

作用于 AT₂ 受体化合物的研究进展

张艳春^{1,2*}, 张祖志¹, 徐进宜³, 王丹慧¹, 徐梅月¹

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012;
3. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 血管紧张素 II 2 型受体 (angiotensin receptor type 2, AT₂R) 是血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 受体亚型之一, 选择性激动或拮抗 AT₂ 受体可引起血管舒张、抗细胞增殖、促突起生长、阻断神经元兴奋性等。AT₂ 受体可作为潜在的药物靶标用于心血管疾病、纤维化、炎症、神经元疾病和肿瘤等疾病的治疗。新型选择性作用于 AT₂ 受体的药物研发以及 AT₂ 受体参与的细胞内信号转导机制的研究是一个具有挑战性但值得深入研究的领域。本文对 AT₂ 受体蛋白的研究进展以及作用于 AT₂ 受体化合物的研究进行阐述, 结合构效关系分析, 为该领域进一步的研究提供借鉴和指导。

关键词: 血管紧张素 II 2 型受体; 激动剂; 拮抗剂; 选择性; 构效关系

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)03-0711-12

Review of novel compounds that act on the AT₂ receptor

ZHANG Yan-chun^{1,2*}, ZHANG Zu-zhi¹, XU Jin-yi³, WANG Dan-hui¹, XU Mei-yue¹

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012, China; 3. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Selective activation or inhibition of the angiotensin II type 2 (AT₂) receptor can cause vasodilation, decrease cell proliferation, promote neurite outgrowth and block neuronal excitability. The AT₂ receptor can be used as a potential drug target for the treatment of cardiovascular diseases, fibrosis, inflammation, neuronal diseases and tumors. Research and development of new drugs that selectively act on the AT₂ receptor and the mechanism of intracellular signal transduction involving the AT₂ receptor is a challenging but worthy endeavor. We review research progress on the AT₂ receptor and compounds that act on the AT₂ receptor, along with structure-activity relationship analysis, to provide reference and guidance for further research in this field.

Key words: angiotensin receptor type 2 receptor; agonist; antagonist; selectivity; structure and activity relationship

AT₂受体是血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 受体的其中一个亚型, 属于 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 家族成员之一。AT₂受体在胎儿组织中高水平表达, 随着年龄的增长, 组织中 AT₂受体含量逐渐降低, 并在心力衰竭、心肌梗死、血管损

伤、伤口愈合等病理损伤中出现明显的上调^[1-3]。研究发现, AT₂受体的活化可以抵消由 AT₁受体 (血管紧张素 II 受体的另一种亚型) 的激活所引起的生理效应, 如激动 AT₂受体可以抑制由 AT₁受体激活引起的血压升高^[4]。因此, 早期研究针对 AT₂受体在肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin-system, RAS) 中的作用以及潜在信号通路中的作用展开了探讨。大量研究证实, AT₂受体可介导 RAS 中的多种细胞内信号的转导, 产

收稿日期: 2020-08-24; 修回日期: 2020-09-23.

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目 (1908085MH269).

*通讯作者 Tel: 86-551-68129062, E-mail: yczhang2017@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1389

生抗增殖、抗纤维化、抗肿瘤细胞增生、抗血栓、促进细胞凋亡和分化等作用^[5-7]。

近期研究发现,激动AT₂受体可以引起大鼠十二指肠黏膜的碱性成分分泌增多,增强十二指肠黏膜抵御胃酸的能力;拮抗AT₂受体可以阻断神经元兴奋性,继而产生缓解疼痛的作用^[8,9]。因此,AT₂受体被认为是具有潜力的药物靶标。从早期对内源性配体Ang II进行结构修饰,得到一系列肽类AT₂受体激动剂和拮抗剂;到后来以非肽类、非选择性AT₂受体激动剂L-162313为先导化合物,得到的一系列非肽类AT₂受体激动剂和拮抗剂,针对作用于AT₂受体化合物的研究从未止步。

本文对AT₂受体的结构特点、介导的生理效应、细胞信号转导的分子机制以及作用于AT₂受体的化合物的研究进展进行总结,并对现有研究中存在的问题和经验进行分析讨论,为后期深入研究提供参考。

1 AT₂受体蛋白的研究进展

1.1 AT₂受体蛋白的结构

AT₂受体与AT₁受体仅有34%的基因序列同源性,在基因结构、特性、蛋白质序列、组织表达、信号和调控等方面与AT₁受体均有差异^[10,11]。人类AT₂受体基因位于染色体Xq22-Xq23上(AT₁受体基因位于3q21-

3q25),编码受体基因的位置导致了其在表达和功能上的性别差异^[12,13]。AT₂受体蛋白是由一个7TM束(跨膜螺旋I-VII)和一个细胞内两性螺旋VIII组成的膜蛋白。与AT₁受体及其他肽结合的GPCRs类似(图1^[14]),AT₂受体的细胞外环2(ECL2)处具有一个 β -发夹构象和两个二硫键:①连接受体蛋白的N端和细胞外环3(ECL3)的二硫键,氨基酸残基为N端:Cys35;ECL3:Cys30;②连接ECL2和螺旋III的二硫键,氨基酸残基为螺旋III:Cys117;ECL2:Cys195^[14-16]。研究表明,任何一个二硫键被还原均可改变AT₂受体与配体分子的亲和力,也就是说,AT₂受体蛋白中的二硫键对配体与受体之间的亲和力起着关键作用^[15]。

1.2 激活AT₂受体蛋白的结构基础

Zhang等^[14]认为,AT₂受体蛋白的螺旋VIII处于一个非经典的位置,这种非经典位置阻断了AT₂受体对G蛋白或 β -抑制蛋白(β -arrestin)的招募,继而使得AT₂受体具有与AT₁受体不同的信号转导机制。Connolly等^[17]认为螺旋VIII所处的非典型位置可能在受体与下游效应器耦合的能力中发挥作用,继而阻碍了受体与下游信号调节因子G蛋白或 β -抑制蛋白的结合,使得AT₂受体具有与AT₁受体不同的信号通路。研究发现,AT₂受体螺旋VIII朝向细胞内环1(AT₁受体的螺旋

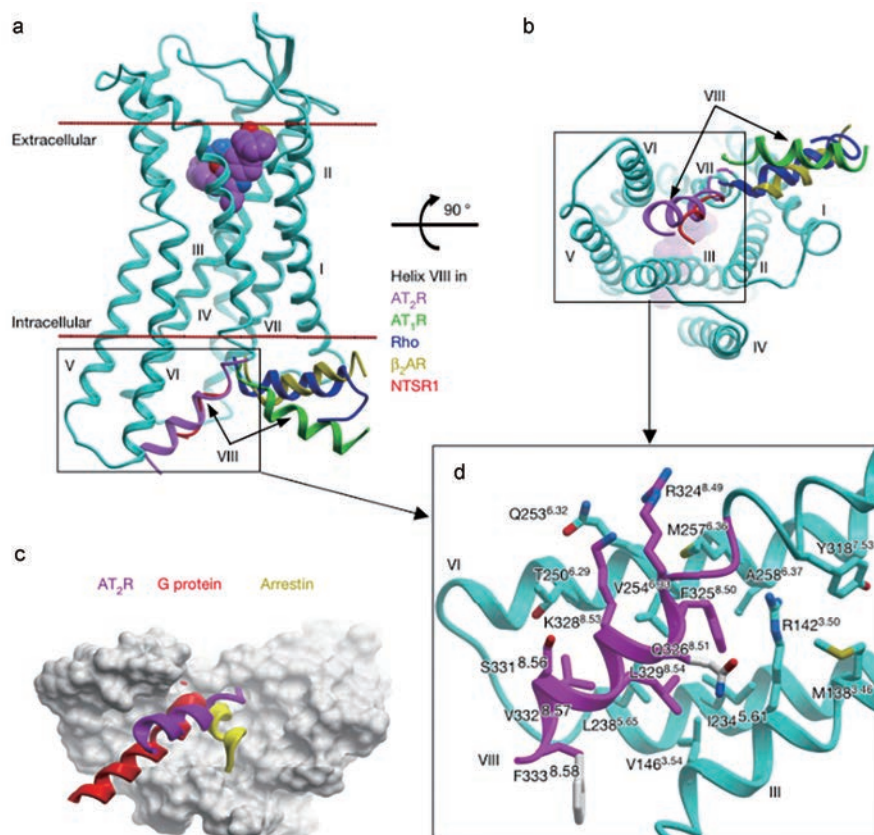


Figure 1 Helix VIII blocks the putative G protein/ β -arrestin-binding site of AT₂R

