•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。

由诺华公司研制的以鞘氨醇-1-磷酸受体1 (S1PR1) 为靶标的第一个激动剂芬戈莫德, 是治疗多发性硬化病药物, 于2010年上市, 成为该类的第一药物 (FIC)。本刊于2014年第1期作了介绍, 叙述了由虫草的次级代谢产物多球壳菌素演化成功的药物化学历程。时隔9年后诺华研制的本品辛波莫德, 作为跟随性创新药, 在活性、选择性和药代性质上超越了芬戈莫德, 在化学结构上将羧基构建于结构中, 从而避免了芬戈莫德需在体内活化 (磷酸化), 使药物的分布与消除更加合理, 还优化了选择性作用, 避免了对S1PR3的脱靶所引起的心动过缓不良反应。本品对研制跟随性创新药提供了一个范例。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0992

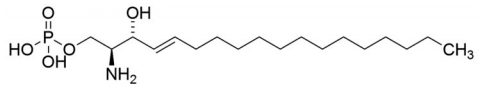
超越首创药物的辛波莫德

郭宗儒

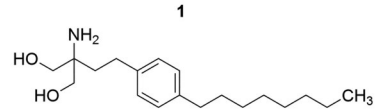
(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

1 研制背景

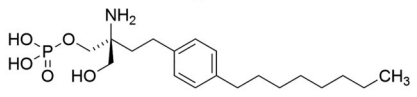
鞘氨醇-1-磷酸 (**1**, S1P) 是内源性鞘磷脂, 调节多种生理功能, 包括淋巴细胞传输、心脏功能、血管发育和炎症等。S1P的受体已知有5种亚型 (S1PR1～5)。2010年诺华公司上市芬戈莫德 (**2**, fingolimod), 是S1PR1激动剂, 为作用于该靶标的治疗多发性硬化病的首创性药物 (FIC)。芬戈莫德在体内经鞘氨醇激酶2催化磷酸化 (**3**), **3**与淋巴细胞表面的S1PR1受体结合, 改变淋巴细胞的迁移, 促使细胞进入淋巴组织, 阻止其离开淋巴组织进入移植器官, 从而减少自身反应性和淋巴细胞再次进入循环, 防止这些细胞浸润中枢神经系统, 达到免疫抑制的效果。芬戈莫德口服用药, 临床不良反应是引起心动过缓、房室传导阻滞等, 原因是激活S1PR 3受体亚型的脱靶作用所致。



1



2



3

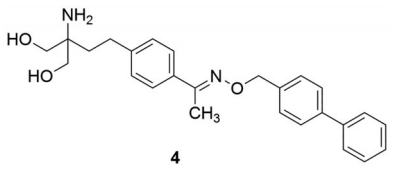
诺华公司为消除心动过缓的不良反应研制高选择性激动剂设定的目标是, 高选择性地结合于S1PR1而不激活S1PR3受体; 降低体内的消除半衰期, 缩短体内存留时间。分子设计的思路是保持药效团前提下, 改变柔性的脂质链成有一定的刚性结构, 以固定某种有利于结合S1PR1的分子构象, 消除或降低对SIPR3的结合。

2 先导化合物及其优化

2.1 体外活性评价 评价化合物活性是测定受试物激活SIPR受体结合GTPγ^{35}S能力。将表达S1P的细胞匀浆后, 膜蛋白悬浮于HEPES、牛血清等混合液中, 加入WGA包被的SPA珠和GDP, 然后加入不同浓度的受试物混匀, 室温下温孵10 min, 加入定量的GTPγ^{35}S, 室温下开始发生GTPγ^{35}S与S1P结合反应, 120 min后, 离心, 上清液用TopCount仪测定放射活性, 回归分析计算受试物激活SIPR受体的EC_{50} (Pan S, Mi Y, Pally C, et al. A monoselective sphingosine-1-phosphate receptor-1 agonist prevents allograft rejection in a stringent rat heart transplantation model. Chem Biol, 2006, 13: 1227−1234)。

