

## • 专家论坛 •

## 2018年首创性小分子药物研究实例浅析

王磊<sup>1,2</sup>, 姜正羽<sup>1,2</sup>, 尤启冬<sup>1,2\*</sup>

(中国药科大学 1. 江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 2. 药学院药物化学系, 江苏 南京 210009)

**摘要:** 首创性 (first-in-class) 药物是使用全新的、独特的作用机制或靶向于某个全新的候选靶标来治疗某种疾病的药物, 其研发理念和过程不同于跟随性药物 (me too, me better)。2018年, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 共批准上市了 59 个全新药物, 打破了 1993 年批准 53 个新药的历史记录。获批的新药中, 小分子药物以 64% 占据较大比例。在获批的 34 个小分子新药中, 有 9 个是首创性的小分子药物, 这对后续的药物研发具有里程碑式的重要意义。其中包括全球首个作用于 Hedgehog 信号通路的 Smo 小分子抑制剂格拉德吉; 首个靶向于突变型 IDH1 的小分子抑制剂艾伏尼布; 首个抗天花病毒的 p37 蛋白小分子抑制剂替韦立马; 首个靶向于 cap-依赖型核酸内切酶的抗流感药物玛巴洛沙韦; 首个靶向于 GnRH-R 治疗子宫内膜异位症的小分子药物艾拉戈克钠等。首创性的药物研发往往需要经历非常坎坷的研发过程, 而成功的首创性药物多数也都成为重磅炸弹级的明星药物。本文选取 2018 年批准的具有代表性的首创性小分子药物研究实例, 浅析其研发过程, 为更多首创药物的研发提供研究借鉴及研发思路。

**关键词:** 首创性药物; 小分子药物; 新药研发

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)07-1145-12

## First-in-class small molecule drugs in 2018

WANG Lei<sup>1,2</sup>, JIANG Zheng-yu<sup>1,2</sup>, YOU Qi-dong<sup>1,2\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization; 2. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** In 2018, FDA approved 59 kinds of new drugs in all, breaking the record of 53 set in 1993. There were 34 types of small molecule drugs, which accounted for 64% of the whole new drugs. Of these 34 new small molecule drugs, 9 first-in-class ones marked a milestone for the subsequent drug discovery and development. These include Glasdegib, the world's first small molecule inhibitor targeting Smo through Hedgehog signaling pathway; Ivosidenib, the first small molecule inhibitor targeting mutant IDH1; Tecovirimat, the first small molecule drug for anti-variola virus therapy through targeting p37; Baloxavir marboxil, the first anti-flu drug targeting cap-dependent endonuclease; Elagolix sodium, the first small molecule inhibitor in treating endometriosis by targeting GnRH-R, etc. The research and development of first-in-class drugs is always full of obstacles and challenges. However, once they were successfully recognized as the "heavy bomb" drugs, they would become huge benefits. This article chose the representative first-in-class small molecule drugs that were approved in 2018 as examples to analyze their development processes in an attempt to provide guidance for the research and development of more first-in-class drugs.

**Key words:** first-in-class drug; small-molecule drug; drug development

首创性 (first-in-class) 药物是指为了解决目前尚

未有药物可治疗的相关疾病难题, 在全新的候选靶点中, 从无到有逐步发现全新的候选化合物, 通过反复实验筛选, 最终确证其药效、安全性、药代动力学性质等均满足临床要求的药物分子。在新药研发中, 结构全

收稿日期: 2019-05-07; 修回日期: 2019-05-29.

\*通讯作者 Tel: 86-25-83271351; E-mail: youqidong@gmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0356

新的药物并不意味着可以称为首创性药物。根据美国食品药品监督管理局 (FDA) 的定义, 被授予首创性资格的药物是指一种使用全新的、独特的作用机制或靶向于某个全新的候选靶标来治疗某种疾病的药物。由于需要全新的作用机制与治疗靶点, 首创性药物的研发通常源自于生物学驱动的研究, 而跟随性药物 (me too, me better) 往往更加注重解决现有药物的缺陷或实现专利的突破, 因此多为化学驱动的研发, 这是二者的重要区别<sup>[1]</sup>。基于首创性药物研发的特征, 早期的化学生物学研究成为首创性药物的重要引擎。化学生物学的研究着眼于发现并确证潜在的全新药物靶标, 其过程常常通过多种化学手段设计探针分子, 研究其与靶标间的相互作用关系。随后通过探针分子探索新靶标的全新作用机制, 并判断此靶标是否具有药物开发的潜力与可能性。靶标的发现与靶标的验证是相辅相成的过程, 经反复验证后具有成药性的蛋白最终成为药物靶标, 而探针分子也成为苗头化合物。苗头化合物虽具有一定的活性, 但往往成药性较差, 很难继续推进至临床, 需要大量的药物化学工作对其进行优化。因此, 以化学生物学发现新靶标为出发点, 以药物化学优化苗头化合物为支撑, 通过生物学驱动的首创药物研发需要长期、大量的投入。同时, 现有的首创药物研发多以靶标为核心, 其研发过程通常从蛋白靶标、细胞水平等体外验证, 到动物水平的体内验证, 再到临床实验, 在此过程中存在的转化医学的不确定性, 物种间和个体间的差异性也大大增加了首创药物的研发难度。从靶标的发现、苗头分子的确定、苗头分子向先导物的过渡、先导化合物的确定与优化、成药性优化到靶标再验证往往需要数十年的研发时间, 需要十年磨一剑的攻坚精神。

首创性药物研发的过程如同大海捞针, 投入大、风险高, 伴随着极大的未知性, 失败率极高。在这一漫长的过程中, 药物靶标的确证贯穿始终, 甚至上市后也需要接受不断的考验, 其中也不乏很多倒在黎明前的惨痛研发案例。例如曾经备受制药企业青睐的胆固醇酯转移蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 抑制剂, 在前后历经 30 年的研发与临床实验后纷纷失败, 这一项目的领头羊辉瑞公司研发投入超过 8 亿美金, 开展了超过 15 000 人的 III 期临床实验, 但最终在 2006 年由于心血管不良反应的风险而不得不终止该项目, 证明 CETP 并不适合作为药物靶标<sup>[2,3]</sup>。这一惨痛的失败案例也说明了寻找与疾病相关的蛋白只是研究的开始, 靶标蛋白作为生物标志物与疾病的相关性未必会产生后续治疗中的因果性, 如何确定靶标蛋白的异常与疾病发生发展的因果关系则极具挑战性。在靶向药

物的研发中, 通常只关注生物标志物的降低 (或提高) 以及最终所产生的生物学效应, 然而却很难阐明靶标蛋白作为生物标志物与治疗效应之间的因果性, 只有阐明了调控过程中蛋白靶标与治疗效应之间的因果性的蛋白才有可能成为真正的药物靶标。另一著名的失败案例是 1999 年 FDA 批准的默克公司的罗非昔布, 该药上市后用以治疗关节炎和急性疼痛。由于其良好的疗效, 罗非昔布在 2003 年的销售额高达 25 亿美元, 全球约有 8 000 万患者服用过此药, 然而在随后的研究中发现罗非昔布会导致严重的心血管系统不良反应 (如心脏病及脑卒中), 默克公司也在 2004 年宣布在全世界范围内召回罗非昔布, 这可能也是历史上规模最大的一次处方药召回事件<sup>[4,5]</sup>。这一事件也使得环氧合酶 2 (COX2) 作为药物靶标的可能性受到全球的质疑。由此可见, 药物靶标的确证不可能一蹴而就, 需要长期反复确证, 即便是成功上市的药物, 也未必能真正实现药物靶标与治疗应用之间的因果性。首创药物必须靶向于全新的作用靶标, 其研发历程之艰辛可见一般。

