•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。

激肽释放酶−激肽系统 (K-K 系统) 是机体的一个重要的体液调节网络。它参与循环、血液凝固、水盐代谢、免疫活动和维持许多器官的功能。作为罕见病的遗传性血管性水肿是由于K-K 系统异常所致, 血浆激肽释放酶 (PKa) 和 (或) C1 酯酶抑制蛋白 (C1-INH) 的异常表达。本品作为针对血液中 PKa 抑制剂, 由于与血液中许多酶都属于丝氨酸蛋白酶家族, 选择性作用是研制的关键所在。本品是作用于PKa、预防和治疗遗传性血管性水肿的首创性药物, 研制的要点是选择性作用和口服吸收的药代环节, 基于靶标蛋白结构的设计与药物化学的构效关系研究相结合是研制的路径。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1122

首创的防治遗传性血管性水肿病药物贝罗司他的研制

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

遗传性血管性水肿 (HAE) 是一种罕见的遗传性疾病, 发病率约为五万分之一。该疾病以皮肤、胃肠道、四肢及上呼吸道突发严重肿胀, 以至于危及生命。其病因是 SERPING1 基因突变, 所编码的蛋白酶 C1 酯酶抑制剂 (C1-INH) 表达异常。C1-INH 是一种蛋白, 作为一种丝氨酸酶抑制物, 抑制血浆激肽释放酶 (PKa) 的活性, 从而介导生成缓激肽, 使血管通透性增加和肿胀。缓激肽由高分子量缓激肽原产生, 是通过 PKa 催化发生的, 所以, PKa 成为 HAE 发作的核心介质。图 1 是血浆激肽释放酶原 (PK)、PKa、高分子量缓激肽 (HK) 和缓激肽 (BK) 与 C1-INH 之间相互制约的生化过程示意图, 可以看出 HAE 是通过 PKa 介导发生与发作的, 因而蛋白酶 PKa 成为研制治疗和预防 HAE 的药物靶标。

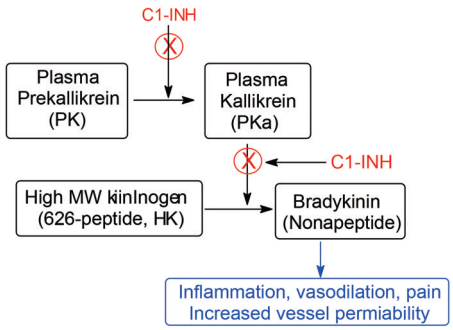


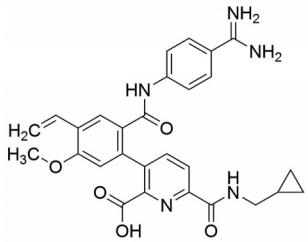
Figure 1 Diagram of productions of plasma kallikrein and bradykinin

2 前期研发的启示

目前 HAE 尚无根治手段, 临床治疗是对急性发作期按病情治疗和预防性治疗, 已获批用于治疗和预防的都是多肽或蛋白类药物, 例如有拉那芦单抗 (Lanadelumab, Takhzyro)、皮下注射 C1 酯酶抑制剂海格达 (Haegarda) 和静脉注射 C1 酯酶抑制剂冻干剂 Cinryze 等, 由于都是注射或输注给药的生物制剂或多肽药物, 患者依从性较差, 而口服用药是个理想途径。

美国 BioCryst 公司曾研究 PKa 抑制剂得到高活性化合物阿伏司他 (**1**, avoralstat, BCX4161), 与靶标蛋白 PKa 的结合力很强, K_i = 0.000 26 μmol·L^{-1}, 由于化学结构中含有碱性的脒基和酸性的羧基 (许多抗凝/抗血栓药物, 靶标属于丝氨酸蛋白酶, 往往含有这两性基团), 两性离子导致生物利用度欠佳, **1** 曾进入 III 期临床试验, 但未成功 (Kotian PL, Krishnan R, Rowland S, et al. Design, parallel synthesis, and crystal structures of biphenyl antithrombotics as selective inhibitors of tissue factor FVIIa complex. Part 1: exploration of S2 pocket pharmacophores. Bioorg Med Chem, 2009, 17: 3934−3958)。

图 2 是阿伏司他 (**1**) 分子对接到 PKa 活性中心的结合模式, 分子中带负电荷羧酸根结合于连接 His57 和 Gly193 残基的氧阴离子空腔。乙烯基进入由 Tyr94、Asp59、Gly99 和 Ser214 侧链形成的表浅的 S2 疏水腔内。末端环丙基嵌入由 Phe143、Ile151 和 Leu41 (S′结构



