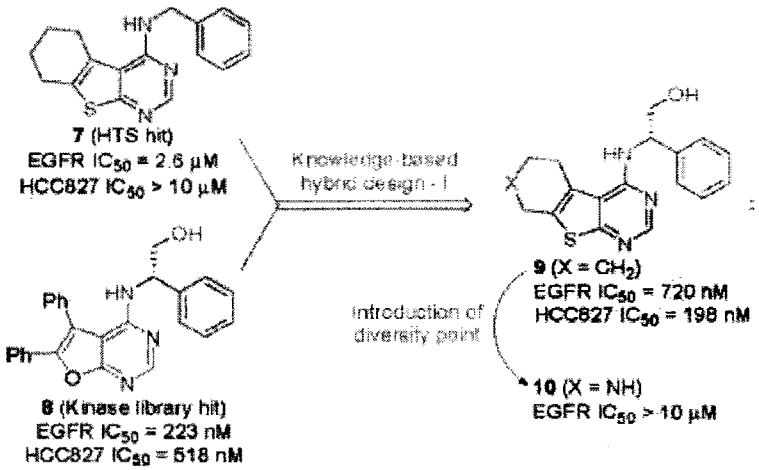
7, 7a-c: n = 1
7d: n = 0

compd	n	R	EGFR-WT kinase % inhibition at 20 μM
7	1	$-CH_2Ph$	76.9
7a	1	$-CH_2CH_2Ph$	44.3
7b	1	$-CH_2(4\text{-}OCH_3\text{-}Ph)$	1.1
7c	1	$-CH_2(4\text{-}F\text{-}Ph)$	52.7
7d	0	$-CH_2Ph$	69.1

[a] WT: wild type kinase.

首次 SAR 分析

首次 SAR 的分析实验并不成功。研究人员们首先尝试延长化合物 7 的侧链长度，如图，在其六圆环上上增加取代，事实证明此举导致了活性的下降。而把六圆环缩为五元环，则同样导致了 EGFR 激酶活性的下降，这都给其结构的进一步设计带来了困难。研究者也因此暂时失去了研究思路。而与此同时，在一个与之并行的荧光激酶抑制剂的研究项目中，研究者已经合成了一批以呋喃并嘧啶为架构的以激酶为靶点的合成库。此库的化合物可以屏蔽 EGFR 激酶抑制剂，使他们得以鉴别筛选出另一种新的呋喃并嘧啶类 EGFR 激酶选择性抑制剂，研究者暂定其为化合物 8。



化合物 7、化合物 8 及杂交制作的化合物 9

研究者通过对化合物 7 和化合物 8 的结构比较得出了一种猜想。尽管两者的母核结构存在差异，但两者的侧链却十分相似，可能是侧链在化合物的活性大小中起了决定作用。化合物 8 的嘧啶环侧链除去羟甲基分支和由此引发的手性中心外，别处与化合物 7 的结构完全相同，证明这个侧链结构可能对 EGFR 激酶抑制剂的活性有很大影响，而这个新奇的侧链结构从未在 EGFR 激酶抑制剂的报道中提及过。目前市场上的主流 EGFR 激酶抑制（如图），均未含有如此结构。由此研究者们确立了以此手性侧链为研究突破点，一来研究侧链手性对 EGFR 激酶抑制剂活性的影响，二来以此发展新的具有较高药效的分子。虽然研究者们发现这样的侧链结构也曾极少的出现在一些 EGFR 激酶抑制剂中（其中一款抑制剂已经发展到了临床试验阶段），但侧链的手性对其活性的影响仍不明了，且那些研究也没有进行构效关系方面的研究。

第二阶段，通过对两个有药效的化合物的结构比较，研究人员获得新的思路，确定了将侧链对活性影响定为下一步的研究目标，并以此进行了第二次 SAR 分析。

结合化合物 7 与化合物 8 的结构特征，研究者将两者的构型进行了杂交，保留了化合物 7 的三环结构核心，同时引入化合物 8 的手性侧链，新形成的构架暂命名为化合物 9。化合物 9 显示了良好的 EGFR 激酶抑制作用，并对 HCC827 细胞簇显示了良好的抑制增殖的作用。研究者以此化合物 9 作为下一步优化的基础。确定了研究方向，研究者合成了一批具有对比意义的化合物，主要围绕着化合物 9 侧链的官能团变化、手性变化、六圆环大小的变化展开，开始进行第二次的 SAR 分析。详细数据见下图。