VIII则与细胞内环1平行),使得螺旋VIII与细胞内环1形成一种相互作用,这种相互作用阻断了细胞内环1与下游效应器的结合,使得下游信号调节因子G蛋白或 β -抑制蛋白未能参与AT₂受体的激活^[17]。此结果表明AT₂受体的细胞内环1和螺旋VIII之间的相互作用控制着受体的激活。

1.3 AT₂受体蛋白的活性位点

对于非肽类小分子配体,AT₂受体的活性口袋的中心位于由K^{5.42}、R^{4.64}以及Y^{7.43}残基围成的空腔,主要通过氢键、疏水、盐桥以及范德华力与配体形成相互作用,与结合位点有关的氨基酸残基为:F^{2.53}、F^{7.43}、F^{6.51}、L^{2.57}、W^{2.60}、W^{6.48}、Y^{2.65}、Y^{2.64}、P^{7.36}、I^{7.39}、L^{3.22}、M^{3.66}、V^{3.32}。Ang II (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸)与AT₂受体靶蛋白的结合模型表明^[18]:Ang II深嵌入整个受体蛋白的跨膜区(transmembrane domain, TMD),His⁶位于由AT₂受体靶蛋白的Y^{2.64}、W^{2.60}、L^{3.32}和F^{7.43}组成的空腔中;Phe⁸则位于由TM3和TM5-TM7组成的疏水区,且Ang II的C末端能够与R^{4.64}和K^{5.42}残基形成离子相互作用;Ang II的C末端采用了一种延长的构象位于受体蛋白中,且C末端三肽(His⁶-Pro⁷-Phe⁸)与非肽类配体的结构覆盖,即处于相同大小的活性口袋(图2^[18])。

综上,目前达成一致的观点是:由W^{2.60}、K^{5.42}、R^{4.64}、M^{3.36}、F^{7.43}以及ECL2的R182残基组成的活性口袋与AT₂受体的活性关系密切;由TM3和TM7在靶蛋白的N末端处形成的活性口袋,与配体对AT₂受体的选择性有关。即受体蛋白在TM3和TM7形成的口袋中:AT₁受体含有Y^{7.43}残基,能够与TM3的V^{3.32}残基形成氢键(使得TM3和TM7形成一种相互作用);而AT₂

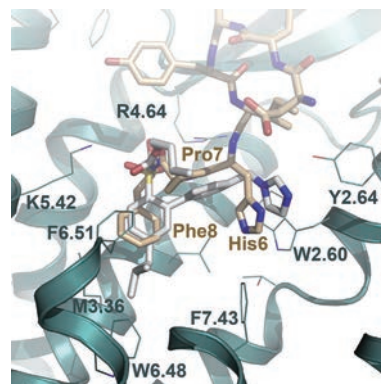


Figure 2 Binding mode of the endogenous agonist, Ang II (beige) and non-peptide ligand (light gray) on the modeled active-like conformation of the AT₂R

受体含有F^{7.43}残基(缺少氢键供体),该残基不能与TM3的V^{3.32}残基形成氢键(TM3不能与TM7形成相互作用),继而产生选择性差异。

2 作用于AT₂受体的激动剂研究进展

现有的AT₂受体激动剂主要包括拟肽类AT₂受体激动剂和小分子AT₂受体激动剂。

2.1 拟肽类AT₂受体激动剂研究进展

Ang II的氨基酸序列为:Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸,与AT₂受体结合时处于一种延长的构象。Ang II与AT₁受体和AT₂受体的亲和力分别为0.31和0.63 mol·L⁻¹,对AT₂受体几乎无选择性^[19,20]。因此,早期作用于AT₂受体化合物的设计主要围绕Ang II(图3)的氨基酸序列,对某个氨基酸残基或其中的某个片段进行修饰与改造,以提高化合物对AT₂受体的选择性。

2.1.1 用肌氨酸取代Asp¹得到的化合物 参考早期

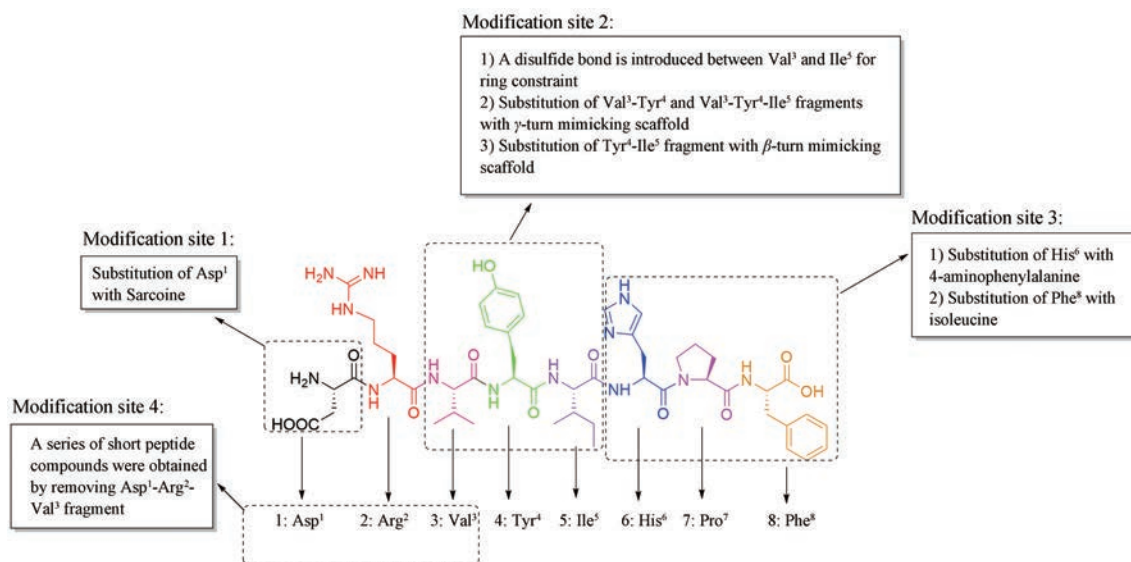


Figure 3 Modification sites and structure of Ang II

作用于 AT_1 受体化合物的研究思路, 研究围绕 Ang II 的氨基酸残基对 AT_2 受体的亲和力的影响, 发现 Asp¹ 不是 Ang II 及其类似物与 AT_2 受体结合的必需基团^[21-23]。于是有人开始尝试用肌氨酸 (Sar) 来替代 Ang II 的 Asp¹, 并保留与 AT_2 受体的亲和力中起着关键作用的 Arg² 残基, 得到了化合物 **1** (Sar¹-Ang II, 图4)。结果表明, 这种修饰不仅保留了对 AT_2 受体一定的激动效应, 提高了代谢稳定性, 而且增强了配体与 AT_1 受体和 AT_2 受体的亲和力, 但该化合物对 AT_2 受体仍不具有选择性^[24]。

