

• 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多维性质。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。

肺动脉高压是凶险的难治之症,被称为心血管系统的癌症。以内皮素受体为靶标的拮抗剂波生坦作为治疗药首创于2001年,从10万个化合物筛选出苗头分子到确定波生坦为候选物,合成了1200个化合物,虽然在发表的文章中难以厘清研发细节,但从专利报道的实施例可以读出研发者围绕苗头分子的结构作了全面的改造,而且常常对某一位置作反复优化,以免此处的结构变换影响了彼处的结合模式,这是应用构效关系和试错探索(trial and error)应加注意的。12年后上市的马西替坦是以波生坦为起点的跟随性药物,它优胜和超越波生坦,反映在药效、药代和安全性等方面,虽然借鉴了波生坦的许多经验,但结构上也有许多创新,读者可从其研发历程领悟出怎样进行跟随性药物创新。

(编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2016-0908

肺动脉高压治疗药:首创的波生坦和跟随的马西替坦

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 首创的波生坦

1.1 研制背景和靶标

1.1.1 肺动脉高压 肺动脉高压(pulmonary artery hypertension, PAH)指肺动脉压力升高超过一定界值的一种血流动力学和病理生理状态,可导致右心衰竭,是一种致残率和病死率很高的疾病,被称为心血管系统的癌症。患者内皮素浓度明显增高,尤其是肺动脉血浆内皮素水平显著高于右心室和股动脉,由于肺动脉平滑肌细胞的异常收缩和增殖,导致肺动脉压力及肺血管阻力增大,提示血浆内皮素增高在肺动脉高压形成中具有重要的病理生理作用。降低或阻断内皮素的作用是治疗PAH的重要环节。

1.1.2 内皮素和内皮素受体 1988年日本学者Yanagisawa等首先纯化和克隆了由血管内皮细胞产生的多肽,具有强效收缩血管的功能,定名为内皮素(endothelins, ETs)(Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, 332: 411-415)。内皮素是包括3个结构相近的二十一肽ET-1、ET-2和ET-3的总称,ET收缩血管的作用远强于血管紧张素II和去甲肾上腺素作用,其中ET-1的活性最强。ET的受体是G蛋白偶联受体,ET与受体结合启动的生理效应是多方面的,最重要的是收缩血管。内

皮素受体有两种:ET_A和ET_B,主要表达于血管平滑肌细胞上,作为药物靶标这两种受体都是重要的。血液循环中内皮素水平提高使内皮素系统活化,引起肺动脉高压等心血管疾病。

1.1.3 内皮素的结构 ET-1是21个氨基酸组成的寡肽,N端的Cys1和Cys3分别与Cys11和Cys15形成两个二硫键,构成两个环状结构,C端的6个保守的疏水性氨基酸是与受体ET_A结合的主要位点。NMR解析ET-1的三维结构表明,C端的六肽靠近中部的二硫环,是由于Phe14与Ile19、Ile20和Trp21疏水簇集所致。这个构象特征对于模拟肽类或小分子药物设计是重要的启示。图1是ET-1的结构和ET-1水溶液经NMR测定的构象图(Ragg E, Mondelli R, Penco S, et al. Tertiary structure of endothelin-I in water by ¹H NMR and molecular dynamics studies. *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 1994, 1317-1326)。

1.2 先导化合物

1.2.1 活性评价 评价化合物对内皮素受体的拮抗作用使用两种体外模型。用重组的人ET_A受体表达在Sf9或CHO细胞模型,评价化合物与放射性标记的内皮素对受体的竞争性结合实验,计算化合物对ET_A受体的IC₅₀。用人胎盘细胞膜富集的内皮素受体(富含ET_B)与放射性标记的内皮素竞争性结合实验,评价化

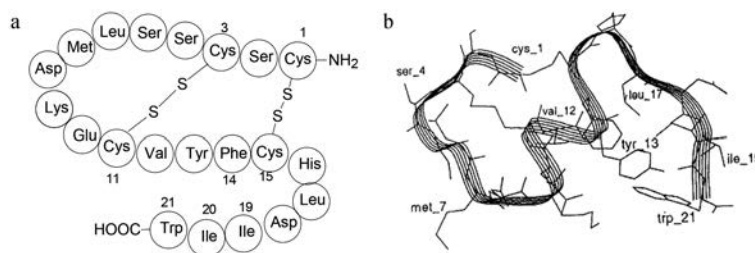
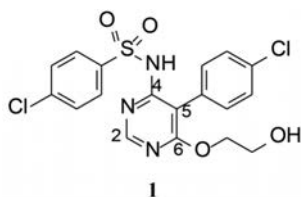


Figure 1 a: The chemical composition of ET-1; b: The conformation of ET-1 in solution

