

· 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。

基于流感神经氨酸酶的晶体结构和生化研究，以底物的过渡态作为出发点，将分子模拟的结果指导抑制剂的设计，在设计合成的有限化合物中，诞生了首创的扎那米韦。然而也由于过分拘泥模仿底物的结构，过强的极性导致扎那米韦药代的缺陷和用药的局限性。奥塞米韦也是基于酶的三维结构和模拟底物过渡态，但注意到成药性的要求，也在为数不多的化合物中，成功地合成出结构简单而合理的口服抗流感药。从研发和上市顺序看，奥塞米韦是后继药物，但超越了首创的扎那米韦。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2015-0394

基于结构的理性设计：扎那米韦和奥塞米韦

郭宗儒

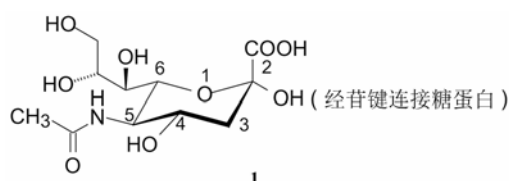
(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所，北京 100050)

1 流感病毒和靶标

人流感主要由 A、B 两型流感病毒感染发生，A 型病毒又可根据包膜上的两种糖蛋白的抗原特性分成亚型，这两种糖蛋白称作血凝素和神经氨酸酶，血凝素有 16 种 (H1~H16)，神经氨酸酶有 9 种 (N1~N9)，近年发生的流感大流行是由 H5N1 和 H1N1 感染。流感病毒极容易变异。

1.1 血凝素和神经氨酸酶

血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuroaminidase, NA, 又称唾液酸酶 sialidase) 是两种酶，它们识别并结合的底物是 *N*-乙酰神经氨酸 (1, *N*-acetylneuraminic acid, 又称唾液酸, sialic acid) 片段，后者是人上呼吸道上皮细胞膜上的糖缀合物的末端糖结构，血凝素结合了唾液酸片段，将病毒带到细胞膜上，经病毒包膜与细胞膜融合使病毒进入细胞内 (内化)。病毒神经氨酸酶的作用是切掉唾液酸与糖缀合物连接的糖苷键，将子代的病毒颗粒释放



到上皮细胞中，完成了播散周期。抑制神经氨酸酶以阻止糖苷的裂解，导致病毒颗粒持续结合于血凝素上，可阻断病毒的传染。血凝素和神经氨酸酶都是抗流感病毒的靶标，当今研究较多的是神经氨酸酶。

1.2 神经氨酸酶的结构和催化机制

神经氨酸酶是种糖蛋白，为 4 个亚基构成的四聚体，经疏水性的 N-端键合于病毒包膜上。其晶体结构于 1983 年经 X-射线衍射解析 (Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuroaminidase. *Nature*, 1983, 303: 41–44; Varghese JN, McKimm-Breschkin J, Caldwell JB, et al. The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. *Proteins*, 1992, 14: 327–332)。唾液酸定位于神经氨酸酶的催化中心，其结合方式是 2 位羧基与三个精氨酸簇形成静电结合；5 位的乙酰氨基形成两个氢键：NH 与水分子结合，C=O 与 Arg152 结合，甲基结合于 Trp178 与 Ile222 构成的疏水腔内；6 位链上的羟基与 Glu276 的羧基形成二齿氢键，如图 1 所示。

2 计算机辅助解析活性中心的结合特征

2.1 神经氨酸酶的水解机制

Itzstein 等基于神经氨酸酶 (apo protein) 和酶与

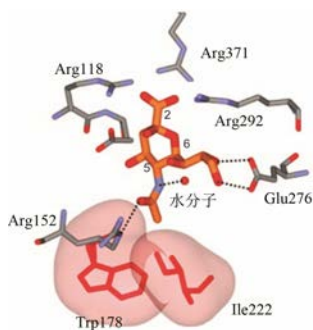
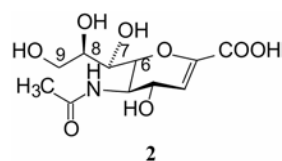


