

## • 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。

本文讨论了继9年前首创的芬戈莫德之后的跟随性药物辛波莫德的研制历程。首创药物的风险在于对靶标可药性自始至终的验证,风险贯穿于始末,乃至上市后;跟随研制药物的难度在于风险后置于批准上市后的命运。这就要求跟随研制应优于或不劣于首创品,因而在启动项目前须制定研发的目标,有针对性地克服先行药物之不足。辛波莫德的优化内容是,设定了避免前药活化过程,和不干扰S1P3受体的功能,体现在药代和选择性的优势,当然在活性强度、物化和安全性方面也要满足成药的属性。本药品结构中同时存在必需的药效团胺基和羧基,避免了磷酸的活化带来的多余负电荷,但同时存在两性基团,对吸收可能有不利影响,这就要求化合物的高强度活性,低剂量弥补物化性质的不足。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1209

# 跟随性免疫调节剂辛波莫德的研制

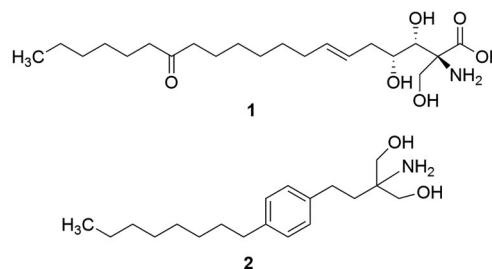
郭宗儒

(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 靶标** 鞘氨醇-1-磷酸(1, S1P)是鞘脂类的一种活性成分,对体内多种生理功能有调节作用,如淋巴细胞运行、心脏功能、血管发育和炎症等。S1P的这些生理活性是通过与5种S1P受体亚型结合起作用的,S1P1~S1P5都是G蛋白偶联受体。

**1.2 首创药物的不足** 2010年FDA批准的S1P1受体调节剂芬戈莫德(2, fingolimod)上市,治疗复发性多发性硬化病。2通过抑制胸腺和淋巴结释放淋巴细胞,阻止外周炎性组织的淋巴细胞的再分布。芬戈莫德是个前药,在体内需经活化,经鞘氨醇激酶催化生成磷酸酯起作用,以纳摩尔水平与4种受体结合,其中主要对S1P1受体呈调节作用,因而呈现免疫抑制(Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 883–897)。临床的不良反应是发生剂量依赖性的瞬息心率减慢,是由于干扰了S1P3受体的缘故。诺华公司研制新的药物的目标,是对S1P1和S1P5双重激动剂,而不影响S1P3的功能。另一目标是去除体内活化的前药性质,将酸性基团置于药物结构之中,以降低研制过程的复杂性。



## 2 活性测定

评价目标化合物的活性是分别用表达人S1P1和S1P3蛋白的N-段质粒转染CHO细胞,得到高表达相应的受体蛋白两种细胞。细胞悬浮在冷却的营养液中匀浆化,离心,得到2~3 mg·mL<sup>-1</sup>膜蛋白,加入全基因扩增SPA磁珠和不同浓度的受试物,室温定时温孵后,加入定量的GTP<sup>35</sup>S,温孵后离心,用多功能同位素测定仪(TOPCount)测定与GTP<sup>35</sup>S结合的放射性活性,分别计算对S1P1和S1P3受体的EC<sub>50</sub>。

## 3 先导物及其优化

**3.1 变氨基醇为胺基羧酸** 为了提高化合物的选择性,将芬戈莫德结构中正辛基用联苯脲醚的刚性结构替换,化合物3对S1P1的活性与芬戈莫德相同,但消除半衰期也很长( $t_{1/2} > 30$  h),有较高的分布容积( $V_{ss} = 36.9$  L·kg<sup>-1</sup>)的缺点,这是由于活化后的单磷酸酯结构中有剩余的负电荷,易于同组织中的脂蛋白结