合物对 ET_B 的 IC_{50} 值。受试物扩张血管的功能实验是对抗一定浓度的内皮素引起大鼠主动脉环的收缩力,使主动脉环收缩力降低 50% 所需的化合物摩尔浓度 EC_{50} , 作为受试物的拮抗功能的量度, 取其负对数值 (pA_2), 数值越大化合物的活性越高。

1.2.2 先导化合物的发现 由于缺乏受体三维结构信息, 难以进行理性分子设计, 罗氏公司筛选了 10 万个化合物, 以 10 个化合物为一组的混合物作为受试样品实行高通量筛选, 对出现的苗头再区分评价结合作用和功能。这样, 发现化合物 **1** 具有初步活性, $IC_{50}(ET_A)$ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $IC_{50}(ET_B)$ $8.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这个化合物原作为降血糖而合成的, 但没有降糖作用, 由于 **1** 有良好的物化性质和容易合成, 例如用会聚方法构建嘧啶环, 再分步引入 4 位的苯磺酰基和 6 位的侧链, 还可用不同的脞和取代的丙二酸酯, 变换 2 位和 5 位的取代基, 对于制备多样性是易行的, 因而 **1** 适宜作为先导物。



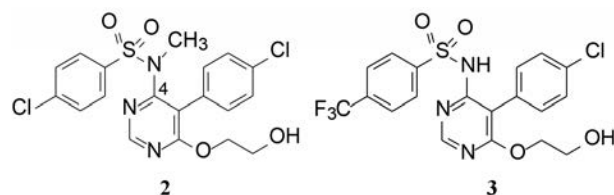
对先导物的结构优化位点, 嘧啶环除了 1,3 位不能取代和变换外, 其余 4 个位置都可以修饰, 应用药物化学的构效关系和试错 (trial and error) 方法, 罗氏对先导结构作了“地毯”式的探索, 如图 2 所示的各个位置进行变换的内容。

这些不同位置的各种基团的组合, 共合成了大约 1 200 个目标物, 测定了活性 (Burri K, Clozel M, Fischli

W, et al. Verwendung von Sulfonamiden als Heilmittel und neue Sulfonamide. EP 510526.28, 28 Oct, 1992, F Hoffmann-La Roche, Germany)。下面就研发成功波生坦的主要脉络作简要叙述。

1.3 构效关系和结构优化

1.3.1 嘧啶环的 4 位取代基的变换 化合物 **1** 的 4 位胺磺酰基 NH 被甲基化 (**2**) 失去了活性, ($IC_{50}(ET_A) > 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 提示氮上氢原子对活性是必要的。由于磺酰基的拉电子效应和 $p-\pi$ 共轭的电荷离域化, NH 显示酸性和部分解离性, 可能与受体发生重要的氢键或盐键结合。



4 位的苯基上 4'-氯原子被三氟甲基置换, 化合物 **3** 的活性 $IC_{50}(ET_A)$ $18 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $IC_{50}(ET_B)$ $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 ET_A 略有降低, 而 ET_B 的活性提高 3 倍。 CF_3 的尺寸大于 Cl ($Es_{(CF_3)} = -2.49$; $Es_{(Cl)} = -0.97$, 绝对值越大体积越大), CF_3 的疏水常数 (π 值) 略大于氯原子 ($\pi_{CF_3} = 0.82$, $\pi_{Cl} = 0.71$), 提示苯环对位的大体积和亲脂性基团可能有利于提高活性。这为后来的优化增大该位置的亲脂性提示了方向。

1.3.2 嘧啶环的 5 位取代基的变换 进而合成亲脂性更强的 4'-叔丁基 ($Es_{(t-Bu)} = -2.78$; $\pi_{t-Bu} = 1.98$), 同时变换嘧啶的 5 位苯基上取代基, 合成的化合物中, **4** 的活性显著提高, $IC_{50}(ET_A)$ $0.22 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $IC_{50}(ET_B)$

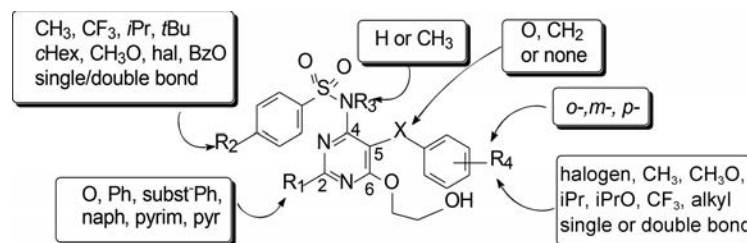
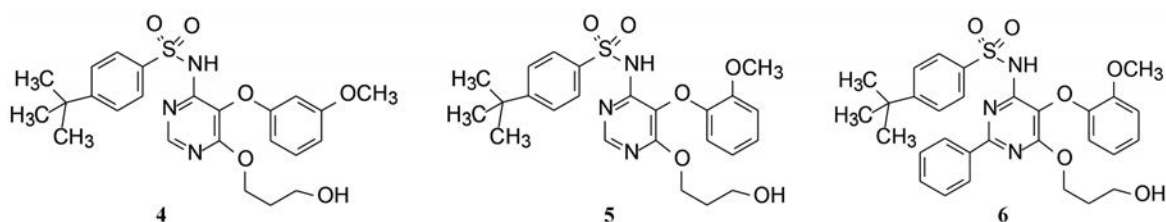