研究者从这组数据中主要获得了以下信息：

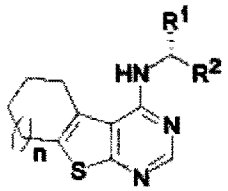
1. 移走侧链上的羟基（化合物 9a）导致活性显著下降。

2. 移出苯基（化合物 9b）会导致活性的彻底消失，证明苯基对活性具有近乎决定性的作用。

3. 改变化合物 9 侧链的手性（化合物 9c）也会导致活性的完全丧失，证明了其活性对于侧链的手性是有明确的选择性的。

4. 缩小六元环为 5 元环（化合物 9d）也导致了活性的降低.

进一步的研究证明，无论是化合物9还是化合物9d的活性均不具有足够的抑制双突变的 EGFR 激酶的活性，因此也不能满足克服吉非替尼抗药性的设计初衷，第二次 SAR 也未能取得理想的效果。



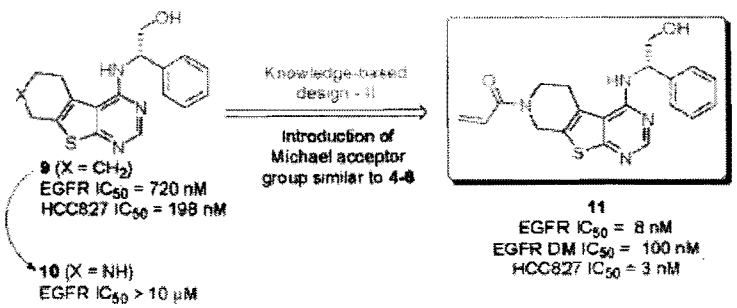
9, 9a-c: n = 1
9d: n = 0

compd	R^1	R^2	EGFR-WT kinase inhibition $IC_{50}{}^b$ (μM)	HCC827 IC_{50} (μM)^b
9	CH_2OH	Ph	0.720	0.198
9a	CH_3	Ph	3.240	
9b	CH_2OH	H	> 20^c	
9c	Ph	CH_2OH	> 20^c	
9d	CH_2OH	Ph	1.090	0.324

第二次 SAR 分析

第三阶段，通过汲取其他案例的成功元素，进一步改进目前不理想的结构。

通过查阅最新的研究成果，撰写本文的研究者发现了一种可能有效对付吉非替尼抗药性菌株 T790M 的双突变 EGFR 激酶的方法。通过共价修饰激酶 ATP 结合域的 cys733 末端，研究者发现其具有不可逆抑制此激酶的作用。3 个由此产生的新化合物已经进入临床实验阶段，用于吉非替尼抗药型病人 NSCLC 的治疗。研究者发现这 3 中新的化合物中都含有一个新的迈克尔受体基团，此基团通过不可逆共价结合色氨酸末端，在抑制吉非替尼看药性 T790 菌株中发挥至关重要的作用。



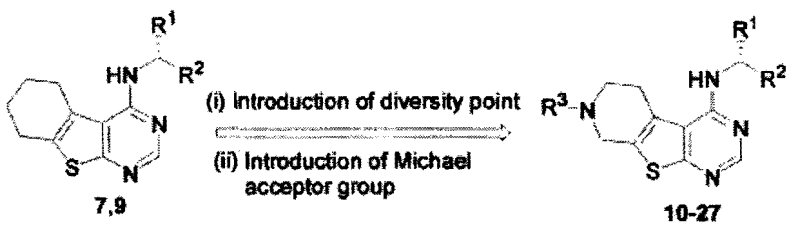
化合物 9 及引入迈克尔受体基团后的化合物 11

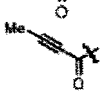
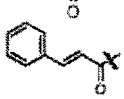
这再次带给了研究者灵感，他们尝试在之前研究产物的基础上，引入迈克尔受体基团，以增强对抗吉非替尼抗药菌株的效力。通过认真比较，研究者保留了原先化合物 9