图 1 唾液酸与神经氨酸酶的晶体结构图

唾液酸复合物 (complex) 的晶体结构, 并通过分子模拟研究, 确定了底物与神经氨酸酶结合特征和基团的能量贡献, 提出了如图 2 所示的酶水解唾液酸苷的反应历程。认为底物在游离状态下吡喃糖环呈椅式构象存在, 2 位羧基处于直立键, 苷键采取平展位置 (2a)。在酶活性中心的氨基酸残基作用下, 带正电荷的 Arg371 (以及 Arg 118 和 Arg292) 与带负电荷的 2 位羧基发生盐键结合, Arg151 和 Arg152 通过与水分子氢键结合, 形成了与苷键的结合网络。这样, 使糖环由椅式变形成船式, 羧基呈假平展键取向, 苷键成为直立键, 并在环中 O¹ 原子未偶电子的助力下, 发生键电荷的重新分布 (2b), 形成了苷元即将离去的过渡态, 此时生成的 C2 正电荷被 O¹ 的未偶电子稳定化 (*p*- π 共轭), 吡喃环成为半椅式的氧鎓离子, 鎓离子同时被酶的 Glu277 的负电荷稳定 (2c)。水分子形成的 OH⁻ 向 *sp*² 杂化的 C2 进攻, 恢复了 C2 的 *sp*³ 杂化态 (2d), 吡喃糖环经过渡态 (2e) 向产物转变, 从酶的活性中心释放唾液酸, 羧基处于直立键位

置 (2f), 是由于 OH⁻ 以 SN₁ 机制进攻 C2 所致, NMR 也证明初产物是 α 异构体, 并逐渐经变旋作用使羧基处于更稳定的平展构型的 β 体 (2g) (Taylor NR, von Itzstein M. Molecular modeling studies on ligand binding to sialidase from influenza virus and the mechanism of catalysis. J Med Chem, 1994, 37: 616–624)。

该反应机制得到了实验的证明, Burmeister 等通过晶体学研究发现流感 B 病毒的神经氨酸酶催化水解唾液酸苷, 得到了 Δ^2 唾液酸 (2, Neu5Ac2en), 2 的结构与图 2e 的过渡态非常相似, 而且还证明 2 是神经氨酸酶的抑制剂, 这为设计过渡态类似物提供了有力的根据 (Burmeister WP, Henrissat B, Bosso C, et al. Influenza B virus neuraminidase can synthesise its own inhibitor. Structure, 1993, 1: 19–26)。



2.2 确定活性中心的结合腔

前面提出的水解机制和所涉及的功能残基, 以及过渡态的分子构象变化, 为设计过渡态类似物提供了依据, 接下来需要了解活性中心与底物 (或抑制剂) 分子的结合模式。为此, 应用了分子模拟的研究方法, 用 GRID 软件计算并定义活性中心的氨基酸残基与底物的相互作用。为此, 以 COO⁻、NH₃⁺、OH⁻ 和 CH₃ 等 4 个探针基团扫描活性中心的范德华表面, 分别确定负电荷、正电荷、极性基团和疏水相互作用