Figure 2 Group alteration on the pyrimidine core



$1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 动物实验显示对高血压猴有降压作用。将化合物 **4** 的 3'-甲氧基移至 2'位, 化合物 **5** 的活性虽略低于 **4** [$\text{IC}_{50}(\text{ET}_A)$ $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], 但提高了扩张大鼠主动脉活性, pA_2 ($-\log \text{EC}_{50}$) 为 6.02。

1.3.3 嘧啶环 2 位引入取代基 根据 ET-1 的三维结构揭示的 C 端的氨基酸残基 Ile19、Ile20 和 Trp21 与 Phe14 发生疏水性簇集, 并且是与受体 ET_A 结合的重要位点 (经 ET-1 的肽模拟物的构效关系证实), 在化合物 **5** 嘧啶环的 2 位连接出苯环, 模拟配体的簇集特征, 合成了化合物 **6**, 其活性显著提高, $\text{IC}_{50}(\text{ET}_A)$ $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pA_2 为 6.90。

在苯环的不同位置用各种基团取代, 以及用其他芳环或芳杂环置换苯基, 经广泛的合成和活性评价, C2 被 2'-嘧啶基取代的化合物 **7** 对 ET_A 和 ET_B 显示出优良和相匹配的活性, $\text{IC}_{50}(\text{ET}_A)$ $0.08 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{IC}_{50}(\text{ET}_B)$ $0.15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 功能活性 pA_2 为 7.4。化合物 **7** 的构效关系表明, 去除 2 位苯环上叔丁基 (**8**) 使活性减弱; C4 磺酰胺基的 H 被甲基化完全失去活性; 将 C5 苯环上的甲氧基去甲基化成羟基活性显著减弱; 嘧啶母核换成苯基的活性也减弱。这些构效关系与前述的结构演化所得的结论是一致的 (Neidhart W, Brau V, Bur D, et al. The discovery of non-peptide endothelin receptor antagonists. Progression towards bosentan. Chim Int J Chem, 1996, 50: 519-524)。

化合物 **7** 的物理化学性质表明, 水溶解度为 0.3%

(pH 7.4), $\log P$ 3.1, $\log D$ 1.3, pK_a 5.1, 呈弱酸性。药代动力学实验表明, 口服生物利用度 $F=50\%$, 口服给药后 3~5 h 血药浓度达到峰值。分布容积大约为 $18 \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$, 清除率大约为 $8 \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, 消除半衰期 $t_{1/2}$ 为 5.4 h, 与血浆蛋白结合率 98%, 主要是白蛋白。罗氏公司命名 **7** 为波生坦 (bosentan), 经临床 III 期试验研究, 于 2001 年美国 FDA 批准上市, 治疗肺动脉高压。每日口服 2 次, 初始剂量每次 62.6 mg, 维持剂量为每次 125 mg。

1.4 波生坦的结构特征

波生坦晶体 X-射线衍射分析表明, 磺酰胺基呈同向配置, 两面角为 62° 。两个嘧啶环具有共面结构 (4 个邻位都是氮原子没有阻转效应), 因而扩大了芳环的平面。5 位的苯基受 4 位和 6 位基团的“夹挤”, 采取的构象是垂直于中心嘧啶环的平面。图 3 为波生坦的 X-射线晶体衍射图。与中心的嘧啶环相连的 4'-叔丁基苯磺酰胺环和 2'-甲氧基苯环在空间的相对位置, 构成了内皮素受体拮抗剂与 ET 受体特异性结合的构象, 这在后继研发的 ET 拮抗剂的构象中得到进一步确认。

