

## • 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。

脊髓性肌萎缩症(SMA),是一类常染色体隐性遗传性疾病,由于脊髓运动神经元变性而导致肌无力和肌萎缩,是威胁生命的难治之症,临床也不少见。自从解析了SMA的医学分子生物学病因以来,针对SMA的基因缺失和相关蛋白的缺乏作为突破口,人们致力于用外来物质干预和纠正基因缺陷,例如干预SMA相关基因的mRNA剪切从而提高表达蛋白的水平,成为研制治疗药物的靶标。本文阐述的瑞德普兰就是以小分子化合物干预相关基因的mRNA的剪切,纠正并恢复了由于基因缺失导致相关蛋白的表达水平,用药物化学方法和分析构效关系,成功地优化了化合物的活性、选择性和成药性。瑞德普兰于2020年上市,是继2016年FDA批准的反义寡核苷酸诺西那生(nusinersen)之后的第一个口服治疗SMA的小分子药物,所以具有首创性意义。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1464

# 治疗脊髓性肌萎缩症的首创性口服药物瑞德普兰

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 背景

### 1.1 脊髓性肌萎缩症

脊髓性肌萎缩症(SMA),是一类由于脊髓前角运动神经元变性导致肌无力、肌萎缩的疾病,属常染色体隐性遗传病,临床不少见。本病临床表现差异较大,根据患者起病年龄和临床病程,将SMA由重到轻分为4型。共同特征是脊髓前角细胞变性,临床表现为进行性、对称性和肢体近端为主的广泛性弛缓性麻痹与肌肉萎缩。SMA是种常染色体隐性神经肌肉障碍,持续性地缺失脊髓运动神经元,导致肌无力和并发症。

### 1.2 药物治疗靶标

脊髓性肌萎缩症是遗传性疾病,患者的脑干和脊髓中的 $\alpha$ -运动神经元发生持续性退化,导致肌萎缩和威胁生命的并发症。发病的机制是运动神经元生存基因1(SMN1)的纯合子缺失或发生变异所致,SMN1编码的运动神经元生存蛋白(SMN),是人体的神经元性和非神经元性细胞中维持正常发育和功能平衡的重要蛋白。人体还存在另一个相关基因SMN2,也产生SMN蛋白,但其水平受SMN1基因控制。SMN2与SMN1的区别只是在核苷酸840的C-T被沉默,导致发生另一种剪切,SMN2在转录中丧失了外显子7,生成的mRNA称作 $\Delta 7$ ,编码的蛋白为SMN $\Delta 7$ ,是非常不稳定而迅速降解的蛋白。不过含有外显子 $\Delta 7$ 的少量

的SMN2仍可产生SMN蛋白。

虽然SMA患者都没有SMN1基因,但存在有SMN2,拷贝数为2~6不等,拷贝数多的患者症状较轻,是因SMN蛋白水平随拷贝数增加而提高的缘故,这就提供了一个治疗途径,即用外来物刺激SMN2,使产生全长的SMN2 mRNA,以提高表达功能性SMN蛋白水平。

2016年美国FDA批准的反义寡核苷酸药物诺西那生(nusinersen),通过鞘内注射钠盐直接进入脑脊髓,是首个SMA治疗药(Sahashi K, Ling KKY, Hua Y, et al. Pathological impact of SMN2 mis-splicing in adult SMA mice. EMBO Mol Med, 2013, 5: 1586-1601)。本品研发目标是可口服和进入中枢的小分子药物,提高SMN蛋白水平,缓解SMA患者症状。

## 2 先导化合物优化

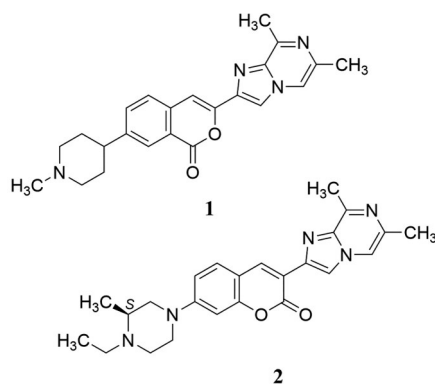
### 2.1 先导化合物

为了寻找能够选择性调控SMN2前体mRNA(pre-mRNA)的剪接,以提高SMN蛋白水平,用含有SMN2微小基因的人胚胎肾细胞作为筛选模型,评价化合物库,经过几轮优化得到了异香豆素(1)和香豆素(2)为母核的化合物,在纳摩尔浓度下,可提高肾细胞中带有 $\Delta 7$ 全长SMN2的mRNA水平,并且可以改善脊髓性肌萎缩小鼠的运动功能和延长存活寿命(Naryshkin

