

• 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。

氯吡格雷是用于预防和治疗因血小板聚集引起的心脑血管疾病的药物,其安全有效上市20年来经久不衰,是与阿司匹林媲美的重磅药物。该药物有诸多特点,最初属于偶然发现新型作用机制的活性化合物;研发的程式是先确定疗效,后阐明作用靶标和机制的经典模式;作为跟随性药物完胜于先驱药物噻氯匹定,并取而代之;氯吡格雷还是个生物前体型前药,在体内代谢活化后与靶标发生共价键结合,因而不是不可逆抑制剂。也因为代谢活化后的不稳定性难以人工复制,在结构类型上成为“唯一性”药物。(编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2018-0329

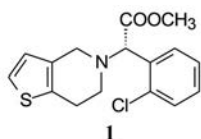
幸运发现的生物前体药物抗血栓的氯吡格雷

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 引言

氯吡格雷 (**1**, clopidogrel) 是 Sanofi 和 BMS 公司共同研制的心血管系统药物,口服用于预防和治疗因血小板聚集引起的心、脑及其他动脉循环障碍疾病,如脑卒中、心肌梗死和外周动脉疾病等。氯吡格雷由于安全有效和适应症广泛,成为全球性的重磅药物,销售额与阿托伐他汀钙比肩,广泛性与阿司匹林媲美。现专利期已过,年销售额仍破20亿美元。



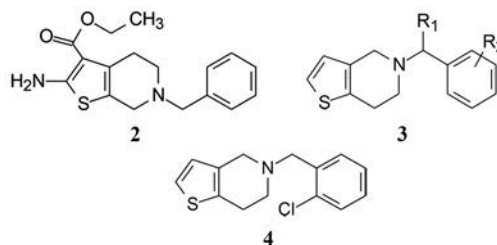
氯吡格雷在药物化学及其研制上有其特点:它是以前动物表型特征筛选和评价而成的,确定作用靶标和机制在其后,与当今多由靶标到验证疗效的研究模式不同。它不是首创药物,但显著优于首创药噻氯匹定,彰显了跟随性药物创新的成功。氯吡格雷是前药,本身没有活性,在体内经代谢活化而起效,然而,活化成分不能独立成药。活化物与靶标发生共价键结合,所以氯吡格雷是不可逆抑制剂。

2 先导化合物的发现

2.1 苗头的幸运发现

Sanofi 公司的 Eloy 等在 1972 年研究新型抗炎镇痛药,以日本 Yoshitomi 公司在 1970 年研究的里程碑化

合物 tinoridine (**2**) 为先导物 (Nakanishi M, Imamura H, Maruyama Y. Pharmacological investigations of 2-amino-3-ethoxy-carbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno [2,3-c] pyridine. Arzneimittel-Forschung, 1970, 20: 998-1003) 合成了一系列噻吩并吡啶为母核的化合物,并变换噻吩和吡啶不同的稠合位置 (**3**)。用大鼠和小鼠的多种模型评价抗炎和镇痛效果,结果没有预期的活性。然而,却意外地发现大鼠灌胃后呈现抗血小板聚集和抗血栓形成的活性,这个偶然发现是幸运的,其价值远远超过了无抗炎活性的失落,成为失之东隅收之桑榆之例 (Maffrand JP, Eloy F. Synthèse de thiénoypyridines et de furopyridines d'intérêt thérapeutique, Eur J Med Chem, 1974, 9: 483-486)。



2.2 噻氯匹定的发现

在用动物评价合成的噻吩并吡啶化合物抗炎活性中,受试物显示出强效的抗血小板聚集活性。这在 20 世纪 70 年代是个突破性的发现,因为那时临床忽视血小板聚集、血栓形成和心血管疾病的关联,只认为血

管痉挛是动脉硬化并发症的主因。因而这个发现启发人们探索抗血栓药物治疗因心脏手术或体外透析造成血栓症候。通过合成与评价众多噻吩并吡啶的目标化合物,找到了活性最强的化合物,定名为噻氯匹定(4, ticlopidine),通过临床试验,表明4对高风险血栓病的患者以及曾有脑出血或卒中或缺血性心脏病患者均有治疗或预防效果,噻氯匹定于1978年在法国上市,美国于1991年批准上市,应用遍及全球。

噻氯匹定作为首创性药物,因在临床前未做活性、安全性和结构的深入优化,临床应用中(尤其是初用的3个月)出现多种血液学的不良反应:白细胞和血小板减少症、粒细胞缺乏症和全血细胞减少症等,因而限制了临床应用。其实在开发噻氯匹定的同时,为了优化活性/毒性比,以期转化为对患者的有较高的疗效/风险比,公司进行了候选物备份(backup molecule)研究。