2.2 先导物及其活性 研制者设计了化合物**4**, 脂质链中加入苄氧肟的结构片段, 以降低分子的柔性, 小鼠灌胃**4**, 测定在淋巴细胞的分布, 表明在体内磷酸化后诱导淋巴细胞重分布活性与芬戈莫德相同, 但是消除半衰期仍很长 ($t_{1/2}$ > 30 h), 分布容积也很大 (V_{ss} = 36.9 L·kg^{-1}), 推测**4**在体内磷酸化后, 磷酸基的负电荷

与组织中的脂蛋白发生广泛的非特异性结合的缘故。因而改变策略, 在分子中预构一羧基, 提高特异性结合, 避免泛泛分布。这种非前药的设计策略也减少了研究的复杂性, 因为前药被鞘氨醇激酶磷酸化的构效关系 (SAR) 与生成的氨基磷酸化合物对S1PR活性的SAR未必相同, 协调起来是很复杂的。



4

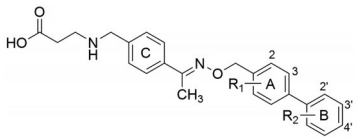
2.3 确定氨基羧酸的结构类型和初始优化 为了探索氨基与羧基的距离和结合方式, 试验了多种氨基羧酸的模块形成的目标物, 与芳烷基醛缩合−还原而制备了多样的结构类型。图1列出了制备目标物的反应通式和各种氨基羧酸的模块。

在这些模块合成的化合物中, 发现β-丙氨酸和β-氮杂环丁酸 (图1方框所示) 活性较好。例如化合物**5**对S1PR1活性EC_{50} = 300 nmol·L^{-1}, 因而以**5**为起始点作第一轮的结构变换。分别或同时在苯环A和B上作取代, 代表性化合物列于表1。

表1中构效关系概述如下: ① A环上3-位取代提高活性, 尤其是3-CF_3 (**9**) 活性很高; ② 2-位取代不利于活性, 例如2-CF_3 (**8**) 活性很低, 低于**9**逾千倍; ③ B环上取代基不利于活性, A, B环同时取代 (固定A环为3-CF_3) 的化合物**16**～**19**, 只有小体积的2′-F (**16**) 和4′-F (**17**) 与**9**的相当, **18**和**19**活性都下降。

2.4 苯环B的变换 在苯环A的3-位优化出三氟甲基, 下一步是变换苯环B, 合成的化合物列于表2。结果表明用2-呋喃环 (**20**) 或2-噻吩环 (**21**) 置换苯基对SIPR1的活性基本相近, 而用环戊基 (**22**) 或环己基 (**23**) 置换, 活性显著提高, 对S1PR3仍然维持着低活性, 提示变换成脂肪环有较高的选择性, 尤其是环己基化合物**23**达到最高的激动活性, 强于对S1PR3活性5 000倍。

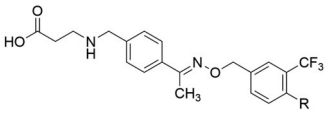
Table 1 Structure and S1PR1 activity of compounds with different substituents at biphenyl ring



Compd.	R_1	R_2	S1PR1 EC_{50}/nmol·L^{-1}
5	H	H	300
6	2-F	H	120
7	3-F	H	61
8	2-CF_3	H	10 000
9	3-CF_3	H	9
10	H	4′-F	210
11	H	4′-CH_3	640
12	H	4′-OCH_3	1 500
13	H	2′-OCH_3	1 400
14	H	4′-CF_3	10 000
15	H	2′-CF_3	1 700
16	3-CF_3	2′-F	8
17	3-CF_3	4′-F	11
18	3-CF_3	4′-CH_3	94
19	3-CF_3	3′,4′-F_2	16

