

• 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。

药物治疗肺动脉高血压病可针对不同的靶标和环节。利奥西呱是以激活可溶性鸟苷酸环化酶为靶标的首创性药物。基于生理机制研发药物的重要前提是靶标的可药性, 因而揭示对靶标的作用与临床效果的因果关联性贯穿于首创药物的研发始终, 概念验证是反复进行的。利奥西呱的研制过程中用酶、器官、多种动物的病理模型评价化合物的活性和选择性, 以保障临床的有效性。结构优化也是在药效、药代和选择性等多维空间中展开的。 (编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2016-1087

概念验证研发首创性药物利奥西呱

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 肺动脉高压

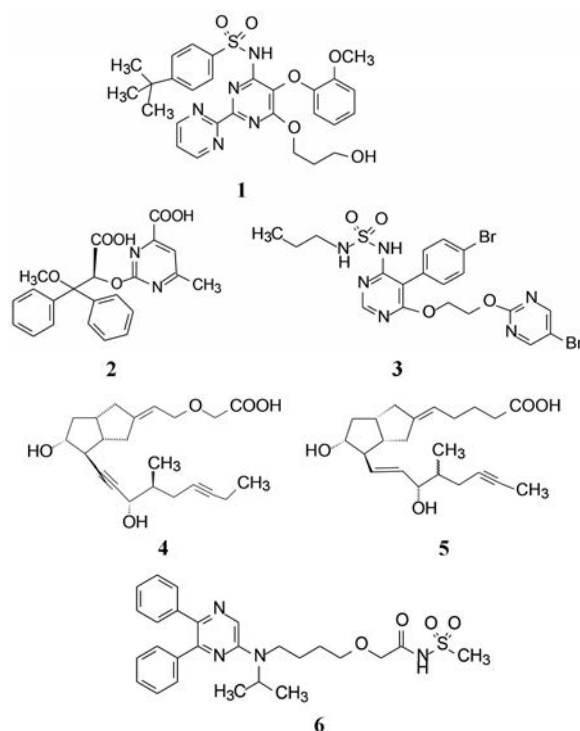
肺动脉高压 (pulmonary artery hypertension, PAH) 指肺动脉压力升高, 超过一定界值而发生的血流动力学和病理生理状态, 可导致右心肥大和衰竭, 是一种致死率和病死率很高的疾病。患者内皮素浓度明显增高, 尤其是肺动脉血中内皮素浓度显著高于右心室和股动脉, 由于肺动脉平滑肌细胞的异常收缩和增殖, 导致肺动脉壁重塑 (平滑肌细胞增生、凋亡、炎症和纤维化等复合作用引起血管结构的病理变化), 引起血管阻力和压力增大等病变。

2 药物治疗的环节

为了阻断和缓解肺动脉壁的重塑, 药物应减轻患者肺动脉血管内壁的纤维化, 阻止内皮细胞的增生以及平滑肌肥大和增生等。就药物作用靶标而言, 主要聚焦于3个方面, 即①内皮素受体拮抗剂; ② 前列环素 (PGI₂) 受体激动剂; ③ 一氧化氮 (NO) 受体激动剂。

2.1 内皮素受体拮抗剂 内皮素 (ET-1) 是引起肺动脉重塑和 PAH 的主要祸害, 阻断 ET-1 对受体 ET_A 和 ET_B 的结合, 上市药物已有波生坦 (1, bosentan)、安倍生坦 (2, ambrisentan) 和马西替坦 (3, macitentan) 等, 都是口服用药。

2.2 前列环素受体激动剂 前列环素 (PGI₂) 是内源性激素, 主要产生于血管内皮细胞。PGI₂ 具有多种生理功能, 可强效舒张血管, 抑制血管平滑肌细胞分化、增殖和迁移以及抑制血小板聚集。上市的 PGI₂ 受体激动剂药物有伊洛前列素 (4, iloprost) 和西卡前列素