NA, Weetall M, Dakka A, et al. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science*, 2014, 345: 688–692)。然而在临床前阶段发现 **1** 和 **2** 有致突变作用 (Ames 试验), 预示有潜在的遗传毒性, 而且在血浆中快速消除的不稳定性, 从而终止了试验。其实, 香豆素和异香豆素类化合物通常有致突变作用。

## 2.2 构效关系

### 2.2.1 吡啶并嘧啶酮骨架的确定 经骨架迁越的变



换, 用不同的稠合芳环替换香豆素母核结构, 例如用二氢异喹啉酮和喹啉酮作为 **1** 或 **2** 的生物等排体, 结果表明没有呈现活性。吡啶并嘧啶酮作为母核有良好的活性, 因而以此为骨架, 变换的片段是左端的哌嗪环或/和右端的咪唑并吡嗪。

测定化合物活性的生物学指标包括 ① 体外促进全长 *SMN2* mRNA 的生成活性, 指标是促进肾细胞的 *SMN2* 剪切发生 1.5 倍增量的受试物浓度 ( $EC_{1.5\times}$ ,  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); ② 用均相时间分辨荧光法 (HTRF) 测定细胞中 SMN 蛋白量提高 1.5 倍的受试物浓度 ( $EC_{1.5\times}$ ,  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); ③ Ames 试验测定化合物是否有致突变作用。首轮合成的代表性化合物结构及其活性列于表 1, 变换的位置是左端哌啶环的取代基 ( $R_1$ ) 和右端的稠合杂环 ( $R_2$ )。

表 1 的构效关系显示, 右侧的稠合杂环的变换对活性和致突变性的影响规律性不强, 氟代苯并噻唑 (**7**、**8** 和 **13**) 以及甲基吡啶并咪唑 (**11**) 的活性较强。而苯并咪唑 (**4** 和 **5**) 以及吡啶并咪唑 (**9** 和 **10**) 的活性很弱。

**Table 1** Structure, Ames assay results and *in vitro* potency of compounds with a pyridopyrimidinone central core

Compd.	$R_1$	$R_2$	Ames assay	<i>SMN2</i> splicing $EC_{1.5\times}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	SMN protein $EC_{1.5\times}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>3</b>	$\text{CH}_3$		Negative	92	170
<b>4</b>	$\text{CH}_3$		Positive	Inactive	Inactive
<b>5</b>	$\text{CH}_3$		Positive	314	820
<b>6</b>	$\text{CH}_3$		Positive	148	395
<b>7</b>	$\text{CH}_3$		Positive	3	13
<b>8</b>	H		Positive	1	4
<b>9</b>	$\text{CH}_3$		Positive	582	3 400
<b>10</b>	$\text{CH}_3$		Positive	182	760
<b>11</b>	$\text{CH}_3$		Negative	7	14
<b>12</b>	$\text{CH}_3$		Negative	32	40
<b>13</b>	H		Negative	1	9

Ames 试验呈阴性且具有促进 SMN 蛋白生成的化合物是 **3**、**11**、**12** 和 **13**, 而且稠合环上氟原子取代对活性有显著的提高。此外化合物 **3** 对光照射产生的毒性很低, 在不同 pH 溶液中的稳定性也较高, 从而对化合物 **3** 作进一步优化, 代表性化合物列于表 2。表 2 中右端为吡唑并吡嗪片段的化合物都没有致突变作用, 其中左端为 N-烷基哌啶环的化合物 **16** 和 **17** 的活性较高, 四氢吡啶的仲胺化合物 **18** 活性更高。

**2.2.2 避免被糖蛋白外排作用的优化** 与此同时还对活性较好的化合物评价了被 P-糖蛋白的外排作用, 并测定了化合物的分布系数。分布系数高的化合物亲脂性强, 通常有被细胞滞留的趋势, 从而降低了外排作用。用外排比 (efflux ratio) 表征, 比值低表示外排作用弱。表 3 列出代表性化合物的这些参数, 表明分布系数大于 1.6 的化合物, 不是或者不易成为外排糖蛋白的底物。化合物 **7**、**11**、**12** 和 **16** 的活性和外排性 (以及致突变性) 等性质较好, 从而进行了体内动物的药代动力学研究。

**2.2.3 体内药代动力学性质的评价** 对活性强度  $EC_{1.5x}$  低于  $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、无致突变作用而且外排比低的化合物评价了成药性的各种参数: 包括溶解性、化学稳定性、人血浆中稳定性、过膜性 (Pampa)、药物-药物相互作用 (通过评价对多种 CYP450 亚型的抑制作用)、体外清除率 (肝微粒体和肝细胞试验) 以及是否存在共价结合等, 从中选出了化合物 **11**、**12** 和 **16** 进行体内药代的评价。结果列于表 4。表 4 的结果显示, 3 个化合物对正常大鼠和犬的药代动力学性质差别不大, 主要差异是 **16** 的消除半衰期显著长于 **11** 和 **12**, **16** 的分布