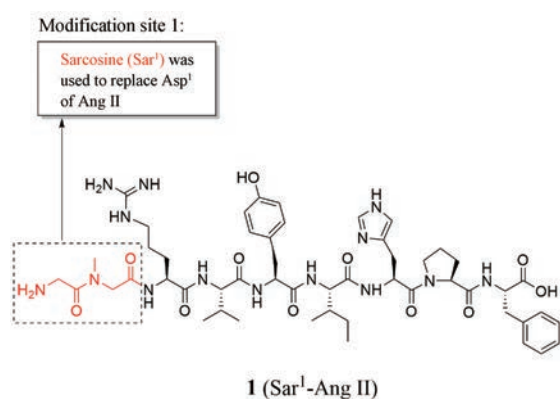


Figure 4 The modified site of Ang II and the structure of compound **1**

2.1.2 用二硫键连接 Val³ 和 Ile⁵ 得到的化合物 为提高 Ang II 及其类似物对 AT_2 受体的选择性, 人们除了对 Ang II 进行线性修饰 (如化合物 **1**) 外, 还尝试了对 Ang II 进行环约束 (用二硫键连接 Val³ 和 Ile⁵), 继而得到一系列大环二硫类 Ang II 类似物。13 元环系的二硫化合物 **2** (c[Hcy^{3,5}]Ang II, 图5) 是一种强效的 AT_1 受体激动剂, 具有一定的血管收缩活性, 但对 AT_2 受体的选择性很低 (K_i : $AT_1R = 0.23 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $AT_2R = 4.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[25-27]。

在化合物 **2** 的两个硫原子之间引入亚甲基, 得到

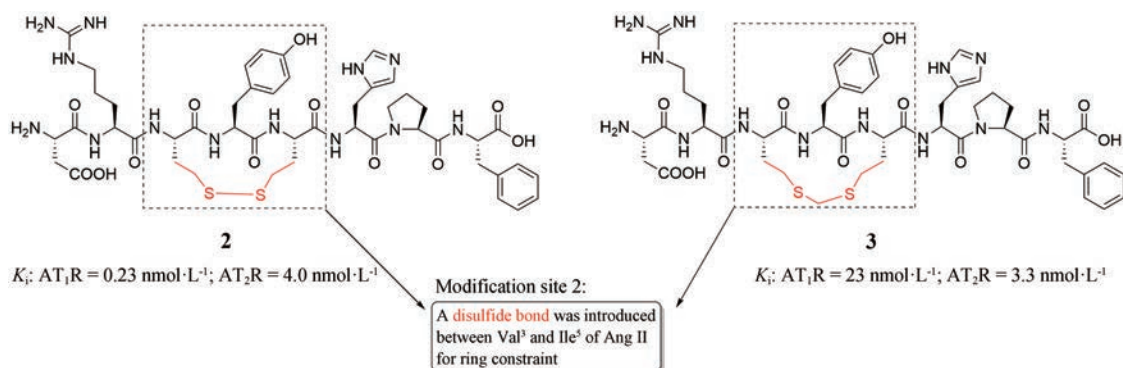


Figure 5 The modified site of Ang II and the structures of compounds **2** and **3**

了 14 元亚甲基二硫醚单环化的拟肽类化合物 **3** (图5)。该化合物降低了对 AT_1 受体的亲和力, 并且对 AT_2 受体的亲和力几乎没影响 (K_i : $AT_1R = 23 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $AT_2R = 3.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[28]。

2.1.3 用 γ 转角模拟结构取代 Val³-Tyr⁴-Ile⁵ 片段得到的化合物 研究表明, 脯氨酸-3-氨基-2-甲氧基苯甲酸是一种根据构象分析设计得到的 γ 转角模拟结构^[29]。用该结构取代 Ang II 的 Val³-Tyr⁴ 片段可得到一种高效的拟肽类 AT_2 受体激动剂, 如化合物 **4** (图6)。化合物 **4** 可以诱导 NG108-15 细胞的突起生长, 且在选择性 AT_2 受体拮抗剂 PD-123319 (图6) 的存在下, 这种生长受到抑制^[29]。

进一步研究发现, 去除 Ang II 的 Val³ 残基使得 Arg² 残基和 Tyr⁴ 残基间的距离变短, 导致配体失去了对 AT_2 受体的激动活性, 说明 Arg² 残基在空间上相对于 TYR⁴ 残基的位置对配体的活性至关重要; 用 γ 转角模拟结构取代 Ang II 的 Ile⁵-His⁶ 片段, 对于提高配体对 AT_2 受体的选择性和活性是无效的。于是, 尝试用具有 γ 转角构象的苯二氮草结构取代 Ang II 的 Tyr⁴-Ile⁵ 片段, 得到了化合物 **5** (图6); 继而又取代 Ang II 的 Val³-Tyr⁴-Ile⁵ 片段, 得到了化合物 **6** (图6)。与 Ang II 类似, 化合物 **5**、**6** 均可通过 MEK/p42/p44^{mapk} 和一氧化氮/鸟苷酸环化酶/cGMP 信号通路来介导轴突生长^[30]。

2.1.4 用 β 转角模拟结构取代 Tyr⁴-Ile⁵ 片段得到的化合物 前期研究表明, 用构象限制的结构 (基于 γ 转角构象的结构) 取代 Ang II 的 Tyr⁴-Ile⁵ 片段得到了具有选择性的拟肽激动剂。于是, 人们尝试用具有 β 转角构象的苯二氮草结构取代 Ang II 的 Tyr⁴-Ile⁵ 片段, 得到了化合物 **7** (图7)。研究发现, 化合物 **7** 可以诱导 NG108-15 细胞的突起生长, 因此可作为拟肽类选择性 AT_2 受体激动剂^[30]。综上所述, 这种构象限制的拟肽类化合物 (含 γ 转角模拟结构和 β 转角模拟结构) 可提高配体对 AT_2 受体的选择性, 同时保留对 AT_2 受体的激动活性。