1

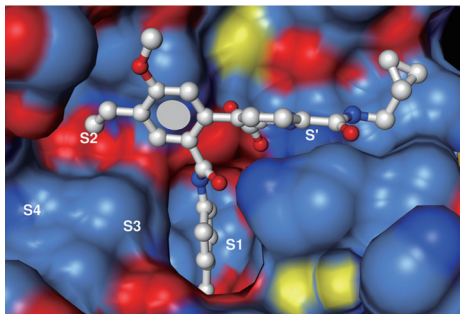


Figure 2 Compound **1** docking in PKa with the benzamidine occupying the S1 pocket, the vinyl group in the S2 pocket, and the terminal cyclopropyl in the S′ pocket

域) 形成的疏水腔中。正电荷苄脒基团与 Asp189 的末端羧基形成盐桥, **1** 的溶解度低和吸收性能差。本项目的目标是避免两性离子改善溶解性和吸收性, 但并不是对上述作结构优化和改造。

3 起始于苯脒的变换

文献中报道丝氨酸蛋白酶抑制剂结构中的苯脒是常见片段, 研制者用苄胺替换苯脒, 是由于苯脒与苄胺的 pK_a 分别为 10.5 和 8.8, 比较接近, 而且形状也有类似性, 有文献证明丝氨酸蛋白酶凝血因子 Xa (FXa) 抑制剂中的苯脒换作吡唑基苄胺仍保持活性 (Pinto DJ, Smallheer JM, Cheney D, et al. Factor Xa inhibitors: next-generation antithrombotic agents. J Med Chem, 2010, 53: 6243−6274), 说明替换的可能性, 因而 Bio-Cryst 公司在蛋白数据库 (PDB) 中搜寻含有吡唑基苄胺片段的分子与丝氨酸蛋白酶的晶体结构, 发现吡唑基苄胺确实处于活性中心的 S1 结构域。遂首轮合成并评价了表 1 化合物的活性。

化合物 **4** 是在化合物 **3** 的 C5 位引入了羧基, 活性提高 65 倍。为解释 **4** 的增强机制, 分子对接提示, **4** 在 PKa S1 腔中发生互作: 质子化的苄氨基与 Asp189、Gly219 和 Ala190 形成氢键, 吡唑环上的三氟甲基与二硫键 (Cys191-Cys220) 形成堆积作用。羧基与 Gly216 的羰基处于氢键结合距离, 取代了原本占据该位置的水分子。羧基经苯胺酰胺化, 消除了负电荷, **5** 和 **6** 的活性变化不大, 但多一个苯环的联苯胺活性却显著提高, 例如联苯衍生物 **7** 和 **8** 的 IC_{50} 值分别提高了 8 倍和 27 倍, 活性的增强源于联苯结构填充了 PKa 的 S3 和 S4 腔穴 (图 3 紫色结构为化合物 **7**), 而化合物 **5** 仅有的苯

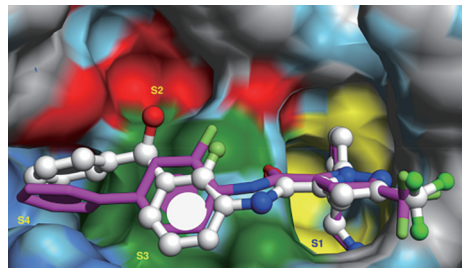
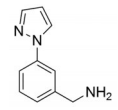
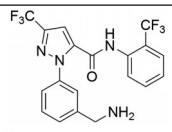
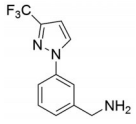
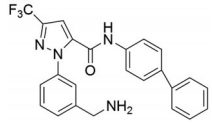
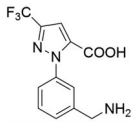
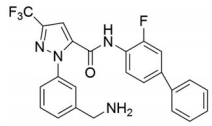
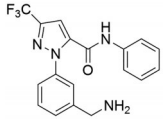
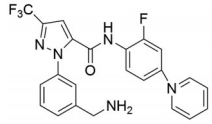


Figure 3 Superposition of modeled compounds **7** (magenta) and **14** (white) in the PKa active site. Compound **13** provided a handle to reach into the S2 site

Table 1 PKa potency for pyrazole-based benzylamine compounds

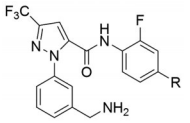
Compd.	Structure	PKa/ IC_{50}/μmol·L^{-1}	Compd.	Structure	PKa/ IC_{50}/μmol·L^{-1}
2		3 400	**6**		27.3
3		1 000	**7**		2.9
4		15.4	**8**		1.02
5		22.6	**9**		7.5% inhibition at 5 μmol·L^{-1}