2.5 C环的变换 下一步是固定A环取代基为3-三氟甲基-4-环己基, 变换C环为杂环或苯环上的取代基以及极性片段氨基羧酸的变换, 合成的化合物列于表3。

Table 2 SAR of compounds with different terminal rings



Compd.	R	EC_{50}/nmol·L^{-1}	
		S1PR1	S1PR3
20		15	3 000
21		18	5 900
22		0.6	1 600
23		0.3	1 500

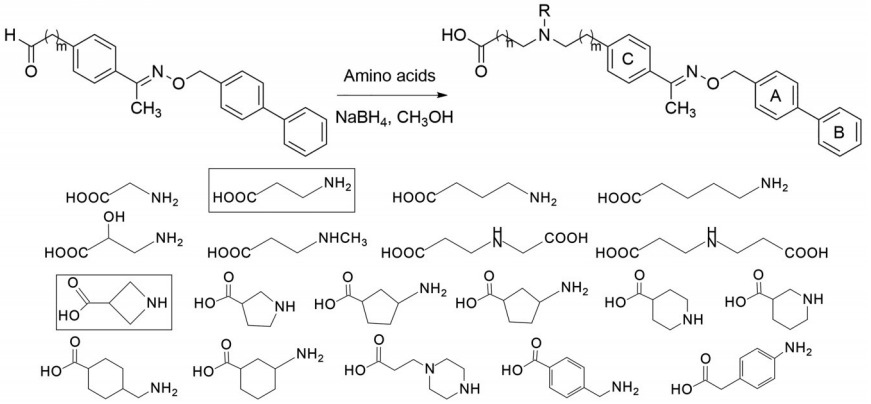
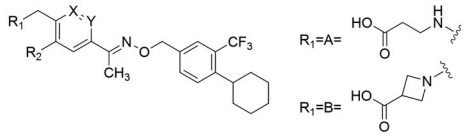


Figure 1 Amino carboxylate to mimic amino phosphate for synthesis of target compounds

Table 3 SAR of the compounds with varied rings or substituents. *Values in parentheses represent the E_{max}, % of agonism at 10 μmol·L^{-1} as compared to S1P



Compd.	R_1	R_2	X=Y	EC_{50}/nmol·L^{-1}*	
				S1PR1	S1PR3
24	A	H	N=CH	2.6(86)	4.3(44)
25	A	H	CH=N	1.4(92)	2.6(53)
26	A	H	S	2.2(104)	4.0(79)
27	A	H	O	17(100)	2.5(62)
28	A	F	CH=CH	0.3(105)	2.2(61)
29	A	Cl	CH=CH	0.6(106)	1.9(50)
30	A	Br	CH=CH	0.4(85)	1.1(65)
31	A	CH_3	CH=CH	2(96)	5.9(159)
32	A	C_2H_5	CH=CH	0.7(92)	7.2(43)
33	A	*cyclo*-C_3H_6	CH=CH	0.4(98)	1.3(63)
34	B	CH_3	CH=CH	1.6(80)	3.2(127)
35	B	C_2H_5	CH=CH	0.4(91)	5.0(55)

表3的构效关系如下: ① 用杂环取代苯环, 例如吡啶 (**24**、**25**) 和噻吩 (**26**) 略强于苯环 (**9**), 对S1PR3的脱靶作用也较小, 但未呈现明显优势。呋喃环 (**27**) 对S1PR1活性下降, 可能因环体积较小, 难以维持稳固的活性构象; ② 苯环上卤素取代 (**28**～**31**) 也略强于**9**。而小烷基取代有利于活性和选择性, 乙基 (**32**) 尤其显著; ③ 用前述的*β*-氮杂环丁烷 (可视作*β*-丙氨酸的环–链等排体) 的含有乙基取代物 (**35**) 也是优良分子。