容积也大于 **11** 和 **12**。

进而用成年 C/C-等位基因 SMA 小鼠模型评价 **11**、**12** 和 **16** 对该病理模型的剪切改善效果。小鼠有中等程度的 SMA 症状为肌无力、体重减轻和外周神经坏死等。灌胃给药 3 个剂量 ( $1$ 、 $3$ 、 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 每日 1 次, 10 天后, 测定脑内和四头肌中 SMA 蛋白水平。表明这 3 个优选物都有良好的量效关系, 其中化合物 **16** 更显优胜性质, 拟进行深入研究 (Ratni H, Karp GM, Weetall M, et al. Specific correction of alternative survival motor neuron 2 splicing by small molecules: discovery of a potential novel medicine to treat spinal muscular atrophy. J Med Chem, 2016, 59: 6086–6100)。

**2.2.4 化合物的选择性** 分析 **16** 等化合物对人源性纤维母细胞的 SMN 剪切的影响, 尤其是调控细胞周期和凋亡相关的基因的变化, 发现由于 *FOXMI* 和 *MADD* 的改变终止了细胞周期, 这些与体外细胞培养和实验动物的毒性表型密切相关。*FOXMI* 表达插头样框蛋白 M1 (forkhead box protein M1), 在快速分裂的细胞中高表达, 如肠道、骨髓、精子和皮肤等, 影响了正常组织的细胞分裂。

化合物 **16** 的体内代谢产物是 N-去甲基化合物 **21**, **21** 对 SMA 患者的纤维母细胞的体外活性是 **16** 的 10 倍, 影响 SMN2 的剪切活性  $EC_{1.5x} = 2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 对 *FOXMI*,  $\Delta A2$  的  $EC_{50} = 23 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 后者显然是不利的因素。**21** 被 P-gp 的外排作用也显著大于 **16**, 对人 P-gp 的外排比为 18.7, 增强近 10 倍, 在脑中的 SMN 蛋白很少, 都表达在肌肉中 (10 天给药的 SMA 小鼠模型)。而且 **21** 有诱导外周组织和器官 *FOXMI* 的剪切作用, 引起

**Table 2** *In vitro* potency and Ames assay results within the pyrazolopyrazinone subseries

Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Ames assay	SMN2 splicing $EC_{1.5x}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	SMN protein $EC_{1.5x}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>3</b>		H	CH <sub>3</sub>	Negative	92	170
<b>14</b>		H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Negative	40	163
<b>15</b>		CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Negative	57	77
<b>16</b>		CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Negative	23	87
<b>17</b>		CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Negative	30	84
<b>18</b>		CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Negative	6	15

**Table 3** P-gp efflux ratio and lipophilicity of typical compounds

Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Log <i>P</i>	Human P-gp efflux ratio	SMN protein EC <sub>1.5x</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>
7		H		2.46	1.1	13
11		H		2.49	2.4	55
12		H		2.30	1.9	40
16		CH <sub>3</sub>		2.26	2.0	87
17		CH <sub>3</sub>		1.87	1.4	84
18		H		1.45	8.5	76
19		H		1.53	6.6	46
20		CH <sub>3</sub>		1.82	1.2	77

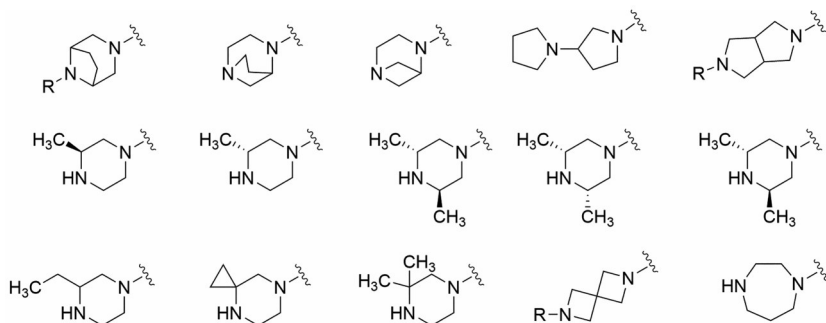
**Table 4** *In vivo* single-dose pharmacokinetic profile for compound **11**, **12** and **16**. a: iv, 2 mg·kg<sup>-1</sup>; b: *p.o.*, 10 mg·kg<sup>-1</sup>; c: iv, 0.3 mg·kg<sup>-1</sup>; d: *p.o.*, 1 mg·kg<sup>-1</sup>

