•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。

血管舒缩综合征 (VMS) 是历来困扰更年期女性的生理−病理性疾病, 出现的潮热、出汗和皮肤血管扩张等症状, 历来采用雌激素和抗抑郁药作替代性治疗。本品非唑内坦基于下丘脑−垂体−性腺轴 (HPG) 调控KNDy神经元和促性腺激素释放激素 (GnRH) 的生理学机制, 成功设计和创制了针对神经激肽3受体 (NK3R) 的选择性抑制剂。从普筛出苗头, 到苗头演化成先导化合物, 以及全方位的结构优化, 都是以经典药物化学的构效关系和试错法进行的, 在成药性方面, 对药代、物化和脱靶性质都进行了反复的考量, 从而在2023年成就了全球首创的VMS治疗药。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0453

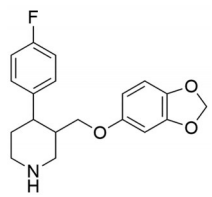
经典药物化学方法创制的非唑内坦

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

本品为治疗更年期女性血管舒缩综合征 (vasomotor syndrome, VMS) 研制的首创性药物。VMS是由于更年期常见的血管舒缩失常造成困扰, 长时发生潮热症状, 包括出汗和皮肤血管扩张等症状。目前, 治疗VMS药物多采用传统的雌激素替代疗法, 以致伴随有许多不良反应, 因而创制VMS药物为临床之亟需。2013年FDA批准了抗抑郁药物帕罗西汀 (**1**, paroxetine) 作为老药新用上市, 用于治疗中/重度VMS, 为首款非激素类药。



1

2 生物学依据—下丘脑−垂体−性腺轴

人体中枢神经支配的下丘脑−垂体−性腺轴 (HPG), 组合调节生殖生理功能。在HPG轴上通过由吻素蛋白 (kisspeptin)、神经激肽B (NKB) 和强啡肽 (Dyn) 联合调节KNDy神经元控制促性腺激素释放激素 (GnRH) 水平。绝经期雌激素水平下降, 负性反馈使得GnRH等激素及其受体表达显著提高, 这些激素又通过神经激肽3受体 (NK3R) 将信号传递到下丘脑, 成为发生VMS和潮热的关键因素。因此, 设计阻断NKB/NK3R通路的化合物有望成为治疗VMS全新机制的药物。

3 苗头化合物及其演化

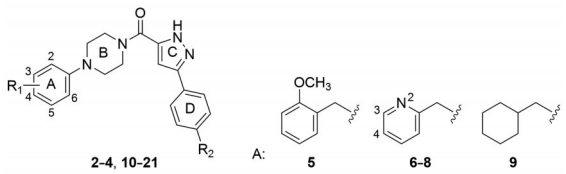
3.1 苗头化合物的A环变换 用发光蛋白Ca^{2+}生物荧光方法普筛化合物对hNK3R的抑制作用, 发现有4个环的化合物**2**活性IC_{50} = 480 nmol·L^{-1}, 为将苗头分子演化成先导物 (hit-to-lead), 首先变换A环, 合成的化合物结构、活性和对肝微粒体和血浆稳定性列于表1。

构效关系分析如下: ① 去除2-CH_3O的化合物**3**活性显著降低, IC_{50} = 2 100 nmol·L^{-1}, 甲氧基移至3-或4-位, 化合物**10**和**11**活性更低, 提示2-位取代基与B环的邻近, 可能分子采取某种构象有利于同受体结合; ② A环与B环 (哌嗪) 之间加入亚甲基, 化合物**5**仍保持活性, 但换成吡啶 (**6**～**8**) 或环己基**9**失去活性; ③ 2-位甲基、三氟甲基或苯基取代活性都很低, 但2-乙基 (**15**)、2-(3′-氟苯氧基) (**20**) 和2-氨甲酰氧基 (**21**) 化合物活性都很高, 原因有待揭示; ④ D环的苯基作4-氯代 (例如**4**) 比无取代的 (**2**) 活性强高, 也提升了血浆中的稳定性。