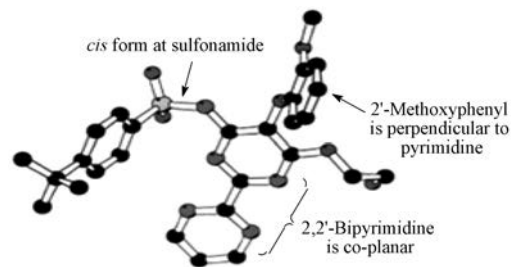
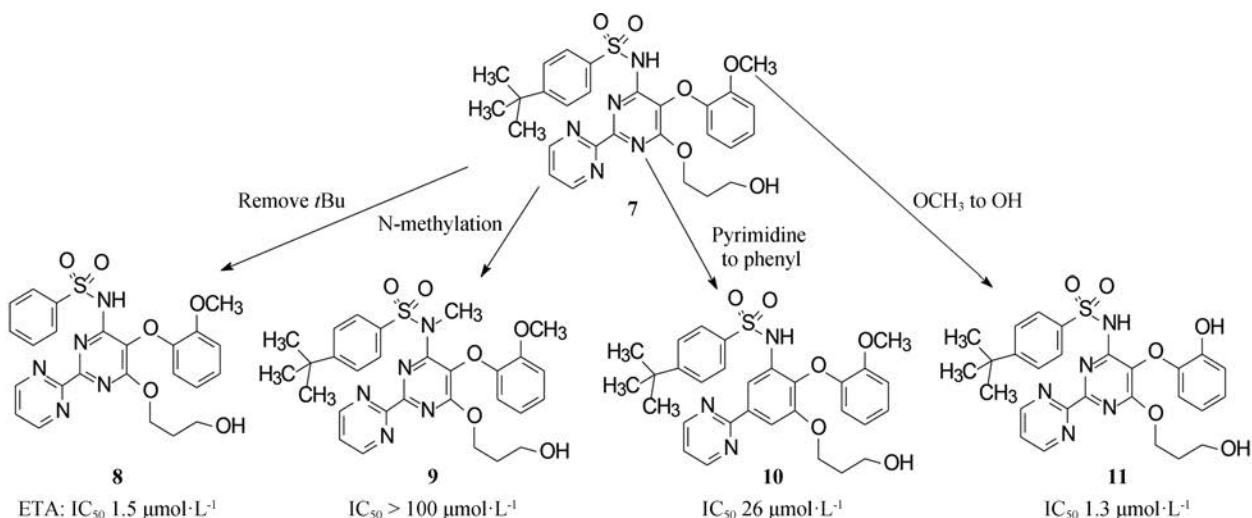


Figure 3 Chrystallography of bosentan



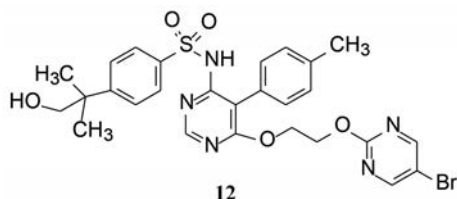
2 跟随的马西替坦

2.1 研发目标

罗氏公司研发的波生坦为治疗肺动脉高压的首创性药物 (first-in-class)。Actelion 公司为了研制更优良的药物, 设定了如下的目标: ① 比波生坦的作用更强; ② 体内对 ET_B 受体也有抑制活性; ③ 口服一日一次; ④ 消除波生坦对肝脏小管对胆酸盐外排的抑制作用。为此需要对波生坦的结构作深层次的改造。

2.2 C6 侧链连接嘧啶环

2.2.1 外来的线索 日本田边制药研发的 ET 受体拮抗剂 T-0201 (**12**) 体外活性很高, IC₅₀(ET_A) 0.4 nmol·L⁻¹, IC₅₀(ET_B) 0.12 nmol·L⁻¹, 并进入临床研究, 其结构特征是在 C6 的乙二醇链的末端连接了嘧啶环, 抑制双靶标的活性显著提高。Actelion 依此作为研发的切入点, 在波生坦的 C6 位的侧链末端也连接了 2'-嘧啶环。



2.2.2 在波生坦的骨架上引入嘧啶环 田边的化合物与罗氏的母核有区别, 前者是 5-苯基 (苯环与嘧啶环单键相连), 后者是 5-苯氧基 (苯环与嘧啶环经氧桥相连), 模拟 **12** 的 6 位基团, 合成了探索性的化合物列于表 1, 成对地比较末端嘧啶基对活性贡献。

Table 1 Comparison of activity for the compounds with varied C4-groups and C6-side chains

R	Compd.	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		Compd.	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	
		ET _A	ET _B		ET _A	ET _B
4- <i>t</i> -Bu-Ph	7 (bosentan)	45.0	202	13	4.3	76
PhCH ₂	14	25.7	1 131	15	8.0	465
CH ₃	16	4 534	9 506	17	739	1 765

表 1 中的数据显示, C4 基团无论是芳基、芳烷基或烷基, 只要 C6 侧链连接有嘧啶环, 对 ET_A 和 ET_B 的抑制活性都比无嘧啶环的高。化合物 **13** 是在波生坦 (**7**) 的 6 位侧链连接嘧啶基, 抑制 ET_A 活性提高 10 倍, ET_B 提高 3 倍。另外两对化合物的活性虽然较弱, 但含有嘧啶环的化合物活性都比相应不含的要高。