合。因而结构变换的策略是在分子中预构一个羧基,不必到体内经磷酸酯化,也避免研发过程的复杂性。

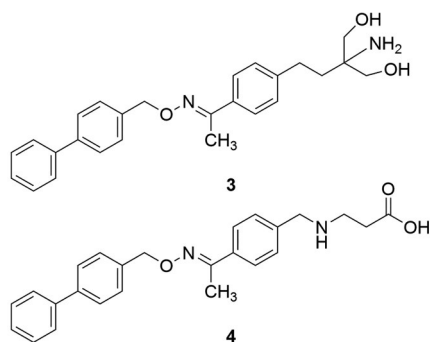
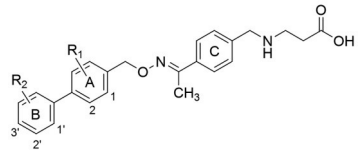


图1是探索的多种胺基羧酸的模块,通过与芳香醛经还原胺化制备多样性胺基羧酸的末端结构,在这有利于制备的组装式的合成中,发现化合物4对S1P1的 $EC_{50}$ 达到 $300 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,联苯片段是满足受体对疏水性结合的要求,从而以4为先导化合物进行了优化。

首先优化的部位是在联苯上做不同取代,代表性化合物的结构及其对S1P1受体的激动作用列于表1。分析构效关系显示:①苯环A的2位取代有利于提高激动活性,例如2-F(6)和2- $\text{CF}_3$ (8)化合物的活性都强于无取代的3,尤其是2位的三氟甲基取代,活性强度达到纳摩尔水平。②A环的1位取代不利于提高活性。例如1-F(5)的活性弱于6一倍,1- $\text{CF}_3$ (7)的 $EC_{50}$ 值为 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,提示1位不宜连接基团。③在B环作单取代,无论哪个位置(1', 2'和3')都不利于活性,如化合物9~14活性都较低。④在A环作2- $\text{CF}_3$ 取代、B环的任何位置引入取代基都使活性显著提高,例如化合物15~18活性都较高。但多数没有超过化合物8。

**3.2 构效关系的分子模拟验证** 在后来获得了化合物4与S1P1蛋白的晶体结构后(Hanson MA, Roth CB, Jo E, et al. Crystal structure of a lipid G-protein-coupled receptor. Science, 2012, 335: 851–855),对上述的构效关系进行了分子模拟验证,得到了合理的解释。图2显示化合物4与S1P1蛋白的晶体结构的结合模式,分子的弯曲形状是在脞醚键处为拐点;蓝色代表正电荷

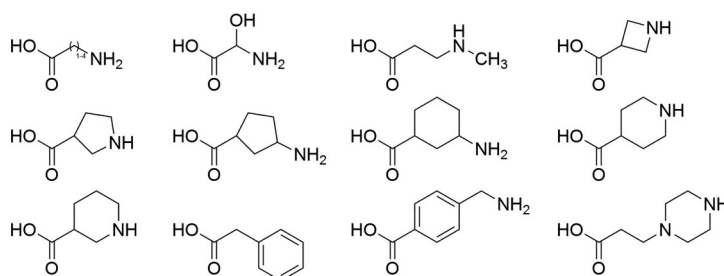
**Table 1** S1P1 potencies of typical compounds with different biphenyl substituents



Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	$EC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
4	H	H	0.3
5	1-F	H	0.12
6	2-F	H	0.061
7	1- $\text{CF}_3$	H	10
8	2- $\text{CF}_3$	H	0.009
9	H	3'-F	0.21
10	H	3'- $\text{CH}_3$	0.64
11	H	3'- $\text{OCH}_3$	1.5
12	H	1'- $\text{OCH}_3$	1.4
13	H	3'- $\text{CF}_3$	10
14	H	1'- $\text{CF}_3$	1.7
15	2- $\text{CF}_3$	1'-F	0.008
16	2- $\text{CF}_3$	3'-F	0.011
17	2- $\text{CF}_3$	3'- $\text{CH}_3$	0.094
18	2- $\text{CF}_3$	2'-F-3'-F	0.016

