

## • 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。

自2014年开辟本栏目以来,刊登的范例都是已批准上市的药物。本品瑞德西韦是个例外,处于III期临床研究的候选物。这是一个在特殊时期的应急项目,一种新型冠状病毒感染蔓延成全国性疫情,在无药可医的情况下,基于体外对多种冠状病毒有效,临床应用证明是安全的,又有美国治愈一位患者的孤例启示,本品成为由同情用药发展为正规的III期临床的新药研究。刊登本文也是对新药研究特定路径的探索与关注。我们对瑞德西韦的疗效抱以期待。

(编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2020-0103

# 由同情用药发展为 III 期临床研究的瑞德西韦

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 引言

2019年末在武汉爆发了新型冠状病毒(2019-nCoV)引起的传染病,波及到全国,并被世界卫生组织(WHO)定性为“国际关注的突发公共卫生事件”。这种强传染力的新型冠状病毒定名为2019-nCoV,感染的疾病为新冠肺炎(NCP),患者无针对性药物可用。

美国为治疗首例2019-nCoV感染的患者,遵循同情给药(compassionate use)原则,试用了处于研究阶段、治疗埃博拉病毒病的药物瑞德西韦(remdesivir),静脉输注瑞德西韦,次日症状明显减轻,不再吸氧,氧饱和度94%~96%,除干咳外其他症状消除,最后治愈出院。2020年1月31日NEJM在线发表论文介绍了瑞德西韦在治疗新型冠状病毒病例的临床表现(Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *New Eng J Med*, 2020, <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2001191>)。虽然孤例待证,但有重要参考价值。

武汉病毒学研究所鉴于瑞德西韦对包括SARS/MERS病毒在内的一系列冠状病毒有抑制作用,进行了瑞德西韦对2019-nCoV的体外抑制实验,结果表明瑞德西韦作用于病毒进入细胞的后期阶段,与核苷类药物的作用机制一致。对感染该病毒的Vero E6细胞抑制活性 $EC_{50} = 0.77 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;细胞毒作用 $CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;选择性指数 $SI > 129.87$ 。对感染细胞的 $EC_{90} = 1.76 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Wang ML, Cao RY, Zhang LK,

et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro*. *Cell Res*, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>).

经中国药监部门批准,吉利德公司启动了瑞德西韦治疗NCP患者的III期临床研究。本文对瑞德西韦的研发路径加以简要的介绍。

## 2 研发背景

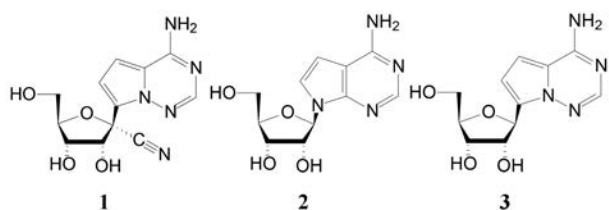
2012年在西非爆发了埃博拉病毒性疾病(EVS),历时4年死亡人数逾11 000名,其中500人是医护人员,是一种人传人的高死亡率的流行病,并确证该病原体属于纤丝病毒家族的一种,为负链非节段性单链RNA病毒。吉利德科学公司基于长期研制核苷(酸)类抗病毒药物的实践,2010年着手研究,靶标是埃博拉病毒的RNA依赖的RNA聚合酶。

## 3 活性化合物的发现

吉利德选择了1 000个核苷(酸)或其前药,在P4实验室筛选对埃博拉病毒感染的人微血管内皮细胞(EBOV-HMVEC)的生长作了系统的筛选,发现化合物**1**呈现抑制活性, $EC_{50} = 0.78 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,**1**的结构具有两个特征:母核为鸟嘌呤的类似物,戊糖与母核的C9经C-C键相连。

**3.1 1'-取代的C-C核苷的由来** 研究者考虑到,既往的核苷较少涉及戊糖的1'-取代,是因为化学稳定性差的缘故。例如1'-甲基鸟苷在 $\text{pH} < 7$ 溶液中迅速水解

N-C 苷键, 游离出鸟嘌呤。而 C-C 相连的 1'-取代的核苷则化学性能稳定。另一方面, 天然产物杀结核菌素 (**2**, tubercidin) 为 7-去氮鸟苷, 具有细胞毒活性, 是因为三磷酸化后成为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的底物, 可参入到 RNA 链中。4-氮杂-7,9-去氮鸟苷 (**3**) 与 **2** 的抑制肿瘤细胞活性相同, 提示 C-C 核苷可作为核苷的代谢物。