3.2 D环的变换 固定A环为2-甲氧基苯, B和C环不变, 用取代苯基、环己基和苄基探索构效关系, 化合物结构与活性列于表2。

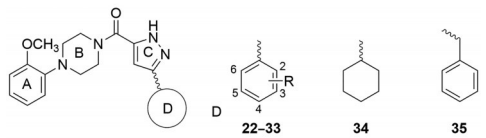
分析构效关系如下: ① D环为苯环时, 对位疏水性拉电子基团有利于活性, 例如三氟甲基 (**25**) 活性强

Table 1 Potency and stability SAR at ring A. a: Inhibition of NKB-induced aequorin Ca^{2+} signal in CHO cells expressing recombinant hNK3-R; b. *Ex vivo* rat plasma stability reported as % intact compound at 1 h



Compd.	R_1	R_2	hNK3R IC_{50}[a]/nmol·L^{-1}	RLM $t_{1/2}$/min	Plasma stability[b]/%
2	2-CH_3O	H	480	5	3
3	H	H	2 100	9	15
4	2-CH_3O	Cl	130	3	8
5	–	Cl	130	8	46
6	2-Pyridyl	Cl	5 090	Not test	Not test
7	3-Pyridyl	Cl	3 810	Not test	Not test
8	4-Pyridyl	Cl	1 800	Not test	Not test
9	–	Cl	>10 000	Not test	Not test
10	3-CH_3O	Cl	>10 000	Not test	Not test
11	4-CH_3O	Cl	>10 000	Not test	Not test
12	2-CF_3	Cl	>10 000	Not test	Not test
13	2-CH_3	Cl	>10 000	12	Not test
14	2-ph	H	>10 000	Not test	Not test
15	2-C_2H_5	Cl	180	5	14
16	2-CN	Cl	480	22	Not test
17	2-OH	Cl	1 300	Not test	Not test
18	2-$CONH_2$	Cl	370	Not test	Not test
19	2-CH_3O, 5-Cl	Cl	>10 000	120	0
20	2-O-ph-3′-F	Cl	60	8	0
21	2-H_2NCOO	Cl	80	29	48

Table 2 Potency and stability SAR at ring D

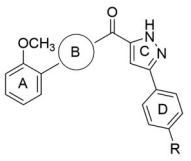


Compd.	R	hNK3R IC_{50}/nmol·L^{-1}	RLM $t_{1/2}$/min	Plasma stability/%
22	2-F	1 200	Not test	Not test
23	3-F	580	Not test	Not test
24	4-F	240	4	18
25	4-CF_3	42	5	55
26	4-OCF_3	130	5	59
27	4-CH_3	390	Not test	Not test
28	4-SO_2CH_3	2 500	Not test	Not test
29	4-CN	208	8	91
30	2,4-Cl_2	205	45	5
31	2-N	3 100	Not test	Not test
32	3-N	7 100	Not test	Not test
33	4-N	7 200	Not test	Not test
34	–	2 000	Not test	Not test
35	–	3 300	Not test	Not test

于甲基 (**27**) 大约 10 倍, 三氟甲氧基 (**26**) 虽然也拉电子但活性强于极性更强的**28**和**29**; ② 拉电子的**25**、**26**和**29**的血浆稳定性较高, 但大鼠肝微粒体的稳定性差, 而二氯取代的**30**提高了对微粒体的稳定性; ③ 吡啶、环己基和苄基 (**31**～**35**) 的活性都很低。

3.3 B环的变化 固定A环为2-甲氧基苯, C环为吡唑和D环为4-氯苯, 变化B环的化合物结构与活性列于表3。

Table 3 Potency and stability SAR at ring B



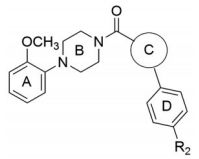
Compd.	B	R	hNK3R IC_{50}/nmol·L^{-1}	RLM $t_{1/2}$/min	Plasma stability/%
36		Cl	3 100	Not test	Not test
37		H	7 400	Not test	Not test
38		Cl	190	2	100
39		Cl	2 900	Not test	Not test
40		Cl	93	147	48