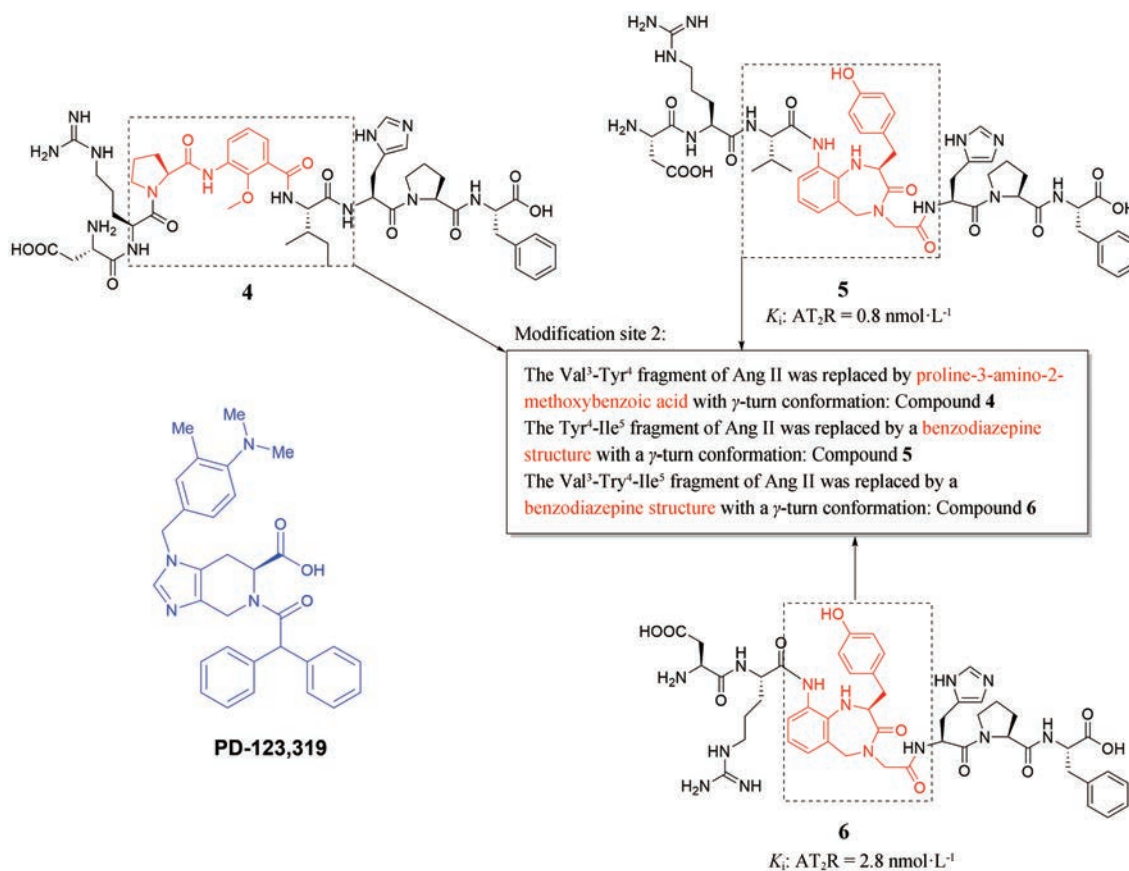


Figure 6 The modified site of Ang II and structures of compounds 4–6, PD-123319

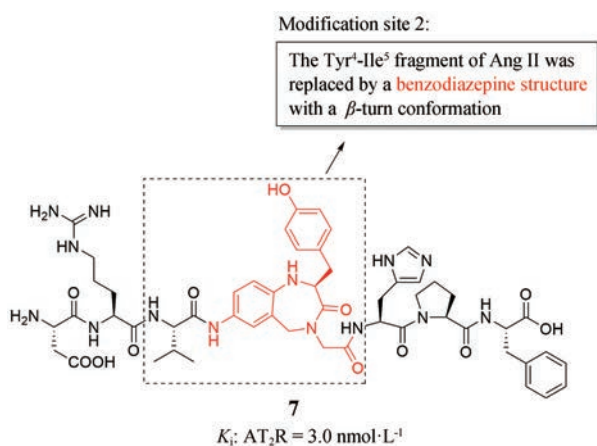


Figure 7 The modified site of Ang II and the structure of compound 7

2.1.5 用4-氨基-苯丙氨酸和酪氨酸取代 His⁶ 得到的化合物 研究发现, 用4-氨基-苯丙氨酸 (4-NH₂-Phe) 取代 Ang II 的 His⁶ 得到化合物 **8** (4-NH₂-Phe⁶-Ang II, 图8)。而且, 在G蛋白稳定激动剂鸟苷5'-O-(3-硫代三磷酸) (GTP γ S) 存在时, 肝脏中化合物 **8** 与 AT₂ 受体的结合亲和力降低, 即说明化合物 **8** 是一个高选择性的拟肽类 AT₂ 受体激动剂^[31, 32]。

同时, 用酪氨酸 (Try) 取代 Ang II 的 His⁶ 得到了化合物 **9** (Tyr⁶-Ang II, 图8)。研究发现, 化合物 **9** 不仅对 AT₂ 受体具有较好的激动活性, 还具有一定的选择性, 并可诱导 AT₂ 受体过度表达的 PC12 细胞突起生长, 抑制 MCF-7 乳腺癌细胞增殖及小鼠胰腺导管癌 (PDAC) 的移植瘤生长^[32-34]。

2.1.6 去除 Asp¹-Arg²-Val³ 片段得到的短肽化合物 1991年, Gasparo 等^[35]报道, 乙酰化五肽 Ac-Tyr-Val-His-Pro-Phe 和 Ac-Tyr-Val-His-Pro-Ile 均表现出较高的 AT₂ 受体亲和力和选择性。为了检测这些缺乏 Asp¹-Arg²-Val³ 片段的乙酰化五肽是否真的能够激活 AT₂ 受体, Guimond 等^[36]合成了化合物 **10** (Ac-Tyr-Val-His-Pro-Phe, 图9)。化合物 **10** 能够激活 AT₂ 受体, 但对 AT₂ 受体的选择性并不高, 即缺乏 Asp¹-Arg²-Val³ 片段的乙酰化五肽可以激活 AT₂ 受体, 但对 AT₂ 受体不具有选择性。因此, 为提高化合物对 AT₂ 受体的选择性, 人们开始尝试分别对化合物 **10** 的 C 端 (苯丙氨酸) 以及 N 端 (乙酰化酪氨酸) 进行修饰改造。

化合物 **10** 的 C 端修饰: 用异亮氨酸 (Ile) 取代化合物 **10** 的 C 端苯丙氨酸 (Phe) 得到了化合物 **11** (图9), 在保留其激动活性的基础上, 提高了对 AT₂ 受体的选择