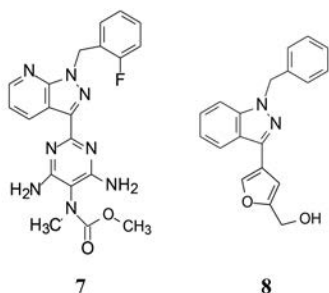


(5, cicaprost) 以及赛乐西帕 (6, selexipag)。

2.3 提高和维持环鸟苷酸水平 健康人体内的一氧化氮 (NO) 的功能是舒张血管和抑制平滑肌细胞增生, 机制是通过激活可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC) 提高生成环鸟苷酸 (cGMP) 水平。然而 NO 释放剂如硝酸酯对 PAH 患者无效, 是由于微弱的肺血管舒张作用被强大的扩张外周血管抵消, 不良反应超过主作用。因而需通过激活可溶性鸟苷酸环化酶提高患者 cGMP 水平,

即开 cGMP 之源。另一条途径是节 cGMP 之流。例如抑制磷酸二酯酶 5 (PDE5) 活性, 保护和延缓 cGMP 免于水解成 GMP, 维持对肺动脉的舒张。所以, 治疗男性勃起障碍的药物西地那非 (sildenafil) 和他达拉非 (tadalafil) 也用于治疗 PAH。

本文叙述激活可溶性鸟苷酸环化酶药物利奥西呱 (7, riociguat) 的研发过程。



3 苗头化合物和活性评价

1994 年台湾大学 Ko 等发现化合物 **8** (YC-1) 可抑制多种炎症介质引起家兔的血小板聚集, 并证明是激活了血小板的可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC), 提高了 cGMP 水平, 因而 **8** 作为激活 sGC 的苗头化合物, 开辟了研制舒张血管防止血小板聚集药物新方向 (Ko FN, Wu CC, Kuo SC, et al. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. Blood, 1994, 84: 4226-4233)。

评价受试化合物的体外活性用两种方法。一是家兔主动脉环模型, 用一定浓度的苯肾上腺素处理主动脉环引起收缩, 测定并计算达到设定舒张程度的化合物浓度 IC_{50} 。另一是用重组的可溶性鸟苷酸环化酶在 NO 存在下产生 cGMP 的最低有效浓度 (MEC) 来评价化合物活性。化合物的体内活性是灌胃大鼠测定麻醉状态下的扩张血管、降低血压的作用。

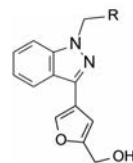
4 结构优化

Bayer 公司以化合物 **8** 为先导化合物。为进行结构修饰, 将 **8** 分成 3 部分分别优化, 即苯基, 苯并吡唑和羟甲基呋喃。

4.1 苯基是必要的 将连接苯并吡唑与苯基的亚甲基变换成 -COO-、-CO- 或单键直接连接, 合成的化合物都失去或降低了活性, 提示母核上苯基取代的必要性, 因而以后的结构修饰不改变这个连接片段。在苯环上做不同位置的基团取代, 或用杂环置换苯环, 合成的有代表性的化合物列于表 1。

表 1 的构效关系提示, 苯环的 2-位氟代化合物的活性强于 3 或 4 位氟代, 2-CN 同样强于 3-CN。其他卤素取代均使活性降低 (数据未列)。虽然 5-嘧啶取代的化合物活性最强, 但溶解性差, 而且难以合成, 所以, 选

Table 1 Structure and activity of the compounds with different *N*-substituents

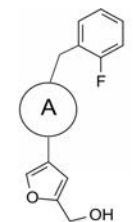


Compd.	R	Inhibition of contraction of aortic rings $IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
8	Phenyl	10
9	2-F-phenyl	4.9
10	3-F-phenyl	10
11	4-F-phenyl	19
12	2,6-F ₂ -phenyl	15
13	2-CN-phenyl	8.7
14	3-CN-phenyl	26
15	2-(5-Cl-thienyl)	7.2
16	2-Pyridyl	16
17	3-Pyridyl	9.6
18	5-Pyrimidinyl	3.2