2.2.3 末端嘧啶环上取代基的变换 化合物 **15** 对 ET_A

活性 IC₅₀ 8 nmol·L⁻¹, 以 **15** 为模板考察嘧啶环上取代基对活性的影响。表 2 列出了化合物的活性。

Table 2 Optimization of substituents on pyrimidine ring at C6-side chain

Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	
		ET _A	ET _B			ET _A	ET _B
15	H	8.0	465	22	5-SCH ₃	1.1	42
18	5-CH ₃	17.8	1 501	23	5-CF ₃	3.0	145
19	5-Cl	2.8	461	24	5- <i>c</i> -Pr	7.7	424
20	5-Br	2.2	216	25	4,6-(OCH ₃) ₂	4 775	>10 000
21	5-OCH ₃	3.2	202				

表 2 的构效关系提示, 除 5-甲基化合物 (**18**) 的活性低于无取代基的 (**15**) 外, 其余化合物在 5 位的取代都提高了 ET_A 的抑制活性, 此外, 5-溴 (**20**)、5-甲氧基 (**21**)、5-三氟甲基 (**23**) 也提高了 ET_B 的活性, 尤其以 5-甲硫基 (**22**) 活性更高。然而, 4,6-二甲氧基化合物 **25** 几乎没有活性。化合物 **20** 和 **22** 的双靶标活性强度基本达到预定的目标。然而由于结构中含有 5 个芳香环, 相对分子质量超过 600, 预计对物化性质不利, 因而对嘧啶母核的各个位置仍需优化。

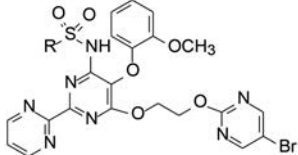
2.3 C4 取代的优化

为了考察 C4 苯磺酰胺基连接的基团对活性的贡献, 固定 C2、C5 和 C6 的基团不变, 变换叔丁基, 合成的有代表性的化合物列于表 3。分析构效关系提示如下: 化合物 **26** 是波生坦的 C6 链端连接 5-溴嘧啶环, 对 ET_A 和 ET_B 有很强的活性, 但去除叔丁基 (**27**) 的两种活性都降低 10 倍, 提示叔丁基之重要。苄基取代的化合物 **28** 活性更低。但苯乙基化合物 **29** 对 ET_A 的活性接近 **26** (但对 ET_B 活性未能恢复活性), 苯丙基 (**30**) 的活性略低于苯乙基 (**29**)。简单的烷基取代 (**31~34**) ET_A 的活性随着链的增长活性提高, 但对 ET_B 活性稍有提升, 但不敏感。

将磺酰胺连接基变换成磺酰二胺化合物, 除吗啉化合物 **41** 外, **35~40** 的活性都很强, 明显优于磺酰胺, 对 ET_B 也呈现有意义的活性, 如苄胺基化合物强于苄基, 甲胺基强于甲基, 乙胺基强于乙基等等, 这个发现指引了优化的新方向。

2.4 C2 基团的优化

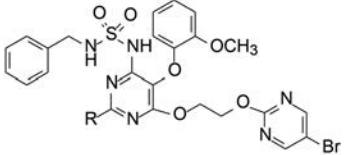
固定 C4 的取代基为 *N*-苄基磺酰二胺, C5 和 C6 仍保持原优化的基团, 变换 C2 的嘧啶环, 考察构效关系,

Table 3 Activity of optimized C4-phenylsulfonamides


Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	
		ET _A	ET _B
26	4- <i>t</i> -Bu-Ph	1.5	19.3
27	Ph	10.4	341
28	Bz	73	3 479
29	PhCH ₂ CH ₂	2.2	216
30	PhCH ₂ CH ₂ CH ₂	6.7	377
31	CH ₃	113	1 146
32	CH ₃ CH ₂	14	460
33	CH ₃ CH ₂ CH ₂	9.4	566
34	<i>n</i> -Bu	4.3	552
35	PhCH ₂ NH	1.9	147
36	CH ₃ NH	7.9	194
37	CH ₃ CH ₂ NH	9.9	655
38	<i>n</i> -PrNH	3.8	322
39	<i>n</i> -BuNH	1.7	167
40	<i>N,N</i> -BzN(CH ₃)H	7.0	457
41	Morpholinyl	187	1 474

合成的化合物列于表4。

C2的嘧啶环变换成吡嗪、吡啶或吗啉,对ET_A和ET_B的活性基本不变,即使换成较小的烷基或烷氧基对ET_A活性变化也不大(对ET_B较大)。有意义的是化合物48在C2位没有取代,对ET_A活性影响也不大,提示C2的基团对于受体结合的贡献较小。这个发现对降低分子尺寸很有意义,若能去除C2的嘧啶基,可减少一个芳环,分子量降低79,对改善物化性质是有利的。虽然在研发波生坦过程中确认C2基团的必要性,但在新的结构特征下(C4的磺酰二胺基和C6末端的