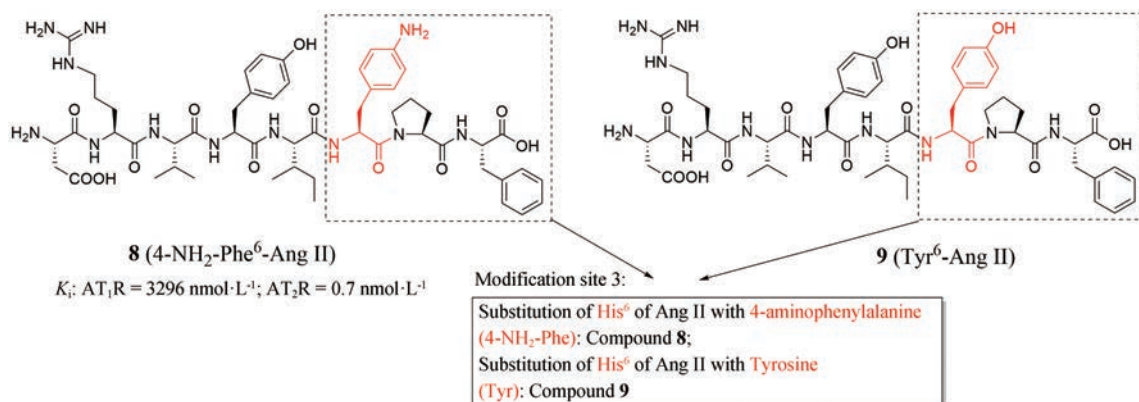


Figure 8 The modified site of Ang II and structures of compounds 8 and 9

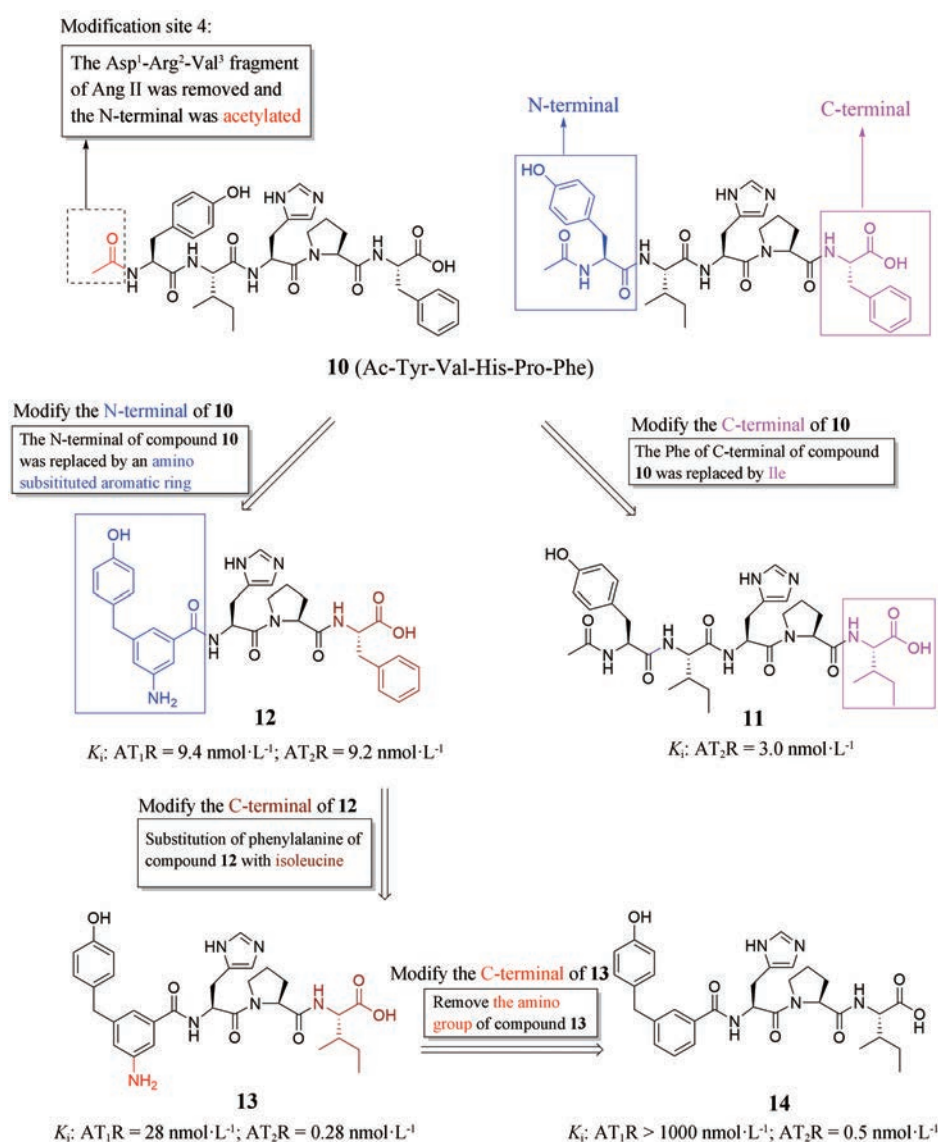


Figure 9 The modified site of Ang II and structures of compounds 10–14

性 (K_i : AT₂R = 3.0 nmol·L⁻¹)^[37]。

化合物 10 的 N 端修饰: 用氨基取代的芳环结构取代化合物 10 的 N 端 (乙酰化酪氨酸), 得到了化合物 12

(图 9), 对 AT₂ 受体无选择性 (K_i : AT₁R = 9.4 nmol·L⁻¹; AT₂R = 9.2 nmol·L⁻¹)。为进一步提高化合物 12 对 AT₂ 受体的亲和力, 保留化合物 12 的 N 端结构, 用异亮氨酸

(Ile) 取代C端的苯丙氨酸 (Phe) 得到了化合物 **13** (图9), 提高了对 AT₂ 受体的选择性 (K_i : AT₁R = 28 nmol·L⁻¹; AT₂R = 0.28 nmol·L⁻¹)。同时, 也再次证明了作用于 AT₂ 受体的短肽化合物的C端含有亲脂性侧链时, 可提高配体对 AT₂ 受体的亲和力。在此研究的基础上, 为获得具有更高选择性的 AT₂ 受体激动剂, 人们删除化合物 **13** 的N端苯环上的氨基, 得到了化合物 **14** (图9), 作为高选择性的短肽 AT₂ 受体激动剂^[37]。

综上, 通过对现有的作用于 AT₂ 受体的拟肽类化合物的总结, 发现: ① Ang II 中的 Asp¹ 不是与受体结合所必需的; ② Arg² 的氨基酸残基胍基团与 N 末端在空间上影响 Ang II 类似物与受体的结合; ③ Val³-Tyr⁴-Ile⁵ 区域的 γ -转角构型和 β -转角构型有助于 Ang II 类似物与受体的结合, 但不同 γ -转角和 β -转角结构取代的化合物对受体亲和力不同, 作用也不相同; ④ 取代 His⁶ 的基团包含咪唑环、4-氨基或 4-羟基苯基均能提高化合物对 AT₂ 受体的选择性; ⑤ 7 位的芳香氨基酸残基与 8 位的疏水性氨基酸残基之间的作用也可提高化合物对 AT₂ 受体的选择性; ⑥ C 端以 Ile 取代 Phe⁸ 后得到的化合物对 AT₂ 受体的亲和力增高数倍。

2.2 小分子 AT₂ 受体激动剂研究进展

2.2.1 非选择性小分子 AT₂ 受体激动剂

化合物 **16** (L-158,807, 图 10) 是以化合物 **15** (S-8307: 选择性 Ang II 受体拮抗剂, 但拮抗活性很弱, 图 10) 为先导化合物, 进行结构修饰 (S-8307→EXP6155→EXP6803→EXP7711→DUP753→L-158,807) 得到的 AT₁/AT₂ 受体双重拮抗剂^[38]。化合物 **16** 虽然对 AT₁、AT₂ 受体产生了较高的拮抗活性, 但不具备对 AT₂ 受体的选择性。以提高化合物对 AT₂ 受体的选择性为目的, 对化合物 **16**

进行结构修饰: 将苯环换为噻吩环 (化合物 **17**, L-158827, 图 10); 或将与苯环连接的 1,2,4-三氮唑换为磺酰胺片段 (化合物 **18**, L-159282, 图 10), 但都没有达到理想的激动活性和选择性。于是利用化合物 **17** 的苯联噻吩骨架和化合物 **18** 的磺酰胺片段, 并保留苄基咪唑并吡啶环, 得到了化合物 **19** (L-162313, 图 10)^[39,40]。体内试验表明, 静脉注射化合物 **19** 可使小鼠的平均动脉压增加, 且该升压作用可以被 AT₁ 受体拮抗剂氯沙坦阻断; 化合物 **19** 对大鼠十二指肠黏膜的碱性分泌增加的作用可以被选择性 AT₂ 受体拮抗剂 PD-123319 抵消, 因此确定化合物 **19** 为 AT₁ 受体和 AT₂ 受体的非选择性小分子激动剂^[41]。

2.2.2 选择性小分子 AT₂ 受体激动剂

为提高化合物 **19** 对 AT₂ 受体的选择性, Wan 等^[42] 在化合物 **19** 的基础上, 通过活性筛选并借鉴前期课题组的经验, 将咪唑并吡啶替换为苄基咪唑, 得到了第一个具有较高选择性的小分子 AT₂ 受体激动剂: 化合物 **20** (C21, 图 11)。研究表明, C21 可以诱导细胞轴突生长、调节 MAPK 信号通路、增加大鼠十二指肠黏膜的碱性分泌, 降低自发性高血压大鼠 (SHR) 的平均动脉压^[43-45]。目前, C21 正处于临床 II 期试验, 主要用于肺和其他器官纤维化的疾病治疗。人们进一步将化合物 **19** 的噻吩环替换为苯环, 得到了化合物 **21** (L-162782, 图 11)。该化合物具有与化合物 **20** 相当的激动活性和 AT₂ 受体选择性 (K_i : AT₁R > 10 μ mol·L⁻¹; AT₂R = 0.6 nmol·L⁻¹)。

近年, 针对小分子 AT₂ 受体激动剂的研究, 主要围绕对 C21 和 L-16278 2 进行结构修饰开展^[46]。现有的构效关系表明: ① 磺酰胺基为配体拥有对 AT₂ 受体选择性的必需基团; ② 苄基咪唑和咪唑并吡啶可以采用

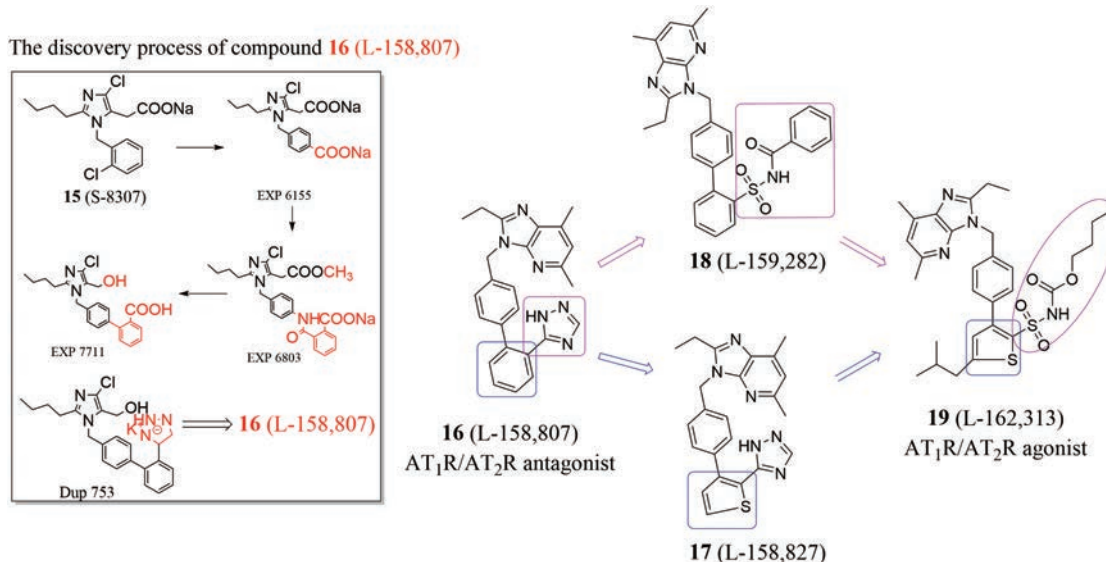


Figure 10 The discovery process of compound **16** and structures of compounds **16**–**19**