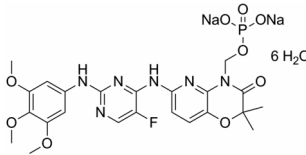
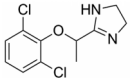
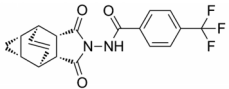
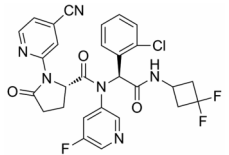
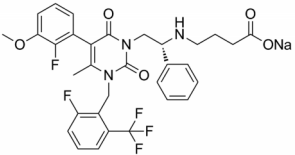
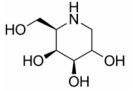
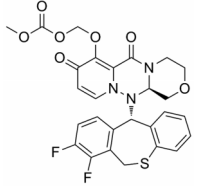
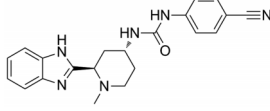
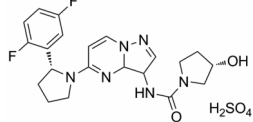
正因为首创药物的研发困难重重, 最终成功的首创药物才更显得弥足珍贵。它们通常会成为相应疾病治疗领域的重大突破并获得巨大的收益, 研发投入数亿美元的重磅新药多为首创药物。历史上的首个磺胺类药物和青霉素、我国的抗疟药青蒿素、首个降胆固醇药物洛伐他汀、分子靶向药物伊马替尼、首个质子泵抑制剂奥美拉唑等的发明与发现都是划时代的首创药物, 造福了无数患者。近年来, 首创性药物成为“重磅炸弹”的案例也不胜枚举, 例如由辉瑞公司于 2015 年成功研发上市的全球首个 CDK4/6 小分子抑制剂哌柏西利 (Ibrance), 在乳腺癌的治疗中取得了显著疗效, 2018 年销售额高达 46.84 亿美金; 由强生公司于 2011 年成功研发的全球首个 CYP17A1 抑制剂上市后, 对前列腺癌患者提供了重要的治疗选择, 2018 年销售额也高达 34.98 亿美金。据不完全统计, 1999~2018 的 20 年里 FDA 共批准 620 个新药, 属于首创性药物的仅有 194 个。2018 年 FDA 批准上市的 59 个全新药物中, 有 9 个为首创性小分子药物 (表 1)。本文选取了其中 4 个具有代表性的首创性小分子药物进行介绍, 简要讨论其研究背景, 研发思路及治疗应用, 为今后更多的首创性药物研发提供研究借鉴与思路。

## 1 全球首个作用于 Hedgehog (Hh) 信号通路的 Smo 抑制剂格拉德吉 (Glasdegib)

### 1.1 研发背景

分子信号通路中的错误调控与细胞的多种重要生理过程 (细胞增殖与死亡) 密切相关, 也是多种疾病的重要诱因。其中, Hedgehog (Hh) 信号通路是具有代表性的信号通路之一。Hh 信号通路的激

**Table 1** First-in-class small molecule drugs approved by FDA in 2018

Drug (brand name)	Sponsor	Chemical structure	Target	Indication	Approved time
Fostamatinib (Tavalisse)	Rigel		SYK inhibitor	Immune thrombocytopenic purpura	2018.4.17
Lofexidine	Britannia		$\alpha_2$ -Adrenoceptor agonist	Opioid withdrawal	2018.5.16
Tecovirimat (TOPXX)	SIGA		Viral p37 protein inhibitor	Smallpox	2018.7.13
Ivosidenib (Tibsovo)	Agios		IDH1 inhibitor	IDH1-mutated AML	2018.7.20
Elagolix sodium (Orilissa)	Neurocrine		GnRH receptor antagonist	Pain associated with endometriosis	2018.7.23
Migalastat (Galafold)	Amicus		$\alpha$ -Galactosidase regulator	Fabry disease	2018.8.10
Baloxavir marboxil (Xofluza)	Shionogi/ Roche		Polymerase acidic endonuclease inhibitor	Acute uncomplicated influenza	2018.10.24
Glasdegib (Daurismo)	Pfizer		Hedgehog pathway inhibitor	AML	2018.11.21
Larotrectinib sulfate (Vitrakvi)	Array Bio Pharma		TRKA, TRKB and TRKC inhibitor	NTRK-positive solid cancers	2018.11.26

活需要 Sonic Hedgehog (Shh)、Indian Hedgehog (Ihh) 或 Desert Hedgehog (Dhh) 3 种特定配体中的一种与 Patched (Ptch) 受体进行特异性结合, 随后解除 Ptch 的抑制效应后激活 Smoothed (Smo) 蛋白 (7-跨膜蛋白)。Smo 的激活会引起 Gli1、Gli2 和 Gli3 三种转录因子的激活, 最终导致细胞的增殖 (作用机制如图 1 所示)<sup>[6]</sup>。因此, Hh 信号通路在各项组织的早期发育、体内生理平衡及组织再生方面起到重要的作用, 并在多种恶性肿瘤的发生发展过程中, 扮演着关键的角色, 其中包括基底鳞状细胞癌、膀胱癌、结肠癌、白血病、肺癌、成神经管细胞瘤、胰腺癌、前列腺癌和胃癌等多种

恶性肿瘤<sup>[7]</sup>。鉴于 Hh 信号通路的重要作用, 在此通路进行抑制剂的开发成为了学术界与工业界的研究热点, 研究方向主要包括 3 类: ① Hh 配体蛋白的抑制剂; ② Smo 抑制剂; ③ 转录因子 Gli 抑制剂<sup>[8]</sup>。

第一个 Smo 抑制剂是 Taipale 等<sup>[9]</sup>在 2000 年发现的 Cyclopamine。研究结果表明, Cyclopamine 可以通过抑制 Smo 蛋白而调控 Hh 信号通路, 并在临床前的肿瘤模型中表现出一定的有效性, 确证了 Smo 蛋白是 Hh 信号通路中的潜在靶标<sup>[10]</sup>。这一研究结果也引起制药界的广泛关注, 随后 Smo 抑制剂的研发络绎不绝, 许多研究团队研发的 Smo 抑制剂陆续进入临床研究,

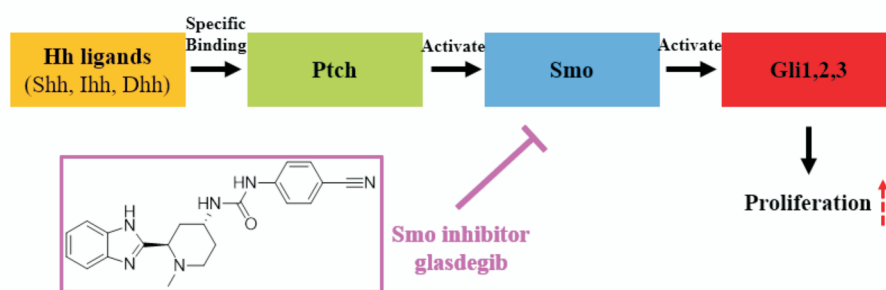


Figure 1 The biological mechanism of Hedgehog (Hh) signal pathway and Smo inhibitors

均展现出对恶性肿瘤的治疗效果。其中 Infinity 公司的 IPI926、Novartis 公司的 NVP-LDE225 以及 Genentech 公司的 GDC-0449 在此类抑制剂的研发中处于领先地位<sup>[8,11]</sup>。与此同时,还有很多结构多样的 Smo 抑制剂在各类文献中被陆续报道<sup>[12-14]</sup>。虽有多个 Smo 抑制剂被开发进入临床,但直到 2018 年,全球首个 Smo 抑制剂格拉德吉才被批准上市,从众多的 Smo 抑制剂中脱颖而出。靶向于 Smo 蛋白的抑制剂研发从靶标发现、先导确证与优化、临床研究到最终上市,整体研发时间横跨将近 20 年。

