

# 先导化合物结构优化策略 (一)改变代谢途径 提高代谢稳定性

先导化合物结构优化策略 (一)改变代谢途径提高代谢稳定性

Lead compound optimization strategy (1) — changing  
metabolic pathways and optimizing metabolism stability

作者

王江, 柳红

中国科学院上海药物研究所, 新药研究国家重点实验室

## 摘要

先导化合物结构优化是新药研发的关键环节。通过改变先导化合物的代谢途径可以改善化合物的药代动力学特性, 延长药物在体内的作用时间, 增强代谢稳定性, 提高生物利用度。本文主要综述了通过改变代谢途径提高代谢稳定性的先导化合物结构优化策略, 包括封闭代谢位点、降低脂溶性、骨架修饰、生物电子等排以及前药等。

## 正文

新药研发包括苗头化合物的发现、先导化合物的结构优化、候选药物的临床评价等一系列药物研究开发过程。在药物发现过程中, 经常遇到先导化合物类药性差、药物代谢动力学特性不佳、毒副作用等问题, 为了提高先导化合物的成药性, 加速新药研发的进程, 对先导化合物进行结构优化已经成为目前新药研发的关键环节。

代谢稳定性一般用来描述化合物代谢的速度和程度, 是决定药物小分子生物利用度的一个重要因素, 是影响药代动力学性质的主要因素之一。据上世纪 90 年代的统计数据表明, 新药研发失败的 40% 是由于化合物的药代动力学性质不良造成的。

代谢稳定性差是药物发现过程中经常遇到的问题, 有效提高先导化合物的代谢稳定性具有重要的研究意义。通过对先导化合物进行结构优化, 改变其主要的代谢途径能够有效地提高化合物的代谢稳定性、延长药物在体内的作用时间、增加体内的暴露量、降低化合物的清除率、提高生物利用度, 进而优化其药物代谢动力学特性。

本文主要综述了通过改变主要代谢途径提高代谢稳定性的先导化合物结构优化策略, 包括: 封闭代谢位点、降低化合物的脂溶性、骨架修饰、生物电子等排

以及前药修饰等。通过这些先导化合物的结构修饰策略，能够显著地提高先导化合物的代谢稳定性，为开发 I 类新药提供理论指导和实践经验。

1

## I 相代谢与 II 相代谢

### 1.1 药物的 I 相代谢与 II 相代谢

药物从体内消除主要有两种方式，即代谢和排泄。代谢是大部分药物从体内消除的主要方式。药物代谢反应分为两相代谢：I 相 (Phase I) 代谢是对化合物分子结构的代谢反应，包括氧化反应、水解反应和还原反应；II 相 (Phase II) 代谢是化合物或其代谢物与极性基团进行结合反应，包括谷胱甘肽结合反应、磺酸化反应、乙酰化反应和葡萄糖醛酸化反应等 (图 1)。