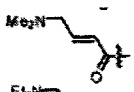
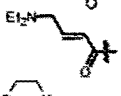
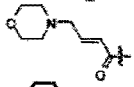
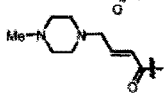
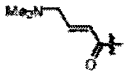
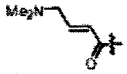
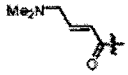
的三环结构与手性侧链，改造了其单纯的六元环结构，引入了氮原子（化合物 10），再进一步与迈克尔受体制成酰胺，得到新的目标产物化合物 11。通过一系列测试，化合物 11 显示了极好的性能。一方面，此化合物在纳摩尔当量对野生型 EGFR 激酶和双突变型激酶都显示了良好的抑制作用，其对野生型 EGFR 激酶的抑制能力比化合物 9 高出了惊人的 90 个数量级。另一方面，更让研究者惊喜的是，此化合物 11 对双突变型 EGFR 激酶显示出了强大的抑制作用，比吉非替尼高出了 25 个数量级。在显示出对 EGFR 激酶抑制能力的同时，化合物 11 也对 HCC827 细胞簇显示了抗增殖能力，其纳摩尔浓度范围内浓度与抑制作用成线性关系。未连接迈克尔受体基团的化合物 10 在此两方面均无抑制作用，充分说明了迈克尔受体基团对其活性的重要性。

第四阶段，化合物 11 药动性能差，迫使研究人员进行了第三次 SAR 分析，以发现既有良好药效活性又具有较慢代谢速率的化合物。同时在本次 SAR 分析中，研究人员也尝试阐明侧链手性、侧链官能团对药效活性的影响。这也是本文的首要创新点。

尽管化合物 11 在活性方面实现了重大突破，但令人惋惜的是，此化合物在药动实验中表现很不理想，静脉注射后 10 分钟血浆浓度过低。研究者以化合物 11 为基础，进行了第三次 SAR 的设计。此次研究同时囊括了手性侧链和迈克尔受体两者的变化，一方面寻找对 EGFR 激酶表达更高抑制活性的化合物，一方面寻找减缓体内代谢速率的方案。通过实验数据，研究者得到了以下结论：



Compd	R^1/R^2	R^3	EGFR kinase inhibition (μM)		HCC827 IC_{50} (μM)[a]
			WT IC_{50}[a]	DM IC_{50}[a]	
7	H/Ph	-	2.600	> 10[c]	> 10
S-9	CH_2OH/Ph	-	0.720	> 10[c]	0.198
S-10/33a	CH_2OH/Ph	H	> 20[b]	> 10[c]	-
S-11	CH_2OH/Ph		0.008	0.100	0.003
S-12	CH_2OH/Ph		> 20[b]	> 10[c]	-
S-13	CH_2OH/Ph		1.270	> 10[c]	-
S-14	CH_2OH/Ph		0.091	2.480	0.273
R-15	Ph/CH_2OH		3.057	>10[c]	-
R-16	CH_3/Ph		0.020	0.739	0.019
R-17	CH_2CH_3/Ph		0.046	2.200	0.024
S-18	CH_2OH/Ph		3.503	> 10[c]	-

***S*-19**	CH_2OH/Ph		0.007	0.305	0.002
***S*-20**	CH_2OH/Ph		0.009	0.930	0.008
***S*-21**	CH_2OH/Ph		0.021	1.399	0.004
***S*-22**	CH_2OH/Ph		0.089	> 10[c]	0.038
***R*-23**	Ph/CH_2OH		> 20[b]	> 10[c]	-
***R*-24**	CH_3/Ph		0.012	0.596	0.002
***R*-25**	CH_2CH_3/Ph		0.012	5.750	0.007
***S*-26**	$CH_2OH/$ CH_2Ph		0.149	4.107	0.032
27	CH_2OH/H		4.884	> 10[c]	-
Gefitinib (1)	-	-	0.02	2.815	0.013

第三次 SAR 分析内容

1. 改变迈克尔受体基团的双键为单键（化合物 12）或者三键（化合物 13）均会导致药效的显著下降甚至彻底丧失。证明迈克尔受体结构中，与羰基共轭的双键是不可或缺的。

2. 用巯基代替迈克尔受体中的羰基（化合物 15）也会导致活性的下降。

3. 改变侧链手性中心的构型（化合物 14），将会导致其对野生型和双突变型菌株 EGFR 激酶抑制能力的下降。

4. 无论是将侧链上的羟基取消（化合物 16）还是用甲基取代羟基（化合物 17）都会导致活性的降低，这也暗示了羟基对化合物的活性具有重要影响。

5. 对侧链的改造失败使研究者重新把研究方向转回了对迈克尔配体的研究上。在迈克尔配体的链端引入苯基（化合物 18），其活性近乎完全丧失。

6. 研究者对此猜想可能苯基的疏水性是活性下降的原因，从而引入了亲水性的二甲氨基基团（化合物 19）、二乙胺基基团（化合物 20）、吗啉环基团（化合物 21）、N-甲基哌嗪基团（化合物 22）。结果证明化合物 19 具有理想的活性，并优于化合物 20-22 的活性。