**1.2 研发过程** 格拉德吉的先导化合物来源于一类苯并咪唑的化合物,它们具有较低的分子量、较强的 Smo 抑制活性及一定的化学结构稳定性,其代表性结构如图 2 所示(化合物 1)。然而,尽管化合物 1 作为先导化合物具有较好的抑制活性,但其仍存在着许多缺陷,限制了其进一步的开发与应用,包括:① 代谢稳定性差,清除率高;② 亲脂性过强,血浆蛋白结合率高;③ 溶解性差 ( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。因此,基于以上存在的问题,需要利用药物化学手段对化合物 1 进行进一步的

优化以降低其脂溶性、肝清除率,并提高抑制剂的水溶性以及血浆游离组分含量<sup>[15]</sup>。

在先导物的优化过程(图 2)中,化合物 1 被分割成 3 个区域,即:苯并咪唑区(A)、苯环区(B)以及芳酰胺基区(C)。考虑到中心苯环 B 区域对脂溶性贡献较大及其作为中心骨架的重要连接作用,中心 B 区域成为首先优化的目标。通过将苯环替换为 1,3 位顺式取代的环己基后得到化合物 2,发现其在体外活性略有下降。与化合物 1 相比,化合物 2 的脂溶性有所降低,体外代谢稳定性更佳,但口服生物利用度较差。尽管化合物 2 的溶解度 ( $37 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 较化合物 1 提升了 370 倍,但进一步的药代动力学研究表明较差的溶解度是导致口服生物利用度不佳的原因。为了进一步提升溶解度,B 区域的环己基被替换为不同的含 N 杂环,其中以 *N*-甲基哌啶替换的化合物 3 活性得以保持。化合物 3 具有较好的肝微粒体稳定性与生物利用度,但仍存在体内清除速率过快(大鼠:  $\text{CLp} > 70 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 的缺陷。为了进一步提高化合物 3 的活性并优化体内的药代动力学性质,后续优化围绕以下 4 个方面开展

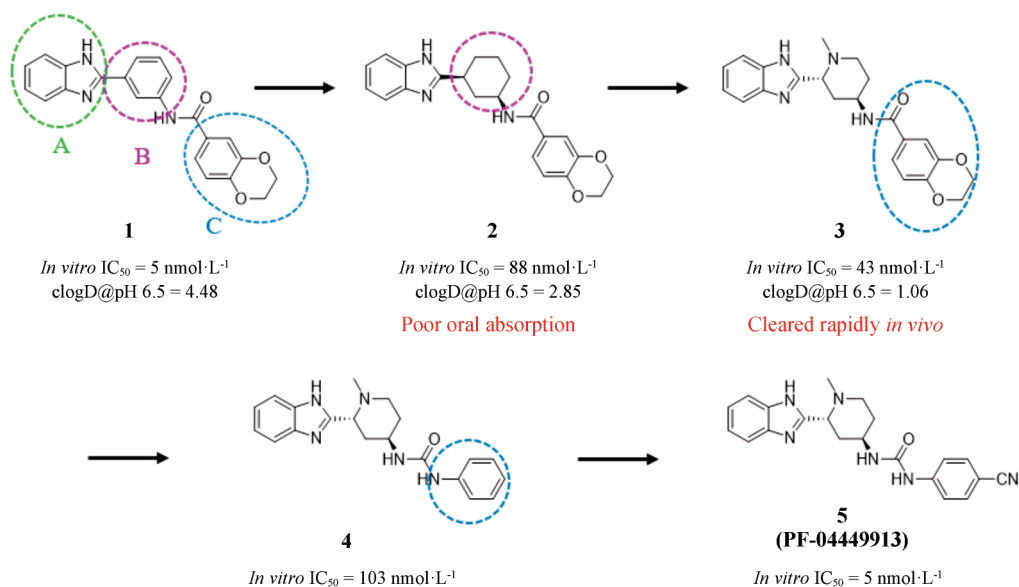


Figure 2 The discovery and development of Glasdegib

系统性研究: ① 优化哌啶环上N的取代基; ② 研究苯并咪唑环取代基的构效关系; ③ 确定在4-氨基哌啶位的最优取代; ④ 深入研究衍生物的体内药代动力学性质。实验结果表明, ①②两个方面的优化未取得明显成效, C区域经过一系列优化后得到的化合物**4**被视为更佳的首导化合物。通过构效关系研究发现, 化合物**4**中C区域的苯环替换为吡啶等杂环后活性丧失, 而在苯环的对位或间位引入取代基后活性有所提高。最终, 在苯环对位引入氰基得到的化合物**5**表现出最佳的体外、体内活性, 包括具有优异的理化性质、适宜的清除率、对主要的细胞色素P450酶无抑制、人工胃液中溶解度高、半衰期长以及口服生物利用度高等<sup>[16,17]</sup>。

**1.3 治疗应用** 急性髓系白血病(AML)是一种存在于血液与骨髓的恶性肿瘤, 也是最为常见的急性白血病类型(约占全部急性白血病病例的80%), 较其他实体瘤病情发展迅速。AML治疗选择少, 对新的治疗需求极为迫切。AML是一种侵袭性的癌症, 主要在60岁以上的老年人群中发病, 表现为失控的肥大细胞增殖和扩散。肥大细胞能导致器官损伤以及严重的瘙痒症状。AML患者中, 大多数预后不良, 反复发作, 患者生存期很短。目前, 对于AML患者的标准治疗是采用高强度化疗。然而, 许多老年AML患者以及确诊前就有其他合并症的患者, 无法承受高强度的治疗, 缺乏有效的治疗手段。格拉德吉于2018年11月21日被批准作为新型口服Smo蛋白抑制剂, 在审批过程中获得“孤儿药”认定并获得优先审查资格。主要用于治疗新确诊的75岁及以上或由于合并症而无法使用高强度诱导化疗的AML患者, 在使用过程中需要联合使用低剂量阿糖胞苷(LDAC)。格拉德吉的上市为无法接受高强度化疗的AML患者提供了全新的治疗选择和生存机会, 作为首款获批的Smo蛋白的小分子抑制剂具有重要意义。

## 2 全球首个靶向于突变型异柠檬酸脱氢酶(mIDH1)的抑制剂艾伏尼布(Ivosidenib)

**2.1 研发背景** 大多数AML患者在使用药物治疗后病情最终会复发, 这种类型被称为突变复发性或难治性急性髓系白血病(R/R AML)。R/R AML预后差, 5年生存率低(约27%), 患者治疗选择很少, 严重威胁着人们的生命健康。在研究此类AML临床样本后, 通过对全基因组的突变分析发现部分患者(6%~10%)携带的突变的异柠檬酸脱氢酶(IDH)会通过促进异常代谢物的累积而阻碍正常的造血干细胞分化, 是AML发生的原因之一<sup>[18]</sup>。IDH家族包括两种NADP依赖的异构体IDH1和IDH2, 其主要功能是催化异柠檬酸的氧化脱羧过程, 生成二氧化碳、 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG)和

NADPH<sup>[19,20]</sup>。许多恶性肿瘤经常伴随着IDH1和IDH2的突变, 其中包括胶质瘤、胆管肿瘤、软骨肉瘤和急性髓性白血病<sup>[21]</sup>。IDH1中, 酶催化域活性位点的精氨酸132(R132)是主要的突变位点。其活性位点的突变会导致异柠檬酸氧化脱羧的功能丧失, 并生成另外一种与 $\alpha$ -KG结构相似的癌性代谢物D-2-羟戊二酸(2-HG)。有证据表明, 相比正常细胞, IDH1的突变会导致2-HG的表达量显著提高100倍<sup>[20]</sup>。IDH酶的突变(mIDH)使得体内2-HG大量聚集, 并竞争性抑制 $\alpha$ -KG依赖的双加氧酶的活性, 进而影响其参与的一系列细胞内生理过程, 包括组蛋白和DNA的去甲基化并使细胞适应低氧环境。双加氧酶的抑制会影响正常细胞的分化, 并加速致癌转变<sup>[20,22-24]</sup>。因此, IDH1的突变被视为致癌基因, 同时也成为治疗AML的全新治疗策略, 针对此全新靶标的突变位点筛选小分子抑制剂也成为一项极具挑战性的工作。