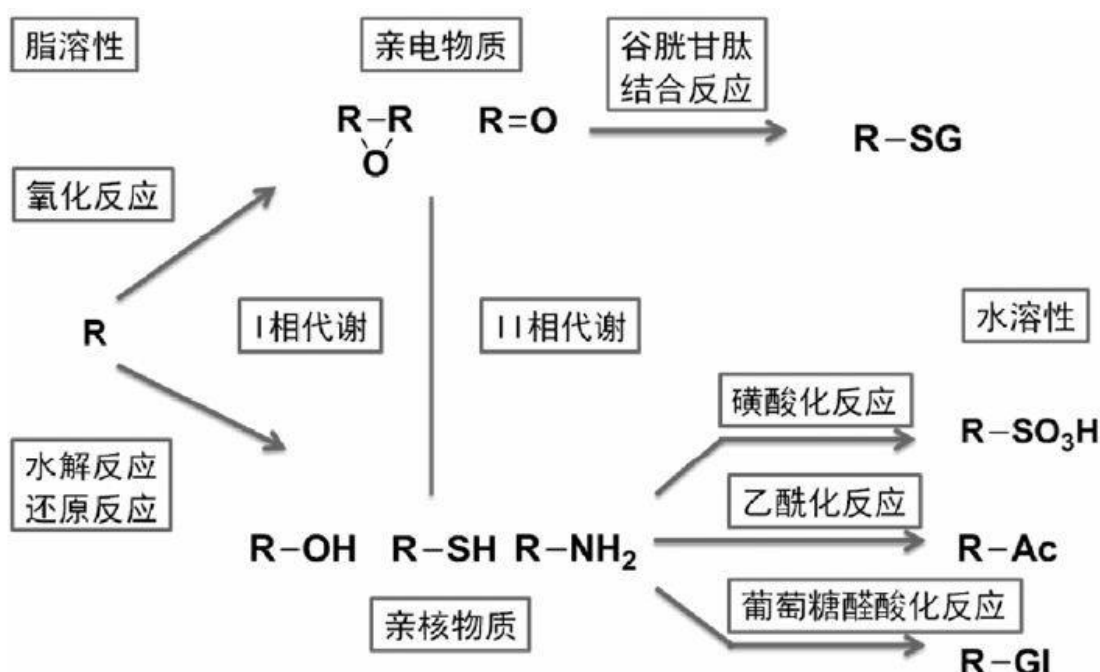


图 1 I 相和 II 相药物代谢示意图

化合物通过 I 相代谢和 II 相代谢，将脂溶性的化合物转化为极性更强、水溶性更好的化合物，通过胆汁和尿排出体外。

### 1.2 针对 I 相代谢与 II 相代谢的结构优化策略

通过预测先导化合物的代谢位点，改变其代谢途径进而优化药代动力学特性，已经成为目前先导化合物结构优化的重要研究策略。

I 相代谢反应包括两个重要特点：① 化合物与代谢酶的结合；② 化合物分子中特定结构的反应活性。通过改变与代谢酶活性位点结合的活性片段以及规避易与 I 相代谢酶发生代谢反应的活性片段，能够有效地降低化合物的 I 相代谢活性，增强其代谢稳定性。

主要包括：引入氟原子、氯原子以及其他基团封闭代谢位点、降低脂溶性、改变环的大小、成环修饰、骨架迁越、生物电子等排和前药修饰。

除此之外，通过引入吸电子基团和空间位阻、生物电子等排、前药修饰等结构优化策略，也能有效地降低化合物与极性基团进行结合反应，从而阻断 II 相代谢，提高先导化合物的代谢稳定。

2

### 化学修饰在提高代谢稳定性中的应用

为了提高化合物 I 相代谢和 II 相代谢的代谢稳定性，针对其代谢特点，开发出一系列通过改变主要代谢途径的先导化合物结构优化策略，主要包括：封闭代谢位点、降低化合物的脂溶性、骨架修饰、生物电子等排以及前药修饰等。

#### 2.1 封闭代谢位点

根据药代动力学的研究结果，封闭药物代谢位点可以延缓药物的消除速率。如在苯环引入氟原子取代基，可以封闭苯环羟基化的代谢位点、阻断羟基代谢产物的生成、改变化合物的代谢途径，延长药物在体内的作用时间。

封闭代谢位点是提高先导化合物代谢稳定性最重要的结构改造策略之一。亲脂性化合物苯环对位的氢原子易被肝脏中的 P450 酶氧化得到 4-羟基代谢产物，该产物随即与体内的葡萄糖醛酸结合转化为极性更强、水溶性更好的化合物，通过胆汁和尿排出体外，是大多数化合物的主要代谢途径。