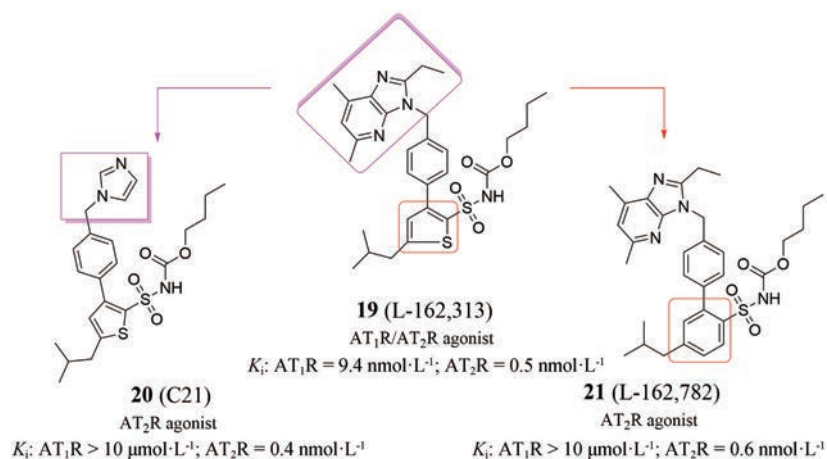


Figure 11 Structures of compounds 19–21

相似大小的含氮碱性基团代替,可使配体保持一定的选择性;③联苯和苯联噻吩对活性和选择性几乎没影响,可能由于此结构只起到骨架支撑的作用。因此,C21和L-162782的R₁、R₂、R₃部位成为此系列化合物结构修饰的关注点(如图12,列举了部分基团),以获得更理想的选择性AT₂受体激动剂。

3 作用于AT₂受体的拮抗剂研究进展

3.1 第一代AT₂受体拮抗剂

化合物**22** (spinacine, 图13)是在对Ang II的组氨酸(His⁶, Ang II的功能活性片段Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸中的重要氨基酸)改造中得到的醛环化衍生物,是非肽类Ang II受体拮抗剂,并且对AT₂受体具有一定选择性^[47]。于是,以化合物**22**为先导化合物,结合4,5,6,7-四氢-3H-咪唑[4,5-c]吡啶-6-羧酸(化合物**22**)衍生物的构效关系,通过人工合成得到了化合物**23** (PD-123319, 图13),作为高效高选择性的AT₂受体拮抗剂^[48]。PD-123319能够拮抗由激活AT₂受体导致的细胞功能障碍、细胞生长停滞和凋亡,在中枢神经系统中,还具有神经保护功能^[49,50]。目前,PD-123319常作为工具药用于小分子AT₂受体拮抗剂的研究。

在此研究的基础上,将PD-123319的二甲基氨基用甲氧基取代,得到了化合物**24** (EMA300, 图13),提高了对AT₂受体的选择性和拮抗活性。PD-123319的类似物:化合物**25** (EMA400, 图13)和化合物**26** (EMA401, 图13)的亲合力较高,EMA401的受体结合亲和力与PD-123319相当,并在治疗神经病理性疼痛中具有一定的止痛作用^[51,52]。目前,第一代选择性AT₂受体拮抗剂临床主要用于神经病理性疼痛的治疗,其中EMA401正处于临床II期试验,用于带状疱疹神经痛的治疗^[53]。

3.2 第二代AT₂受体拮抗剂

在对AT₂受体激动剂C21及其类似物的结构进行修饰的同时,人们发现结构的微小改变,可使得活性发生翻转^[54]。如图所示,化合物**20** (C21, 图14)和化合物**27** (C38, 图14)由于苯基咪唑的位置由对位转到间位,即可使化合物的活性由激动转变为拮抗^[55]。为进一步探究结构的微小改变对配体活性的影响,Wallinder等^[56-58]合成了具有咪唑骨架的作用于AT₂受体的化合物,以评估异丁基侧链在空间中的取向对AT₂受体的亲和力和活性产生的影响。在所合成的4对异丁基构象限制的对映异构体中,化合物**28a**(-)和化合物**28b**(+),

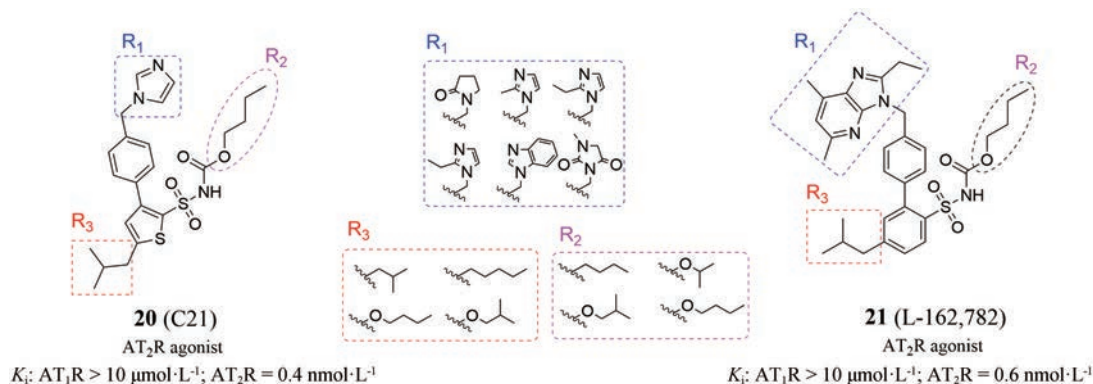


Figure 12 The modified site of compounds 20 and 21 and structures of R₁, R₂, R₃

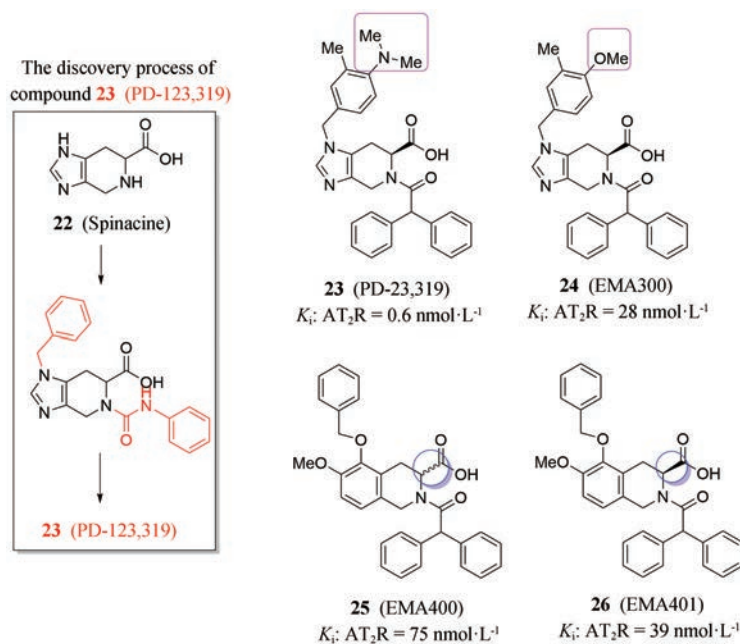


Figure 13 The discovery process of compound **23** and structures of compounds **22**–**26**

化合物**29a**(-)和化合物**29b**(+)均实现了活性的翻转^[59]。如图14所示,左旋体化合物**28a**(-)为激动剂,右旋体化合物**28b**(+)则为拮抗剂;左旋体化合物**29a**(-)为激动剂,右旋体化合物**29b**(+)则为拮抗剂。因此,近年对选择性AT₂受体拮抗剂的结构修饰,主要以现有选择性AT₂受体激动剂为先导化合物,通过对其结构进

