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1988年奥美拉唑问世治疗胃食管反流病等与胃酸相关的疾病以来, 质子泵抑制剂 (PPI) 广泛应用, 20多年来在此领域中独占鳌头, 也使组胺H2受体阻断剂的应用黯然失色。PPI在体内酸催化下, 分子重排产物与H^+,K^+-ATP酶发生不可逆结合而抑制胃酸生成。然而PPI有起效滞后和对CYP代谢的多态性的不足。多年来药界基于H^+,K^+-ATP酶的功能, 研制钾离子竞争性抑制剂, 可逆性抑制酶活性, 阻断K^+与H^+的交换, 不能产生胃酸。武田药厂首创的伏诺拉生就是钾离子竞争性酸阻断剂 (P-CAB)。本文简述了从通量筛选出苗头化合物, 经过分子模拟和数轮的结构变换, 最后成功上市的药物化学历程, 清晰地展现出研制者深厚的药物化学内涵和丰富的研制经验。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0325

首创的钾离子竞争性酸阻断剂伏诺拉生

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

胃食管反流病 (GERD)、胃溃疡和与胃酸相关的疾病是常见和多发病, 当前治疗药大体分3类: 物理性保护胃黏膜的铋/铝制剂, 如复方维U颠茄铋铝片; 抑制组胺刺激胃壁细胞的组胺H2受体阻断剂, 如西咪替丁等; 抑制H^+,K^+-ATP酶的质子泵抑制剂 (PPI), 如艾司奥美拉唑等。PPI是治疗GERD的强效不可逆抑制剂, 已在广泛应用, 但也存在显效迟缓和其代谢酶CYP2C19基因多态性引起的用药问题。多年来制药界针对H^+,K^+-ATP酶另辟蹊径, 研究钾离子竞争性酸阻断剂 (P-CAB), 通过可逆地抑制胃部H^+,K^+-ATP酶阻止钾与质子的交换, 阻断胃酸的分泌, 治疗GERD等疾病。P-CAB与PPI虽然作用靶标相同, 都是抑制胃酸生成, 但生化机制不同, 是不同的治疗路径。

2 活性测定

2.1 抑制H^+,K^+-ATP酶活性 新鲜猪胃洗净后剥离胃黏膜, 剁碎后与缓冲液匀浆, 匀浆液离心, 上清液高速离心得到的沉淀物与缓冲液再高速离心, 制备的微粒组分作为H^+,K^+-ATP酶源。

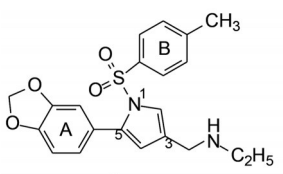
一定重量的微粒组分用一定体积的特定缓冲液混匀, 加入不同浓度的受试物, 并行加和不加KCl溶液, 加入一定量ATP溶液, 温孵30 min, 加入孔雀绿试剂终止反应。用比色法于620 nm测定含有孔雀绿的无机磷酸根浓度, 由系列测试ATP释放的磷酸的百分含量计算化合物抑制H^+,K^+-ATP酶活性的IC_{50}。

2.2 抑制组胺刺激大鼠胃酸分泌活性 将麻醉大鼠结扎幽门, 腹腔缝合后立即静脉注射受试物或空白对照液, 3 min后皮下注射定量组胺液, 3 h后牺牲大鼠, 取出胃中全部内容物, 离心, 上清液用NaOH滴定酸浓度, 由总酸量和3 h分泌的酸量, 计算受试物抑制酸分泌的百分数。

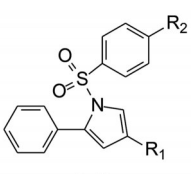
3 苗头化合物和先导物的演化

3.1 吡咯环3位碱性链的变换 武田公司用上述酶法高通量筛选公司的化合物库, 发现了含有吡咯片段的化合物**1**, 虽然活性不高 (IC_{50} = 540 nmol·L^{-1}), 但是结构中存在碱性基团的新颖结构, 而且**1**有较大的修饰空间。首轮的变换是苯环A (吡咯5-位连接)去除亚甲二氧基, 变换苯环B (吡咯1-位连接) 的甲基和吡咯环3-位的碱性侧链。合成的化合物体外抑制H^+,K^+-ATP酶活性和大鼠体内胃酸分泌程度列于表1。