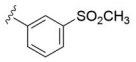
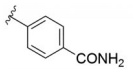
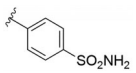
基只能触及S3腔。换成苯基哌啶环**9**活性显著降低。

4 结构优化

4.1 变换联苯片段的构效关系 以化合物**7**为新的起点, 开展SAR研究, 化合物结构与活性列于表2。在端基苯环基间位引入甲磺酰基化合物**10**, 活性与**7**相当; 而在对位引入磺酰胺或酰胺基团 (**11**和**12**) 活性提高3倍。分子模拟显示**11**和**12**中对位基团深埋于S4腔内, 而化合物**10**间位的甲磺酰基朝向溶剂区域, 对结合没有贡献。此外, 较小的环丙基化合物**13**活性提高2倍。

Table 2 SAR exploration of the substituent at biphenyl ring



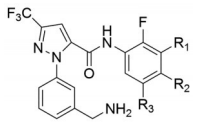
Compd.	R	PKa/ IC_{50}/μmol·L^{-1}
10		1.229
11		0.395
12		0.395
13		0.577
14		1.0

重要的是化合物**14**, 它不是共轭的联苯基, 而是由羟甲基桥连接两个苯环, 从而增加了分子的柔性, 图3是化合物**14** (白色) 和**7** (紫色) 与PKa分子对接的叠合图, 羟基突入S2腔内。虽然联苯基变换成二苯羟甲基失去了部分活性, 但可与S2/S3/S4三个腔穴结合, 开辟了优化的新路径。

4.2 连接二苯基的含氧原子片段的位置变换 表3中羟甲基苯的取代基分别为R1、R2和R3, 其中**15**的活性最强, 提示这样的位置配置与PKa活性中心的结合力最强, 与酰氨基对位的**14**活性最弱, **16**的活性居中。若羟基换作环丙甲氧基连接于不同的位置, 化合物**17**～**19**的活性普遍提高, 尤其是**19**的活性最强, 比**14**提高了110倍。

4.3 环丙甲氧基链的变换 变换环丙甲氧基片段成简单的甲氧基、乙氧基或环丙甲氨基, 表4列出化合物**19**～**22**的活性, 还测定了在血浆存在下化合物的抑制强度 (PKa^{plasma}, 模拟口服吸收后的内环境), 结果表明, **22**强于**19**的活性14倍, 而且更拉大了与甲氧基和乙氧基的活性差距。含有氨基侧链的**22**是优化出的强效化合物。

Table 3 SAR of oxygen-containing moiety with different position



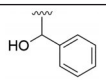
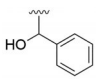
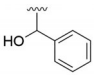
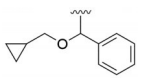
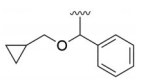
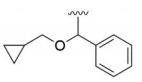
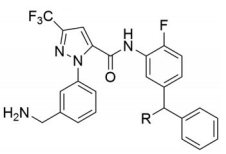
Compd.	R_1	R_2	R_3	PKa/ IC_{50} /μmol·L^{-1}
15		H	H	0.149
14	H		H	1.0
16	H	H		0.710
17		H	H	0.037
18	H		H	0.651
19	H	H		0.006 4

Table 4 SAR upon replacement of the hydroxyl group of compound **16**

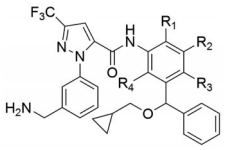


Compd.	R	PKa/ IC_{50}/μmol·L^{-1}	PKa^{plasma}/ IC_{50}/μmol·L^{-1}
19		0.006 4	0.287
20		0.231	Not test
21		0.134	1.280
22		0.009	0.019

4.4 氟原子的位置优化 为考察氟原子的位置对活性的影响, 以**19**为中心, 即固定环丙甲氧苄基在酰氨基的间位, 变换氟原子的位置或去除氟原子, 合成的化合物列于表5。结果表明氟原子处于R1的位置 (**19**) 活性最强。

4.5 优化药代和物化性质 以化合物**22**为模版, 优化结构以增加吸收性, 对末端苯环作修饰, 合成的化合物列于表6。表中的化合物 (混旋物或光活物) 还测定了大鼠灌胃的 C_{max} 和AUC等药代性质 (数据从略)。拆分**22**发现 (−)-对映体 (**22a**) 活性强于 (±)-混旋体和 (+)-对映体, 提示苯基的空间取向对活性有显著影响。