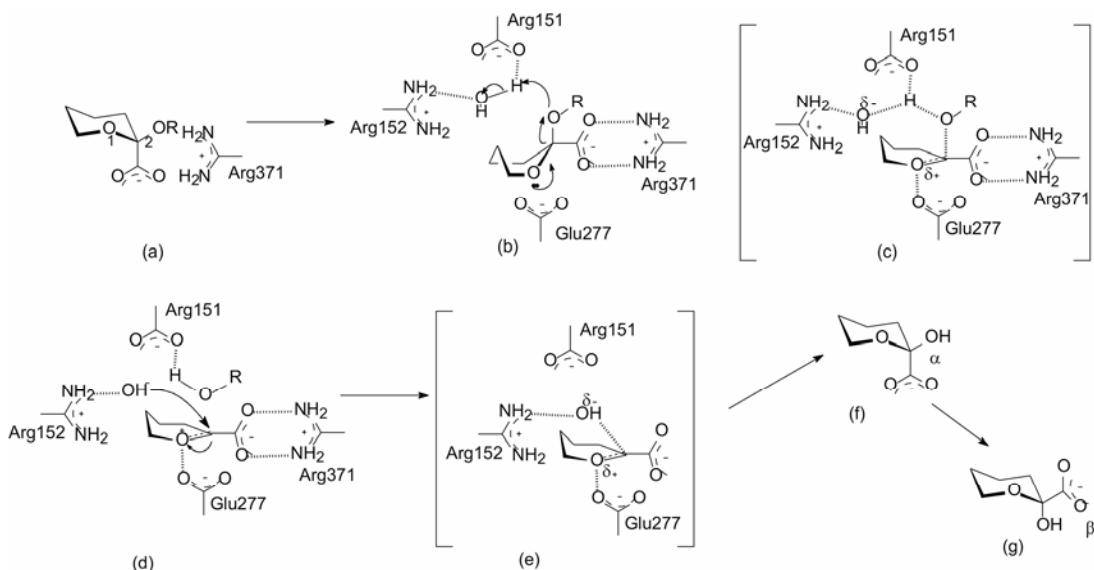


图 2 神经氨酸酶水解唾液酸苷的历程 (唾液酸的未变化基团省略)

范围。

2.2.1 羧酸根探针 带有负电荷的羧酸根扫描确定出一个相互作用区域, 相当于唾液酸的羧基在活性中心所处的位置, 映射出 Arg118、Arg292 和 Arg371 构成的三角区 (尤其是 Arg371) 的重要性, 也提示抑制剂的设计应有羧基或提供负电荷的基团。

2.2.2 铵离子特征 由于神经氨酸酶在 pH 5.5 呈现最适活性, 碱性的胺类在 pH 5.5 环境下被质子化, 带有正电荷, 因而用 NH_3^+ 作为探针, 计算分子表面的能量状态。结果表明有 3 个区域呈现相互作用: 在唾液酸的 4-OH 附近; 糖环 C4 的下面; 甘油侧链和 5 位 N-乙酰基之间的区域。

2.2.3 羟基探针 羟基探针显示的相互作用与上述的羧酸根的位置重合, 因而未能提供新的相互作用信息。

2.2.4 甲基探针 甲基探针发现的疏水性相互作用区域是乙酰胺基侧链上的甲基位置, 对应于 Trp178 构成的疏水腔。

这些探针勾画的区域, 映射出酶活性部位发生结合作用的环境, 为抑制剂的设计提供了信息和结构背景。

3 设计抑制剂

3.1 模拟过渡态结构

根据神经氨酸酶与唾液酸复合物的晶体结构、分子模拟预示活性中心的结合特征, 以及推测的水解反应机制, 抑制剂的设计首先合成了化合物 **2**, 它是唾液酸 **1** 的 $\Delta^{2,3}$ 类似物, 环上的其他取代基未做改变。由于 C2 和 C3 为 sp^2 杂化态, 与氧原子的未偶电子对形成 $p-\pi$ 共轭, 导致吡喃环变形, 类似于过渡态的氧鎓离子态的平面构象。

化合物 **2** 对流感 A 病毒神经氨酸酶有较弱抑制活性, $K_i=4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 分子模拟的结构与实验得到的晶体数据相近。实验还证明将酶活性中心的 Arg152 突变为 Lys, Glu277 突变为 Asp, 化合物 **2** 对发生突变的酶失去抑制活性, 推测是由于 Lys 和 Asp 残基链变短, 达不到参与结合位置, 从而佐证了 Arg152 和 Glu277 参与同 **2** 的结合。

