

• 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。

美国两位分子生物学家用化学方法发现并确定了G蛋白偶联受体家族中一类重要蛋白及其功能,称作 β -抑制蛋白(β -arrestins),在所有GPCR系统中存在这类特异性 β -arrestins,是在激动剂激活G蛋白的同时,还导致胞内 β -arrestins蛋白的构象变化,引发下游的级联反应,构成对GPCR脱敏、内化、复敏等生物学功能的负性调节。这个重大发现获得了2012年诺贝尔化学奖。阿片受体也是GPCR, Trevena公司研制新型阿片类镇痛药,将激动剂对G蛋白的活性与对 β -arrestin作用剥离,消除化合物对 β -arrestin的募集作用,以期提高镇痛活性同时,消除传统吗啡类药物的不良反应,本品成功地实现了强镇痛和低不良反应的目标,是将基础研究的成果用于药物研发的可贵尝试。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1951

新理念指导研制的镇痛药奥利赛丁

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

吗啡是个历史悠久(1817年始)的镇痛药,至今仍在临床应用。以吗啡为先导物研制出众多的天然改构物(如氢化吗啡酮等)和合成简化物(如芬太尼等),但以阿片受体为靶标,作用于中枢神经的镇痛药仍在不断的研发中,这是因为阿片受体有 μ 、 δ 、 κ 和 σ 亚型的区分,由于非选择性作用导致不良反应,如便秘、呕吐、呼吸抑制和成瘾性等。本项目旨在研制具有特点的阿片受体激动剂。

美国科学家Lefkowitz和Kobilka经多年研究发现了一类可溶性蛋白,称之为 β -抑制蛋白(β -arrestins),参与介导G蛋白偶联受体(GPCR)的复杂信号通路。不同的GPCR对应相应的 β -arrestins,后者通过构象的变化,对GPCR脱敏、内化、复敏、细胞增殖和基因转录扮演重要角色。此发现不仅是重大的基础性发现,也为新药研究开拓了新的途径。两位学者因此获得了2012年诺贝尔化学奖。

跨膜受体GPCR与膜外激动剂结合后,偶联了胞内的G蛋白,引发了胞内信号通路的活化。但GPCR也同时启动了另一独特的信号通路,即活化的GPCR与 β -arrestins蛋白结合,使G蛋白信号脱敏,促使其内化等一系列独特而负性调节的级联反应。这种激动剂被称作偏向性激动剂(biased agonists),如果激动剂避

免了这种偏向性,则与GPCR的结合只选择性地影响G蛋白,而不启动 β -arrestins通路,所产生的效应有可能与传统的(泛)激动剂不同,选择性作用提高靶向或降低脱靶作用。阿片受体是一类GPCR,本品就是研发影响阿片受体的 β -arrestins通路的激动剂。

研究表明,敲除了 β -arrestin基因的小鼠,吗啡的镇痛作用延长,并降低了对吗啡的耐受性(Bohn LM, Leftkowitz RJ, Gainetdinov RR, et al. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. Science, 1999, 286: 2495-2498),也减少了吗啡引起的便秘和呼吸抑制等不良反应(Raehal KM, Walker JK, Bohn LM. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 314: 1195-1201)。本品的研制目标是,阿片受体激动剂只唤醒胞内的G蛋白,而不影响 β -arrestins的偏向性,希望保留和提高镇痛活性并较少不良反应,以扩大镇痛药的治疗窗口。

2 体外活性评价

2.1 细胞的制备 将 β -arrestin-2与 β -半乳糖苷酶片段的融合蛋白基因,以及分别用阿片 μ 1、 δ 1和 κ 1受体基因(分别为OPRM1、OPRD1、OPRK1)与 β -半乳糖苷酶片段融合蛋白基因,经pCMV-Pro连接的质粒转染到HEK-293细胞内,培养细胞用于以下测定。

2.2 cAMP聚集实验 用上述的细胞评价化合物在不

同浓度下对阿片 μ 受体的作用引起细胞内cAMP水平改变,用cAMP-HTRF试剂盒测定,计算cAMP达到指定浓度的50%时化合物的摩尔浓度的负对数(pEC₅₀,数值越大活性越强)。 δ 和 κ 受体用以评价脱靶作用,pEC₅₀值越低越好。

2.3 β -Arrestin-2的募集实验 原理是在配体激动剂刺激下,当 β -arrestin-2转移到活化的受体上时,受体分子融合的 β -半乳糖苷酶片段与 β -arrestin相互作用,释放出有功能的 β -半乳糖苷酶,用化学发光仪测定酶活性,作为评价受体激活 β -arrestin的指标。所有的实验都是以吗啡对受体的最大活性(100%)的百分比来表示,数值越小表示对 β -arrestin的活化作用越低。