3 结构优化

偶然发现的噻氯匹定被批准上市,但其化学结构和活性优化的不充分,因而产生了上述的不良反应(也可能是由实验动物向患者的转化中出现的)。

3.1 活性评价

评价化合物抑制血小板聚集的活性是用大鼠半体内(*ex vivo*)模型,5只大鼠于取血前的2、24、48 h时间点三次灌胃一定剂量受试物,同时用5只大鼠作空白对照。血样加枸橼酸盐后,用两种方法测定化合物影响血小板聚集程度。

3.1.1 受试物对腺苷二磷酸(ADP)诱导血小板聚集的抑制实验 将血样二等分,一份加入EDTA-甲醛溶液以固定形成的聚集体,测定血小板计数;另一份只加EDTA溶液,使聚集的血小板解聚,并计数。按以下公式计算受试物抑制血小板聚集的活性:

未聚集血小板% = EDTA-甲醛处理样品的血小板计数 / EDTA处理样品的血小板计数。数值越大(接近100%)表明受试物的抑制活性越强。

3.1.2 受试物对胶原诱导血小板聚集的抑制实验 血样中加入胶原后,连续计数血小板,随时间的延长血小板数减少,将血小板计数与时间作图,计算初始的聚集速率。速率越小表明受试物的活性越强。

评价化合物安全性的方法是测定出血时间。5只大鼠在取血前65、41、17 h时间点三次灌胃受试物10 mg·kg⁻¹,之后在麻醉状态下,切断鼠尾(距根部5 mm处),每隔15 s用海绵吸去鼠血,不得触及伤面。当1 min内不流血,表示达到止血。测定5只大鼠平均流血时间(s)。同时5只大鼠作空白对照。流血时间超过1 200 s后不再计时。

评价化合物的抗血栓形成的活性,是将大鼠的左

颈静脉和右颈动脉手术形成动静脉短路,短路由一个中央导管两个侧枝导管所构成,将丝线导入中央导管,血液循环20 min后,停止循环,慢慢抽出丝线,立即称重,与导入前的丝线重量差值为形成的血栓重量。与对照组比较,差值越小表示化合物抗血栓作用越强。

合成的目标物都是经上述模型评价的,可谓工作量很大。

3.2 以噻氯匹定为先导物的结构优化

在以噻氯匹定为先导物的结构变换中,研发者合成了上千个类似物,可谓精雕细刻地在抗血小板聚集、抗血栓形成和避免出血等层面上,用实验动物加以评价。由于未发现详细披露优化过程的路径和细节,本文仅从公布的专利中列出的有代表性化合物及其生物活性,讨论优化操作的结果(Aubert D, Touch PD, Ferrand C, et al. Thieno[3,2-c]pyridine derivatives and their therapeutic applications: US 4529596, 1985)。表1列出了代表性化合物的结构及其抗血小板聚集活性,高活性化合物实施多剂量评价。



表1中15个代表性化合物与噻氯匹定的骨架相同,只是在N-苄基的 α 位有羧基(酯或酰胺)的取代,提示了抗血小板聚集活性(两种模型)与结构的关系已基本确定,只是再精确地考察羧酸酯或酰胺和苯环的2'位取代基的不同搭配对活性和安全性的影响。化合物1和11的活性明显强于其余化合物,因而进一步降低剂量考察量效关系,其中1的活性尤强。

进而用大鼠灌胃评价了上述较高活性的化合物的抗血栓活性和引起出血的作用,结果列于表2,化合物1在低剂量下仍然呈现强效抗血栓形成作用,但不引起出血的不良反应。虽然化合物1对大鼠显示良好抗血小板聚集和抗血栓作用,研发者仍然选取了8个高活性化合物对健康受试者进行了I期临床研究,以消除由动物转换到人群的变动可能引发的误导或疏漏。结果表明化合物1的活性和耐受性都超过已上市的噻氯匹定。II期临床试验对患者也呈现强效的抗血小板聚集活性。

3.3 化合物1的优映体氯吡格雷

化合物1的消旋体代号为PRC4099,虽然作为备用的候选药物,其抗血小板聚集作用超过噻氯匹定,但仍担心有血象的不良反应。为此,将1拆分成光学异构体,分别考察两个对映体的活性-不良反应之比的差异,结果表明,只有S构型具有抗血小板聚集和抗血栓形成的活性,而R异构体没有活性,因而停止了PRC4099临床研究,1987年重新开始对1的S-异构体进行临床前和临床研究,定名为氯吡格雷(clopidogrel)。历经11年的I/II/III期临床研究,于1998年被批