Table 4 Activity of the compounds with varied C2-substituents


Compd.	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	
		ET _A	ET _B
35	2-Pyrimidinyl	1.9	147
42	2-Pyrazinyl	2.1	166
43	4-Pyridinyl	3.4	561
44	4-Morpholinyl	1.4	192
45	<i>c</i> -Propyl	14	1 082
46	Methoxy	40	2 490
47	2-CH ₃ OC ₂ H ₄ O	6.9	554
48	H	6.9	525

嘧啶基),需要重新审视C2取代基的作用。

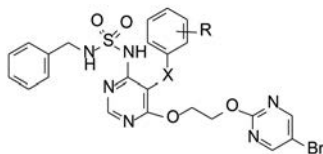
2.5 C5基团的优化

优化至此,已经对波生坦的结构做了多位点的变换,在去除C2的取代基后需要对C5位置再做优化,所选择的片段是从罗氏和田边公司报道的高活性化合物中借鉴而来的(这是跟随性药物研发的常循之道),表5列出了化合物的体外活性和体内降压作用。

化合物49的C5取代基是3'-甲氧苯基(不同于波生坦的2'-甲氧基),抑制ET_A作用强于波生坦40余倍,对ET_B的活性减弱一倍。C5苯环直接连在嘧啶母核上,化合物50的抗ET_A活性也比较强,但对ET_B显著减弱,不过4'-位取代后(52~56)活性明显升高,这又恢复到研发波生坦初期的结构上,只是在C2与C6位置上的取代基有较大的变化罢了。

用大鼠灌胃受试物(3 mg·kg⁻¹)评价了化合物的体内降压作用,波生坦(7)的降低动脉血压的最大值为

Table 5 Optimization of C5-substituents. ^ΔMAP = Maximal reduction in mean arterial blood pressure as extracted from the moving average over 6 h after administration of 3 mg·kg⁻¹ of the compound to conscious hypertensive Dahl salt-sensitive rats. ^{**}Area between curve (ABC) as calculated from the blood pressure recordings 24 h before and after administration of 3 mg·kg⁻¹ of the compound to conscious hypertensive Dahl salt-sensitive rats. ^{***}NT: Not test



Compd.	X	R	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		max ΔMAP ^Δ /mmHg	ABC ^{**} /mmHg·h
			ET _A	ET _B		
7		Bosentan	45	202	-7	-88
49	O	3-OCH ₃	1.0	457	-10	-245
50	O	2-Cl-5-OCH ₃	1.4	712	-24	-639
51	Single bond	H	6.8	5 067	NT ^{***}	NT
52	Single bond	4-CH ₃	0.7	441	NT	NT
53	Single bond	4-Cl	1.4	506	-18	-593
54	Single bond	4-Br	1.6	461	-14	-445
55	Single bond	4-C ₂ H ₅	2.3	1 264	NT	NT
56	Single bond	4-CH(CH ₃) ₂	3.6	2 474	NT	NT

7 mmHg, 降压持续时间为 15 h, ABC 值为-88 mmHg·h, 表明 **7** 的活性远低于化合物 **53** 和 **54**。 **53** 和 **54** 是里程碑式化合物, 成为优化结构的新起点。为此, 固定 C5 为单键相连的 4'-溴苯基, 再优化 C4 连接的磺酰(二)胺的取代基。

2.6 候选化合物和马西替坦上市

2.6.1 候选化合物的确定

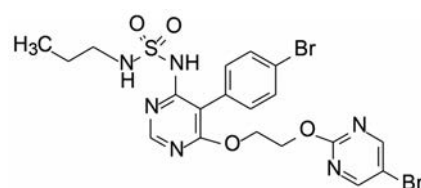
以 C5 单键连接 4'-溴苯基为固定基团, 变换 C4 的磺酰二胺结构, 目标为体内外活性最大化, 合成了有代表性的化合物列于表 6。由于 **57**~**60** 等较小烷基取代的化合物活性都很强, 难以区分和选择, 为此进行体内降压活性的比较, 化合物 **59** 呈现活性最强, 从而合成了 **58** 的周边化合物以发现更强的化合物, 例如 **64** 是将化合物 **59** 的 4'-Br 换成 4'-Cl, **66** 是将苯基换成苯氧基 (4'-Br 换成 3'-OCH₃, 6'-Cl), **68** 是将 **59** 的正丙胺基换成正丁基, 然而, 这些结构类似的化合物的体外或体内活性都低于 **59**, 因此确定 **59** 为进一步研发的候选化合物, 定名为马西替坦 (macitentan)。