**2.2 研发过程** 为了发现靶向于IDH1的小分子抑制剂, Agios公司建立了一种针对IDH1蛋白R132H突变的同源二聚体高通量筛选方法。通过对其化合物库进行高通量筛选, 得到了一类苯甘氨酸类抑制剂(化合物**6**, 图3)作为苗头化合物(Hit), 其体外酶活水平的IC<sub>50</sub>值为0.06  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对化合物**6**进行初步的结合动力学研究发现其可以可逆地结合于mIDH1, 并可以作为 $\alpha$ -KG的竞争性抑制剂, 但对NADPH无竞争性作用。基于其新颖的化学结构及初步确证的抑制活性, 化合物**6**被视为首导化合物并随即展开了系统性的结构优化。

考虑到化合物**6**的母核结构可以通过UGI四组分缩合得到, 因此可以分别优化其中的R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>四个位置的取代。考虑到化合物**6**的疏水特性(clogP = 5.6), 在第一轮的结构优化中, 首先对R<sub>1</sub>位置进行了构效关系研究。结果表明, 这一位置可以耐受不同的含碳杂环, 其中将环戊基替换为环己基后活性保持, 缩环或者将其替换为芳杂环均导致活性降低。若在R<sub>1</sub>位点为提升水溶性而引入吡喃环和哌啶环则将导致化合物活性大幅降低, 因此R<sub>1</sub>位点不宜引入亲水性取代基。R<sub>2</sub>位置的最优取代基为邻位取代的苯基, 若将其替换为脂肪环或含杂原子的芳环均会导致活性下降。为了进一步优化先导物的理化性质并降低其脂溶性, R<sub>4</sub>位被替换为多种不同的杂环。构效关系结果表明, R<sub>4</sub>位可以容纳多种杂环的取代, 这也提示此位点可能伸向溶剂区, 可以针对此位点开展水溶性的优化。在第一轮的结构优化中得到的化合物**7**(AG-5198)在靶标水平和细胞水平均表现出最佳的活性, 并在U87 R132H异种移植瘤小鼠模型的体内研究中表现出有效

性,此化合物也成为针对 mIDH1 的首个活性小分子抑制剂<sup>[25]</sup>。

然而,在进一步的临床推进过程中,发现 AG-5198 的代谢稳定性差,在人体内肝微粒中发现其在 R<sub>1</sub> 位和 R<sub>4</sub> 位仍有 NADPH 依赖的代谢氧化物,导致 AG-5198 的成药性不佳,极大地限制了其临床应用。随后在 AG-5198 的第二轮结构优化与成药性优化过程中,尝试封闭 R<sub>1</sub> 与 R<sub>4</sub> 位的易代谢位点,并将 R<sub>2</sub> 的邻甲基苯替换成邻氯苯基,以期降低过快的代谢清除速率。首先,在 R<sub>4</sub> 位引入甘氨酸并将其氨基接入甲酸酯类取代基,得到的化合物活性保持但代谢速率仍然较快,又将其进一步替换为脯氨酸的氨基甲酯类取代基,后又将脯氨酸的氨基甲酯替换为芳杂环类似物,以期减缓其氧化代谢过程。经过一系列的芳杂环替换后确定了 4 位有吸电子取代基的吡啶类芳杂环取代可以保持其活性,并提高代谢稳定性,其中以 4-氰基吡啶为最佳。在确定代谢产物的过程中发现, R<sub>1</sub> 位环己基的 4-位单/双氧化是此结构片段的主要代谢途径。为阻断该位置的氧化代谢,将环己基替换为二氟取代的环丁基,以封闭其代谢位点。随后,将 R<sub>3</sub> 位替换成双氟取代的苯环后,得到的化合物 **8** (AGI-14100) 在酶活水平和细胞水平均具有低纳摩尔级的活性,同时还展现出理想的代谢稳定性。然而,药物优化的过程往往十分坎坷,尽管化合物 **8** 已具有较好的 PK 性质和较低的肝微粒体清除率,但在进行人孕烷 X 受体 (hPXR) 筛选实验评价时,发现其具有细胞色素 P450 (CYP) 3A4 诱导激活作用,激活率可达到利福平 (一种强效的 CYP 3A4 诱导剂) 的 70%<sup>[25,26]</sup>。

第三轮的结构优化主要聚焦于消除化合物 **8** 的 CYP450 诱导活性。考虑到 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 需要疏水性片段以保持活性,本轮的优化集中于 R<sub>3</sub> 和 R<sub>4</sub> 位置,主要策略是增加其极性。将 R<sub>4</sub> 位的取代基替换成羟基吡咯烷酮后确实可以降低 hPXR 的激活活性,但也会导致其整体的透膜率降低并增加其流出速率。若将化合物 **8** 中的 4-氰基吡啶替换为 4-氰基嘧啶会完全消除 hPXR 的激活效应,但也会导致细胞活性下降并降低抑制剂的代谢稳定性。在 R<sub>4</sub> 的优化不能兼顾活性与不良反应的情况下,目标只能被转移至 R<sub>3</sub>。将 R<sub>3</sub> 上的 3 位氟原子替换为磺胺后会显著提高分子的极性,虽可降低 hPXR 的激活活性,但也引起了较高的肝微粒体清除率和外排率。经过反复的摸索与尝试后,最终通过将 R<sub>3</sub> 上二氟取代的苯环替换为单氟取代的吡啶,得到的化合物 **9** (AG-120) 具有最佳的成药性,包括:优异的酶活与细胞活性、良好的肝微粒体稳定性、可接受的 hPXR 激活活性、较高的透膜性以及较低的流出速率。

同时,化合物 **9** (AG-120) 对 mIDH1 具有极高的选择性,对 IDH2 的野生型和突变型几乎均无活性。在后续的体内及药效评价中,化合物 **9** (AG-120),即艾伏尼布,均表现出优异的活性和良好的安全性,随即被批准进行临床研究<sup>[26]</sup>。

艾伏尼布的研发是典型的生物驱动型的过程,通过对现有临床样本的分析延展出潜在的治疗靶标并进行全新药物的开发。从 2010 年发现 mIDH1 是潜在的 R/R AML 治疗靶标后,仅用 2 年时间便发现了先导化合物,又历经 2 年共三轮大规模结构优化工作,随后在 2014 年进入临床研究,最终于 2018 年上市。尽管 mIDH1 的抑制剂研发过程看似顺利,但整体研发时间仍长达 8 年之久。

**2.3 治疗应用** 艾伏尼布 (Ivosidenib) 作为首个被批准的针对 IDH1 酶的高选择性口服靶向抑制剂,于 2018 年 7 月 20 日被 FDA 批准,用于 IDH1 突变的 R/R AML 成人患者。艾伏尼布是目前唯一的针对 mIDH1 的口服靶向抑制剂,也是唯一一个获得 FDA 批准治疗 IDH1 突变型 R/R AML 的药物。艾伏尼布的临床试验从 2014 年 3 月开始至 2017 年 5 月结束,共计纳入了 258 名 AML 患者接受靶向 mIDH1 抑制剂的治疗。其中 125 名为主要治疗人群,艾伏尼布对其完全缓解或完全缓解伴随部分血液学恢复的比例为 30.4%,完全缓解率 21.6%,总体有效率为 41.6%,展现出了优异的治疗效果。艾伏尼布作为单药服用其不良反应也在可接受范围,主要包括 Q-T 间期延长、IDH 分化综合征、贫血、血小板减少以及白细胞增多。艾伏尼布的成功上市是化学生物学驱动、药物化学优化的最终结果,具有里程碑式的重要意义,为很多 R/R AML 患者提供了更多的治疗选择和生存机会。