3.2 C4 位置的重要性

前已述及, 用 NH_3^+ 探针研究揭示了在 C4 附近有与正电荷相互作用的负电区, 推测若将 C4 的羟基置换成氨基, 可能提高与酶的亲和力, 因而合成了化合物 **3**, 活性评价表明 **3** 显著提高了活性, $K_i=40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 是化合物 **2** 的 100 倍。

分子模拟研究了 **3** 与神经氨酸酶结合状态 (图 3),

表明 4 位氨基被质子化, 带有正电荷, 可与 Asp151 和 Glu119 的羧基发生氢键结合, 距离分别为 2.74 Å 和 2.96 Å (表明结合能很强)。此外, 水分子 6X 也与氨基发生氢键结合, 距离为 2.77 Å。吡喃环上其他取代基的结合模式与 **1** 和 **2** 相同。

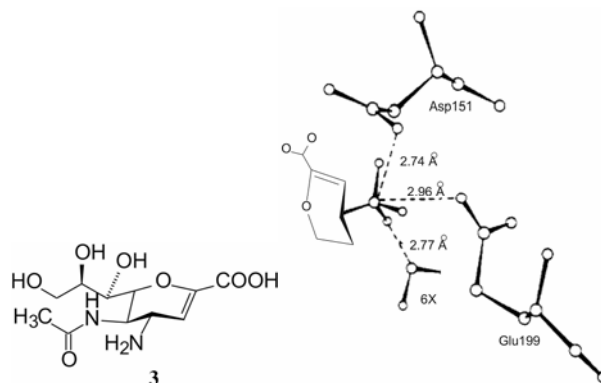
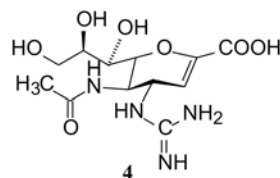


图 3 化合物 **3** 的 4-氨基与神经氨酸酶形成氢键的示意图

3.3 4-胍基取代—扎那米韦的上市

为了适配于 GRID 程序计算所揭示的 C4 有较大范围的正电荷结合区域, 将化合物 **3** 的 4-氨基换成碱性更强、分布范围更大的胍基, 合成了化合物 **4**, 对神经氨酸酶的活性比化合物 **3** 提高了 40 倍, $K_i=1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示基于酶和与底物结合的结构特征, 以及分子模拟获得的信息指导设计的有效性。由于碱性胍基 (带有正电荷) 结合的范围扩大, 可以同 Glu119、Glu227、Asp151 和 Tyr277 等多个氨基酸残基发生氢键和静电结合, 尤其重要的是胍基 (正电荷) 与 Glu227 的羧基 (负电荷) 发生电荷-电荷相互作用。此外, 还与水分子 14X 发生氢键结合。图 4 是化合物 **4** 与神经氨酸酶分子对接所形成的氢键示意图。



化合物 **2~4** 的结构差异在于 C4 连接的基团不同, 比较 3 个化合物的 C4 基团与活性中心相关的氨基残基的结合的热力学性质, 计算出化合物 **4** 由于胍基的结合最强, 焓变最大, 化合物 **3** 的氨基结合次之, 焓变居中, **2** 的焓变最小, 3 个化合物的焓变值与抑酶的活性值呈线性相关。表 1 列出了化合物 **2~4** 的 C4 连接基与神经氨酸酶相关残基结合的焓变。