行微小改变,获得具有选择性的作用于AT₂受体的拮抗剂,但结构的微小改变使得活性翻转的机制仍不明确,构效关系仍未阐明。

4 总结与展望

AT₂受体与许多疾病的发生关系逐渐得到重视,是临床治疗心血管疾病、纤维化、炎症、肿瘤学和神经

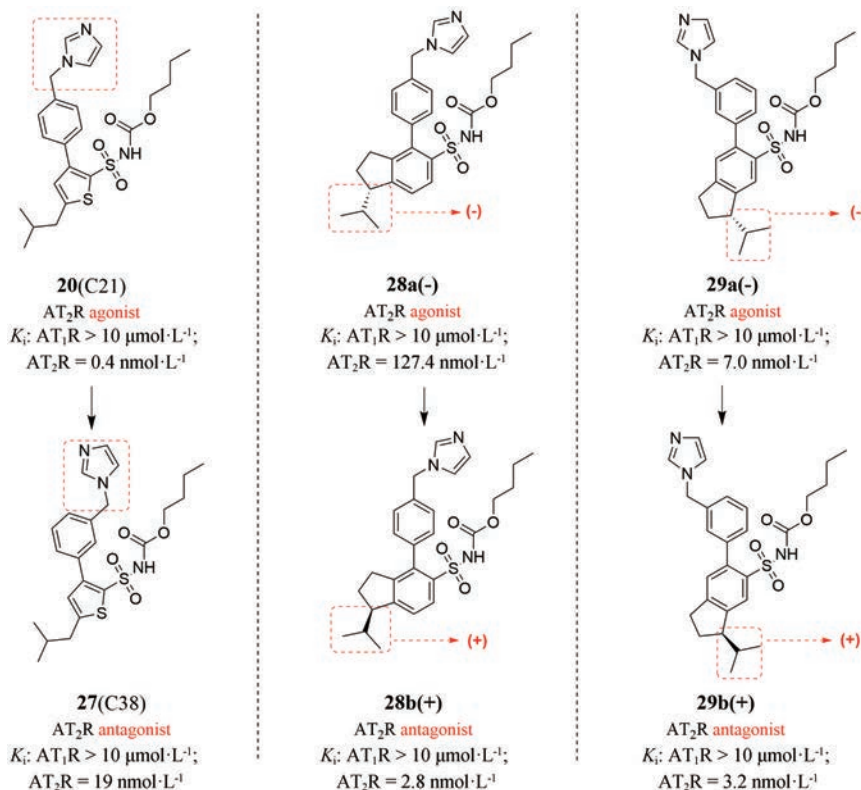


Figure 14 Structures of compounds **20**, **27**, **28a**(-), **28b**(+), **29a**(-), **29b**(+)

元疾病的生物医学研究中关注度较高的潜在药物靶标, 选择性 AT₂ 受体激动剂或拮抗剂的研究可能为这些疾病的药物开发提供新的方向。

目前, AT₂ 受体的功能及其在相关疾病的作用已逐渐清晰, 大量的 AT₂ 受体的激动剂和拮抗剂被报道。但除小分子 AT₂ 受体激动剂 C21 正处于临床 II 期试验, 可能用于治疗肺和其他器官的纤维化疾病; AT₂ 受体拮抗剂 EMA401 正处于治疗周围神经性疼痛的 II 期临床试验以外, 还没有其他 AT₂ 受体激动剂或拮抗剂进入临床研究。而且, 作用于 AT₂ 受体的配体分子的构效关系仍不十分清楚。由于 AT₂ 受体在胎儿组织中高水平表达, 成人组织中含量很低; 在病理条件下表达水平显著提高, 并且具有组织和细胞特异性。有研究者提出^[60], 需要设计具有更高组织和细胞选择性和特异性的化合物, 来改善药物在疾病器官中的生物分布, 以提高疗效。可以设计以线粒体靶向抗氧化肽 SS-31 (*D*-Arg-dimethylTyr-Lys-Phe-NH₂) 作为碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, APA) 诱导的 AT₂ 受体在病变肾脏中表达的前体药物, 来选择性地将 AT₂ 受体激动剂或拮抗剂输送到病变组织和细胞中。

针对当前的研究现状, 建议可从以下 3 个方面推进作用于 AT₂ 受体化合物的研发: ① 利用现有活性化合物的结构进一步确认 AT₂ 受体蛋白与配体分子的关键活性位点, 为化合物的设计提供理论指导; ② 以 C21 和 PD-123319 为先导化合物, 运用计算机辅助药物设计方法, 发现具有新型骨架的化合物。并通过进一步的结构优化获得能够选择性作用于 AT₂ 受体的配体分子, 以丰富化合物库, 为完善构效关系提供基础; ③ 由于 AT₂ 受体在 G 蛋白偶联受体中的信号转导机制还未完全阐明, 深入研究配体与受体靶蛋白的相互作用机制将有助于明确 AT₂ 受体的作用, 并为作用于 AT₂ 受体新化合物的进一步药理研究提供指导。

作者贡献: 张艳春和张祖志负责论文的撰写; 王丹慧和徐梅月参与论文图片及结构的绘制; 张艳春和徐进宜负责论文的规划、指导及审阅。

利益冲突: 所有作者均声明本论文与其他人或机构无任何利益冲突。

References

- Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, et al. Expression of angiotensin type-1 (AT₁) and type-2 (AT₂) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review [J]. *Front Neuroendocrinol*, 1997, 18: 383-439.
- Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, et al. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 24543-24546.
- Carey RM. Update on the role of the AT₂ receptor [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005, 14: 67-71.
- Hein L, Barsh GS, Pratt RE, et al. Behavioral and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice [J]. *Nature*, 1995, 377: 744-747.
- Tsutsumi K, Zorad S, Saavedra JM. The AT₂ subtype of the angiotensin II receptors has differential sensitivity to dithiothreitol in specific brain nuclei of young rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 1992, 226: 169-173.
- Karnik SS, Unal H, Kemp JR, et al. Angiotensin receptors: interpreters of pathophysiological angiotensinergic stimuli [J]. *Pharmacol Rev*, 2015, 67: 754-819.
- Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT₁/AT₂ receptors: regulation, signalling and function [J]. *Blood Press*, 2003, 12: 70-88.
- Danser J, Anand P. The angiotensin II type 2 receptor for pain control [J]. *Cell*, 2014, 157: 1504-1506.
- Johansson B, Holm M, Ewert S, et al. Angiotensin II type 2 receptor-mediated duodenal mucosal alkaline secretion in the rat [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280: G1254-G1260.
- Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, et al. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 24539-24542.
- Bienvenu T, Poirier K, Van Esch H, et al. Rare polymorphic variants of the AGTR2 gene in boys with non-specific mental retardation [J]. *J Med Genet*, 2003, 40: 357-359.
- Schmieder RE, Erdmann J, Delles C, et al. Effect of the angiotensin II type 2-receptor gene (+1675 G/A) on left ventricular structure in humans [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37: 175-182.
- Ott C, Titze SI, Schwarz TK, et al. High sodium intake modulates left ventricular mass in patients with G expression of +1675 G/A angiotensin II receptor type 2 gene [J]. *J Hypertens*, 2007, 25: 1627-1632.
- Zhang H, Han GW, Batyuk A, et al. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors [J]. *Nature*, 2017, 544: 327-332.
- Speth RC, Rowe BP, Grove KL, et al. Sulfhydryl reducing agents distinguish two subtypes of angiotensin II receptors in the rat brain [J]. *Brain Res*, 1991, 548: 1-8.
- Feng YH, Saad Y, Karnik SS. Reversible inactivation of AT(2) angiotensin II receptor from cysteine-disulfide bond exchange [J]. *FEBS Lett*, 2000, 484: 133-138.
- Connolly A, Holleran BJ, Simard E, et al. Interplay between intracellular loop 1 and helix VIII of the angiotensin II type 2 receptor controls its activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 168: 330-338.
- Sallander J, Wallinder C, Hallberga A, et al. Structural determi-