### 3 全球首个用于治疗子宫内膜异位症的 GnRH-R 小分子拮抗剂艾拉戈克 (Elagolix)

**3.1 研发背景** 子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是一种女性常见妇科疾病,主要病因是由于内膜细胞聚集在不正常的位置而形成。EMs 是育龄期女性较为常见的临床良性疾病,其发生率达 10%,且呈明显上升趋势,该病以痛经、盆腔疼痛及不孕不育为主要特征,严重影响女性的生殖健康和生活质量。内膜细胞本该生长在子宫腔内,但由于子宫腔通过输卵管与卵巢、盆腔相通,因此使得内膜细胞可经由输卵管进入卵巢、盆腔及子宫邻近区域异位生长,导致疾病的产生。在全球范围内,约有 1.76 亿女性正在遭遇 EMs 的困扰。目前,由于尚未有针对性的药物被研发,EMs 不能被治愈。现有的可选择的药物治疗策略主要有:口服避孕药、非甾体抗炎药、阿片类药物和促性腺激素释放

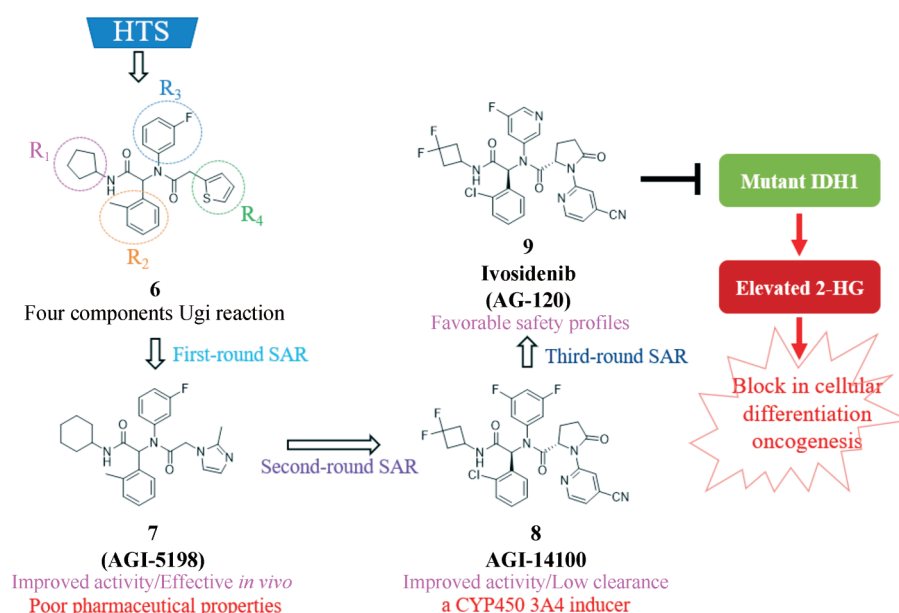


Figure 3 The discovery and development of Ivosidenib

激素拮抗剂等。若以上药物均不能取得治疗效果,则需要使用手术干预,然而这些治疗策略并不能针对性地治疗 EMs。

根据其作用机制, EMs 可以通过有效调控垂体-性腺轴开展治疗。促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH), 又称促黄体激素释放激素 (luteinizing hormone-releasing hormone, LH-RH), 最初是一种从猪和绵羊的下丘脑分离并发现的具有线性构象的十肽<sup>[27,28]</sup>。GnRH 发挥其生物学功能的主要途径是通过激活其细胞表面的 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 以及促性腺激素释放激素受体 (GnRH-R), 从而促进脑垂体中促性腺激素、促黄体激素 (LH) 和促卵泡激素 (FSH) 的分泌<sup>[29,30]</sup>。GnRH 在人体的生殖系统中具有极其重要的生物学作用, GnRH 本身或其类似物在临床上被广泛应用于治疗各种类固醇激素依赖性疾病, 其中对 EMs 表现出一定的治疗效果<sup>[31]</sup>。目前在临床上主要使用以亮丙瑞林为代表的多肽类 GnRH-R 拮抗剂来治疗相关疾病, 但此类多肽类拮抗剂会产生先激活后抑制的“反跳效应”, 具有较多的局限性<sup>[32]</sup>。临床研究的证据表明, 拟肽类的 GnRH-R 拮抗剂可有效降低性腺激素的水平, 缓解相关疾病的症状且不引起此类拮抗剂诱发的“反跳效应”<sup>[33]</sup>。因此, 研发 GnRH 的小分子拮抗剂具有更多的优势, 例如更加灵活的给药剂量和更易控制的药物浓度, 这也将为此类疾病的临床治疗提供更多的选择。

**3.2 研发过程** 非肽类 GnRH-R 拮抗剂的研发长期以来都备受关注<sup>[34]</sup>。早在 1998 年, 随着第一个具有极强体

外结合活性 ( $IC_{50} = 0.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的非肽类 hGnRH-R 小分子拮抗剂 T-87475 (化合物 10) 被发现, 陆续有数个不同结构类型的小分子也被相继报道<sup>[35]</sup>。2003 年, 基于噻吩并嘧啶类化合物 T-87475 的化学结构进一步开发得到的化合物 13, 即舒夫戈利 (Sufugolix, TAK-013), 可以在长期口服给药的情况下抑制猕猴的脑垂体-卵巢轴<sup>[36]</sup>。同年, 也有研究表明舒夫戈利通过口服给药可以在临床上抑制人体促黄体激素的产生。基于前期的研究结果, Neurocrine Biosciences 公司也在 2002 年发现了一类具有吡唑并嘧啶酮/咪唑并嘧啶酮类的强效 hGnRH-R 小分子拮抗剂, 其代表性结构如化合物 11 和化合物 12 所示<sup>[37,38]</sup>。在此类小分子优化过程的早期, 更多的研究聚焦于减小此类抑制剂的分子量来进一步提高其口服生物利用度。通过基于结构的药物设计, 得到了一类具有尿嘧啶结构的高亲和力拮抗剂 (化合物 14)<sup>[39]</sup>。然而, 此类拮抗剂仍具有较高的清除率, 通过体外肝微粒体实验发现其主要的代谢过程为尿嘧啶 3 位侧链仲氨基发生 N-脱烷基化, 这类 N-脱烷基化产物会导致结合活性的大幅丧失。考虑到该仲氨基侧链 N 上的烷基 (例如与碱性 N 原子相连的苄基) 在此类化合物中的重要作用, 2-氨基苯乙基被用来取代尿嘧啶 3 位上的仲氨基侧链, 即将苯乙基直接和尿嘧啶 3 位相连, 保留碱性 N 原子以伯氨基的形式与苯乙基侧链相连, 以期减少其中的一个易被氧化清除的 C-N 键。通过系统性的构效关系研究, 发现了化合物 15 (NBI 42902) 具有低纳摩尔级别的亲和力 ( $K_i = 0.56 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和强效的人源 GnRH-R 拮抗活性

( $IC_{50} = 3.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。经口服给药后, NBI 42902 在猴子体内具有良好的血浆暴露量和体内活性, 证明了这一系列尿嘧啶类拮抗剂在非人灵长类动物中的有效性<sup>[40]</sup>。