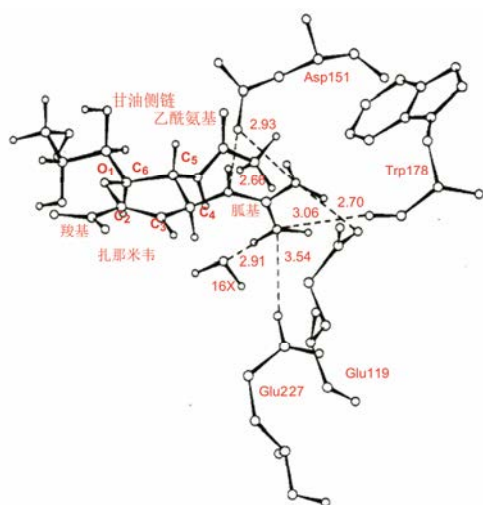


图 4 化合物 4 与神经氨酸酶分子对接的示意图

表 1 化合物 2~4 的 C4 基团与神经氨酸酶相关残基结合的焓变

氨基酸残基	$\Delta H/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$		
	化合物 2	化合物 3	化合物 4
Glu119	-12	-22	-23
Asp151	7	-25	-25
Trp178	-3	-2	-9
Glu227	1	-14	-14
Glu277	8	-7	-8
H ₂ O 6X	1	-13	
H ₂ O 14X	-2	-4	-12
总能量	-189	-219	-242

化合物 4 体外对流感 A 和 B 病毒感染的细胞有显著抑制活性，而对哺乳动物的神经氨酸酶不呈现抑制作用，说明 4 具有选择性作用。因而确定为候选化合物，定名扎那米韦 (zanamivir) 进入临床研究。由于口服生物利用度低，给药途径是经鼻吸入，这样气管和肺的吸收可达到 15%。由于疗效的不确定性，FDA 直到 1999 年才批准上市。然而，这个由澳大利亚 Monash 大学和 Biota 公司研制、经葛兰素公司开发上市的首创性抗流感药物，上市后并没有获得广泛的应用和认可，数月后另一个上市的口服药物——神经氨酸酶抑制剂奥塞米韦 (oseltamivir)，安全与有效性都优于扎那米韦。

4 后继的奥塞米韦

在扎那米韦上市数月后，Gilead 公司研制、罗氏公司开发的奥塞米韦经 FDA 批准上市，后者虽不是首创，但也是独立研发的。奥塞米韦可口服吸收、生物利用度高、代谢稳定等品质，完胜于扎那米韦，后来居上。

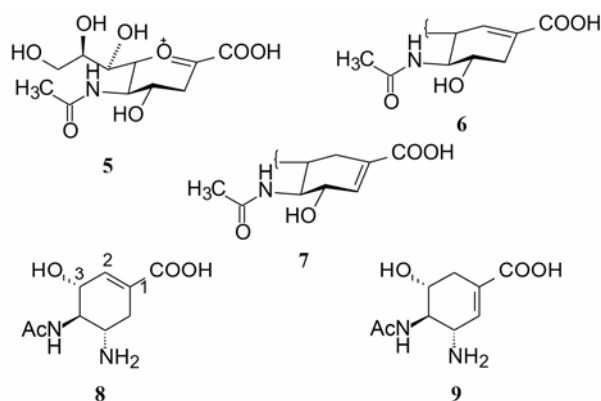
4.1 同一个起点

奥塞米韦项目的启动，也是基于神经氨酸酶的三维结构，特别是从酶与唾液酸 (1) 和与 Δ^2 唾液酸 (2) 的复合物三维结构出发，实施了基于结构的药物设计 (SBDD)。Gilead 的研发目标是口服用药，便于预防和治疗。

研究的切入点是确定母核，用环己烯替换 Δ^2 唾液酸 (2) 的二氢吡喃环，环己烯的构象类似于过渡态的吡喃鎓离子的部分平面结构，也与 Δ^2 唾液酸的二氢吡喃构象相似。环己烯的优点在于：一是环的稳定性提高，二是碳环上连接基团或侧链可以多样性和变换灵活性。

4.2 双键在环中的位置

多取代环己烯的双键位置会影响活性强度，因而具有特异性，设计的位置对于模拟过渡态 (5) 是非常重要的。起初设计了双键在两个位置，即类型 6 和 7。6 的双键位置类似于过渡态 5，7 的双键位置类似于化合物 2、3 和 4，所以难于确定哪个双键位置最为适宜。为此合成了化合物 8 和 9。