取了化合物 **9** 作为继续优化的起点。

4.2 母核苯并吡唑的变换 母核苯并吡唑用其他双环进行了变换, 合成的化合物列于表 2, 结果显示吡唑并吡啶环连接的化合物 **19** 活性最强, 而且氮原子的位

Table 2 Activity of the compounds with varied benzopyrazole rings. ^aValue before parenthesis is concentration, inside is inhibition percentage



Compd.	A	Inhibition of contraction of aortic rings $IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
9		4.9
19		1.7
20		6.9
21		9.8
22		20.4 (27%) ^a
23		9.4

置很重要, **20~22** 的化合物活性弱, 而且多一个氮原子的吡唑并嘧啶化合物 **23** 活性也差。所以, **19** 为优选的化合物。

4.3 呋喃环的变换 将母核固定为吡唑并吡啶, N1 连接的是 2-氟代苯甲基, 下一步考察变换呋喃环对活性的影响, 表 3 列出了化合物的结构与活性。

表 3 的数据表明, 呋喃环上去除羟乙基或换成磺酰胺基都使活性降低, 用噁唑、咪唑或吡唑环替换呋喃, 活性基本不变或略低, 2-嘧啶基化合物 **32** 活性略高, 虽然加入羟甲基活性未见提高, 但 4-氨基嘧啶 (**34**) 活性显著增强。

4.4 氨基嘧啶环上取代基变换 母核上 C3 连接的 4-氨基嘧啶环是优选的片段, 进而对环上 C5 做取代基修饰, 合成的化合物列于表 4。

表 4 的构效关系可总结如下: ① 在 2-氨基嘧啶环的 5 位做不同的取代, 除正己基、氰庚基和氨甲基外, IC_{50} 都在 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下, 例如烷基取代 $C_2 \sim C_5$ 的活性变化不大, 说明氨基嘧啶环的 C5-基团变动影响不大; ② 立体位阻较大或亲脂性强的基团使活性减弱; ③ 含有极性基团 (同样链长) 的化合物活性较强, 例如吗啉基比硫代吗啉的活性强一倍。但氨甲基化合物 **64** 活性很弱, 或许是部分离解的缘故。

4.5 里程碑式化合物 45 表 4 中有若干个活性 (IC_{50}) 低于 $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的化合物, 但拜耳公司选择了化合物 **45** (代号为 Bay 41 2272, $IC_{50} 304 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 做了深入研

究, 文献中未说明理由, 或许是环丙基具有代谢稳定性。通过机制研究表明 **45** 在低水平的一氧化氮下可提高可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC) 的敏感性, 而且当 sGC 上的卟啉被氧化或除去后, 就失去了刺激产生环鸟苷酸的生成作用。用多种肺动脉高压的动物模型评价了 **45**, 表明有显著降低肺动脉血压, 逆转右心室肥大和肺血管的重塑作用。然而, 由于 **45** 显示有抑制并诱导细胞色素 P450 的作用, 未能进入开发阶段 (Straub A, Stasch JP, Alonso-Alija C, et al. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 781-784)。

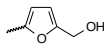
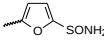
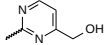
5 嘧啶环的再优化

5.1 同时评价代谢稳定性和体内活性 对新一轮合成的化合物评价体外活性的同时, 还用灌胃清醒的 SH 大鼠, 测定血压降低 10 mmHg 的最低有效剂量 (MED, $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 作为评价体内活性的指标, 并且测定对 CYP 1A2 和 CYP3A4 的作用, 深化优化过程。

5.2 对化合物 45 和 60 的深入研究 由于尚未探索嘧啶环 C6 取代的构效关系, 而且 4 位和 6 位是对称位置, 因而新一轮重点对 **45** 和 **60** 合成了 4,6-二氨基化合物, 并与单氨基的做比较, 合成的化合物列于表 5。

表 5 的数据表明环丙基取代的二氨基化合物的体内活性和对 CYP 的作用没有明显变化。而吗啉基取代的二氨基化合物 **66** 的体内活性提高了 10 倍, 而且对 CYP 未显示诱导或抑制作用。然而由于 **66** 清

Table 3 Structure and activity of the compounds with various heterocycles at C3 position

