•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。

本刊于2026年第4期刊登了首创的口服治疗遗传性血管性水肿药物贝罗司他, 本品是第2个上市药物, 相隔5年, 意味着并非跟随性创制。体现在本品不含有贝罗司他碱性氨基的片段, 而是以近于中性的基团充满了PKa的S1腔, 既满足了高活性, 也有利于口服吸收。本品的研制是以基于靶标结构的设计和药物化学构效关系相结合的过程, 体现在P1和P4精雕细刻的结构优化。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1160

新型口服治疗遗传性血管性水肿病药物塞贝特拉斯他的研制

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

1.1 遗传性血管性水肿病 遗传性血管性水肿 (HAE) 是一种罕见遗传性疾病, 患者身体的不同部位会出现疼痛性肿胀, 当肿胀发生在上呼吸道时可能危及生命。本案例就是研制治疗HAE的化学药物, 研制依据是对该疾病发生的分子机制进行干预。

HAE的发生与发作源于遗传因素, 与表达的血浆激肽释放酶 (plasma kallikrein, PKa) 活性失控以及缓激肽 (BK) 生成密切相关。此外, 也与内源性蛋白C1酯酶抑制剂 (C1-INH) 的调节有关, C1-INH是PKa的主要生理性抑制剂。

1.2 血浆激肽释放酶−激肽系统 人血浆中有许多蛋白酶在凝血、纤溶、引发炎症和疼痛等生理/病理过程中起重要作用, 其中凝血因子XII和XIIa蛋白不仅是凝血级联反应的导火索, 而且XIIa还启动了血浆激肽释放酶−激肽系统 (KKS), 催化血浆前激肽释放酶 (PK) 水解切割成活化态的PKa, 后者又将高分子量的缓激肽原 (HK, 626肽) 转化为九肽的BK, BK具有多种生理功能, 比如引起血管舒张、增加血管通透性、诱发炎症和疼痛等。由凝血因子激活得到PKa又催化XII转化为XIIa, 形成了正反馈的激活效应。

1.3 C1-酯抑制蛋白 血浆中存在的C1-INH是人体免疫和炎症系统的重要蛋白, 主要在肝脏中合成, 属于“丝氨酸蛋白酶抑制剂”家族, 作为一种内肽酶, 能水解蛋白质的一些肽键, 生成较小的蛋白质或多肽分子。C1-INH对上述的血浆激肽释放酶−激肽系统多个环节具有抑制调节作用, 既抑制PK转变为PKa, 也抑制HK水解成BK, 还抑制PKa反馈激活XII的转化。图1是上述级联/抑制过程的示意图。由SERPING1基因突变引起的C1-INH缺陷是导致最常见HAE类型的主要原因, 但HAE也可在C1-INH活性正常的情况下发生, 研究证实即使C1-INH活性正常的HAE患者PKa在发病过程中起关键作用。

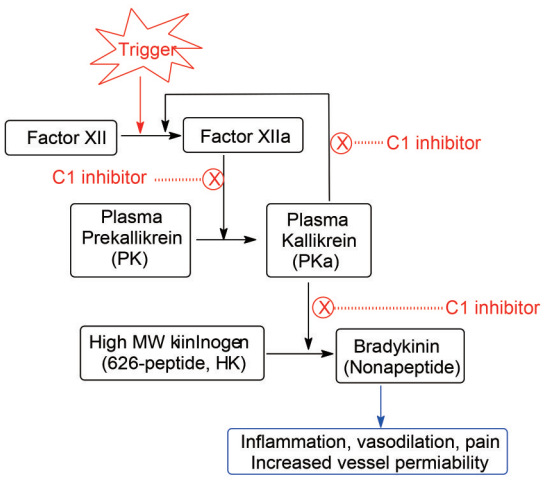


Figure 1 Diagram of productions of plasma kallikrein and bradykinin

本案例的目标是研制血浆激肽释放酶抑制剂, 阻断其对高分子量激肽原发生裂解, 以减少缓激肽的生成, 还能抑制血浆激肽释放酶对KKS的正反馈, 减少凝血因子XIIa和新的PKa生成, 从而提高治疗效果。