通过在苯环的对位引入氟、氯、氰基等基团封闭此代谢位点，改变该类化合物的主要代谢途径，能够有效地提高先导化合物的代谢稳定性（图 2）。

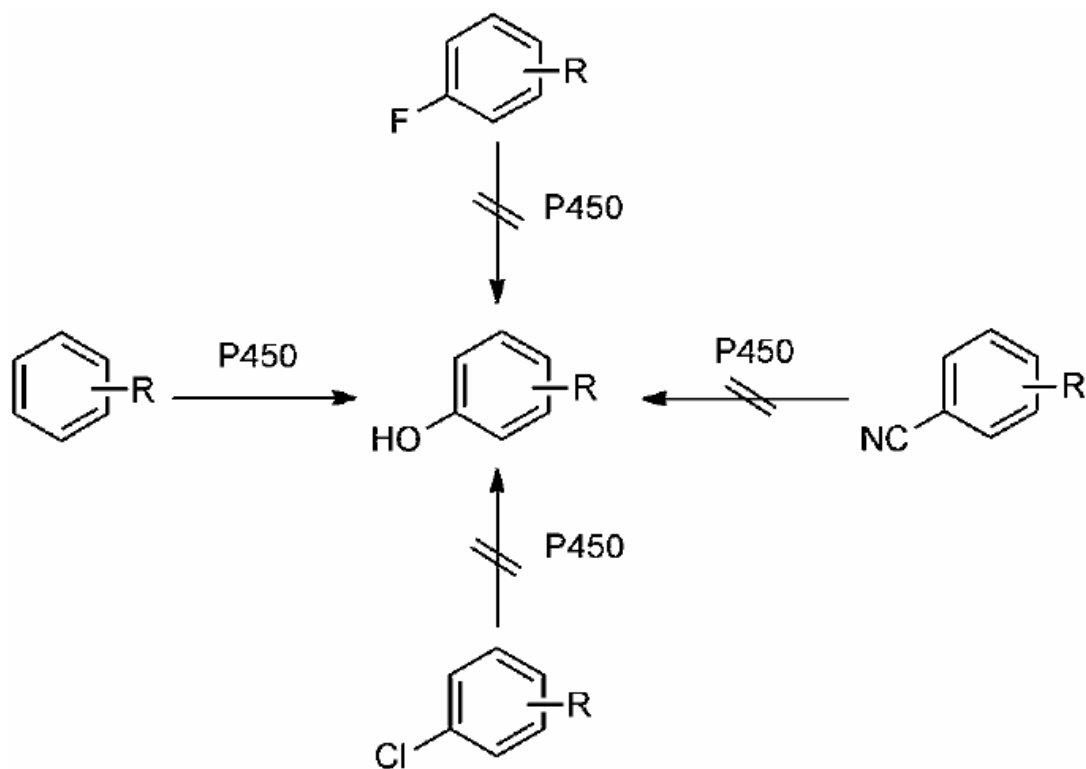


图 2 封闭代谢位点策略

如胆固醇吸收酶抑制剂依泽替米贝 (ezetimibe, 1) 的研究发现，依泽替米贝的前体药物 SCH48461 含有多个氧化和去甲基化代谢位点，具有代谢消除速率

快、生物利用度低等缺点,通过在前导化合物的苯环上引入氟原子,封闭氧化代谢位点,在提高活性的同时增强药物的代谢稳定性;又如将 COX-2 抑制剂塞来昔布 (celecoxib, 2) 的甲基替换为氟原子,封闭代谢位点,延长了药物在体内的作用时间 (图 3)。

