

• 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。

奥贝胆酸治疗原发性胆汁性胆管炎虽然不是第一个上市的药物,但从作用机制和分子设计的意义上它具有首创性,在天然激动剂鹅去氧胆酸的结构基础上,为了提高激动作用和代谢稳定性,在理性设计合成不多的目标物中,优化出活性和稳定性优胜的激动剂。最近揭示对非酒精性脂肪性肝炎的临床疗效,预示奥贝胆酸有更广泛的应用前景。
(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0309

新作用机制治疗原发性胆汁性胆管炎药物奥贝胆酸

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 研发背景

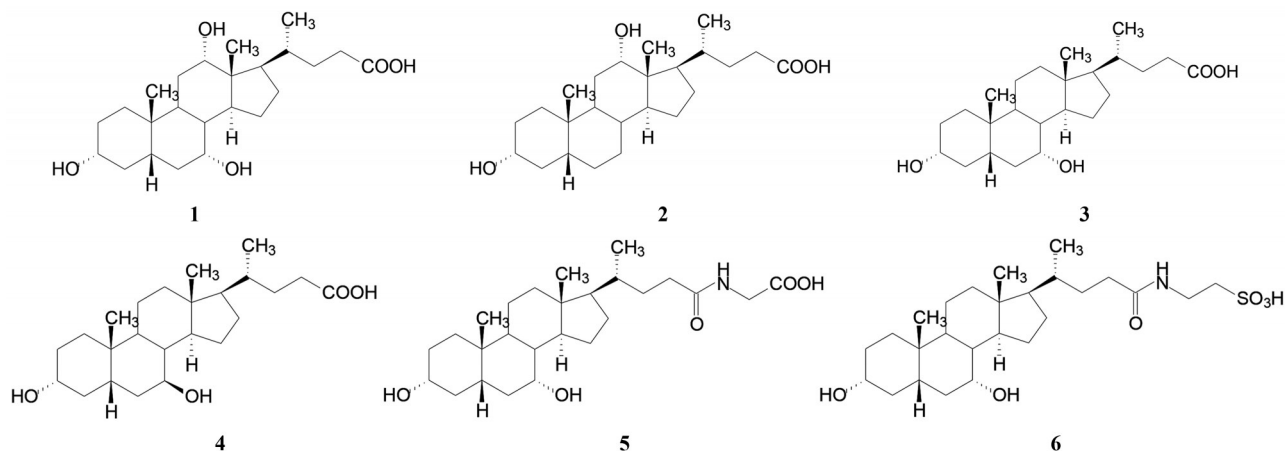
1.1 胆汁酸 胆汁酸 (bile acid) 是胆汁的重要成分,主要功能是促进脂质吸收和消化,也帮助脂溶性维生素吸收,在脂肪代谢中起重要作用。胆汁酸主要在肝肠循环系统中起作用,只有很少量进入外周循环。

胆汁酸是混合物,包括胆酸 (**1**, cholic acid, CA)、脱氧胆酸 (**2**, deoxycholic acid, DCA)、鹅脱氧胆酸 (**3**, chenodeoxycholic acid, CDCA) 和熊脱氧胆酸 (**4**, ursodeoxycholic acid, UDCA) 等,人体的胆汁酸主要含有 CA 和 CDCA。还可以在 C17 的侧链羧基上缀合牛磺酸或甘氨酸,形成轭合物 (conjugates), 例如鹅去氧胆酰甘氨酸 (**5**) 和鹅去氧胆酰牛磺酸 (**6**) 等也是胆汁酸中的成分,轭合物的 pK_a 变小,在肠道中完全呈离解状态。组成胆汁酸的分子由于含有疏水片段和羧基,

是内源性表面活性物质,在体内可促进脂肪乳化形成胶束,乳糜化而利于吸收。

胆汁酸到达回肠部位被重吸收,经肝脏分泌到胆汁排到肠中,完成一次肝肠循环。肠中细菌可代谢鹅脱氧胆酸成 7-去氧化合物—石胆酸,是胆结石的重要组成部分。1999 年发现胆酸类是核受体法呢醇 X 受体的天然配体,揭示了胆酸类新的生理功能和药用前景 (Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*, 1999, 284: 1365-1368)。

1.2 法呢醇 X 受体 法呢醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 属于细胞内转录因子超家族的一员,该家族受体是由小分子配体激活,参与许多生理和毒理过程。FXR 主要高表达于肝脏和小肠,它的天然配体



是鹅脱氧胆酸等胆汁酸成分。FXR 作为核受体被激活后, 移位到细胞核内, 与维甲 X 受体 (RXR) 结合成异二聚体, 然后结合于 DNA 的激素反应元件 (LBD) 上, 调节某些基因表达 (高或低调)。

体内胆汁酸是由胆固醇合成的, 催化该反应的酶系之一是胆固醇- α -羟化酶 (CYP7A1), 是合成链中的限速酶。激活 FXR 后的主要功能是抑制 CYP7A1, 但并不是直接抑制, 而是诱导生成小异二聚体伴侣蛋白 (SHP), 由 SHP 抑制 CYP7A1 的基因转录。所以当细胞内已有高水平的胆汁酸时, 通过负反馈机制抑制胆汁酸的合成。