Table 1 The blood platelet aggregation inhibiting action of representative compounds. ADP: Adenosine diphosphate

No.	R	X	ADP test		Collagen test	
			Dosage /mg·kg ⁻¹	Result	Dosage /mg·kg ⁻¹	Result
1	OCH ₃	2-Cl	3×25	94 ± 3	3×25	0.14 ± 0.03
			reference	16 ± 4		3.12 ± 0.47
1	OCH ₃	2-Cl	3×5	82 ± 11	3×5	0.19 ± 0.04
			reference	20 ± 11		2.17 ± 0.64
1	OCH ₃	2-Cl	3×2.5	56 ± 17	3×2.5	0.60 ± 0.20
			reference	23 ± 15		5.00 ± 1.02
5	OCH ₃	H	3×100	72 ± 4	3×100	0.51 ± 0.18
			reference	4 ± 0		5.00 ± 1.06
6	OC ₂ H ₅	2-CH ₃	3×100	89 ± 4	3×100	0.12 ± 0.02
			reference	4 ± 1		4.73 ± 0.55
7	H	H	3×100	22 ± 4		
			reference	18 ± 1		
8	<i>n</i> -OPr	2-Cl			3×100	0.66 ± 0.18
			reference			2.00 ± 0.35
9	<i>n</i> -OBu	2-Cl			3×100	0.86 ± 0.18
			reference			2.25 ± 0.32
10	<i>i</i> -OPr	2-Cl	3×60	65 ± 7	3×100	0.11 ± 0.01
			reference	11 ± 0		3.41 ± 0.55
11	OC ₂ H ₅	2-Cl	3×25	66 ± 2	3×25	0.16 ± 0.07
			reference	8 ± 0		3.92 ± 0.63
11	OC ₂ H ₅	2-Cl	3×12.5	49 ± 11	3×12.5	0.54 ± 0.12
			reference	8 ± 1		2.00 ± 0.35
11	OC ₂ H ₅	2-Cl	3×10	24 ± 5		
			reference	8 ± 1		
12	N(CH ₃) ₂	2-Cl	3×100	11 ± 3	3×100	0.83 ± 0.02
			reference			2 ± 0
13		2-Cl	3×100	27 ± 5		
			reference			4 ± 0
14		2-Cl			3×100	1.89 ± 0.13
			reference			2.77 ± 0.32
15	NHCH ₃	2-Cl			3×100	10.82 ± 0.81
			reference			11.35 ± 1.01
16	N(CH ₃) ₂	H	3×100	4 ± 1		
			reference	18 ± 1		
17	N(CH ₃) ₂	2-CH ₃			3×100	3.04 ± 0.22
			reference			11.35 ± 1.01

准上市。

3.4 氯吡格雷的作用机制

氯吡格雷的临床效果显著优于噻氯匹定,但其对ADP诱导血小板聚集的强效抑制作用机制尚不清楚。直到后来才揭示出氯吡格雷(以及噻氯匹定)的作用靶标是结合于血小板膜上的ADP受体P2Y₁₂,而且属于前药(确切称为生物前体型前药)(Savi P, Herbert JM, Pflieger AM, et al. Importance of hepatic metabolism in the antiaggregating activity of the thienopyridine clopidogrel. *Biochem Pharmacol*, 1992, 44: 527-532)。

氯吡格雷活化机制是经肝细胞CYP2C19等氧化酶催化氧化,发生噻吩S-氧化物或双键加氧成环氧化物(芳环系统破坏),经电荷转移形成不饱和和硫内酯,后者水解开环生成活性代谢产物巯基顺式丁烯酸,进而与血小板P2Y₁₂受体发生共价键结合,不可逆地抑制血小板的活化,从而阻断了可溶性纤维蛋白的交叉连接和血栓的形成。

研究还表明活性代谢物含有3个不对称因素:连接羧基的碳为S构型,连接巯基的碳原子为R构型,以及吡啶环相连的双键为Z构型,这些构型在空间的配置保障了活性产物与P2Y₁₂受体的特异性结合(Pereillo JM, Maftouh M, Adriou A, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30: 1288-1295)。图1是氯吡格雷在人体内代谢活化的主要历程。