在进一步推进和研究 NBI 42902 的过程中发现, 这类化合物虽有强效的 hGnRH-R 抑制活性, 但其对 CYP3A4 酶也有较强的抑制作用 ( $IC_{50} = 0.1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[41]</sup>。CYP3A4 酶可以代谢超过 50% 的市售小分子药物, 因此对 CYP3A4 的抑制活性会引起很多潜在药物间相互作用的不良反应风险<sup>[42]</sup>。通过大量的研究后发现, 在此类结构中合并羧酸结构可以大幅降低其对 CYP3A4 的抑制活性<sup>[41]</sup>。通过更加深入地研究具有羧酸结构的尿嘧啶类化合物的构效关系, 最终发现了艾拉戈克 (化合物 16, Elagolix), 其具有较弱的 CYP3A4 抑制活性 ( $IC_{50} = 56 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和极强的 GnRH-R 体外亲和力 ( $K_i = 0.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。若将艾拉戈克中的羧酸制成甲酯, 则其 CYP3A4 的抑制活性将大大提高 ( $IC_{50} = 0.44 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 表明具有较强极性的羧酸结构可以大幅减弱此类化合物对 CYP3A4 抑制的不良反应。为了进一步验证艾拉戈克的特异性与选择性, 100 种可能使艾拉戈克产生脱靶效应的靶标被用以测试其可能存在的脱靶效应, 其中包括离子通道、激酶和转录因子。测试结果表明艾拉戈克不会对以上靶标产生脱靶效应, 表现出优异的选择性与特异性。经历 10 年的反复结构优化、骨架优化、代谢稳定性优化、脱靶效应优化与药

效学验证后, 艾拉戈克终被批准进入临床研究, 用以治疗 EMs<sup>[43]</sup>。正如图 4 所示, 艾拉戈克的整体研发时间横跨 20 余年。

**3.3 治疗应用** 艾拉戈克最早是由 Neurocrine 公司研发的, 并在 2010 年以 5.75 亿美元的价格被 Abbvie 公司收购, 在当时就被视为 Abbvie 公司后期研发管线中的几种顶级药物之一, 并被预测有望在 2018 年成为畅销药物前十名。由于 EMs 缺乏针对性治疗的药物, 艾拉戈克也被 FDA 授予优先审查资格。2018 年 7 月 23 日, 艾拉戈克获得了 FDA 的批准, 用于治疗因 EMs 导致的疼痛, 并成为此类适应证 10 多年来第一种全新的口服药物。在针对近 1 700 名中度至重度疼痛的 EMs 患者的临床研究中, 艾拉戈克给药组与安慰剂组相比, 在减轻 3 种类型 EMs 相关疼痛方面表现出显著的优越性, 包括: 经期盆腔疼痛 (DMPP)、非经期盆腔疼痛 (NMPP) 和性交痛 (dyspareunia)。艾拉戈克给药组最常见的不良反应是潮热、盗汗、头痛、恶心、失眠、焦虑、关节痛、抑郁和情绪波动等, 但均在可控范围内。因此, 不论是对于子宫内膜异位症的女性患者还是对需要更多选择来治疗这一疾病的医生, 艾拉戈克都是一项具有里程碑式意义的突破性药物。

#### 4 全球首款天花治疗药物替韦立马 (Tecovirimat)

**4.1 研发背景** 天花 (smallpox) 病毒是一种极具传染性、致命性的传染病毒。没有患过天花或没有接种天花疫苗的人, 均有可能被感染, 其主要症状表现为病

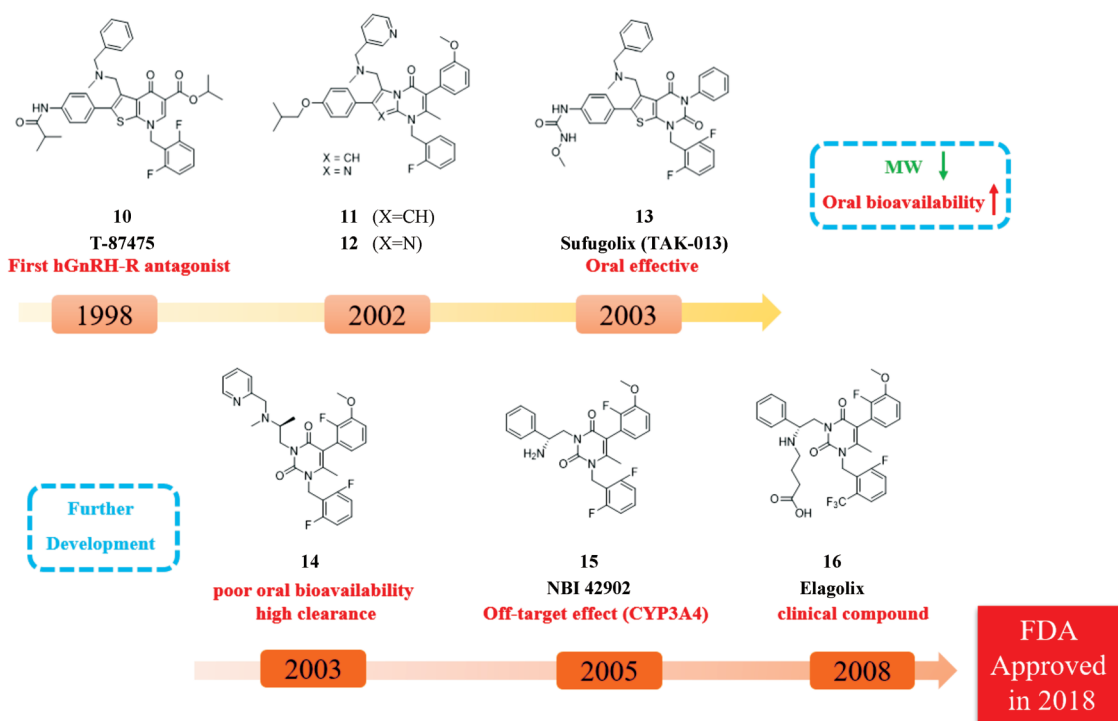


Figure 4 The discovery and development of Elagolix

毒血症,感染后死亡率高。早在1980年,世界卫生组织宣布天花病毒已经彻底根除,天花疫苗也是人类成功开发的第一款疫苗。然而,疫苗相关的不良反应和抗体药物迟滞期的问题也一直困扰着人们,例如一些免疫缺陷的疾病和皮肤病等,都被视为疫苗相关的并发症<sup>[44,45]</sup>。与此同时,长期以来并未有专门针对天花的小分子药物上市以协助抗体药物的治疗,并预防可能的生物恐怖主义风险或潜在的天花爆发的影响。在替韦立马被发现之前,尽管有若干核苷类似物的小分子抑制剂可以抑制正痘病毒(天花病毒是其中之一)的复制或抑制DNA聚合酶的活性,但这些抑制剂的作用机制并不专一,限制了其进一步的临床应用<sup>[46,47]</sup>。其中,核苷类似物西多福韦(cidofovir, CDV)可以在细胞内抑制多种DNA相关的病毒(包括腺病毒、疱疹病毒、嗜肝病毒、多瘤病毒、乳头瘤病毒和正痘病毒等),被FDA批准用于AIDS病人中由巨细胞病毒(CMV)引起的视网膜炎,同时也被批准作为天花爆发的应急治疗药物<sup>[48-53]</sup>。然而,CDV作为抗痘病毒的抑制剂存在着诸多缺陷,使其临床应用大大受限。CDV口服无效,必须静脉注射给药,且受限于其给药方式,CDV存在着比较严重的剂量限制性的肾毒性<sup>[49]</sup>。为了预防和应对可能的天花爆发的风险,美国国家科学院医学研究所建议必须研制至少两种作用机制不同的抗病毒药物,因此亟需研发一种与CDV作用机制不同的全新的小分子抗病毒抑制剂以对抗天花病毒<sup>[54]</sup>。