表3构效关系提示: ① 哌嗪环上引入羰基 (**36**) 活性下降, 提示不宜有 sp^2 杂化碳的存在; ② 甲酰基换作磺酰基 (**37**) 降低活性; ③ 哌嗪环2-位引入甲基以*S*构型为优映体 (**38**), 而且血浆稳定性较好; ④ 化合物**40**的二甲基提高了活性和肝微粒体代谢稳定性, 血浆稳定性也不错。

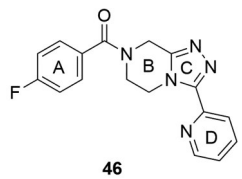
3.4 C环的变换 用甲基吡唑消除N-H氢键供体, 化合物**41**和**42**活性与**4** (表1) 相近, 而对肝微粒体和在血浆的稳定性显著提高, 而没有氢键供体的异噁唑**44**和**45**活性很弱 (表4), 说明甲基的存在有利于活性和稳定性, 推测是位阻和 (或) 疏水作用所致 (Hoveyda R, Roy MD, Blanc S, et al. Discovery of 3-aryl-5-acylpiperazinyl-pyrazoles as antagonists to the NK3 receptor. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21: 1991−1996)。

3.5 三唑并哌嗪系列的先导物 研制者在进行上述结构演化的同时, 又进行了普筛, 或许吸取了上述构效关系的启示, 设计出另一含有三唑并哌嗪母核的化合物**46**。细斟**46**的四环结构, 回顾前述的苗头演化的元件变迁, A和D环相对位置和取代基特征具有相似性, B和C环由羰基相连, 稠合成三唑并哌嗪, 羰基转为A和B环间的连接基。**46**成为先导化合物。

Table 4 Potency and stability SAR at ring C



Compd.	C	R	hNK3R IC_{50}/nmol·L^{-1}	RLM $t_{1/2}$/min	Plasma stability/%
41		Cl	180	44	100
42		Cl	180	40	100
43		Cl	280	17	100
44		H	>5 000	Not test	Not test
45		Cl	1 100	17	78

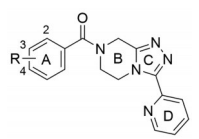


46

4 先导物优化

4.1 A环的变换 固定BCD环不变, 在A环作拉/推电子/疏水基团的变换, 合成的化合物活性和物化性质列于表5。

Table 5 SAR at ring A. a: LLE = pK_i−clog$P$; b: At pH 7.4 PBS buffer



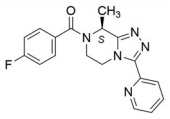
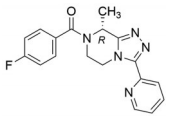
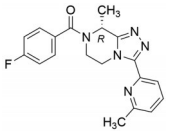
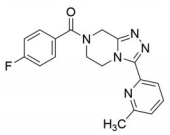
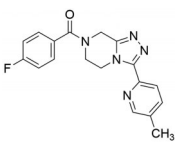
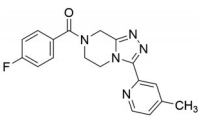
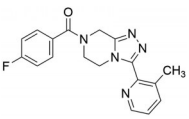
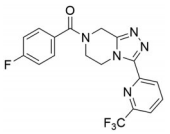
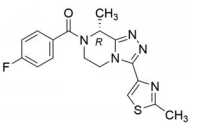
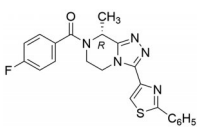
Compd.	R	pK_i	LLE[a]	clog$P$	Solubility /μmol·L^{-1} [b]
46	4-F	5.3	4.5	0.8	≥200
47	4-OCH_3	<4.5	<3.7	0.8	194
48	3-F	5.3	4.5	0.8	199
49	3-OCH_3	<4.5	<3.7	0.8	196
50	2-F	<4.5	<3.7	0.8	≥200
51	2-OCH_3	<4.5	<3.7	0.8	≥200
52	4-ph	5.9	3.4	2.5	28
53	4-ph-4′-F	5.7	3.0	2.7	10
64	4-ph-4′-Cl	5.3	2.0	3.2	5.3
55	4-ph-4′-OCH_3	<4.5	<2	2.5	6.4
56	4-CH_2-ph	<4.5	<1.8	2.7	169
57	4-(2-Thienyl)	6.3	3.9	2.4	12
58	4-(5-Me-furan-2-yl)	4.8	2.4	2.4	71