2 活性测定

为了测定化合物对离体人源PKa抑制活性, 将受试物与人源PKa蛋白温孵5 min, 用荧光光度法测定荧光底物裂解的动力学评价酶活性。PKa酶活性采用H-D-Pro-Phe-Arg-AFC作为底物进行测定。通过四参数剂量–反应曲线对标准化荧光增长率进行拟合, 计算受试物的IC_{50}值, IC_{50}值越低表明活性越强。

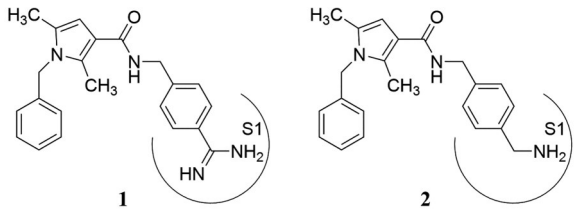
测定候选化合物的选择性作用, 是对一组丝氨酸蛋白酶催化作用的影响, 受试物经与蛋白酶温孵5 min后, 分别加入各蛋白酶特异性荧光底物, 测定荧光强度, 通过四参数剂量–反应曲线对标准化荧光增长率进行拟合, 从而计算IC_{50}值, IC_{50}值越高表明选择性越强。

3 PKa的结构特征

PKa的活性位点包含多个亚位点, 这些亚位点采用Schechter和Berger命名的S1、S2等表示, P1、P2等表示占据对应亚位点的配体基团或片段 (Schechter I, Berger A. On the active site of proteases. Biochem Biophys Res Commun, 1967, 27: 157–162)。PKa属于胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶家族, 该家族对赖氨酸或精氨酸等带正电荷氨基酸的特异性识别, 是由位于S1腔穴底部的Asp189驱动的, 天冬氨酸的负电荷与带正电荷氨基酸形成强效静电相互作用。设计PKa抑制剂需在P1处有碱性基团以结合于S1腔, 但碱性基团往往对口服生物利用度产生不利影响。本研究的目标之一是降低或避免碱性基团。

4 线索–苗头–先导物

研制者从专利中发现化合物**1**具有很强的PKa抑制活性 (Inhibitors of plasma kallikrein. WO 2008/016883; Chilcote TJ, Sinha S. ASP-634: An oral drug candidate for diabetic macular edema. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53: 2240), IC_{50} = 4.4 nmol·L^{-1}, 配体效率LE高达0.43 (LE = 1.37 pK_a/$N_{非氢原子数}$), **1**的pK_a 11.6, 碱性的苯脒应是结合S1腔的P1结构, 为降低碱性以有利于药代, 将苯脒换作苄胺化合物**2**, pK_a 9.1, IC_{50} = 3 700 nmol·L^{-1}, LE = 3.1, 可以看到伴随分子的碱性减弱, 活性和配体效率显著降低。研制者以苄胺**2**为苗头化合物, 变换分子的另一端, 是延长N-苄基片段, 因为**1**的苄基没有触及到S4结合腔底部。

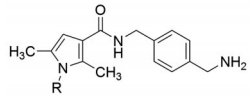


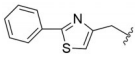
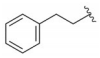
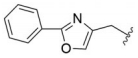
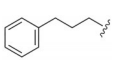
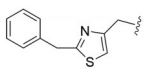
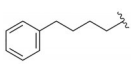
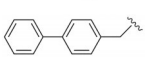
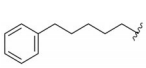
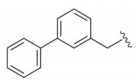
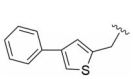
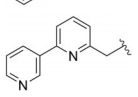
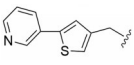
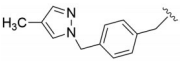
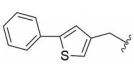
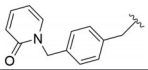
1 **2**

5 苄基的变换和取代

吡咯的N-苄基用噻吩甲基置换, **3**的活性与**2**相近, 是由于苯和噻吩的尺寸和物理性质相似的缘故。不同长度的N-苯烷基 (C_2～C_5) 置换, 以苯丁基 (**6**) 活性最好。苯基替换丁基 (对位长度相近, 是药物化学常用的环–链替换), 联芳基或芳甲芳基化合物**9**～**18**中3个化合物**11**、**17**和**18**的活性显著提高 (表1)。