**4.2 研发过程** 为了得到具有一定专一性的、强效的正痘病毒抑制剂,研发人员使用牛痘病毒建立了一种“病毒诱导的细胞病变(CPE)”模型的高通量筛选方法,筛选了商业库中的356 000个具有较低分子量的小分子化合物。其中,一类具有三环壬烯甲酰胺的化合物**17**(图5)表现出较好的抑制活性,是一类结构全新的抗病毒药物,在CPE实验中,EC<sub>50</sub>从13 nmol·L<sup>-1</sup>到5 μmol·L<sup>-1</sup>不等<sup>[55]</sup>。初步的构效关系表明,化合物**17**结构中R为芳甲酰胺或芳杂环甲酰胺时,CPE实验具有较好的抑制活性。为了阐明此类化合物的构效关系,一系列合成的衍生物的活性证明了当芳甲酰胺上有吸电子基团时,表现出最优的抑制活性。最后,通过系统的构效关系研究明确了化合物**18**(ST-246, Tecovirimat)在包括牛痘、猴痘、骆驼痘等多种正痘病毒家族中具有广谱的抑制活性,且对CDV耐受的牛痘病毒仍然有效,确证了其抗天花病毒的活性并显示出与CDV不同的作用机制。同时,ST-246表现出很好的正痘病毒的选择性,实验表明对其他双链DNA病毒(HSV-1, CMV)以及RNA病毒(RSV, BVDV, rotavirus)几乎无活性,也并不影响细胞的存活率(EC<sub>50</sub> > 40 μmol·L<sup>-1</sup>)<sup>[56]</sup>。

一系列机制验证实验进一步验证了替韦立马(Tecovirimat)的作用机制。首先确证了替韦立马是通过抑制正痘病毒中的血小板生成,从而抑制细胞外的病毒的形成,对细胞内的病毒形成几乎无影响。Resistance mapping实验表明,替韦立马靶向于牛痘病毒中V061基因的编码产物。V061基因主要负责编码牛痘病毒中F13L的基因产物,即包膜蛋白同源物。其中,牛痘病毒F13L编码的一种37 kDa的软脂酰化外周包膜蛋白(p37)是细胞外病毒颗粒形成所必需的,由此确证了替韦立马的作用靶标并揭示了一种与CDV抑制机制不同的作用方式<sup>[56-60]</sup>。在明确了替韦立马的构效关系及其作用机制之后,进一步的研究探索了此类抑制剂的药物代谢动力学性质,其结果均表明替韦立马具有较长的半衰期、较好的代谢稳定性,较高的血浆暴露量以及优异的口服生物利用。在多种正痘病毒的小鼠模型体内实验中,替韦立马也表现出较好的安全性及有效性。在经过一系列的给药剂量优化及临床前验证后,替韦立马在2007年进入临床研究。基于动物实验中展现出的疗效,以及人体试验表明的安全性,最终替韦立马于2018年7月13日获批上市。

**4.3 治疗应用** 替韦立马的成功获批,不仅仅对人类的健康有重要的保护作用,更是对潜在的生物威胁起到有效预防。如果有恐怖分子将天花病毒用作生物武器,替韦立马可作为新的治疗用药。替韦立马是首个获得物质威胁医疗对策(material threat medical countermeasure)优先审查认定的产品,也获得了快速通道资格及孤儿药资格。在临床研究中,替韦立马表现出很好的耐受性,同时对359名无病毒感染的健康志愿者进行试验后发现无明显毒副作用(常见不良反应包括头痛、恶心和腹痛)且不影响免疫系统的功能。有趣的是,尽管这款新药有望能对天花进行治疗,仍然期待天花不会卷土重来,也期待人类永远没有用上这款新药的那一天。

## 结语与展望

首创性的药物研发着眼于攻克无药可医的重大疾病难题,需要寻找全新的药物靶标、作用机制和分子结构。本文所述的格拉德吉(首个Smo抑制剂)和艾伏尼布(首个mIDH1抑制剂)通过靶向于全新的蛋白靶标以解决现有药物在AML治疗中的局限性,为广大患者提供了更多的治疗选择。艾拉戈克(首个治疗EMs的GnRH-R拮抗剂)和替韦立马(首个抗天花的p37蛋白抑制剂)则利用全新的、独特的作用机制成为对相应疾病的治疗的首款药物。首创性的药物研发虽然艰辛,但始终牢牢吸引着学术界与工业界研究者的关

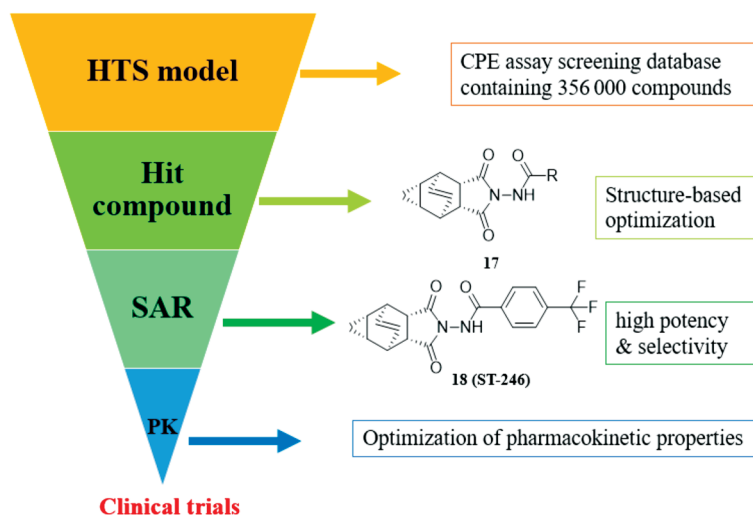


Figure 5 The discovery and development of Tecovirimat

注,并一直都是国际巨头药企竞相追求的目标。在科学的层面上,首创性药物具有全新的作用机制与作用靶标,在药物研发的实验体系建立及苗头化合物的优化过程中均有极强的创新性,可为后续药物的研发提供重要的设计思路与研究参考;在经济的层面上,首创性药物可以造福广大患者并带来巨大的收益回报,使拥有这类药物的公司成为行业的领头羊。本综述浅析了2018年FDA批准的4款具有一定代表性的首创性小分子药物的研究背景、研发过程及治疗应用,为广大奋战在药物研发一线的研究者们提供部分研究借鉴。同时也希望随着我国综合国力的不断提高,基础研究水平的日益完善,会有越来越多的首创性药物成为“中国制造”。

## References

- [1] Guo Z. Concise analysis for innovation of pioneering and follow-on drugs [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 1179-1184.
- [2] Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events [J]. N Engl J Med, 2007, 357: 2109-2122.
- [3] Forrest MJ, Bloomfield D, Briscoe RJ, et al. Torcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone [J]. Br J Pharmacol, 2008, 154: 1465-1473.
- [4] Mello MM, Messing NA. Restrictions on the use of prescribing data for drug promotion [J]. N Engl J Med, 2011, 365: 1248-1254.
- [5] Oberholzer-Gee F, Namdar SN. Merck's recall of rofecoxib -- a strategic perspective [J]. N Engl J Med, 2004, 351: 2147-2149.
- [6] Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5: 1026-1033.
- [7] Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the Hedgehog signaling pathway [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18: 6613-6624.
- [8] Peukert S, Miller-Moslin K. Small-molecule inhibitors of the Hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics [J]. ChemMedChem, 2010, 5: 500-512.
- [9] Taipale J, Chen JK, Cooper MK, et al. Effects of oncogenic mutations in smoothened and patched can be reversed by cyclopamine [J]. Nature, 2000, 406: 1005-1009.
- [10] Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer [J]. Dev Cell, 2008, 15: 801-812.
- [11] Doggrell SA. The hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 shows potential in skin and other cancers [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2010, 19: 451-454.
- [12] Palermo R, Ghirga F, Piccioni MG, et al. Natural products inspired modulators of cancer stem cells-specific signaling pathways Notch and Hedgehog [J]. Curr Pharm Des, 2018, 24: 4251-4269.
- [13] Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, et al. Small-molecule modulators of hedgehog signaling: identification and characterization of smoothened agonists and antagonists [J]. J Biol, 2002, 1: 10.
- [14] Chen JK, Taipale J, Young KE, et al. Small molecule modulation of smoothened activity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99: 14071-14076.
- [15] Hughes JD, Blagg J, Price DA, et al. Physicochemical drug properties associated with *in vivo* toxicological outcomes [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18: 4872-4875.
- [16] Munchhof MJ, Li Q, Shavnya A, et al. Discovery of PF-04449913, a potent and orally bioavailable inhibitor of smoothened [J]. ACS Med Chem Lett, 2012, 3: 106-111.
- [17] Xin M, Ji X, De La Cruz LK, et al. Strategies to target the Hedgehog signaling pathway for cancer therapy [J]. Med Res