区域,红色为负电荷区域,绿色为疏水性区域。4的结合模式概括如下:①4与S1P1的结合部位是封闭而大的疏水腔,入口处有电荷分布。②羧基负离子与质子化的Lys34和Arg120形成盐键,还与Tyr29的羟基发生氢键结合。③质子化的胺基与Glu121的侧链羧基形成盐键。这样,羧基和胺基与受体形成多离子键结合,将化合物锁定在受体结合域中。④联苯基充满于疏水腔中,发生疏水-疏水相互作用。⑤分子模拟提示,化合物6的2-F增加了疏水结合,使活性提高,化合物8的2- $\text{CF}_3$ 接近Leu276和Leu272,发生强力的疏水相互作用,活性进一步提高。而且2位的大基团迫使B环呈近于正交取向,有利于同疏水腔发生范德华引力作用。而化合物5和7的取代基处在1位,不能发生这些结合作用。

**3.3 苯环B的变换** 下一步的优化是深入考察苯环B与疏水腔的结合作用,为此,固定A环为2- $\text{CF}_3$ 取代,合成了表2的代表性化合物,评价了目标物对S1P1和S1P3的双重激动活性,以优化选择性作用。用咪喃或



**Figure 1** Building block of amino carboxylate to mimic amino phosphate

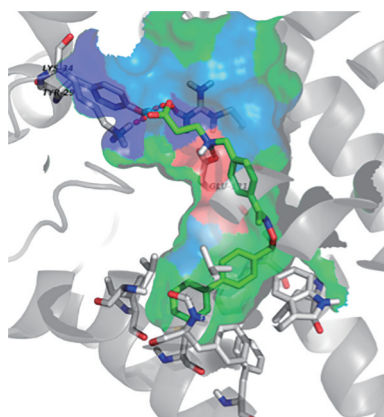
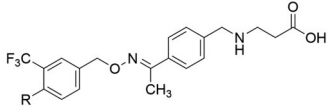






Figure 2 Binding mode of compound 4 in S1P1

噻吩替换末端的苯基, 化合物 **19** 和 **20** 的活性与 **8** 相近, 当用环戊基或环己基替换, **21** 和 **22** 对 S1P1 的激动作用提高了 10 倍, 而对 S1P3 的作用弱, 提示饱和脂肪环的变换对活性强度和选择性都是有利的。

**3.4 苯环 C 的优化** 下一步是优化苯环 C, 为此固定疏水端为 3-CF<sub>3</sub>-4-环己基取代的苯基片段, 变换苯环 C

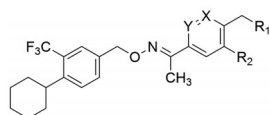
Table 2 SAR of the terminal hydrophobic groups

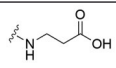
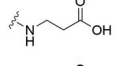
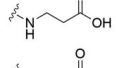
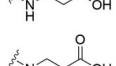
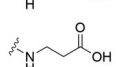
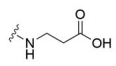
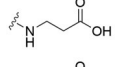
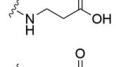
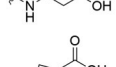
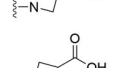

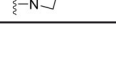



Compd.	R	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	
		S1P1	S1P3
<b>19</b>		0.015	3.0
<b>20</b>		0.018	5.9
<b>21</b>		0.0006	1.6
<b>22</b>		0.0003	1.5

环及其连接的取代基, 合成的代表性化合物列于表 3。构效关系简述如下: ① 苯环 C 用吡啶 (**23**, **24**) 或噻吩 (**25**) 替换, S1P1 的活性略有降低, 但对 S1P3 的活性显著减弱, 所以提高了选择性。咪唑化合物 **26** 的 S1P1 活性显著降低 (20 倍)。② 苯环 C 经卤素取代, **27**~**29** 对 S1P1 保持活性, 与无取代的 **22** 相近, 对 S1P3 的活性有所降低。③ 小烷基取代的 **30**~**32** 对 S1P1 也有较好

Table 3 Structure-activity relationship of the substituted C-ring. a: Values in parentheses represent the E<sub>max</sub>, % of agonism at 10 μmol·L<sup>-1</sup> as compared to S1P



Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X=Y	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup> <sup>a</sup>	
				S1P1	S1P3
<b>23</b>		H	N=CH	0.002 6 (86)	4.3 (44)
<b>24</b>		H	CH=N	0.001 4 (92)	2.6 (53)
<b>25</b>		H	S	0.002 2 (104)	4.0 (79)
<b>26</b>		H	O	0.017 (100)	2.5 (62)
<b>27</b>		F	CH=CH	0.000 3 (105)	2.2 (61)
<b>28</b>		Cl	CH=CH	0.000 6 (106)	1.9 (50)
<b>29</b>		Br	CH=CH	0.000 4 (85)	1.1 (65)
<b>30</b>		CH <sub>3</sub>	CH=CH	0.002 (94)	5.9 (159)
<b>31</b>		C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH=CH	0.000 7 (92)	7.2 (43)
<b>32</b>			CH=CH	0.000 4 (98)	1.3 (63)
<b>33</b>		CH <sub>3</sub>	CH=CH	0.001 6 (80)	3.2 (127)
<b>34</b>		C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH=CH	0.000 4 (91)	5.0 (55)

的活性, 甲基取代的 **30** 对 S1P3 的活性很弱。④ 用氮杂环丁羧酸替换上述的  $\beta$ -氨基丙酸, 化合物 **33** 和 **34** 的活性强度和选择性都显著提高 (Pan SF, Gray NS, Gao WQ, et al. Discovery of BAF312 (siponimod), a potent and selective S1P receptor modulator. ACS Med Chem Lett, 2013, 4: 333–337)。

#### 4 候选物的确定和辛波莫德批准上市

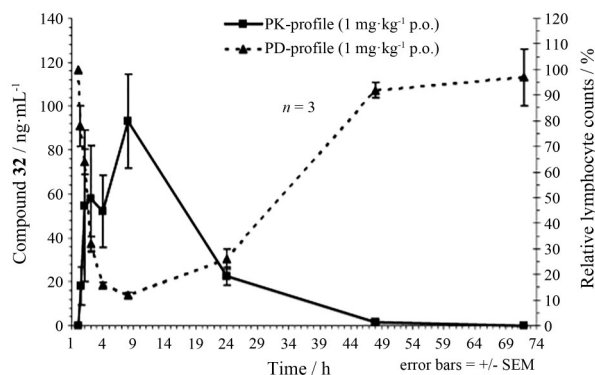
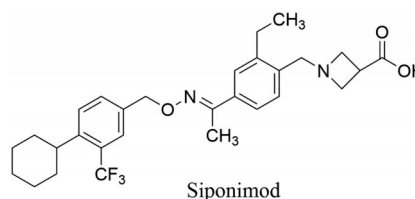
化合物 **34** 的活性和选择性最强, 进而评价了体内的药代动力学性质, 对大鼠和猴的药代主要参数列于表 4。

**Table 4** *In vivo* pharmacokinetics of compound **34**

Animal	CL/L·h <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	V <sub>ss</sub> /L·kg <sup>-1</sup>	t <sub>1/2</sub> /h	F/%
Rat	0.36	2.15	6	50
Monkey	0.098	2.12	19	71

进而 Lewis 大鼠灌胃化合物 **34**, 评价体内的药效/药代 (PD/PK) 的关联特征, 给药 1 mg·kg<sup>-1</sup> 后在不同的时间点测定循环血中的淋巴细胞计数, 图 3 是各个时间点 **34** 的浓度和淋巴细胞计数的相对值 (%)。图中两条曲线显示, 灌胃后血药浓度迅速升高, 同时淋巴计数下降。T<sub>max</sub> = 8 h, 淋巴细胞降低 88%, 到 48 h, 外周淋巴细胞回复正常, 药物从血液中完全消除, 提示化合物

**34** 在体内的持续时间比芬戈莫德短。遂将 **34** 确定为候选化合物, 定名为辛波莫德 (siponimod), 经临床前和临床研究, 表明辛波莫德可有效地延缓继发性多发性硬化病的残疾进展, 于 2019 年经 FDA 批准上市。



**Figure 3** PK/PD relationship of siponimod after oral administration of 1 mg·kg<sup>-1</sup> to Lewis rats