Table 5 SAR of the position of fluorine atom to different positions at the benzene ring



Compd.	R_1	R_2	R_3	R_4	PKa/ IC_{50}/μmol·L^{-1}	PKa^{plasma}/ IC_{50}/μmol·L^{-1}
23	H	H	H	H	0.037 4	0.300
19	F	H	H	H	0.006 4	0.287
24	H	F	H	H	0.100	> 1.0
25	H	H	F	H	0.708	> 1.0
26	H	H	H	F	0.037 4	> 1.0

以不同位置连接的吡啶置换苯基 (**27**～**29**) 活性与 **22** 相近, 但大鼠药动学性质不如 **22**。3-氰基苯 (**30**) 的活性与 **22** 相当, 拆分后的 (+)-对映体活性强于 (±)-混旋体和 (−)-对映体, **30** 的优映体构型与 **22** 相反。

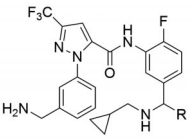
5 候选物的确定和贝罗斯塔批准上市

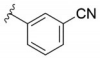
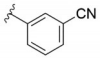
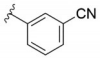
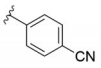
30a 灌胃大鼠 10 mg·kg^{-1}, 呈现良好的药代动力学特征, 血药浓度峰值 242 ng·mL^{-1}, 24 h 药时曲线下面积 2 210 h·ng·mL^{-1}, 因此选作临床候选药物, 定名为贝罗司他 (berotralstat, 代码 BCX7353), 经系统临床前实验进入临床阶段, 表明 **30a** 可预防 12 岁以上成人和儿童患者的遗传性血管性水肿的发作, 作为首创性药物于 2020 年经 FDA 批准上市 (Kotian PL, Wu M, Vadlakonda S, et al. Berotralstat (BCX7353): structure-guided design of a potent, selective, and oral plasma kallikrein inhibitor to prevent attacks of hereditary angioedema (HAE). J Med Chem, 2021, 64: 12453−12468)。

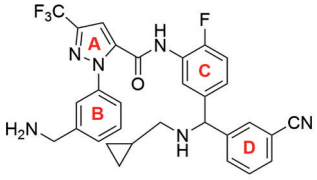
6 贝罗司他与 PKa 蛋白的结合模式

贝罗司他与 PKa 复合物晶体结构显示 (图 4), 分子是以延展的“L”型构象结合于 PKa 活性中心, 其中苯基吡唑嵌入 S1 腔内, 分子其余部分填充 S2、S3 和 S4 结构域。质子化的苄胺基与 Asp189、Ala190 及 Gly219 形成氢键网络, 连接 A 环和 C 环的酰胺羰基氧原子与 Gly216 残基的主链氮原子形成氢键。C 环、D 环以及连接环丙基的 CH_2NH_2 片段以“Y”形构象跨越 S3、S4 和 S2 区域, 其中 C 环及连接的手性碳原子堆叠在 Trp215 残基侧链原子的上方。C 环的氟原子位于活性中心之外, 暴露于溶剂中, D 环上的氰基经 2 个水分子介导, 分别与 Lys175 的羰基氧和-CH_2-NH_2-的氮原子形成氢键网络。

Table 6 SARs upon introduction of nitrogen or nitrile to the terminal benzene ring of compound **22**



Compd.	R	PKa/ IC_{50}/μmol·L^{-1}	PKa^{plasma}/ IC_{50}/μmol·L^{-1}
22 (±)-		0.009	0.019 1
22a (−)-		0.001 2	0.008 51
22b (+)-		0.024	0.115
27		0.010 4	0.026 7
28		0.01	0.01
29		0.005 2	0.016 7
30 (±)-		0.001 8	0.014
30a (+)-		0.000 88	0.005 8
30b (−)-		0.013 9	0.048 1
31		0.007 2	0.019



Berotralstat

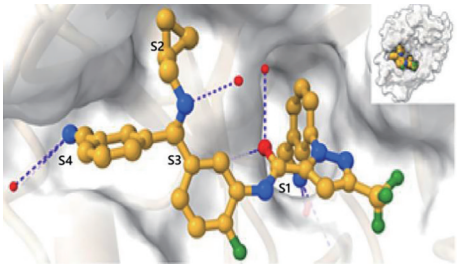


Figure 4 X-ray cocrystal structure of PKa with berotralstat bound to the active site of the serine protease domain of PKa