综述表5的构效关系, 苯环3或4位拉电子基团有利于活性, 而推电子的甲氧基不利, 2-位的拉/推电子都不利于活性, 可能邻位效应产生了不利于同受体结合的构象。联苯基化合物无论有无取代基, 活性有所提高, 推测是疏水结合所致, 但因分子的疏水性提高抵消了活性贡献, 使LLE下降, 因而联苯基**52**～**55**以及**56**不可取。而噻吩基**57**活性提高的幅度显著超越疏水因素, LLE值较高, 成为以后优化的参考。

4.2 B和D环的变换 固定A环为4-氟苯基, C环的三唑稠合于哌嗪环, 变换B和D环的化合物结构与活性等列于表6。

构效关系分析如下: ① 前述第3节的优化B和D

Table 6 SAR at rings B and D

Compd.	Structure	pK_i	LLE[a]	clog$P$	Solubility /μmol·L^{-1}
59		5.1	3.7	1.4	≥200
60		6.1	4.7	1.4	≥200
61		7.2	5.4	1.8	197
62		6.3	5.0	1.3	≥200
63		5.8	4.4	1.3	≥200
64		5.2	3.9	1.3	≥200
65		<4.5	<3.5	1.0	≥200
66		6.4	4.6	1.8	193
67		7.0	5.4	1.6	≥200
68		7.6	4.2	3.2	179

环已经发现哌嗪环的甲基引入有利于对hNK3受体的抑制活性, 化合物**60**比**46**多一个*S*-甲基, pK_i提高了0.8个log单位, LLE和溶解性也都有改善, 这个手性“魔甲基”的效应很显著, 造成活性次序是*S*-甲基 (**60**) > 无甲基 (**46**) > *R*-甲基 (**59**)。表6中D环吡啶的“魔甲基”也很重要, **63**与**46**的结构区别仅多一个甲基, pK_i提高了0.5单位, LLE略有降低是因为甲基增加了分子的疏水性缘故。② 吡啶环上取代基的电性变换对活性影响不显著, **66**拉电子的2-CF_3 (借用Hammet σ_p = 0.54)与**62**推电子的2-H (Hammet σt0) 的活性几乎相同, pK_i值只相差0.1, 提示吡啶环的电荷密度对活性影响不大, 因而可以改换杂环。③ 化合物**67**和**68**的D环为甲基噻唑和苯基噻唑, 活性的确显著提高。

4.3 固定A/B/C环优化D环 综合前述的构效关系, A和D环对活性的贡献主要是与受体的疏水性结合, 化合物**57**的高活性A环是2-噻吩基苯基, pK_i 6.3, 是该系列中活性最强的, 因而表7化合物固定A环为2-噻吩基苯, B/C环为*R*-甲基三唑并哌嗪, 变换D环为不同的杂环, 结构和活性列于表7。

分析构效关系如下: ① **70**与**69**的活性几乎相同, 说明2-甲基吡嗪与吡啶的极性变化对活性影响不大, 但因此LLE提高了0.9, 溶解性也有所改善。② 甲基噻唑 (**71**) 与**70**活性相同, 哌嗪上甲基的构型对活性影响与前述相同, **71** > **73** > **72**。③ 异丙基噻唑**75**的活性显著高于甲基噻唑**71**, 尽管疏水性增强, LLE却仍优于**71**, 只是溶解性差。异丙基噁唑**76**的活性和LLE皆优, 溶解性也优于**75**。④ 甲基噻二唑**79**的活性强于甲基噁二唑**78**近10倍, 虽然溶解性低1倍, 但LLE高于**78** (Hoveyda HR, Fraser GL, Roy MO, et al. Discovery and optimization of novel antagonists to the human neurokinin-3 receptor for the treatment of sex-hormone disorders (Part I). J Med Chem, 2015, 58: 3060−3082)。