基于此设计合成了化合物 **3** 的 1'-位的甲基、乙炔基、乙炔基和氰基化合物, 发现化合物 **1** 对丙肝、流感 A、副流感、SARS 和柯萨奇病毒显示一定的活性。所以, 在普筛埃博拉病毒中发现 **1** 的活性不是偶然的 (Cho A, Saunders OL, Butler T, et al. Synthesis and antiviral activity of a series of 10-substituted 4-aza-7,9-dideazaadenosine C-nucleosides. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22: 2705-2707)。

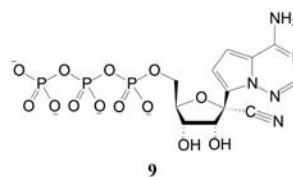
**3.2 1 的周边化合物的活性和毒性** 以化合物 **1** 为先导物, 考察变换 1'和 2'取代以及碱基环的变换对感染埃博拉病毒 (EBOV)、呼吸道多核体病毒 (RSV) 和丙肝病毒 (HCV) 细胞的半数抑制浓度  $EC_{50}$ , 同时也评价受试物对正常细胞的半数抑制浓度  $CC_{50}$  (细胞毒作用), 作为初步安全性指标, 代表性的化合物的结构与活性列于表 1。

表 1 的结果提示, 1'-氰基化合物 **1** 对 3 种病毒都呈现活性, 尤其是埃博拉和呼吸道多核体病毒 (RSV) 活性较高, 而对正常细胞的作用很弱, 提示较低细胞毒作用。换成甲基 (**4**) 或乙炔基 (**5**) 的活性几乎丧失,

1'-CN-2'-F 化合物 **7** 以及母核换为鸟嘌呤环都失去活性, 提示化合物 **1** 的活性和选择性都呈优化状态, 构效关系严格。

为了验证 **1** 的选择性是抑制埃博拉等病毒聚合酶所致, 合成了 **1** 的活化成分三磷酸核苷 (**9**), 测定对病毒和人体 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 的活性, 结果列于表 2。

**Table 2** Inhibition of RSV polymerase, HCV polymerase, and human polymerases by triphosphate compound **9**. <sup>a</sup>SNI: Single nucleotide incorporation; <sup>b</sup>POLRMT: Host mitochondrial polymerase



Enzyme	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SNI rate/% <sup>a</sup>
RSV RdRp	1.1	
HCV RdRp	5	
POLRMT <sup>b</sup>	>200	
RNA pol II	>200	6
DNA pol $\alpha$	>200	
DNA pol $\beta$	>200	
DNA poly	>200	0

表 2 提示, 三磷酸物 **9** 对 RSV 和 HCV 病毒的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶呈现抑制活性, 与表 1 所列对病毒抑制是一致的。由于未能表达提取出埃博拉的聚合酶, 通过对细胞连续动态测定, 估计出对埃博拉聚合酶的  $IC_{50}$  为  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。 **9** 对人体线粒体聚合酶和 RNA/DNA 多种聚合酶未显示抑制作用 ( $IC_{50} > 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 向 RNA 单链中的参入很低, 说明 **1** 和 **9** 对病毒的选择性抑制作用高。

**3.3 化合物的前药修饰** 核苷类药物参入 RNA 链中抑制病毒的复制, 需要经相继发生的三磷酸化而活化,

**Table 1** Structures and activity/toxicity of typical nucleosides. a: HMVEC cell line; b: HEp-2 cell line; c: Huh-7 cell line



Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	EBOV $EC_{50}$ cells <sup>a</sup> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	RSV $EC_{50}$ cells <sup>b</sup> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	HCV1b $EC_{50}$ cells <sup>c</sup> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$CC_{50}$ HEp-2 cells <sup>b</sup> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$CC_{50}$ Huh-7 cells <sup>c</sup> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$CC_{50}$ MT4 cells/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>1</b>	C≡N	H	0.78	0.53	4.1	>100	>88	>57
<b>3</b>	H	H	-	-	0.003 5	0.038	0.15	<0.01
<b>4</b>	CH <sub>3</sub>	H	>10	5.5	38	93	62	4.5
<b>5</b>	C≡CH	H	-	>200	>88	>200	>88	120
<b>6</b>	C≡N	CH <sub>3</sub>	>10	>100	>44	>100	>44	>57
<b>7</b>	-	-	-	>100	>44	-	>44	32
<b>8</b>	-	-	56	>100	>44	>100	>88	>53