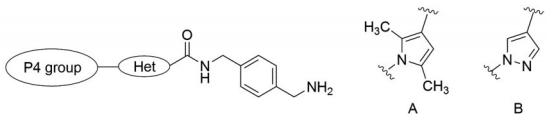
Table 1 Exploration of the S4 pocket for potency

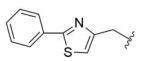
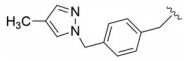
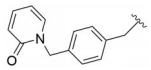


Compd.	R	IC_{50}/nmol·L^{-1}	Compd.	R	IC_{50}/nmol·L^{-1}
3		2 700	**11**		72
4		> 10 000	**12**		480
5		4 800	**13**		2 700
6		920	**14**		5 600
7		3 800	**15**		730
8		570	**16**		580
9		440	**17**		65
10		600	**18**		110

专利还报道了**1**的2,5-二甲基吡咯片段若被吡唑置换, 活性虽然有所损失, 但配体效率变化不大, 意味着分子尺寸减小有利于药代和物化性质, 从而将**11**、**17**和**18**的二甲基吡咯用吡唑替换, 得到的**19**～**21**, 活性与化合物效率列于表2。SAR显示, **19**的活性降低, **20**和**21**的活性都因改成吡唑环连接而活性提高, 尤其是**21**活性非凡, 配体亲脂性效率LLE (LLE的定义是p*K*a − pLog*P*) 高达7.1, 提示吡啶酮与吡唑的二环搭配是优化结构。

Table 2 P4 and core modifications for PKa potency optimization



Compd.	P4 group	Het	IC_{50} /nmol·L^{-1}	LE	LLE
11		A	72	0.32	3.4
19		B	850	0.29	3.7
17		A	65	0.30	3.8
20		B	11	0.36	5.7
18		A	110	0.29	4.1
21		B	4.4	0.37	7.1

6 P1处苯环的取代

为了降低伯胺的碱性, 使P1呈中性或弱碱性, 研制者在ZINC片段数据库设计了一个酰胺库, 筛选分子量小于250的伯胺, 通过理化性质、与PKa抑制剂P1基团的形状叠合及分子对接实验进行过滤, 最终获得140种胺类化合物, 进行平行合成。

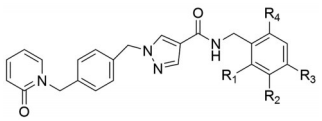
在96孔板初筛化合物采用1 000和100 nmol·L^{-1}单浓度双次测定活性。在1 000 nmol·L^{-1}抑制率超过70%且100 nmol·L^{-1}抑制率超过30%的化合物, 测定IC_{50}。发现P1没有碱性基团的取代苯环也具有抑制活性, 表3选取部分构效关系数据以展示取代基及其位置对抑制率的影响。无取代基化合物**22**在1 000和100 nmol·L^{-1}浓度下抑制率均较低 (< 30%)。间甲氧基化合物**28**和对甲基化合物**31**的IC_{50}分别为90和88 nmol·L^{-1}, 配体效率达0.31和0.32。

SAR还提示邻位−邻位 (R_1和R_4) 双取代类似物**33**～**38**比单邻位取代物**26**～**29**活性显著提升。例如2-F-6-CF_3双取代物**35**的IC_{50}为7.8 nmol·L^{-1}, LE = 0.32。这两个邻位取代基的变换似乎未产生显著影响。该构效关系在获得晶体结构前难以合理解释, 但可能表明S1腔中对邻位双取代苯环存在构象偏好, 或是苯环上取代基通过协同效应与S1中的不同相互作用位点发生了接触。

7 吡唑和P1片段同时优化

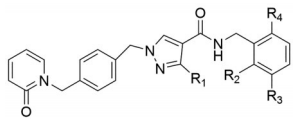
这一节的优化是在保持活性的前提下改善药代性质。吡唑甲酰氨片段是个极性片段, **38**的活性很高, 但过膜性能很差, 若在酰基的邻近增加基团, 空间上遮盖了-C(O)-NH-氢键给体, 可提高脂溶性, 有利于穿越脂质细胞膜; 与此同时变换末端苯环三个位置的取代基, 合成的化合物结构、活性和药代/物化性质列于表4。当吡唑3-位引入甲氧甲基, **39**的活性基本未变, 而过膜性提高了5倍。苯环的两个邻位基团R_2和R_4存在取代基都有较强活性, 单取代的**41**～**43**虽也有较好活性, 但**44**～**46**活性很差, 或许是R_3极性强 (形成氢键)