FXR 还调控上皮细胞转运蛋白的表达和活性, 参与调控小肠内液体的动态平衡, 例如调控囊性纤维化跨膜转导调节因子 (1 480 氨基酸组成, 简称 CFTR), 后者是细胞内氯离子的转运蛋白, 调节细胞的渗透压 (Mroz MS, Keating N, Ward JB, et al. Farnesoid X receptor agonists attenuate colonic epithelial secretory function and prevent experimental diarrhoea *in vivo*. Gut, 2014, 63: 808-817)。

2 鹅去氧胆酸及其类似物

2.1 鹅去氧胆酸 在 FXR 的天然配体中, 活性最强的是鹅去氧胆酸 (CDCA)。由于 CDCA 负反馈作用抑制胆固醇和胆酸的生物合成, 使得胆汁中的胆固醇和胆汁酸减少而去饱和化, 具有逐渐溶解胆囊中的结石作用, 所以 CDCA 临床用于治疗胆结石和脑胆固醇病。胆酸还有引起腹泻的不良反应, 被用来治疗便秘。

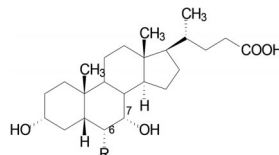
CDCA 在肝脏与牛磺酸结合生成 **6**, 进入门静脉经肝肠循环回到回肠处, 在肠中被细菌代谢还原成 7-去氧化合物 (石胆酸) 而失活。为了提高 CDCA 的代谢稳定性, 抑制代谢去氧作用, 是本品研发的目的所在。为了抑制 CDCA 的 7 α 羟基的还原, 化学上可在 7 位附近引入基团以增加位阻效应, 降低被肠菌酶促还原去氧的能力。当然, 新化合物仍须保持与 FXR 的结合力, 以优化出更强和更稳定的激动剂。

2.2 活性评价 用荧光能量共振转移 (FRET) 方法经无细胞配体传感分析 (cell-free ligand-sensing assay) 评价化合物的活性, 原理是 FXR 的配体诱导 SRC1 蛋白 (作为共激活因子) 与 FXR 结合, 这是调控基因信号转导过程的第一步。由于配体活性的强弱决定了募集到 FRX 处的 SRC¹⁶⁷⁶⁻⁷⁰⁰ 肽的多少, 所以用荧光能量共振转移方法测定被招募的 SRC1⁶⁷⁶⁻⁷⁰⁰ 含量, 作为评价配体激动剂的活性, 用 EC₅₀ 表示。

2.3 分子设计和构效关系 CDCA 的 7 位羟基处于 α 位, 因而在 6 位引入 α -基团 (与 7-羟基同侧) 可发挥位阻效应, 阻止 7 α -羟基的去氧化。表 1 列出代表性化合

物都是 α -烷基或芳烷基。由于 19 β -甲基的存在, 合成制备中引入的烷基都是 α 构型。

Table 1 Binding potency of CDCA analogs to FXR. *Relative recruitment of the SRC1 peptide to FXR where CDCA (**3**) = 100%



Compd.	R	EC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	Efficacy*
3	H (CDCA)	8.66	100
7	CH ₃	0.75	148
8	CH ₂ CH ₃	0.099	144
9	CH ₂ CH ₂ CH ₃	1.11	156
10	CH ₂ Ph	>30	5

构效关系表明, 6 α -甲基化合物 (**7**) 体外活性 EC₅₀ 强于 CDCA 大约 10 倍, 6 α -乙基 (**8**) 增强 80 多倍, 6 α -正丙基 (**9**) 的活性也提高数倍, 然而 6 α -苄基 (**10**) 失去活性, 提示 6 α 位小尺寸烷基有利于激活 FXR, 而过大的苄基不利于结合。就化合物激动 FXR 的功能而言, 以 CDCA 的相对效力为 100, 化合物 **7**~**9** 的激动效力 (efficacy) 大约提高了 50%, 说明 6 α 位小烷基的引入弥补了天然配体 CDCA 激动剂效力的不足。

用 HuH7 细胞表达的人全长 FXR 受体来测定这些化合物对报告基因 (hsp70EcRE) 2-tk-LUC 的影响, 表明化合物 **8** (6 α -EtCDCA) 是活性最强的完全激动剂, EC₅₀ 为 85 nmol·L⁻¹。而且 **8** 的选择性很强, 在 1 μmol·L⁻¹ 浓度下可激活标准板的 LBD-GAL4 嵌合受体, 而对其他核受体没有活性。