第一个磷酸化反应是限速步骤,对起效和作用强度影响最大,为此将一磷酸预构在核糖的5'-位,已有利于直接第二和第三个磷酸化和发挥药效。但预构的一磷酸核苷存在两个负电荷,作为药物不利于过膜和体内传输,用前药掩蔽电荷的极性,吉利德参照了自己成功的范例—治疗丙肝的药物索非布韦(**10**, sofosbuvir),这是个平台技术,用于化合物**1**及其周边化合物的前药设计,合成的代表性化合物列于表3。

化合物**11**是**1**的5'-磷酰丙氨酸酯的前药,**12**与**11**的区别是2'位有甲基取代,**13**与**12**的区别是修饰的酯基不同,表中数据可以看出**11**对埃博拉和呼吸道综合征病毒的抑制活性强于**12**和**13**,这与核苷**1**和**6**之间的活性差异相吻合。**11**对人体正常细胞的作用很弱,提示有较高的选择性。值得提及的是**12**和**13**对丙肝病毒的活性显著强于**11**,这是因为2'-甲基取代更有利于与丙肝病毒聚合酶的结合,索非布韦的戊糖片段就是2'-CH<sub>3</sub>-2'-F取代。分子模拟也显示2'-CH<sub>3</sub>取代有利于同HCV的结合,而不利于同EBOV和RSV聚合酶的结合(Siegel D, Hui HC, Doerffler E, et al. Discovery and synthesis of a phosphoramidate prodrug of a pyrrolo [2,1-f][triazin-4-amino] adenine C-nucleoside (GS-5734) for the treatment of Ebola and emerging viruses. J Med Chem, 2017, 60: 1648-1661)。

**3.4 氨基酸和酯基的优化** 下一步是考察变换连接基氨基酸和末端酯基对活性的影响,合成的代表性化合物列于表4。

分析表4化合物的构效关系,简述如下:① 由于磷酸酯的磷原子为手性中心,前药**11**是1:1的差向异构体混合物,经分离得到纯净的*S*和*R*异构体**11a**和**11b**,抑制埃博拉病毒的活性EC<sub>50</sub>均为53 nmol·L<sup>-1</sup>,都低于混合物**11**,原因不详。后来选定**11a**作为候选化

物的原因是具有广谱抗病毒活性和制备过程结晶性较好的缘故。② *L*-Ala换成*D*-Ala(**17**)活性显著降低,提示*L*构型的必要性。*L*-Ala换成其他氨基酸,例如*L*-Phe(**14**)、*L*-Val(**15**)和2-氨基异丁酸(**16**, AIB)的活性都降低,因而氨基酸片段优选为*L*-Ala。③ 末端酯基的大小和形状对活性有影响,乙基(**18**)、异丙基(**20**)、叔丁基(**21**)和3-戊基(**23**)活性降低;而环丁基(**19**)、环戊基(**22**)和新戊基(**24**)的活性与2-乙基丁基(**11**)相近。

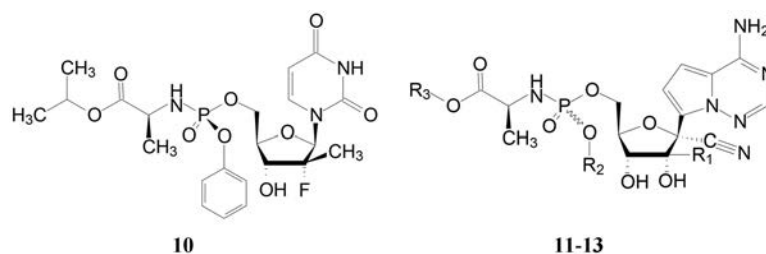
#### 4 候选物的确定

体内实验未用啮齿动物实验,是因为啮齿类血浆中羧酯酶高表达迅速被代谢的缘故。用猕猴进行药代动力学实验表明,口服的首过效应导致生物利用度降低(这与治疗丙肝药物索非布韦不同,后者口服吸收后代谢为一磷酸核苷以及后继的三磷酸化都是在肝细胞中进行的),而且埃博拉病毒患者不宜口服用药,因而**11a**的给药途径是静脉滴注。

猕猴静注**11a**后,迅速在血液中分解为原药一磷酸核苷,并且在2 h内迅速分布在外周血单核细胞中,并且形成活化形式的三磷酸核苷(**9**)达到最大值。例如注射10 mg·kg<sup>-1</sup>,**9**的浓度是体外抑制埃博拉病毒IC<sub>50</sub>的数倍,维持24 h,消除半衰期长达 $t_{1/2}=14$  h,所以每日一次足以维持有效治疗水平。