3 先导化合物及其优化

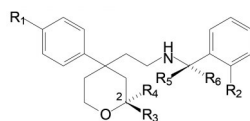
3.1 初步结构变换 苗头化合物是研制者将曾经研制抗炎药物的化合物作上述镇痛活性筛选而发现的,聚焦于为该组化合物可能在化学结构中含有阿片受体激动剂的药效团特征。化合物**1**对阿片受体具有亚摩尔激动活性,也有较弱募集 β -arrestin活性。以化合物**1**为模板,作首轮结构变换,优化的目标是提高对阿片受体蛋白的激动活性,保持或降低对 β -arrestin募集的低活性。代表性化合物列于表1。

化合物**2**的氢化吡喃环2位去除取代基,消除了2位手性碳,激动MOR的活性比**1**降低20倍,对阿片G蛋白的效力也弱于吗啡和化合物**1**。**2**募集 β -arrestin的活性很低,无法检出(NQ)。将**1**的苯环上甲基换作氟原子,化合物**3**对阿片受体的活性和效率都强于**1**,但募集 β -arrestin作用却非凡的高(236%),下一步是固定氟苯基,合成了2位非手性的二甲基**4**和二乙基**5**,同时也去除了侧链环上的酚羟基以消除潜在被葡醛酸苷化的代谢位点,**4**与**3**相比对阿片蛋白的活性降低了

40倍,而**5**只降低6倍,**5**对 β -arrestin的募集作用显著低于化合物**3**,显然是个新苗头,进而将2,2-二乙基关环成螺戊基**6**,**6**的活性比**5**强3倍,募集 β -arrestin作用相近。拆分后的**6R**的募集作用更弱,也低于吗啡,而**6S**募集作用很强。螺环己烷**7**的作用不如**6**,因而2位固定为螺环戊烷。在侧链的苄基 α 位引入甲基或偕二甲基(化合物**8R**、**9R**和**10R**)对受体活性降低6~40倍,因而此处不宜引入取代基。

3.2 侧链芳环的变换 以螺环为骨架作为再优化的起点。首先变换4位上的苯环,发现用2-吡啶取代苯环的化合物激动阿片受体蛋白活性(c-AMP活性和功能)增强,而对 β -arrestin低募集效力,因而固定了母核为4-(2-吡啶基)-2-螺戊环,变换侧链上的芳基,合成的化合物列于表2。解析构效关系如下:①化合物**11**对阿片蛋白的激动活性强于**6**,并降低了募集 β -arrestin能力,将**11**拆分为光活体,**11R**显著优于**11S**,*R*构型仍为优映体,因而以下变换侧链的结构都是*R*构型的化合物。②侧链上苯环用3-氯苯基替换(**13R**)激动活性强于**11R**,但募集 β -arrestin作用也增强,然而2-氯苯基化合物(**12R**)是阿片受体的部分激动剂。③吡啶不同位置连接的化合物(**14R**~**16R**)和2-吡嗪化合物(**17R**)都是部分激动剂,部分激动剂皆不可取。④4-嘧啶化合物**18R**活性不如**11R**;2-萘基化合物**21R**虽有较强的激动作用,但募集 β -arrestin效力高达245%。⑤化合物**19R**和**20R**分别为2-和3-噻吩化合物,激动阿片G蛋白的作用强于**11R**,并且募集 β -arrestin作用也低于**11R**。⑥小鼠体内实验与吗啡作比较,**19R**皮下注射3 mg·kg⁻¹,30 min达到最大镇痛效果(MPE)的79%,吗啡6 mg·kg⁻¹为69%,**19R**的(热板)镇痛作用强于吗啡,此时吗啡组还发生显著便秘的不良反应。**19R**也有较好的药代动力学性

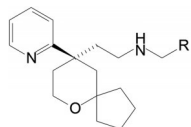
Table 1 SAR of compounds with a spirocyclic core for G protein μ opioid receptor ligand



Compd.	R ₁	R ₂	R ₃ , R ₄	R ₅	R ₆	cAMP' pEC ₅₀	cAMP/% efficacy	β -Arr-2/pEC ₅₀	β -Arr-2/% efficacy
1	CH ₃	OH	Et, Me	H	H	6.3	74	5.7	32
2	CH ₃	OH	H, H	H	H	5.0	41	5.8	NQ
3	F	OH	Et, Me	H	H	7.4	108	NQ	236
4	F	H	Me, Me	H	H	5.8	79	5.2	NQ
5	F	H	Et, Et	H	H	6.6	96	6.2	55
6	F	H	(CH ₂) ₄	H	H	7.1	72	6.4	27
6R	F	H	(CH ₂) ₄	H	H	7.5	79	5.1	20
6S	F	H	(CH ₂) ₄	H	H	6.3	110	5.1	165
7	F	H	(CH ₂) ₅	H	H	6.4	104	NQ	56
8R	F	H	(CH ₂) ₄	CH ₃	H	6.3	75	NQ	NQ
9R	F	H	(CH ₂) ₄	H	CH ₃	6.0	65	NQ	NQ
10R	F	H	(CH ₂) ₄	CH ₃	CH ₃	5.5	84	NQ	NQ
			Morphine.			7.4	100	6.3	100