- nants of subtype selectivity and functional activity of angiotensin II receptors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 1355-1359.
- [19] Hallberg M, Sävmarker J, Hallberg A. Angiotensin peptides as AT₂ receptor agonists [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2017, 18: 809-818.
- [20] Hodges JC, Hamby JM, Blankley CJ. Angiotensin II receptor binding inhibitors [J]. *Drugs Future*, 1992, 17: 575-593.
- [21] Regoli D, Rioux F, Park WK, et al. Role of the N-terminal amino acid for the biological activities of angiotensin and inhibitory analogues [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1974, 52: 39-49.
- [22] Miura S, Karnik SS. Angiotensin II type 1 and type 2 receptors bind angiotensin II through different types of epitope recognition [J]. *J Hypertens*, 1999, 17: 397-404.
- [23] Liu Q, Xu JY, Yao HQ, et al. Advances in research on structure-activity relationship of selective angiotensin II AT₂ receptor agonists [J]. *Prog Pharm Sin (药学进展)*, 2011, 35: 145-153.
- [24] Bosnyak S, Jones ES, Christopoulos A, et al. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT₁ and AT₂ receptors [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 121: 297-303.
- [25] Spear KL, Brown MS, Reinhard EJ, et al. Conformational restriction of angiotensin II: cyclic analogues having high potency [J]. *J Med Chem*, 1990, 33: 1935-1940.
- [26] Lindman S, Lindeberg G, Frdberg PA, et al. Effect of 3-5 monocyclizations of angiotensin II and 4-aminoPhe⁶-Ang II on AT₂ receptor affinity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11: 2947-2954.
- [27] Spear KL, Brown MS, Reinhard EJ, et al. Conformational restriction of angiotensin II: cyclic analogues having high potency [J]. *J Med Chem*, 1990, 33: 1935-1940.
- [28] Johannesson P, Lindeberg G, Johansson A, et al. Vinyl sulfide cyclized analogues of angiotensin II with high affinity and full agonist activity at the AT₁ receptor [J]. *J Med Chem*, 2002, 45: 1767-1777.
- [29] Jedhe GS, Kotmale AS, Rajamohanan PR, et al. Angiotensin II analogs comprised of Pro-Amb (γ -turn scaffold) as angiotensin II type 2 (AT₂) receptor agonists [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2016, 52: 1645-1648.
- [30] Rosenström U, Sköld C, Plouffe B, et al. New selective AT₂ receptor ligands encompassing a gamma-turn mimetic replacing the amino acid residues 4-5 of angiotensin II act as agonists [J]. *J Med Chem*, 2005, 48: 4009-4024.
- [31] Whitebread S, Mele M, Kamber B, et al. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 163: 284-291.
- [32] Speth RC, Kim KH. Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, *p*-aminophenylalanine⁶ angiotensin II [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 169: 997-1006.
- [33] Magnani F, Pappas CG, Crook T, et al. Electronic sculpting of ligand-GPCR subtype selectivity: the case of angiotensin II [J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 1420-1425.
- [34] Ishiguro S, Yoshimura K, Tsunedomi R, et al. Involvement of angiotensin II type 2 receptor (AT₂R) signaling in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a novel AT₂R agonist effectively attenuates growth of PDAC grafts in mice [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16: 307-316.
- [35] De Gasparo M, Whitebread S, Kamber B, et al. Effect of covalent dimer conjugates of angiotensin II on receptor affinity and activity *in vitro* [J]. *J Recept Res*, 1991, 11: 247-257.
- [36] Guimond MO, Hallberg M, Gallo-Payet N, et al. Saralasin and sarile are AT₂ receptor agonists [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5: 1129-1132.
- [37] Georgsson J, Rosenstrom U, Wallinder C, et al. Short pseudopeptides containing turn scaffolds with high AT₂ receptor affinity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14: 5963-5972.
- [38] Timmermans PB, Carini DJ, Chiu AT, et al. The discovery of a new class of highly specific nonpeptide angiotensin II receptor antagonists [J]. *Am J Hypertens*, 1991, 4: 275S-281S.
- [39] Alterman M. Development of selective non-peptide angiotensin II type 2 receptor agonists [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2010, 11: 57-66.
- [40] Kivlighn SD, Huckle WR, Zingaro GJ, et al. Discovery of L-162,313: a nonpeptide that mimics the biological actions of angiotensin II [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268: R820-R823.
- [41] Wan Y, Wallinder C, Johansson B, et al. First reported nonpeptide AT₁ receptor agonist (L-162, 313) acts as an AT₂ receptor agonist *in vivo* [J]. *J Med Chem*, 2004, 47: 1536-1546.
- [42] Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT₂ receptor agonist [J]. *J Med Chem*, 2004, 47: 5995-6008.
- [43] Isaksson R, Casselbrant A, Elebring E, et al. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor reduces nitric oxide production in lipopolysaccharide treated mouse macrophages [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 868: 172855.
- [44] Veron JB, Joshi A, Wallinder C, et al. Synthesis and evaluation of isoleucine derived angiotensin II AT₂ receptor ligands [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 476-479.
- [45] Mahalingam AK, Wan Y, Murugaiah AM, et al. Selective angiotensin II AT₂ receptor agonists with reduced CYP 450 inhibition [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 4570-4590.
- [46] Murugaiah AM, Wallinder C, Mahalingam AK, et al. Selective angiotensin II AT₂ receptor agonists devoid of the imidazole ring system [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 7166-7183.
- [47] Chiu AT, Duncia JV, Mccall DE, et al. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. III. Structure-function studies [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, 250: 867-874.
- [48] Blankley CJ, Hodges JC, Klutchko SR, et al. Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of non-peptide angiotensin II receptor binding inhibitors specific for the AT₂ subtype [J]. *J Med Chem*, 1991, 34: 3248-3260.
- [49] Murugaiah AM, Wallinder C, Mahalingam AK, et al. Selective

- angiotensin II AT₂ receptor agonists devoid of the imidazole ring system [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 7166-7183.
- [50] Asada H, Horita S, Hirata K, et al. Crystal structure of the human angiotensin II type 2 receptor bound to an angiotensin II analog [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25: 570-576.
- [51] Wakchaure PB, Bremberg U, Wannberg J, et al. Synthesis of enantiopure angiotensin II type 2 receptor [AT₂R] antagonist EMA401 [J]. *Tetrahedron*, 2015, 71: 6881-6887.
- [52] Wexler RR, Greenlee WJ, Irvin JD, et al. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: the next generation in antihypertensive therapy [J]. *J Med Chem*, 1996, 39: 625-656.
- [53] Tsuda M. Microglia-mediated regulation of neuropathic pain: molecular and cellular mechanisms [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42: 1959-1968.
- [54] Wallinder C, Sköld C, Botros M, et al. Interconversion of functional activity by minor structural alterations in nonpeptide AT₂ receptor ligands [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 6: 178-182.
- [55] Murugalah AM, Wu X, Wallinder C, et al. From the first selective non-peptide AT₂ receptor agonist to structurally related antagonists [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 2265-2278.
- [56] Liu J, Liu Q, Yang X, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of 1,2,4-triazole bearing 5-substituted biphenyl-2-sulfonamide derivatives as potential antihypertensive candidates [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 7742-7751.
- [57] Wallinder C, Botros M, Rosenström U, et al. Selective angiotensin II AT₂ receptor agonists: benzamide structure-activity relationships [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 6841-6849.
- [58] Murugaiah AM, Wu X, Wallinder C, et al. From the first selective non-peptide AT₂ receptor agonist to structurally related antagonists [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 2265-2278.
- [59] Wallinder C, Christian S, Sundholm S, et al. High affinity rigidified AT₂ receptor ligands with indane scaffolds [J]. *MedChemComm*, 2019, 10: 2146-2160.
- [60] Juillerat-Jeanneret L. The other angiotensin ii receptor: AT₂R as a therapeutic target [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 1978-1995.