去除**1**的亚甲二氧基化合物**2**的活性基本没变, 而将*N*-乙基换成甲基, **3**的体内外活性显著提高, **7**也是同样的3-甲氨甲基侧链, B环为CF_3取代, 活性也很

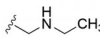


1



2−9

Table 1 Effects of removing benzodioxol moiety at 5-position, substituent at 1-position (R_2) and basic moiety at 3-position (R_1) on inhibitory activities

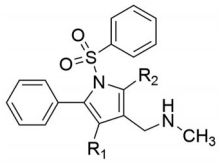
Compd.	R_1	R_2	H^+,K^+-ATPase IC_{50}/nmol·L^{-1}	Rat acid secretion 1 mg·kg^{-1}/% inhibition
1	–	–	540	39 (10 mg·kg^{-1}, iv)
2		CH_3	650	53 (10 mg·kg^{-1}, iv)
3		CH_3	55	65
4		CH_3	>10 000	NT
5		CH_3	>10 000	−3 (10 mg·kg^{-1}, iv)
6		CH_3	860	NT
7		CF_3	110	73
8		CF_3	710	59 (10 mg·kg^{-1}, iv)
9		CF_3	2 300	−4

高。没有碱性的化合物**4**和**5**没有活性, 说明吡咯环上碱性侧链的重要性。未作取代的氨基**6**、二甲胺基**8**以及**9**虽有相当的碱性, 但活性都很弱, 说明吡咯环上3-CH_2NHCH_3是优良的活性片段。

3.2 吡咯环1位磺酰苯基和5位苯基的变换 以化合物**3**为新的起点, 固定吡咯3位为甲胺基甲基, 变换1位的磺酰苯基和5位的苯基, 合成的化合物结构与活性列于表2。表中的SAR鲜明地显示出吡咯环1位若不是苯环 (或取代苯基), 或5-位不是苯基, 体内外活性都很低 (**10**～**15**), 磺酰基用亚甲基或羰基置换也失去活性。**16**和**17**体内外都呈现活性。

3.3 吡咯环上2或4位的取代 变换至此, 只剩下考察吡咯环上2,4位取代基对活性的影响, 表3列出的简单取代的化合物**18**～**20**体内外都显示活性。

Table 3 Effect of substituents at pyrrole ring on inhibitory activities



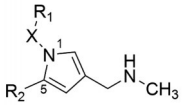
Compd.	R_1	R_2	H^+,K^+-ATPase IC_{50}/nmol·L^{-1}	Rat acid secretion 1 mg·kg^{-1}/% inhibition
18	H	CH_3	25	77
19	H	Cl	40	49
20	CH_3	H	29	95

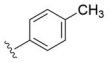
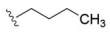
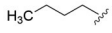
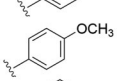
初步评价高活性化合物**3**、**7**、**16**、**17**～**20**对H^+,K^+-ATP酶选择性作用, 测定对Na^+,K^+-ATP酶的抑制作用, 结果表明在10 000 nmol·L^{-1}浓度下对Na^+,K^+-ATP酶没有抑制作用。

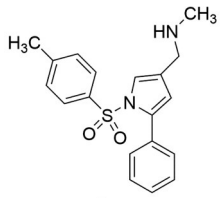
3.4 化合物3与H^+,K^+-ATP酶结合模式 用同源模建方法构建了H^+,K^+-ATP酶的三维结构 (现在可更准确地用AlphaFold生成), 将化合物**3**对接到结合腔内, 如图1所示。

分子对接图形显示苄基与临近的Tyr928发生π-π堆积作用, 磺酰基的氧原子与Tyr925和Tyr928形成两个氢键结合。吡咯的5-苯基与Tyr928侧链发生CH-π相互作用。3位侧链的NH与Val331骨架羰基形成氢

Table 2 Effects of sulfonyl moiety at 1-position and aromatic moiety at 5-position on inhibitory activities



Compd.	R_1	X	R_2	H^+,K^+-ATPase IC_{50}/nmol·L^{-1}	Rat acid secretion 1 mg·kg^{-1}/% inhibition
3		SO_2		55	66
10		SO_2		>10 000	27 (10 mg·kg^{-1}, iv)
11		SO_2		830	NT
12		CH_2		510	84 (10 mg·kg^{-1}, iv)
13		CO		>10 000	NT
14		SO_2		250	−8
15		SO_2		1 500	NT
16		SO_2		30	95
17		SO_2		9.4	96