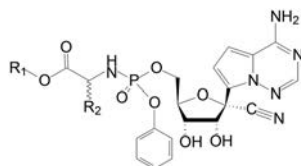
I期临床患者静脉滴注**11a**表明具有安全性和良好的药代动力学性质,剂量由150 mg加大到225 mg未见严重不良反应,对成人和婴儿患者治疗14天后血液和脑脊髓中埃博拉病毒消失。**11a**命名为瑞德西韦(remdesivir)。然而进入II期临床后,由于治疗效果不如竞争对手的候选药物,从而终止了临床试验。

瑞德西韦具有较低不良反应,体外对SARS和MERS等冠状病毒有显著抑制活性,表5列出了瑞德西韦及其原药**1**的体外活性,可以看出对这两株冠



**Table 3** Structures and activity/toxicity of typical phosphoramidate prodrugs. a: HMVEC cell line; b: HEP-2 cell line; c: Huh-7 cell line

Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	EBOV EC <sub>50</sub> cells <sup>a</sup> /μmol·L <sup>-1</sup>	RSV EC <sub>50</sub> cells <sup>b</sup> /μmol·L <sup>-1</sup>	HCV1b EC <sub>50</sub> cells <sup>c</sup> /μmol·L <sup>-1</sup>	CC <sub>50</sub> HEP-2 cells <sup>b</sup> /μmol·L <sup>-1</sup>	CC <sub>50</sub> Huh-7 cells <sup>c</sup> /μmol·L <sup>-1</sup>	CC <sub>50</sub> MT4 cells/μmol·L <sup>-1</sup>
<b>11</b>	H	Ph		3.9	1.1	6.9	>100	>44	>32
<b>12</b>	CH <sub>3</sub>	Ph		13	>50	0.37	>50	>44	1.4
<b>13</b>	CH <sub>3</sub>			40	>20	0.31	>95	>51	7.8

**Table 4** Antiviral activity, half-life, and log *D* of prodrugs with varied ester and amino acids

Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	log <i>D</i>	EBOV EC <sub>50</sub> cells/nmol·L <sup>-1</sup>	CC <sub>50</sub> MT4 cells/μmol·L <sup>-1</sup>	Human plasma <i>t</i> <sub>1/2</sub> /min
<b>11</b>	2-EtBu	<i>L</i> -Ala (mix)	2.1	121	2	191
<b>11a</b>	2-EtBu	<i>L</i> -Ala ( <i>Sp</i> )	2.1	53	1.7	69
<b>11b</b>	2-EtBu	<i>L</i> -Ala ( <i>Rp</i> )	2.0	53	3	234
<b>14</b>	Et	<i>L</i> -Phe	1.6	587	15	1 584
<b>15</b>	Et	<i>L</i> -Val	1.2	3 151	>100	1 584
<b>16</b>	Et	AIB	0.9	1 585	>100	1 584
<b>17</b>	2-EtBu	<i>D</i> -Ala	2.1	518	42	1 584
<b>18</b>	Et	<i>L</i> -Ala	0.6	636	13	1 548
<b>19</b>	<i>c</i> -Bu	<i>L</i> -Ala	1.1	88	6	815
<b>20</b>	<i>i</i> -Pr	<i>L</i> -Ala	1.1	367	21	1 561
<b>21</b>	<i>t</i> -Bu	<i>L</i> -Ala	1.3	3 790	>100	1 584
<b>22</b>	<i>c</i> -Pent	<i>L</i> -Ala	1.3	160	8.8	1 978
<b>23</b>	3-Pent	<i>L</i> -Ala	1.6	845	>100	860
<b>24</b>	Neopent	<i>L</i> -Ala	1.7	92	3	700

**Table 5** *In vitro* activity of compound **1** and remdesivir on MERS and SARS coronavirus

Compd.	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>		CC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
	MERS-CoV	SARS-CoV	
<b>1</b>	0.46	0.22	>100
<b>11a</b> (remdesivir)	0.074	0.069	>10

病毒的活性很高 (Clarke MO, Feng JY, Jordan R, et al. 治疗沙粒病毒科和冠状病毒科病毒感染的方法. 中国专利公布号 2018, CN 108348526A), 加之前述治愈一例感染了 NCP 患者, 在我国当前的严峻时刻, 由同情用药过渡到随机双盲的严格 III 期临床试验, 治疗轻、中和重度感染 NCP 患者。我们期待着良好的治疗效果。