Table 3 Selected SAR from the P1 group library



Compd.	R_1	R_2	R_3	R_4	Inhibition/%		IC_{50}/nmol·L^{-1}	LE
					1 000 nmol·L^{-1}	100 nmol·L^{-1}		
22	H	H	H	H	29	0	Not test	−
23	F	H	H	H	59	13	Not test	−
24	Cl	H	H	H	67	12	Not test	−
25	CH_3	H	H	H	62	12	Not test	−
26	OCH_3	H	H	H	63	11	Not test	−
27	H	Cl	H	H	74	20	Not test	−
28	H	CH_3	H	H	57	11	Not test	−
29	H	OCH_3	H	H	83	35	90	3.1
30	H	H	Cl	H	60	13	Not test	−
31	H	H	CH_3	H	84	36	88	3.2
32	H	H	OCH_3	H	72	17	Not test	−
33	F	H	H	F	88	47	62	3.2
34	F	H	H	Cl	92	61	31	3.3
35	F	H	H	CF_3	97	83	7.8	3.2
36	Cl	H	H	Cl	94	56	41	3.1
37	CH_3	H	H	CH_3	89	53	68	3.1

Table 4 Selected SARs from substituted phenyl P1 groups



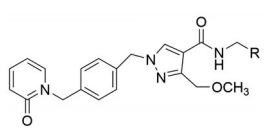
Compd.	R_1	R_2	R_3	R_4	IC_{50}/nmol·L^{-1}	Caco-2 P_{app}×10^{-6}cm·s^{-1}	HLM CL/μL·min^{-1}·mg^{-1}	cLog*P*	LLE
38	H	F	OCH_3	F	3.0	3.2	36	2.4	6.1
39	CH_2OCH_3	F	OCH_3	F	6.0	18	92	2.8	5.4
40	$CH_2N(CH_3)_2$	F	OCH_3	F	6.3	14	280	2.4	5.8
41	CH_2OCH_3	F	OCH_3	H	17	25	45	2.6	5.2
42	$N(CH_3)_2$	F	OCH_3	H	73	23	120	2.7	4.4
43		F	OCH_3	H	23	24	170	3.2	4.4
44	CH_2OCH_3	F	OH	H	440	Not test	Not test	2.2	4.2
45	CH_2OCH_3	F	CH_2CH_3	H	140	Not test	Not test	3.2	3.7
46	CH_2OCH_3	F	$OCHF_2$	H	150	Not test	Not test	2.6	4.2
47	CH_2OCH_3	F	OCH_3	Cl	5.5	93	120	3.4	4.9
48	CH_2OCH_3	F	OCH_3	CN	1.0	14	58	2.1	6.9
49	CH_2OCH_3	H	OCH_3	F	35	Not test	Not test	2.4	5.1
50	CH_2OCH_3	CHF_2	OCH_3	F	6.8	11	100	3.1	5.1

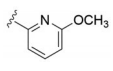
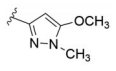
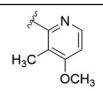
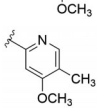
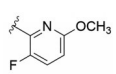
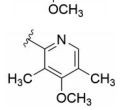
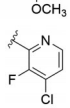
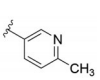
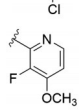
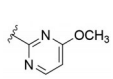
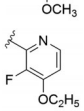
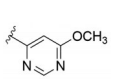
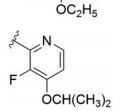
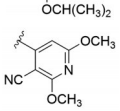
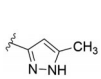
或体积较大的原因。综合评价性质**39**和**48**是基团配置优良的化合物。

8 P1苯环的杂环变换和候选物的确定

至此, P1已由碱性的苄胺演化成2,6-二取代苯基, 说明P1对活性有较大的化学空间, 因此在固定吡唑环有甲氧甲基的取代和P4的吡啶酮前提下, 以中性或弱碱性芳杂环代替苯环, 以提高化合的溶解性, 合成的化合物和活性列于表5。