3.5 氯吡格雷的药代动力学性质

氯吡格雷口服吸收,生物利用度50%以上,在血浆中与蛋白结合率为95%~98%,原型药的半衰期 $t_{1/2}$ 为7~8 h,而活性代谢物的消除半衰期 $t_{1/2}$ 为0.5~1 h,是个亲电性不强但特异性高的活化产物,化学稳定性低,也因此氯吡格雷不能按代谢研究的结果改造结构成稳定的药物,是个不可多得的生物前体型前药(类似于奥美拉唑)。服用氯吡格雷后2 h后即起效,由于

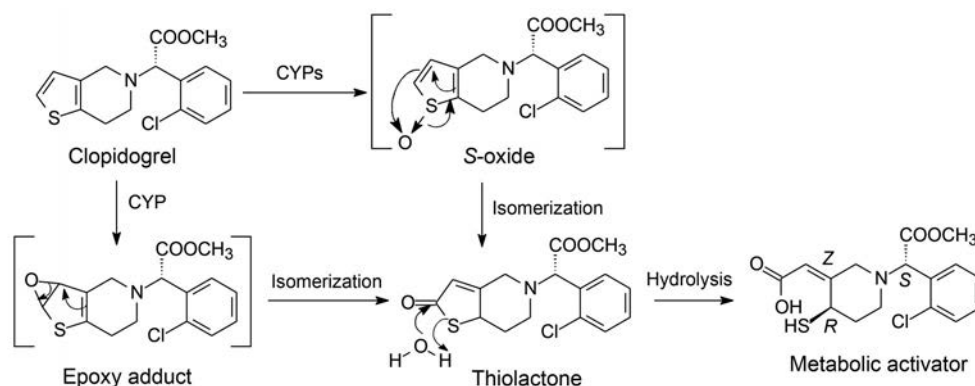
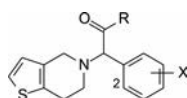


Figure 1 Main process of clopidogrel metabolic activation in humans

Table 2 The anti-thrombotic activity and bleeding time of representative compounds

Compd.	R	X	Antithrombotic activity			Bleeding time	
			Dosage/mg·kg ⁻¹	Wt thrombosis/mg	Variation/%	Dosage/mg·kg ⁻¹	Result/s
1	OCH ₃	2-Cl	3×25	6.65 ± 0.51	-85	3×25	1 200
	reference		-	36.24 ± 2.05	-	-	420
1	OCH ₃	2-Cl	3×12.5	15.89 ± 1.81	-56	3×12.5	1 200
	reference		-	36.24 ± 2.05	-	-	420-
1	OCH ₃	2-Cl	3×5	27.7 ± 2.82	32	3×5	1 080
	reference		-	36.24 ± 2.05	-	-	435
5	OCH ₃	H	3×200	8.42 ± 3.28	-79	3×200	1 200
	reference		-	40.68 ± 1.74	-	-	420
6	OC ₂ H ₅	2-Cl	3×200	5.89 ± 0.99	-86	3×200	1 200
	reference		-	40.68 ± 1.74	-	-	420
9	<i>n</i> -OBu	2-Cl	3×200	29.99 ± 3.05	-22	-	-
	reference		-	38.56 ± 2.42	-	-	-
12	N(CH ₃) ₂	2-Cl	3×200	21.39 ± 2.92	-40	-	-
	reference		-	35.76 ± 1.76	-	-	-
13		2-Cl	-	-	-	3×200	1 200
	reference		-	-	-	-	600
15	NHCH ₃	2-Cl	-	-	-	3×200	1 200
	reference		-	-	-	-	600

是不可逆抑制剂,持续作用时间为5天,作为一个前药,氯吡格雷的药效学和药动学的良好配置成就了一个安全有效的心血管系统的重磅药物。

4 总结

追溯氯吡格雷的研发历程,最初旨在研制抗炎镇痛药物,动物实验中幸运地发现有抑制血小板聚集的作用,抓住这个机遇改换了研究目标,经结构改造和优化合成了上千个目标物,用动物半体内实验系统地评价了活性和安全性,投入量巨大。首创的噻氯匹定虽

然在欧美国家相继上市,但研发者未止于此,继续研发备份候选物,最终发现了氯吡格雷,作为跟随性药物,完全超越了先驱药噻氯匹定,青出于蓝(原结构中加一羧甲基基团)而胜于蓝(消除了血象的不良反应)。在研发程式上,氯吡格雷先确定了疗效,后阐明作用机制,与当今以靶标为核心的先体外后体内和概念验证的程式不同。成功之路并非单一。项目从1974年开始算起,到1998年氯吡格雷上市,历时24年,终于研发出经久不衰的、可与阿司匹林媲美的重磅药物。