3

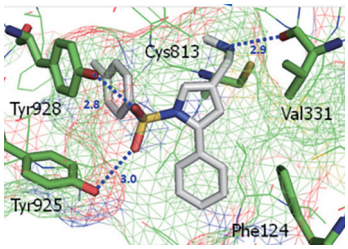


Figure 1 Binding models of compound **3** with H^+,K^+-ATPase

键, 从而使得该侧链紧密地结合在阳离子 (H^+和K^+) 流动通道内, 成为特异性结合的重要片段。然而 A/B 两个苯环和环上取代基还需要优化 (Nishida H, Hasuoka A, Arikawa Y, et al. Discovery, synthesis, and biological evaluation of novel pyrrole derivatives as highly selective potassium-competitive acid blockers. Bioorg Med Chem, 2012, 20: 3925−3938)。

4 深入的优化

4.1 磺酰苯基的环上取代 前述的各个结构片段似乎已臻于最优化, 但从整体结构分析, 尚需改善物理化学性质, 例如降低脂溶性, 提高配体−亲脂性效率 (ligand-lipophilicity efficiency, LLE = pIC_{50} − log D), LLE 数值越大, 成药性越强。

化合物 **16** (4-OCH_3) 的 LLE 值高于化合物 **3** (4-CH_3), 与 H^+,K^+-ATP 酶分子对接发现围绕着苯磺酰基有个不大的极性空间, **16** 的 4-OCH_3 却未能占据 (图 2a 的蓝圈), 倘甲氧基移至 3 位 (图 2b 的蓝圈), 则可能与 Thr815、Phe897 和 Asn898 发生极性相互作用, 以增高结合力。

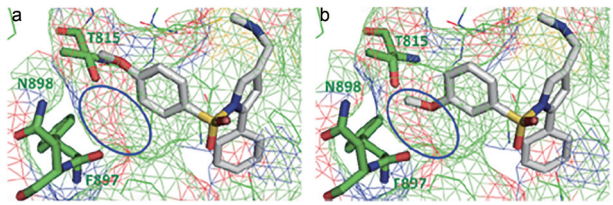
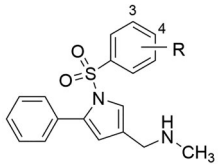


Figure 2 Plausible binding models of compounds **16** (a) and **18** (b) with H^+,K^+-ATPase. Blue circles show the polar space

为此合成了 **18** 和 **19**, 表 4 数据表明 **18** 活性比 **16** 高 2 倍, 而甲磺酰基取代的 **19** 活性低于 **18** 大约 6 倍, 说明这个容纳极性基团的空间较小, 不容磺酰基存在。

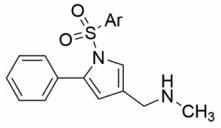
Table 4 Effects of substituents at 1-phenylsulfonyl group on H^+,K^+-ATPase inhibitory activities

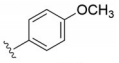
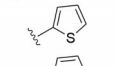
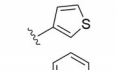
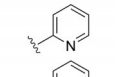
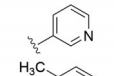
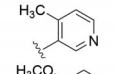
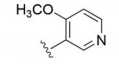
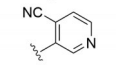


Compd.	R	H^+,K^+-ATPase IC_{50}/nmol·L^{-1}
16	4-OCH_3	30
18	3-OCH_3	11
19	3-SO_2CH_3	78

4.2 磺酰杂芳基置换磺酰苯基 用噻吩和吡啶替换苯环, 合成的化合物列于表 5。3-噻吩化合物 **21** 活性比 **16** 高 1 倍, 而 2-噻吩 **20** 的活性低于 **16**。2-吡啶化合物 **21** 的活性很弱, 但 3-吡啶 **23** 的活性却很高, IC_{50} = 16 nmol·L^{-1}, 与 3-噻吩基相同, 由于 **23** 的 LLE 值比 **21** 高 1.0 (对数单位), 所以 **23** 的成药前景优于 **21**。**21** 和 **23** 都是 3-位连接, 与 **16** 的间位甲氧基的连接位置相当, N、O 和 S 都是含有孤电子对的氢键接受体, 因而有利于氢键或静电引力结合。**24**～**26** 为 3-吡啶基环上进一步取代, 仍具有高活性。**25** 的 LLE 值为 6.2, 显著低于 **23**。以 **23** 为新的起点, 优化咪唑环 5 位连接的苯环, 以进一步提高 LLE 值, 增强活性, 降低脂溶性。