用流感神经氨酸酶评价 8 和 9 的活性，8 的活性 $\text{IC}_{50}=6.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而 9 在 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下未呈现活性，确定了环己烯的双键位置为 $\Delta^{1,2}$ 。

4.3 亲脂性侧链替换极性的甘油侧链

分析化合物 2 与酶的晶体结构，发现与 C7 相连的羟基并没有同酶发生结合作用，因而可以去除这“限制的”7 位羟基，C8 和 C9 的羟基虽然同 Glu276 形成二齿型氢键结合，但 C8 的 CH 与 Arg224 的亚烷基还发生疏水相互作用。这些分析促成了设计亲脂侧链的设计。化合物 2 或其类似物含有过多的极性基团，这对于穿越细胞膜的吸收是不利因素，所以将甘油侧链变为烷基链，对于平衡分子的亲水-亲脂性应是有利的。此外，唾液酸形成过渡态的氧鎓离子是缺电子状态，在环己烯的 3 位 (相当于吡喃环的 6 位) 连接电

负性强的氧原子以接近过渡态的缺电子性, 因而设计了 C3 以氧相连的烷基, 在化学合成上也容易实现。

4.4 环上的其他基团不变

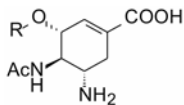
环己烯的其他位置如 1 位的羧基、4 位的乙酰氨基、5 位的氨基等基团与化合物 **3** 的配置相同, 设计依据与前述的是一样的。

4.5 C3-烷氧基的构效关系

为了考察 3-烷氧基的大小 (长短)、形状 (支化) 和方向 (构型) 对活性的影响, 合成了化合物 **10~18**, 活性评价的指标是对 H1N1 病毒的神经氨酸酶和病毒感染细胞生长的抑制活性, 分别用 IC_{50} 和 EC_{50} 表示。表 2 列出了化合物的结构和活性。构效关系分析如下: ① R 由 H 到正丙基 (**10~13**) 的抑制酶活性随碳原子增多而递增, 但延长成丁基 (**14**) 或异丁基 (**15**) 活性未见提高。② 甲基若连接在丙基的 α 位置 (2-甲基丙基), 活性明显增加, 提高大约 20 倍。 α 位的支化映射了该部位有个疏水腔, 适配于 α 甲基的结合。 α 碳原子虽为手性碳, 但 *R* (**16**) 或 *S* (**17**) 构型的活性没有差异。③ α 碳连接为乙基即支化呈对称的戊基 (**18**) 活性再提高 10 倍, 对感染的细胞也有高抑制活性。④ 继续增长碳链为庚氧基 (**19**), 则活性降低, 提示该疏水腔不能容纳更大的亲脂性基团。⑤ 将化合物 **18** 的 5-氨基变换为 5-胍基, 仍保持高活性。比较化合物 **18** 与 **3** 和 **4** (扎那米韦) 的活性, 提示 **18** 的活性显著高于化合物 **3**, 与 **4** (扎那米韦) 的活性相同 (Kim CU, Lew W, Williams WA, et al. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic

表 2 化合物 **10~19** 的结构与抗流感神经氨酸酶和感染细胞的活性

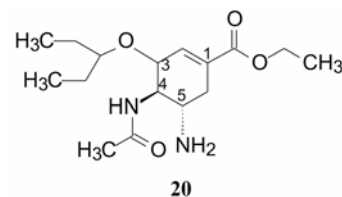
化合物	结构 (R)	酶 IC_{50} /nmol·L ⁻¹	细胞 EC_{50} /nmol·L ⁻¹
10	H	6 300	未测
11	CH ₃	3 700	未测
12	CH ₃ CH ₂	2 000	未测
13	CH ₃ CH ₂ CH ₂	180	未测
14	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	300	未测
15	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	200	未测
16	<i>R</i> -CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	10	80
17	<i>S</i> -CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	9	135
18	(CH ₃ CH ₂) ₂ CH	1	16
19	(CH ₃ CH ₂ CH ₂) ₂ CH	16	未测
3	见前	150	2 500
4 (扎那米韦)	见前	1	16



interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. J Am Chem Soc, 1997, 119: 681–690)。