7. 在化合物 19 的基础上，改变侧链的手性（化合物 23）会导致活性的完全丧失。去掉侧链的羟基（化合物 24）会导致其对野生型和双突变型抑制活性的少许丧失。而用甲基取代羟基（化合物 25），则极大影响了其对双突变型的抑制活性，而对野生型的抑制活性并无太大影响。

8. 在化合物 19 的基础上，拉远侧链苯基 1 个碳原子的距离（化合物 26），将导致其对双突变型活性的下降，而去掉苯基（化合物 27）则会导致其对野生型和双突变型活性的完全丧失。

幸运的是，化合物 19 不仅展示出了与化合物 11 相似的对 EGFR 激酶的抑制活性，还展现出了优良的药动学性能。在 NSCLC 裸鼠转染模型的验证试验中，较低浓度的化合物 19 有效的抑制了癌细胞的增殖，显示了其作为新药的巨大潜力。

第三次的 SAR 分析与第二次 SAR 的分析有很大程度上的吻合，两者共同证明了，除开迈克尔受体的影响，侧链的手性和侧链苯基的定位也对化合物的活性，尤其是针对双突变型

的活性具有至关重要的作用。该发现对于该类药物的进一步设计和药物作用模型的构建具有重要意义。

【文献结论】

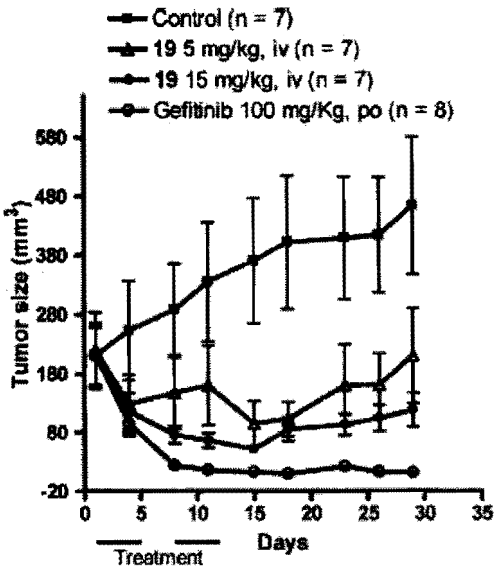
我认为，该研究主要实现了两方面的价值：

一、发现了对 EGFR 激酶野生型和双突变型均具有良好抑制活性的化合物.19，且其药动性能好，具有用于临床治疗吉非替尼耐药性 NSCLC 病人的巨大潜力。

二、阐明了母核结构中侧链的手性和官能团对 EGFR 激酶抑制活性的重要意义。

【体会】

本文详细阐述了一个成功的 SBDD 的案例。虽然本次基于结构的药物设计最终成功，但其过程并非一帆风顺，甚至多次险些以失败告终。至于最终的成功，几个必然因素发挥了主导作用，但成功的过程也可以觅得偶然因素。



低浓度的化合物 19 已起到抑制癌细胞生长的作用

一、**必然因素**

1. 合理的筛选途径，高效的筛选手段。

本文中，研究人员先是成功设计了筛选药物的 EGFR 转染的 32D 细胞高通量筛选模型，浓缩收集到了对 EGFR 或 EGFR 调节的下游信号通路具有抑制作用的物质，而这是该试验成功的基础，确定了课题研究的底物和初步方向。

2. 合成库的储备和利用

在化合物 7 未能表达良好抑制活性且缺乏改进思路的情况下，研究人员在另一个课题的合成库中发现了具有类似活性和结构的化合物 8，通过两者的构型比较使研究人员发现了手性侧链在保持该药活性中的重要地位，使整个 SBDD 过程出现转机。

3. 严格合理的 SAR 设计与分析

该案例的 SBDD 设计中，共有三次 SAR 的过程。每次设计中，各化合物结构类似而不同，彼此有目的的形成对照，有力地阐明了侧链的手性、官能团的作用，并为化合物药效的改进提供了有价值的信息，是该 SBDD 案例成功的核心元素。