- Rev, 2018, 38: 870-913.
- [18] Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28: 3636-3643.
- [19] Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102: 932-941.
- [20] Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate [J]. *Nature*, 2010, 465: 966.
- [21] Dang L, Su SM. Isocitrate dehydrogenase mutation and (R)-2-hydroxyglutarate: from basic discovery to therapeutics development [J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 305-331.
- [22] Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18: 553-567.
- [23] Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation [J]. *Nature*, 2012, 483: 474-478.
- [24] Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells [J]. *Science*, 2013, 340: 626-630.
- [25] Popovici-Muller J, Saunders JO, Salituro FG, et al. Discovery of the first potent inhibitors of mutant IDH1 that lower tumor 2-HG *in vivo* [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3: 850-855.
- [26] Popovici-Muller J, Lemieux RM, Artin E, et al. Discovery of AG-120 (ivosidenib): a first-in-class mutant IDH1 inhibitor for the treatment of IDH1 mutant cancers [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9: 300-305.
- [27] Burgus R, Butcher M, Amoss M, et al. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1972, 69: 278-282.
- [28] Brostoff SW, Eylar EH. The proposed amino acid sequence of the P1 protein of rabbit sciatic nerve myelin [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1972, 153: 590-598.
- [29] Conn PM, McArdle CA, Andrews WV, et al. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope [J]. *Biol Reprod*, 1987, 36: 17-35.
- [30] Conn PM. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action [J]. *Endocr Rev*, 1986, 7: 3-10.
- [31] Barbieri RL. Clinical applications of GnRH and its analogues [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 1992, 3: 30-34.
- [32] Karten MJ, Rivier JE. Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective [J]. *Endocr Rev*, 1986, 7: 44-66.
- [33] Huirne JA, Lambalk CB. Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists [J]. *Lancet*, 2001, 358: 1793-1803.
- [34] Betz SF, Zhu YF, Chen C, et al. Non-peptide gonadotropin-releasing hormone receptor antagonists [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 3331-3348.
- [35] Cho N, Harada M, Imaeda T, et al. Discovery of a novel, potent, and orally active nonpeptide antagonist of the human luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor [J]. *J Med Chem*, 1998, 41: 4190-4195.
- [36] Hara T, Araki H, Kusaka M, et al. Suppression of a pituitary-ovarian axis by chronic oral administration of a novel nonpeptide gonadotropin-releasing hormone antagonist, TAK-013, in cynomolgus monkeys [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 1697-1704.
- [37] Wilcoxon KM, Zhu YF, Connors PJ, et al. Synthesis and initial structure-activity relationships of a novel series of imidazo [1,2-a]pyrimid-5-ones as potent GnRH receptor antagonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 2179-2183.
- [38] Zhu YF, Struthers RS, Connors PJ, Jr., et al. Initial structure-activity relationship studies of a novel series of pyrrolo[1,2-a]pyrimid-7-ones as GnRH receptor antagonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 399-402.
- [39] Zhu YF, Gross TD, Guo Z, et al. Identification of 1-arylmethyl-3-(2-aminoethyl)-5-aryluracil as novel gonadotropin-releasing hormone receptor antagonists [J]. *J Med Chem*, 2003, 46: 2023-2026.
- [40] Tucci FC, Zhu YF, Struthers RS, et al. 3-[(2R)-Amino-2-phenylethyl]-1-(2,6-difluorobenzyl)-5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-6-methylpyrimidin-2,4-dione (NBI 42902) as a potent and orally active antagonist of the human gonadotropin-releasing hormone receptor. Design, synthesis, and *in vitro* and *in vivo* characterization [J]. *J Med Chem*, 2005, 48: 1169-1178.
- [41] Chen C, Chen Y, Pontillo J, et al. Potent and orally bioavailable zwitterion GnRH antagonists with low CYP3A4 inhibitory activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 3301-3305.
- [42] Ekins S, Stresser DM, Williams JA. *In vitro* and pharmacophore insights into CYP3A enzymes [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24: 161-166.
- [43] Chen C, Wu D, Guo Z, et al. Discovery of sodium R-(+)-4-{2-[5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-3-(2-fluoro-6-[trifluoromethyl]benzyl)-4-methyl-2,6-dioxo-3,6-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl]-1-phenylethylamino}butyrate (elagolix), a potent and orally available nonpeptide antagonist of the human gonadotropin-releasing hormone receptor [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 7478-7485.
- [44] Bray M. Pathogenesis and potential antiviral therapy of complications of smallpox vaccination [J]. *Antivir Res*, 2003, 58: 101-114.
- [45] Redfield RR, Wright DC, James WD, et al. Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency

- virus (HIV) disease [J]. *N Engl J Med*, 1987, 316: 673-676.
- [46] Baker RO, Bray M, Huggins JW. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections [J]. *Antivir Res*, 2003, 57: 13-23.
- [47] Kern ER. *In vitro* activity of potential anti-poxvirus agents [J]. *Antivir Res*, 2003, 57: 35-40.
- [48] Bronson JJ, Ferrara LM, Hitchcock MJ, et al. (S)-1-(3-Hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl) cytosine (HPMPC): a potent antiherpesvirus agent [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1990, 278: 277-283.
- [49] Lalezari JP, Stagg RJ, Kuppermann BD, et al. Intravenous cidofovir for peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. A randomized, controlled trial [J]. *Ann Intern Med*, 1997, 126: 257-263.
- [50] De Clercq E, Sakuma T, Baba M, et al. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines [J]. *Antivir Res*, 1987, 8: 261-272.
- [51] de Oliveira CB, Stevenson D, LaBree L, et al. Evaluation of Cidofovir (HPMPC, GS-504) against adenovirus type 5 infection *in vitro* and in a New Zealand rabbit ocular model [J]. *Antivir Res*, 1996, 31: 165-172.
- [52] Snoeck R, Bossens M, Parent D, et al. Phase II double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of cidofovir topical gel for the treatment of patients with human papillomavirus infection [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 33: 597-602.
- [53] Neyts J, De Clercq E. Efficacy of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine for the treatment of lethal vaccinia virus infections in severe combined immune deficiency (SCID) mice [J]. *J Med Virol*, 1993, 41: 242-246.
- [54] LeDuc JW, Damon I, Relman DA, et al. Smallpox research activities: U.S. interagency collaboration, 2001 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8: 743-745.
- [55] Bailey TR, Rippin SR, Opsitnick E, et al. *N*-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-Octahydro-1,3-dioxo-4,6-ethenocycloprop[*f*]isindol-2-(1*H*)-yl)carboxamides: identification of novel orthopoxvirus egress inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2007, 50: 1442-1444.
- [56] Yang G, Pevear DC, Davies MH, et al. An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus challenge [J]. *J Virol*, 2005, 79: 13139-13149.
- [57] Heo DS, Park JG, Hata K, et al. Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity [J]. *Cancer Res*, 1990, 50: 3681-3690.
- [58] Grosenbach DW, Hruby DE. Analysis of a vaccinia virus mutant expressing a nonpalmitylated form of p37, a mediator of virion envelopment [J]. *J Virol*, 1998, 72: 5108-5120.
- [59] Husain M, Moss B. Similarities in the induction of post-Golgi vesicles by the vaccinia virus F13L protein and phospholipase D [J]. *J Virol*, 2002, 76: 7777-7789.
- [60] Husain M, Weisberg A, Moss B. Topology of epitope-tagged F13L protein, a major membrane component of extracellular vaccinia virions [J]. *Virology*, 2003, 308: 233-242.