4.6 候选物的确定和奥塞米韦的上市

化合物 **18** 对 A 和 B 型流感神经氨酸酶具有高抑制活性, 而对哺乳动物的神经氨酸酶不显示抑制作用, 该选择性作用预示对人体的不良反应较少, 结合其他性质被确定为候选化合物。由于分子中含有羧基和脂肪氨基, 在生理条件下可形成内盐, 不利于细胞摄入和吸收。将 **18** 的羧酸乙酯化, 得到前药化合物 **20**, **20** 本身没有活性 (因为游离羧基对酶的结合至关重要), 却有利于吸收, 吸收后经肝脏酯酶水解, 释放出 **18** 而起效。化合物 **20** 命名为奥塞米韦 (oseltamivir), 制成磷酸盐有利于溶解和吸收。



奥塞米韦的口服生物利用度 $F = 80\%$ 以上, 酯的血浆半衰期 $t_{1/2} = 1 \sim 3$ h, 水解后释出的活性药物 (游离酸 **18**) 的 $t_{1/2} = 6 \sim 10$ h, 以 **18** 形式自尿中排出。奥塞米韦由罗氏公司开发, 经临床研究而确定了疗效, 与 1999 年经 FDA 批准上市, 成为预防和治疗流感的第一个口服药物 (Davies BE. Pharmacokinetics of oseltamivir: an oral antiviral for the treatment and prophylaxis of influenza in diverse populations. J Antimicrob Chemother, 2010, 65: Suppl 2: ii5–10)。

4.7 奥塞米韦与神经氨酸酶的结合模式

化合物 **18** 与神经氨酸酶复合物的晶体结构表明与预期的结合模式相同。如图 5 所示, C1 相连的羧

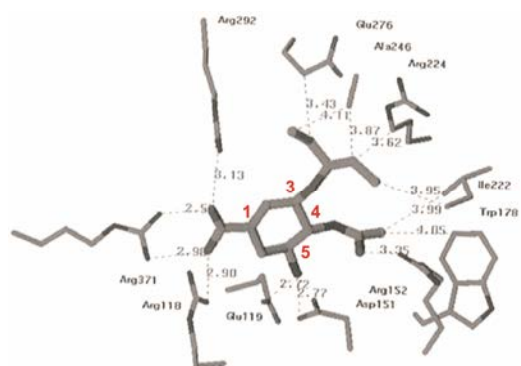


图 5 化合物 **18** 与神经氨酸酶的晶体结构

基与 3 个精氨酸 (Arg292、Arg371、Arg118) 的胍基形成强力结合。C5 的氨基与 Glu119 和 Asp151 发生电荷-电荷样的氢键结合。C4 上的乙酰氨基的甲基占据了由 Trp178 和 Ile222 构成的疏水腔, 酰基的氧原子与 Arg152 发生氢键结合。这些与前述的 Δ^2 唾液酸 (2) 结合模式没有显著差别。不同的是 C3 侧链的结合模式。C3 相连的 3-戊氧基进入由 Glu276、Ala246、

Arg224 和 Ile222 组成的疏水腔内, 这与扎那米韦的甘油片段的末端两个羟基与 Glu276 的羧基形成二齿样氢键结合不同。Glu276 为了适配于疏水-疏水相互作用, 羧基的取向是向腔外, 亲脂性骨架参与了疏水结合。构效关系研究揭示的 C3 位烷基大小和形状对活性的影响, 佐证了 3-戊基与疏水腔结合的熵效应达到最大值。