Table 5 Selected SARs from substituted heterocyclic P1 groups



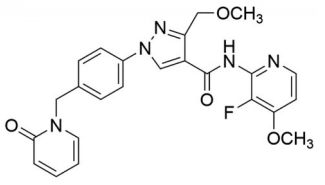
Compd.	R	IC_{50}/nmol·L^{-1}	Compd.	R	IC_{50}/nmol·L^{-1}	Compd.	R	IC_{50}/nmol·L^{-1}
51		3 700	**60**		460	**69**		4.1
52		3 000	**61**		210	**70**		3 200
53		460	**62**		900	**71**		37
54		4 200	**63**		160	**72**		93
55		7 900	**64**		2 200	**73**		6.0
56		2 500	**65**		250	**74**		7.9
57		2 300	**66**		900	**75**		2 400
58		570	**67**		140	**76**		160
59		220	**68**		300			

结果显示所有化合物都有不同程度的活性。含有五元环的吡唑和噻吩环的化合物**58**～**61**呈现中等强度活性。六元环系包括吡啶和嘧啶类结构, IC_{50}值范围在6.0至7 900 nmol·L^{-1}。提示对结构有严格的限制性, 其中连接在2-位且具有4-甲氧基的吡啶化合物**69**、**73**和**74**活性最强, IC_{50}值小于10 nmol·L^{-1}。而异丙氧基取代的**75**活性显著降低 (2 400 nmol·L^{-1}), 表明S1结合腔的空间不大。

进一步比较高活性化合物药代动力学性质, 发现表观渗透系数 (表征过膜性) 和人肝微粒体清除率 (HLM CL) 与化合物的亲脂性 (cLog*P*) 有密切相关性, cLog*P*值为1.8的**73**具有最低清除率 (数据省略)。大鼠和犬体内药代动力学实验也表明**73**具有良好的性质, 从而确定为候选物, 定名为塞贝特拉斯他 (sebetralstat, 编号KVD-900), 经临床前和临床试验, 表明口服可有效治疗遗传性血管性水肿急性发作, 美国FDA于2025年7月批准上市。

9 塞贝特拉斯他与靶标PKa的结合模式

图2是塞贝特拉斯他与PKa复合物晶体结构图, 结合特征简述如下: ① **73**以U形构象结合于S1～S4腔内, 处于S1腔的3-氟-4-甲氧基吡啶的P1片段不存在强碱性, 所以没有与Asp189形成盐桥的条件, 并且在S1腔内没有发现其他的极性相互作用, 4-甲氧基取代基占据了底部的疏水腔。3-氟-4-甲氧基吡啶片段精准适配S1腔, 是对结合能的重要贡献, 从而不需要与Asp189产生离子相互作用。② 酰氨的-NH-与Ser214骨架C=O形成氢键, 羰基与Lys192末端的NH_3^+也是氢键结合。吡啶酮羰基与Gly99骨架N-H形成氢键。③ 至少有3个位点发生面−面π-π堆积作用: 吡唑环与His57的咪唑环, 苯环与Trp215的吲哚环, 以及末端吡啶酮与Tyr174的苯基都分别发生π-π堆积而增强结合。



Sebetralstat

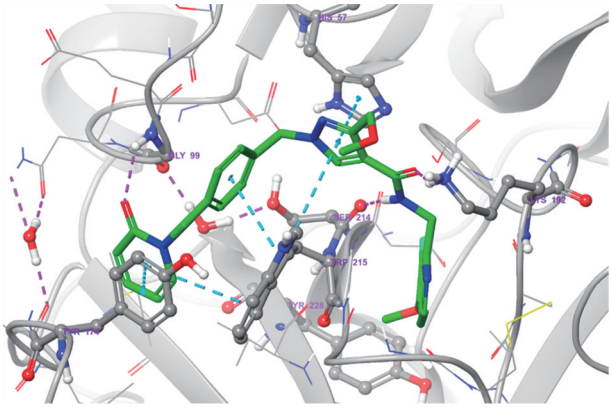


Figure 2 Crystal structure of sebetralstat complex with PKa (PDB code 8A3Q)