4.4 A环的再优化 按照优化得到的A/B/D环或环上取代基作不同的组合, 新合成的化合物连同前述的**71**和**79**列于表8中, 鉴于都是优势组合, 又评价了化合物对细胞色素P450以及对hERG钾通道的抑制作用, 还计算了每个化合物中sp^3杂化碳的在非氢原子中的占比 (Fsp^3), 作为化合物刚性的量度, 数值越大, 分子柔性较高。

分析构效关系如下: ① **79**的D环为3-甲基-1,2,4-噻二唑, 活性比**71** 2-甲基噻唑高, 而且噻二唑的代谢稳定性高于噻唑, 然而**79**对hERG钾通道有一定的抑制作用。② **80**的A环为4-氟苯基, 虽然活性低于**79**, 但因疏水性低, LLE高于**79**。**80**的柔性优于**79**, **80**还显示对CYP和hERG的弱活性。③ **81**是2-甲基-1,3,4-噻二唑, 是**80**的区域异构体, 虽然疏水性低于**80**, 但因**81**活性显著下降, LLE值很低。**82**是2-甲基-1,3,4-噁二唑, 为**80**的O/S电子等排体, 活性锐减, 所以1,3,4-噁二唑不可取。④ **83**的D环有异丙基取代, 活性与**80**

Table 7 Further SAR on optimized compounds

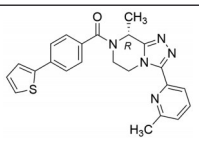
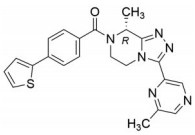
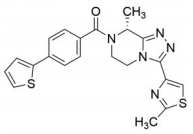
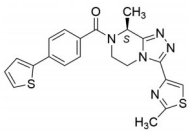
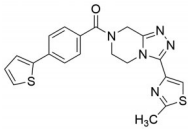
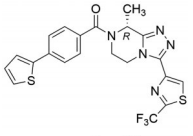
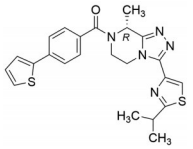
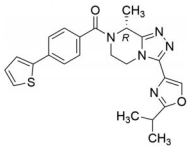
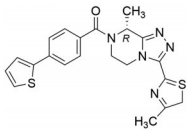
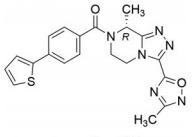
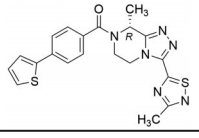
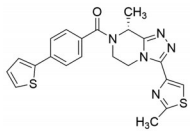
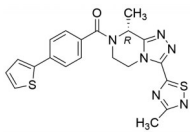
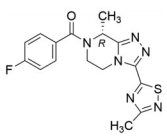
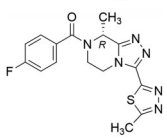
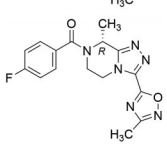
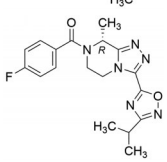
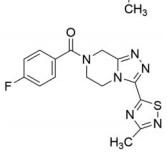
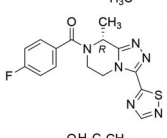
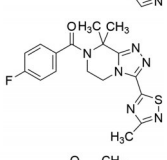
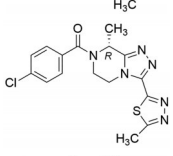
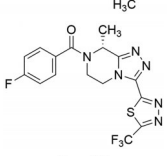
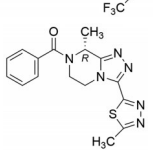
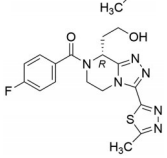
Compd.	Structure	pK_i	LLE	clog*P*	Solubility /μmol·L^{-1}
69		8.0	4.6	3.4	110
70		7.9	5.5	2.4	160
71		7.9	4.8	3.1	118
72		6.5	3.3	3.2	−
73		7.1	4.4	2.7	172
74		7.1	3.4	3.7	11
75		8.6	4.5	4.1	25
76		8.5	5.0	3.5	119
77		8.2	5.0	3.2	50
78		7.6	5.4	2.2	185
79		8.5	5.5	3.0	93