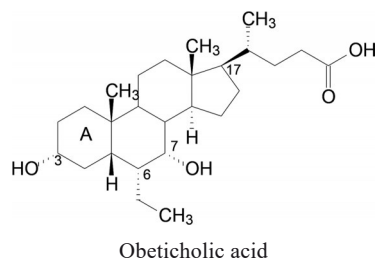
3 候选化合物的确定和奥贝胆酸上市

用大鼠颈静脉插管灌注石胆酸 (鹅脱氧胆酸的代谢产物—7-deoxy-CDCA) 造成大鼠胆汁郁积, 评价受试化合物对胆汁郁积的抑制作用。结果表明, 灌注 3 μmol·kg⁻¹·min⁻¹ 化合物 **8** 可逆转由于石胆酸造成的胆汁断流, 并且保护肝细胞免于损伤, 而 CDCA (**3**) 灌注 7 μmol·kg⁻¹·min⁻¹ 也达不到阻断胆汁郁积和保护肝细胞的作用, 提示 6 α -EtCDCA (**8**) 对 FXR 受体的激动活性显著强于天然的 CDCA。

鉴于化合物 **8** 的体内外活性和选择性显著强于 CDCA 和其他类似物, Intercept 制药公司确定其为候选化合物, 进入开发阶段, 定名为奥贝胆酸 (obeticholic acid), 经临床前和临床研究表明, 对鹅脱氧胆酸反应不足的原发性胆汁性胆管炎显示治疗价值, 于 2016 年在美国和欧盟上市。

4 奥贝胆酸与 FXR 的结合模式

FXR 受体的三维结构尚未解析, 同源模建其结构



是基于同为核受体的 RAR γ 的配体结合域 (LBD) 的晶体结构, 构建了 FXR 的三维结构。与化合物 **8** 做分子对接, 优化后的结合模式表明, A 环接近螺旋 H12, 3 α -羟基进入到由 Trp469、His 447 和 Phe461 构成的腔内, 从而稳定了 **8** 在 FXR 的 LBD 处的空间取向。6 α -乙基进入由 Phe284、Thr288、Leu451 和 Phe461 构成的结合腔。根据 LBD 和奥贝胆酸的分子表面积计算的分子体积分别是 687 \AA^3 和 384 \AA^3 , 表明在 6 位的结合域处有个小疏水腔可容纳尺寸小的烷基, 按照前述的构效关系, 该疏水腔最适于乙基结合。图 1 是奥贝胆酸与 FXR 的配体结合域的分子对接图, 可以看到 3 α -羟基和 7 α -羟基形成的氢键以及 17 位侧链的羧基形成的静电引力, 对维持分子的稳定结合起重要作用, 6 α -乙基

与 H3 附近的疏水腔结合 (Costantino G, Macchiarulo A, Entrena-Guadix A, et al. Binding mode of 6ECDCA, a potent bile acid agonist of the farnesoid X receptor (FXR). *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 1865-1868)。

5 后记

奥贝胆酸可认为是继 CDCA 和 UCDA 的第三个治疗原发性胆汁性胆管炎药物。UCDA 即熊脱氧胆酸 (**4**), 是 1997 年批准上市的。在化学结构上 UDCA 与 CDCA 是互为差向异构物, 区别只在于 UDCA 是 7 β 羟基, 但二者的作用机制完全不同。UDCA 不是 FXR 激动剂, 它的药理作用是促进内源性胆汁酸分泌, 减少重吸收, 拮抗疏水性胆汁酸的细胞毒作用; 而 CDCA 及奥贝胆酸是 FXR 激动剂。所以结构类型相似的奥贝胆酸研发根据与路径与熊脱氧胆酸迥别, 而且治疗剂量相差百倍 (剂量分别为 0.07~0.14 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 13~15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。

近期的临床研究表明, 奥贝胆酸显示出对非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的有效性。NASH 为伴随有炎症和肝细胞损伤的脂肪变性, 导致晚期肝脏纤维化、肝硬化和衰竭, 患者只有肝移植挽救生命, 奥贝胆酸对 NASH 的有益效果, 预示将有重大的医疗价值。

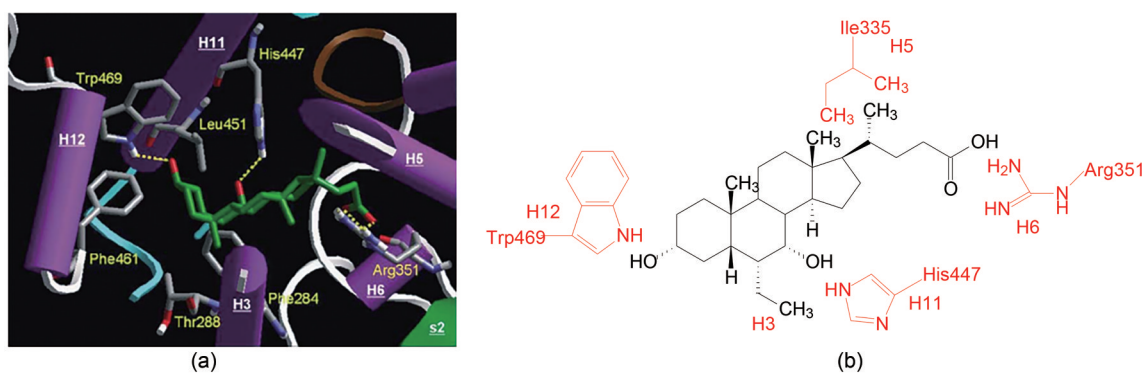


Figure 1 a: Docking diagram of **8** to LBD of FXR. b: The binding diagram of compound **8**