Compd.	B	Inhibition of contraction of aortic rings $IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Compd.	B	Inhibition of contraction of aortic rings $IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
19		1.7	24		9.3
25		8.0	26		0.9
27		1.2	28		1.5
29		3.2	30		0.6
31		4.8	32		1.25
33		1.3	34		0.27
35		1.8	36		8.6

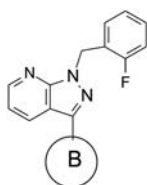
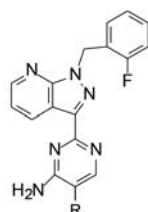
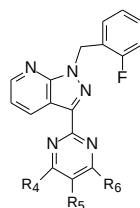


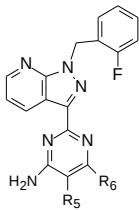
Table 4 Activity of the compounds with varied substituents at pyrimidine ring

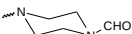
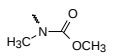
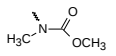
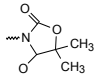
Compd.	R	Inhibition of contraction of aortic rings $IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$	Compd.	R	Inhibition of contraction of aortic rings $IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$
34	H	265	51	2-CNCH ₂ CH ₂ -	412
37	CH ₃	675	52	5-CN(CH ₂) ₅ -	588
38	C ₂ H ₅	272	53	6-CN(CH ₂) ₇ -	1 294
39	<i>n</i> -Pr	252	54	Methoxy	343
40	<i>i</i> -Pr	207	55	Methylthio	243
41	<i>n</i> -Bu	218	56	Methylsulfonyl	261
42	<i>t</i> -Bu	709	57	Propylsulfonyl	378
43	<i>n</i> -Pentyl	200	58	<i>i</i> -Propylsulfonyl	517
44	<i>n</i> -Hexyl	1 041	59	(EtO) ₂ P(=O)-	414
45	cyc-Pr	304	60	<i>N</i> -Morpholinyl	306
46	cyc-Bu	633	61	F	478
47	cyc-Pentyl	904	62	CH ₂ CF ₃	508
48	1-Cyclopentenyl	836	63	<i>N</i> -Thiomorpholinyl	650
49	Cyclohexyl	561	64	CH ₂ NH ₂	1 400
50	CN	391			

Table 5 Activity and metabolic stability of the compounds with varied substituents at pyrimidine ring. a. MEC: Minimal effective concentration to achieve threefold stimulation of cGMP formation in a recombinant sGC-overexpressing cell line. b. Relaxing effect on pre-contracted rabbit aortic rings. c. MED: Minimal effective dose to induce a mean arterial blood pressure decrease of 10 mm Hg following oral administration to conscious, radiotelemetrically instrumented, spontaneously hypertensive (SH) rats (nd = not determined). d. CYP1A2 inhibition following incubation of phenacetin in the presence of the test compound with human liver microsomes; LC-MS-MS analysis. e. CYP3A4 inhibition following incubation of midazolam in the presence of the test compound with human liver microsomes; pre-incubation was conducted for 30 min; LC-MS-MS analysis of formed metabolites



Compd.	R ₄	R ₅	R ₆	cGMP ^a MEC/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	Aortic rings ^b $IC_{50}/\mu mol \cdot L^{-1}$	Rat ^c MED/mg $\cdot kg^{-1}$	CYP1A2 ^d $IC_{50}/\mu mol \cdot L^{-1}$	CYP3A4 ^e $IC_{50}/\mu mol \cdot L^{-1}$
45	NH ₂		H	0.03	0.30	1	1.6	>20/4.3
65	NH ₂		NH ₂	0.1	0.23	nd	1.4	14.9/2.4
60	NH ₂		H	0.03	0.26	3	>20	>20/>20
66	NH ₂		NH ₂	0.03	0.10	0.3	>20	>20
67	NH ₂	C ₂ H ₅	NH ₂	0.03	0.11	nd	2.4	20/14.8
68	NH ₂		NH ₂	0.01	0.79	nd	0.61	>20/>20
69	H		H	0.5	0.93	>3	>20	>20/>20
70	H		CH ₃	0.08	0.67	nd	>20	>20/>20