Table 8 Further optimization of ring A. a: Order of the values as CYP 3A4, 2D6, 2C9, 2C19, and 1A2, respectively

Compd.	Structure	pK_i	LLE	clog*P*	Fsp^3	CYP/IC$_{50}$/μmol·L^{-1a}	hERG/IC$_{50}$/μmol·L^{-1}
71		7.9	4.8	3.1	0.24	50/>100/21/34/26	24
79		8.5	5.5	3.0	0.24	79/39/13/19/67	8
80		7.6	6.1	1.5	0.31	90/>100/42/48/>100	>100
81		5.0	4.2	0.8	0.31	Not test	Not test
82		6.9	6.2	0.7	0.31	>100/>100/42/34/86	Not test
83		7.6	5.9	1.7	0.39	>100/>100/64/56/100	1.6
84		7.0	5.8	1.2	0.27	>100/>100/64/82/>100	50
85		5.9	4.8	1.1	0.27	Not test	Not test
86		6.7	4.7	2.0	0.35	>100/>100/12/4/51	Not test
87		7.7	5.7	2.0	0.31	>100/88/7/50/99	66
88		8.1	5.7	2.4	0.31	>100/>100/45/57/54	39
89		7.3	6.0	1.3	0.31	31/>100/12/17/64	50
90		7.5	6.5	1.0	0.35	>100/>100/77/54/>100	50

相同, 但疏水性过强消减了LLE, 对hERG也有一定的作用。⑤ 其他化合物或因D环上没有“魔甲基”, 或哌嗪环上偕甲基取代, 影响了活性。

表中列出化合物对NK3受体的抑制活性都较高, 所以评价了对影响药物代谢的细胞色素P450和钾通道的抑制活性, 成为取舍化合物的另外参数。

分析D环的结构与hERG活性的构效关系, 提示环上氢键接受体多和分子的疏水性强的化合物具有抑制hERG的趋势, 例如高活性的**79**和**83**对hERG的活性IC_{50}分别为8和1.6 μmol·L^{-1}, 有潜在的心脏毒性。

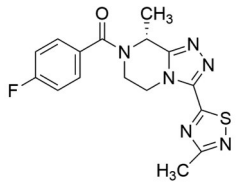
化合物**90**的2-羟乙基替换2-甲基, 活性和对CYP与hERG的数据都不错, 但被糖蛋白P_{gp}外排作用显著, 脑内水平低, 未予选取。

此外, 还体外测定对NK1和NK2受体的脱靶作用, 化合物**80**显示对NK3受体的选择性作用 (数据省略) (Hoveyda HR, Fraser GL, Dutheuil G, et al. Optimization of novel antagonists to the neurokinin-3 receptor for the treatment of sex-hormone disorders (Part II). ACS Med Chem Lett, 2015, 6: 736−740)。

5 候选化合物的选定和非唑内坦的批准上市

5.1 血浆和脑内游离分子的重要性 基于疗效取决于药效/药代 (PD/PK) 的综合影响 (Trainor GL. The importance of plasma protein binding in drug discovery. Expert Opin Drug Discov, 2007, 2: 51−64), 对高活性和低脱靶作用的化合物测定了Caco-2细胞透过性、大鼠和猴血浆中化合物总浓度 (结合+游离态) 和游离态浓度及脑中化合物总浓度和游离态浓度、清除率、分布容积、半衰期和生物利用度等, 还根据大鼠和猴灌胃给药测定血浆和脑中促黄体生成素 (LH) 被抑制的活性 (数据省略), 发现化合物**80**的PD/PK/脱靶作用等显示最佳参数, 确定为候选化合物, 定名非唑内坦 (fezolinetant)。

5.2 非唑内坦上市和适应症 经系统的临床前和临床研究, 表明由Astellas公司研制的非唑内坦是一种口服小分子神经激肽3受体 (NK3R) 拮抗剂, 用于治疗中度至重度血管舒缩综合征 (VMS) 或更年期潮热, 为首创的非激素类型的药物 (FIC), 于2023年在美国批准上市。



Fezolinetant