Compd.	Rat				Cyno			
	CL <sup>a</sup> /mL·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	V <sup>a</sup> /L·kg <sup>-1</sup>	<i>t</i> <sub>1/2</sub> <sup>b</sup> /h	<i>F</i> <sup>b</sup> /%	CL <sup>c</sup> /mL·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	V <sup>c</sup> /L·kg <sup>-1</sup>	<i>t</i> <sub>1/2</sub> <sup>d</sup> /h	<i>F</i> <sup>d</sup> /%
<b>11</b>	38	14	-6	55-100	7.5	4.3	-8	-100
<b>12</b>	61	5	4	-100	9.7	0.7	2.4	2.9
<b>16</b>	18	20	12	83	5	20	40-60	52

更多的不良反应。所以仍需对**16**进行结构优化。后经对合成的200多个化合物的FOXMI, ΔA2的EC<sub>50</sub>值与SMN2的EC<sub>1.5x</sub>值的线性回归分析提示,二者呈正相关关系,说明只优化对SMN2的活性仍然具有挑战性。

**2.2.5 调整胺的碱性** 分子左端的胺基是活性所必需的基团,然而它的碱性(p*K*<sub>a</sub>)关系到分子的溶解性和

亲脂性以至于影响被P-gp的外排性和进入中枢的作用,同时也与化合物对hERGs通道的潜在抑制作用有关,另外也需要提高化合物的代谢稳定性,避免在体内的代谢失活或不利的活化(导致脱靶作用)。为此,设计合成了含有不同环状胺类的片段,图1列出了母核左端的胺类片段(Ratni H, Green L, Naryshkin NA, et

**Figure 1** Typical amine fragments on the left-hand terminal of compounds

al. Compounds for treating spinal muscular atrophy. WO 2015/173181 A1)。合成的高活性化合物还评价  $pK_a$  和大鼠体内的分布容积, 列于表 5。

### 3 候选化合物及其上市

在众多化合物中, **27** 显示出优良的性质, 与化合物 **16** 相比, 调节 *SMN2* 剪切活性和选择性都增强了, 分布容积降低了 10 倍, 碱性降低了近万倍 (4 个对数单位), 从而减少了对 hERGs 的影响。表 6 比较了化合物

**27** 与 **16** 的体外活性、生物利用度和物化性质 (Ratni H, Ebeling M, Baird J, et al. Discovery of risdiplam, a selective survival of motor neuron-2 (SMN2) gene splicing modifier for the treatment of spinal muscular atrophy (SMA). J Med Chem, 2018, 61: 6501–6517)。

**27** 是仲胺, 不发生 N-去烷基作用 (体内可发生 N-羟基化作用而失活)。在哌啶氮原子邻位的螺环丙基有双键性质, 可与 N 上的孤电子对发生  $p-\pi$  共轭, 显

**Table 5** The structure,  $pK_a$ , and volume of distribution in rat. a: Calculated  $pK_a$ ; b: Measured  $pK_a$ ; c: Distribution volumn

Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	cpK <sub>a</sub> <sup>a</sup>	mpK <sub>a</sub> <sup>b</sup>	V <sub>ss</sub> <sup>c</sup> /L·kg <sup>-1</sup>
7		H		7.2	7.2	5
14		H		8.2	8.4	15
14a		H		7.9	7.6	7
16		CH <sub>3</sub>		8.8	10.9	29
17		CH <sub>3</sub>		9.0	9.1	20
18		H		9.3	9.3	18
19		H		9.6	8.9	20
22		H		8.3	7.7	10
23		H		8.6	8.6	15
24		H		8.0	7.3	7
25		H		8.4	8.4	9
26		H		7.9	7.5	4
27		H		–	6.8	2

**Table 6** *In vitro* potency and physicochemical characterization of compound **16** and **27**

Compd.	<i>SMN2</i> splicing EC <sub>1,5%</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	<i>FOXMI</i> splicing EC <sub>1,5%</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	SMN protein EC <sub>1,5%</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	logD	hP-gp ER	mpK <sub>a</sub>	F/% h/m
<b>16</b>	23	247	87	2.3	2.0	10.9	13/2
<b>27</b>	4	67	29	2.5	2.2	6.8	11/10

著降低了碱性。**27**对大鼠和猕猴的口服生物利用度(*F*)分别为100%和43%,分布容积(*V*<sub>ss</sub>)分别为3.1和2.0 L·kg<sup>-1</sup>,对成年C/C-等位基因小鼠诱导生成SMN蛋白的百分增量脑中和四头肌分别为100%和49%,提示有良好的选择性。化合物定名为瑞德普兰(risdiplam),在完成了临床前药学和生物学的试验后,经III期临床研究,表明这个由基因泰克公司和PTC Therapeutics共同研发的瑞德普兰可以用于治疗成人和2岁以上儿童脊髓性肌萎缩患者,FDA于2020年8月批准上市,商

品名为Evrysdi。用药时Evrysdi呈液体状态,通过口服或鼻饲给药,每日1次。瑞德普兰是首创性也是目前唯一一个口服治疗各种类型肌萎缩的药物。