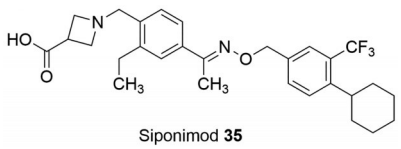
3 候选物的确定和辛波莫德上市

对**35**做体内与体外药代动力学评价, 表明与大鼠、犬、猴和人血浆蛋白结合率99.9%, Caco-2细胞实验显示高效被动扩散过膜, 而且没有外排现象, 猴和人肝微粒体呈现低到中等代谢转化作用。表4列出了**35**在大鼠和猴体内的药代动力学参数, 表明口服生物利用度分别为50%和71%, 口服没有首过效应。半衰期分别为6和19 h, 明显低于芬戈莫德 ($t_{1/2}$ = 40 h), 分布容积也低于芬戈莫德。

Table 4 *In vivo* pharmacokinetics of compound **35** in rats and monkeys

Animal	CL/L·h^{-1}·kg^{-1}	V_{ss}/L·kg^{-1}	$t_{1/2}$/h	*F*/%
Rat	0.36	2.15	6	50
Monkey	0.098	2.12	19	71

用Lowis大鼠实验化合物**35**的PD/PK行为, 观察给药后由于激活S1PR1降低外周血中淋巴细胞计数, 依次作为自身免疫性疾病的药效动力学的生物标示物, 发现Lowis大鼠灌胃1 mg·kg^{-1}后血液中**35**浓度迅速增加, 并与外周淋巴细胞的减少相平行 (数据省略), 给药8 h后外周淋巴细胞数降低88%, 48 h后淋巴细胞数恢复正常, 表明血液中**35**已被清除, 这与芬戈莫德PD/PK区别很大。



Siponimod **35**

经综合评价, 确定**35**为候选化合物, 定名辛波莫德 (siponimod), 完成了临床前药效药代和安全性试验后, 经三期临床试验表明是治疗成人复发型多发性硬化病的有效药物, FDA批准于2019年上市, 是诺华公司继2010年研制的芬戈莫德后另一个同类药物 (Pan SF, Gray NS, Gao WQ, et al. Discovery of BAF312 (siponimod), a potent and selective S1P receptor modulator. ACS J Med Chem Lett, 2013, 4: 333−337)。

4 S1PR1与激动剂结合模式

S1PR1是脂质性的G蛋白偶联受体, 2012年Hanson等解析了该膜受体的晶体结构(Hanson MA, Roth CB, Jo E, et al. Crystal structure of a lipid G-protein-coupled receptor. Science 2012, 335: 851−855)。化合物**5**与S1PR1结合腔做分子对接, 表明羧基和胺基等极性基团处于结合腔的极性入口, 环己基苯处于容积较大的底部疏水腔。**5**的羧基离解, 与Lys24和Arg120形成静电结合, 还与Tyr29形成氢键; 质子化的胺基与Glu121形成盐键, 从而分子的极性端牢固地固定在开口处的极性区域。尾部疏水的联苯基几乎呈垂直取向, 与Leu276和Leu272发生疏水−疏水相互作用。图2是化合物**5**与S1PR1分子对接的结合模式, 蓝色代表正电性区域; 红色是负电性区域; 绿色是疏水性区域。本文叙述的辛波莫德研制过程也是在分子模拟的辅助下进行的, 特别是联苯基变换成环己基, 乙基取代基的引入和位置确定都有结合模式的指导。

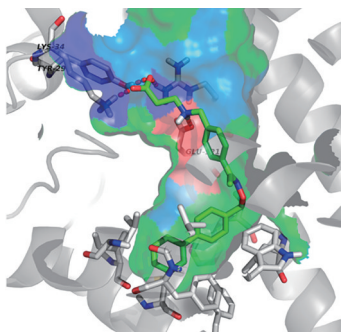


Figure 2 Binding mode of compound **5** in S1PR1. The electrostatic surface is color coded: blue is positively charged, red is negatively charged, and green is hydrophobic