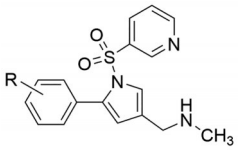
Table 5 Effects of arylsulfonyl group on H^+,K^+-ATPase activity, log D, LLE, and inhibitory activity on histamine-induced gastric acid secretion in rats



Compd.	Ar	H^+,K^+-ATPase IC_{50}/nmol·L^{-1}	Log D	LLE	Rat acid secretion 1 mg·kg^{-1}/% inhibition
16		30	1.5	6.0	95
20		51	1.2	6.1	69
21		16	1.1	6.7	55
22		170	0.7	6.1	NT
23		16	0.7	7.1	85
24		34	1.0	6.6	83
25		13	1.7	6.2	95
26		110	1.4	5.6	17

4.3 吡咯5-位连接的苯环优化 由于**23**已呈现体内外高活性和高LLE值, 研制者对5-位苯环没有作较大的变换, 而是结构的微调。表6列出了化合物的结构和性质。2-、3-和4-位氟代 (**27**～**29**), 虽然**27**和**28**的体外体内活性都相近, 但氟的位置异构使**28**的分布系数(脂溶性的量度) 比**27**高0.6 log单位, 4-F (**29**) 的活性降低2倍。基于氟代的2-位占优势的结果, 合成的**30**～**34**都处于2-位, 除**30**的体内外活性和LLE值与**27**相近外, 其余化合物的活性和LLE值都逊于**27**, 因而优选出**27**作深入的研究。两个极性较强的2-CN (**33**) 和2-CH_2OH (**34**) 活性很弱。

Table 6 Effects of substituents at 5-phenyl group on H^+,K^+-ATPase activity, log D, LLE, and inhibitory activity on histamine-induced gastric acid secretion in rats

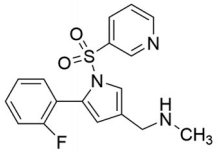


Compd.	R	H^+,K^+-ATPase IC_{50}/nmol·L^{-1}	Log D	LLE	Rat acid secretion 1 mg·kg^{-1}/% inhibition
23	H	16	0.7	7.1	85
27	2-F	19	0.4	7.3	98
28	3-F	20	1.0	6.7	92
29	4-F	46	1.0	6.3	85
30	2-Cl	17	0.7	7.1	97
31	2-CH_3	46	1.0	6.3	95
32	2-CF_3	75	0.8	6.3	92
33	2-CN	230	−0.2	6.8	68
34	2-CH_2OH	2 200	−0.3	6.0	NT

5 候选物的确定和伏诺拉生的批准上市

进一步评价化合物**27**的体内活性, 用不同的剂量灌胃结扎幽门的大鼠, 显示有剂量依赖性的抑制基础胃酸分泌作用, 当**27**剂量为4 mg·kg^{-1}完全抑制胃酸分泌。而用武田上市的PPI兰索拉唑对照, 在8 mg·kg^{-1}时仍未能完全抑制。手术海登海因小胃犬 (Heidenhain-pouch dog) 口服**27**和兰索拉唑1 mg·kg^{-1}, **27**在给药后达到完全抑制, 持续6 h, 而兰索拉唑1～6 h抑制率为60%～40%, **27**持续到48 h仍维持60%的抑制, 说明**27**的作用强度和作用时程优于兰索拉唑。此外**27**对CYP多态性也较弱 (数据省略) (Arikawa Y, Nishida H, Kurasawa O, et al. Discovery of a novel pyrrole derivative 1-[5-(2-fluorophenyl)-1-(pyridin-3-ylsulfonyl)-1*H*-pyrrol-3-yl] -*N*-methylmethanamine fumarate (TAK-438) as a potassium-competitive acid blocker (P-CAB). J Med Chem, 2012, 55: 4446−4456)。

27的药效、药代和安全性都达到候选化合物的目标, 定名为伏诺拉生 (vonorazan), 经临床研究表明可治疗与胃酸相关疾病, 包括反流性食管炎、胃溃疡、十二指肠溃疡等, 于2015年在日本上市, 2019年获得国家药品监督管理局 (NMPA) 批准进入中国, 适应症用于治疗反流性食管炎, 2022年获FDA批准在美国上市。



Vonorazan