Table 6 Activity of the compounds with polar groups at the pyrimidine ring


Compd.	R ₅	R ₆	cGMP MEC / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Aortic rings IC ₅₀ / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Rat MED/mg · kg ⁻¹
71		NH ₂	0.07	0.18	>3
72	-CONH ₂	H	>10	>10	nd
73	4-Pyridyl	H	0.03	0.44	1
74	4-Pyridyl	NH ₂	0.02	0.37	0.3
75	Methylsulfonyl	H	0.05	1.3	3
76	<i>i</i> -Propylsulfonyl	NH ₂	0.10	1.4	3
77	<i>i</i> -Propylsulfonyl	NH ₂	0.03	0.77	3
78		NH ₂	0.02	0.33	3
79		H	0.20	1.0	3
80		H	0.03	0.67	nd
7		NH ₂	0.03	0.12	0.1
81		H	0.05	0.96	1
82		H	0.01	0.47	3

除率过快,且剂量与血药浓度呈非线性关系,不能进入开发研究。

5.3 C4取代基的变换 前已述及,C4的取代基变换对活性影响较小,因而可以对C4做进一步变换以改善药代动力学性质,为此同时合成二氨基和单氨基化合物,表6列出了化合物的结构与活性。

表6中化合物的C5连接的取代基都有极性基团,对CYP没有抑制或诱导作用,故未列出。这些化合物除氨基甲酰基**72**外对sGC酶都有激活作用。化合物**71**激活sGC酶的作用很强,但体内降压作用明显弱于**66**,故不可取。吡啶取代的两个化合物**73**和**74**的体内外活性都较高。含有磺酰基的化合物激活酶的活性虽高,但对家兔主动脉环和大鼠降压作用平平,或许是极性过强的缘故。开链的氨基甲酸酯化合物**7**的活性最强,对大鼠降压的最低有效剂量为0.1 mg · kg⁻¹,而其环状类似物**81**的体内降压作用弱10倍,增加了偕二甲基取代,**82**的体内活性更弱。

5.4 高活性化合物的药代动力学比较 从上述高活性的化合物中选择**66**、**73**和**7**做药代动力学性质评价。

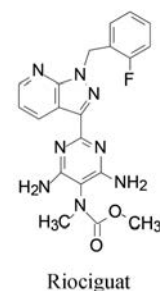
表7列出的结果表明化合物**7**的口服生物利用度显著高于**66**和**73**,血浆半衰期长,清除率和分布容积低于**66**和**73**,这些都是优良性质。

6 候选物的确定和利奥西呱的上市

化合物**7**具有优良药代动力学性质,因而深入系

Table 7 Pharmacokinetic parameters of three compounds in Beagle dogs

Compd.	Clearance /L · h ⁻¹ · kg ⁻¹	Vol. distribution /L · kg ⁻¹	t _{1/2} /h	Bioavailability /%
66	5.3	2.2	0.65	<1
73	2.0	1.9	1.4	29
7	0.25	0.73	2.4	79



统地评价了体内外活性, 在 $0.1 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, **7** 可浓度依赖性地提高 cGMP 水平, 最高可达到 73 倍。与一氧化氮释放剂合用, 显示对激活 sGC 有协同作用。灌胃清醒大鼠可长时间降低血压。对啮齿类肺动脉高压模型, 可改善血流动力学, 逆转右心室增大和减轻肺动脉的重塑作用。此外, 在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下对 69 种酶没有抑制作用, 表明较少脱靶作用。

基于以上优良的药效学 and 安全性品质, 拜耳公司

确定 **7** 为候选化合物, 定名为利奥西呱 (riociguat), 经 3 期临床研究, 表明为治疗慢性血栓栓塞性肺动脉高压和肺动脉高压的有效药物, 美国 FDA 于 2013 年批准上市 (Mittendorf J, Weigand S, Alonso-Alija C, et al. Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. ChemMedChem, 2009, 4: 853-865)。