2.6.2 马西替坦的药效学

大鼠一次灌胃马西替坦 3 mg·kg⁻¹, 最大降低动脉血压平均为 25 mmHg, 持续时间 60 h。大鼠给药范围 1~100 mg·kg⁻¹ 未出现心律变化的不良反应。大鼠灌胃 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 7 天, 动脉压恒定降低 20 mmHg, 并持续到停药后 48 h, 恢复到正常水平, 未出现血压反跳现象, 其间也未出现心动过速的不良反应。

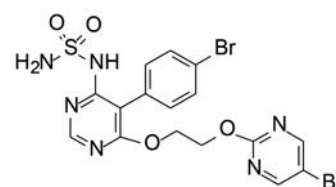
2.6.3 马西替坦的药代动力学

大鼠和犬实验表明马



Macitentan (**59**)

西替坦有良好的药代动力学性质, 表 7 列出了口服给药的主要药代参数, 表明有较高的口服生物利用度, 大鼠有较低的血浆清除率 (6.7 mL·min⁻¹·kg⁻¹) 和较好的组织分布 (1.8 L·kg⁻¹)。马西替坦在体内代谢位点是 *N*-去丙基化, 代谢生成物 **69** 对 ET_A 和 ET_B 的 IC₅₀ 分别是 3.4 和 987 nmol·L⁻¹, 仍具有活性。

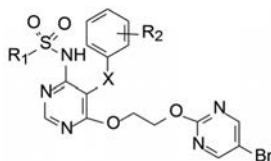


69

2.6.4 马西替坦消除了波生坦的抑制胆酸外排作用

波生坦可引起剂量依赖性的转氨酶增高, 是由于抑制了肝脏转运胆酸的功能, 引起肝内胆酸淤积作用。动物实验表明, 马西替坦不抑制肝脏的胆酸转运功能 (Fattinger K, Funk C, Pantze, M, et al. The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. Clin Pharmacol Ther, 2001, 69: 223-231)。

Table 6 Activity of the compounds with varied C4-substituent. *ΔMAP = Maximal reduction in mean arterial blood pressure as extracted from the moving average over 6 h after administration of 3 mg·kg⁻¹ of the compound to conscious hypertensive Dahl salt-sensitive rats. **Area between curve (ABC) as calculated from the blood pressure recordings 24 h before and after administration of 3 mg·kg⁻¹ of the compound to conscious hypertensive Dahl salt-sensitive rats. ***NT: Not test



Compd.	X	R ₁	R ₂	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		max ΔMAP* /mmHg	ABC** /mmHg·h
				ET _A	ET _B		
54	Single bond	C ₆ H ₅ CH ₂ NH-	4-Br	1.6	461	-14	-445
57	Single bond	CH ₃ NH-	4-Br	1.7	812	-21	-1 045
58	Single bond	C ₂ H ₅ NH-	4-Br	0.8	830	-20	-598
59	Single bond	CH ₃ CH ₂ CH ₂ NH-	4-Br	0.5	391	-25	-922
60	Single bond	<i>n</i> -C ₄ H ₉ NH-	4-Br	0.3	158	-16	-443
61	Single bond	<i>c</i> -Pr-NH	4-Br	4.4	1 474	NT	NT
62	Single bond	<i>N,N</i> -BzN(CH ₃)H	4-Br	4.3	5 208	NT	NT
63	Single bond	Morpholinyl	4-Br	2.8	2 829	NT	NT
64	Single bond	CH ₃ CH ₂ CH ₂ NH-	4-Cl	1.2	784	NT***	NT***
65	O	CH ₃ CH ₂ CH ₂ NH-	3-OCH ₃	1.9	408	-15	-391
66	O	CH ₃ CH ₂ CH ₂ NH-	3-OCH ₃ , 6-Cl	0.4	208	-21	-500
67	Single bond	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -	4-Br	2.2	3 058	-25	-1 116
68	Single bond	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	4-Br	1.1	2 424	-22	-734

Table 7 Pharmacokinetic parameters of macitentan after oral administration in male Wistar rats ($n = 10$) and male Beagle dogs ($n = 10$)

Dose (10 mg·kg ⁻¹)	AUC _{0-∞} /ng·h·mL ⁻¹	C _{max} /ng·mL ⁻¹	T _{max} /h	F/%
Wistar rats	18 500 ± 8 100	1 670 ± 371	6.0	79
Beagle dogs	27 500 ± 6 500	4 590 ± 2 540	2.0	87

2.6.5 马西替坦批准上市 马西替坦的物化性质、药效学和药代动力学性质达到了 Acterion 公司预定的研发标准, 完成临床前研究后, 经 III 期临床试验, 表明是治疗肺动脉高压的有效药物, 美国 FDA 于 2013 年批准了马西替坦上市。