4. 对有用信息的利用和整合

在第二阶段的 SBDD 设计陷入僵局的时候，撰写本文的研究人员及时借鉴了其它成功药物的结构特征，并与自己的药物设计进行结构上的杂交，一方面大大提高了药物设计的成功率，另一方面缩短了药物构型确定的周期，增强了药物设计的目的性和确定性。

5. 对失败实验的理性分析和有效利用

在 SAR 分析中，并非所有化合物都能获得成功，甚至绝大部分都是失败的尝试。但如何总结失败的原因，找到线索和突破口，该案例中研究人员给了我很大启发。例如在迈克尔受体末端增加疏水基团后活性彻底丧失，预示了该基团靶点可能具有亲水性。研究人员立即设计了一批末端为亲水性的化合物，其中 19 号化合物果真表现出了优良的性质。

6. 高工作量的刻苦投入和不断向前探索的勇气。

虽然说一个 SBDD 成功案例最核心的是合理的设计，但最重要最基本的依然是科研人员的劳动元素和精神信念。本实验中不论是前期起始构型的筛选，中期合成方法的探索，还是后期的 SAR 分析，都需要大量的人力物力，需要一个强大刻苦的研究团队的有力支撑，需要研究人员投入极大地热情和精力。除此之外，本案例设计中也三次面临失败风险，活性偏低、实验成果不显著、PK 性能差一次次考验着研究者的神经。但研究人员依然不懈探索，

最终在历经了多次失败后，克服了各种问题，得到了理想的化合物。

二、偶然因素

不得不说的是，在仔细学习该 SBDD 研究的过程中，也发现其成功也有一定的偶然成分。

1. 以筛选产物作为研究基础具有偶然性

以我个人的浅见，发现有效的 EGFR 激酶抑制剂应从 EGFR 激酶胞内或胞外结合域的构型出发，寻找合理的阻断配体。用筛选的手段盲目地从大量化合物中寻找目标药物具有偶然性，费时费力，但这也的确是当前机理研究能力受限下的无奈之举。

2. 化合物结构的设计具有偶然性和主观性

该 SBDD 过程第二阶段中，研究人员将化合物 7、化合物 8 杂交得到化合物 9，以期保留两者的优点。此处具有相当的偶然性和主观性。化合物 9 采用的是化合物 7 的三环母核结构，化合物 8 的侧链结构，但为何直接否定了化合物 8 的呋喃并嘧啶母核结构作者并未提及，且对其母核另一侧的取代基情况研究甚少。第三阶段的杂交也具有相当的主观性，化合物 11 六元环上链接迈克尔受体基团的 N 原子位置的确定没有进行任何对比与考证，之后也未作分析实验。设计上的主观性和偶然性的确很难一一论证，这就很依赖设计者的经验和能力，需要设计者的眼光。

3. 对照试验结论的偶然性

研究人员最终通过简单的正反对照实验，证明了侧链手性和苯基对活性具有重要意义。这样的结论具有参考价值，也具有批判价值。我们都知道化合物的结构与性质往往牵一发而动全身，除去苯基导致活性丧失并不等于这个位置只有苯基才能保持活性，苯基发挥的是疏水性作用还是空间位阻作用不得而知。侧链手性颠倒后活性丧失更不能说明这个侧链对于活性具有决定性意义，也有可能是在 S 构型下该侧链恰好发挥了一个杂环应该发挥的作用。而其他类似功效的药物并为含此侧链，也加深了我对此侧链作用的猜测。

4. 离开机理的盲目尝试

该 SBDD 的过程中，SAR 研究的对照设计是具有偶然性的。整个设计的方案是尝试性的，是没有机理支持的，其成功是没有把握的，是有风险性的。如果能以 EGFR 激酶的结合域构型出发，有目的的进行 TBDD 或许更具可行性，但这需要大量的理论基础，难度极高。相反，很多情况下靶点的结构是针对一个个偶然发现的药物的结构综合分析推导出来的。

总之，认真研读了该文献，使我认识到 SBDD 是一个需要刻苦努力大量付出、需要充足的理论储备，同时又需要经验和想象力的过程。药物设计的魅力或许就是药物设计的不确定性，但确定的是幸运一定青睐那些勇于付出的人。