质。然而对 hERG 蛋白有抑制作用, 家兔动脉灌注心室楔引起心脏传导异常, 因而不宜作深入研发。不过 **19R** 是个里程碑式的化合物。

Table 2 SAR of compounds with 4-(2-pyridyl) spirocyclic core



Compd.	R	cAMP/ pEC ₅₀	cAMP/% efficacy	β-Arr-2/ pEC ₅₀	β-Arr-2/% efficacy
6	--	7.1	72	6.4	27
11	Ph	7.3	74	6.7	16
11R	Ph	7.9	82	6.8	17
11S	Ph	6.2	109	4.8	79
12R	2-Cl-Ph	8.0	30	NQ	NQ
13R	3-Cl-Ph	8.6	91	7.3	59
14R	2-pyridyl	6.8	34	NQ	NQ
15R	3-pyridyl	6.7	53	NQ	NQ
16R	4-pyridyl	5.9	31	NQ	NQ
17R	2-pyrazyl	6.2	35	NQ	NQ
18R	4-pyrimidyl	6.1	84	5.7	23
19R	2-thienyl	7.8	95	6.6	15
20R	3-thienyl	7.9	89	7.2	12
21R	2-naphthyl	6.8	87	4.7	245
22R	cyclopentyl	7.5	69	NQ	NQ

3.3 2-噻吩环的变换 **19R** 侧链的噻吩环作不同基团的取代或等排物咪唑环变换, 合成的化合物列于表3。除了化合物 **24R** 和 **28R** 有较强的募集 β-arrestin 作用外 (相对于吗啡的募集作用分别为 95% 和 197%), 其余化合物对阿片 G 蛋白都有强效的激动活性和较低的募集 β-arrestin 作用。

4 候选物的确定和奥利塞定的上市

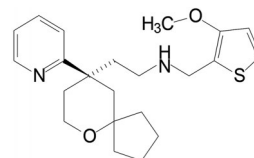
19R 和 **30R** 是两个优选的化合物, 用体外细胞法评价对阿片 κ 和 δ 蛋白的激活作用, 以判断对 μ 蛋白的

选择性, 结果列于表4, 提示化合物 **30R** 对 μ 受体蛋白选择性为 κ 的 178 倍和 δ 的 355 倍。 **19R** 的选择性逊于 **30R**。

Table 4 Comparison of **19R** and **30R** for μ, κ and δ receptor activity

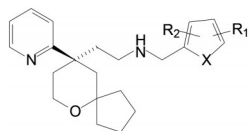
Compd.	μ-cAMP/pEC ₅₀	κ-cAMP/pEC ₅₀	δ-cAMP/pEC ₅₀
19R	7.8	6.0	6.1
30R	8.1	5.9	5.6

考察 **19R** 和 **30R** 对大鼠和小鼠的镇痛作用和引起便秘的不良反应, 二者没有显著差异, 然而 **30R** 对呼吸的抑制作用低于 **19R**, 对 hERG 离子通道的抑制作用 **30R** 也低于 **19R**, IC₅₀ 分别为 6.2 和 2.3 μmol·L⁻¹, 对家兔动脉灌注心室楔引起心脏传导的安全性 **30R** 也优于 **19R** (数据省略) (Chen XT, Pitis P, Liu GD, et al. Structure-activity relationships and discovery of a G protein biased μ opioid receptor ligand, [(3-methoxythiophen-2-yl)methyl] (2[(9R)-9-(pyridin-2-yl)-6-oxaspiro-[4.5]decan-9-yl]ethyl)amine (TRV130), for the treatment of acute severe pain. J Med Chem, 2013, 56: 8019–8031)。因而确定 **30R** 为候选化合物, 研制公司 Trevena 将 **30R** 定名为奥利赛丁 (oliceridine), 经临床前和临床研究, 表明静脉注射用于术后患者的镇痛作用可与吗啡媲美, 但与吗啡相比, 使呕吐、恶心及呼吸问题等不良反应的发生率明显降低, 于 2020 年经美国 FDA 批准上市。



Oliceridine

Table 3 SAR of compounds with varied heterocycles on the side chain



Compd.	X	R ₁	R ₂	cAMP/pEC ₅₀	cAMP/% efficacy	β-Arr-2/pEC ₅₀	β-Arr-2/% efficacy
19R	S	H	H	7.8	95	6.6	15
23R	S	3-CH ₃	H	8.2	75	NQ	NQ
24R	S	4-CH ₃	H	8.3	101	6.4	95
25R	S	5-CH ₃	H	7.8	96	NQ	NQ
26R	O	5-CH ₃	H	7.3	84	6.7	13
27R	S	3-CH ₃	5-CH ₃	7.6	84	6.2	18
28R	S	4-CH ₃	5-CH ₃	8.3	104	6.3	197
29R	O	4-CH ₃	5-CH ₃	7.5	98	6.5	48
30R	S	3-OCH ₃	H	8.1	84	7.3	15