2.7 波生坦和马西替坦与 ET_A 受体的结合特征

ET_A 受体为 G 蛋白偶联受体, 迄今仍未解析三维结构。根据已知的孤啡肽受体 (orphanin FQ receptor) 晶体结构, 经同源模建生成 ET_A 受体三维结构, 对波生坦和马西替坦分别做分子对接, 配合对受体结合部位的氨基酸残基做定点突变, 测定突变体与波生坦和马西替坦的结合力, 用以分析它们的结合特征。结果表明, 二者的结合方式是不同的。

首先, 由于波生坦的磺酰胺基有一定的酸性 (pK_a 5.1), 与 Arg326 形成较强的正负电荷引力, 因而当 Arg326 突变为 Gln326, 因后者缺少正电荷, 降低了波生坦的结合力。而变换为磺酰二胺, 两个 -NH- 导致离解性减弱 (pK_a 6.2), 与 Arg326 未能形成静电结合作用, 因而突变为 Gln326 不影响马西替坦的结合。

第二, 波生坦为刚性分子, 它的叔丁苯基以伸展型构象突入到由 Ile355 等组成的另一个疏水腔内。当 Ile355 突变为 Ala355, 空间变小不能容纳叔丁苯基的进入, 因而导致基团间不能适配, 结合作用减弱。但马西替坦相对应的片段为正丙基链, 突变后的 Ala355 仍

可容纳该柔性链, 所以也不影响马西替坦的结合。

最后, Leu322 变异为 Ala322 对马西替坦的结合影响显著, 是因为 Leu322 形成的腔与正丙基发生强效的疏水性结合, Ala322 减弱了这种作用。然而波生坦的结构本来就没有触及到这个腔穴, 所以变异前后都不影响其结合 (Gatfield J, Grandjean CM, Bur D, et al. Distinct ET_A receptor binding mode of macitentan as determined by site directed mutagenesis. PLoS One, 2014, 9: e107809)。图 4a 和 b 分别是波生坦和马西替坦分子对接并参考定点突变受体的实验结果模拟的结合图。如前所述, 两个药物分子都结合于 ET_A 同一活性中心, 但由于结构的刚柔区别和离解性差异, 导致微观结合的不同。若将对接后的分子抽提出来, 比较波生坦与马西替坦分子的取向和构象 (图 4c 和 d), 可以看出有两个结构片段的区别: 即在图中标示的 2 和 3 处分别有缺失, 但并不影响结合与功能 (Gatfield J, Mueller Grandjean C, Sasse T, et al. Slow receptor dissociation kinetics differentiate macitentan from other endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial smooth muscle cells. PLoS One, 2012, 7: e47662; Boss C, Bolli MH, Gatfield J. From bosentan (Tracleer) to macitentan (Opsumit): the medicinal chemistry perspective. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26: 3381-3394)。

回到本文开始提到的内皮素结构的话题。C 端 6 个疏水性氨基酸与 Phe14 发生疏水性簇集作用, 并且是与 ET_A 受体结合的重要因素, 作为拮抗剂的波生坦和马西替坦外周的芳香环履行的功能就是对应了天然配体内皮素的关键氨基酸, 这些芳香环结合的受体部位是 Gln165、Lys166、Leu322、Arg326、Lys329、Asp351 和 Ile355 组成的结合位点。

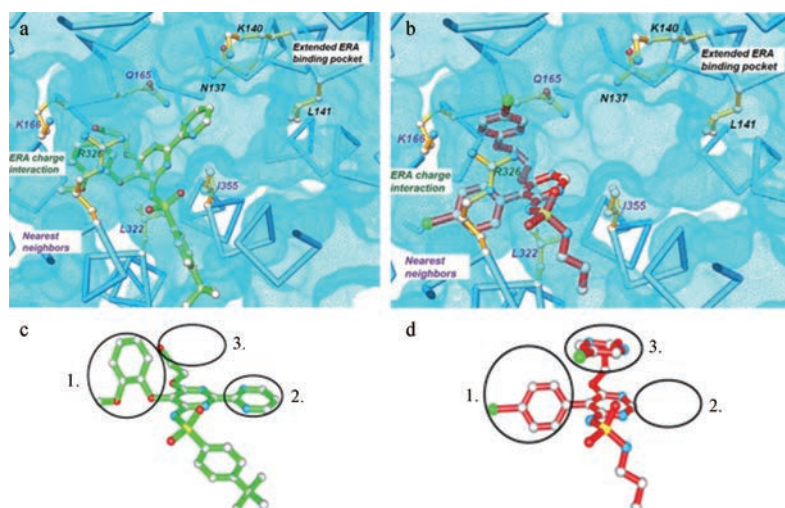


Figure 4 The docking diagrams of bosentan (a) and macitentan (b); the pharmacophoric features of bosentan (c) and macitentan (d)