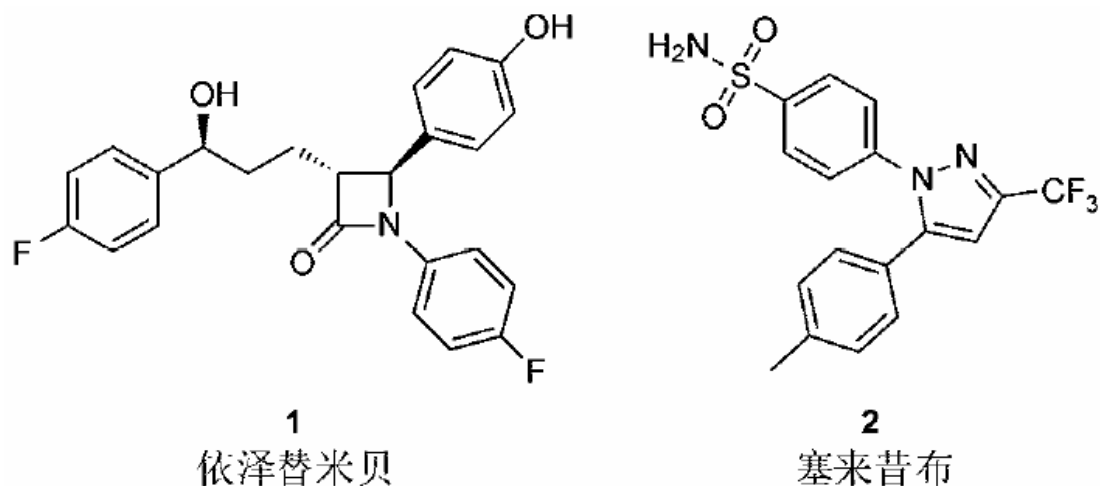


图 3 封闭代谢位点代表药物

### 2.1.1 引入氟原子封闭代谢位点

由于 C-F 键的键能 ( $487 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 比 C-H 键的键能 ( $420 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 高,因此,氟原子是最常用的封闭基团。在药物设计中,通常在小分子化合物中引入氟原子取代,对易氧化代谢的位点进行封闭,选择性地阻止氧化代谢的发生,进而提高化合物的代谢稳定性,延长药物在体内的作用时间。

丁螺环酮 (buspirone, 3) 是 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂 ( $\text{EC}_{50} = 0.025 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),具有抗焦虑作用。CYP3A4 是其主要代谢酶,该化合物的主要代谢途径包括嘧啶环 5-位的芳香羟基化以及哌嗪环右侧亚甲基的 N-去烷基化 (图 4)。

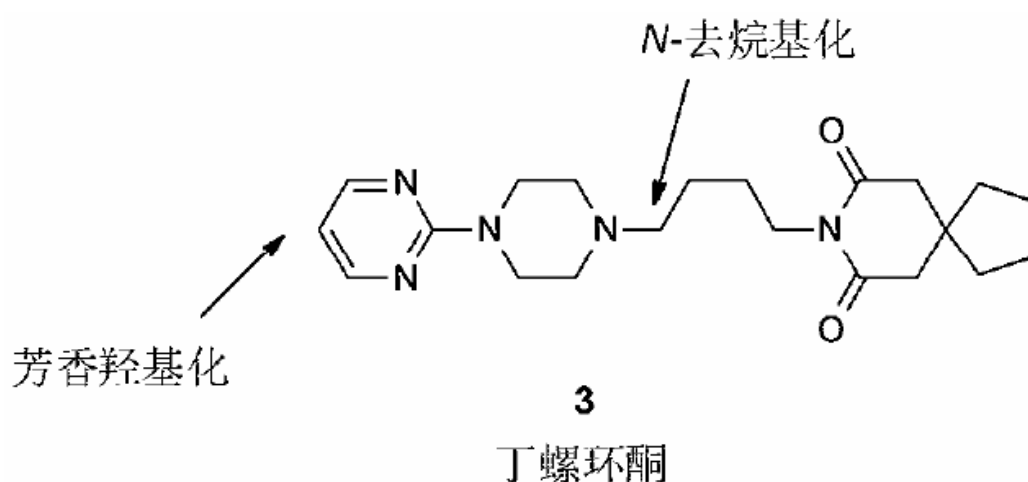
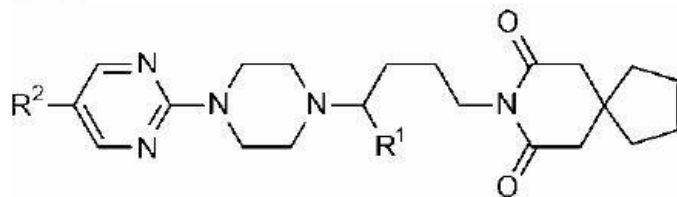


图 4 丁螺环酮 CYP3A4 代谢位点

由于嘧啶环 5-位可被 CYP3A4 氧化羟基化, 因此, 该化合物在体外与 CYP3A4 酶孵化的半衰期较短 ( $t_{1/2} = 4.6 \text{ min}$ ), 通过在嘧啶环的 5-位引入氟原子, 在占据其代谢位点的同时降低了嘧啶环的电子云密度, 使化合物 4 和 6 在体外与 CYP3A4 酶孵化的半衰期分别提高了 10 倍和 3.8 倍, 延长到 52.3 和 14.8 min, 其 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动活性基本保持 (4,  $EC_{50} = 0.063 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 6,  $EC_{50} = 0.046 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (表 1)。

**表 1** 丁螺环酮及其衍生物的 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动活性和 CYP3A4 酶孵化的半衰期



化合物	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	5-HT <sub>1A</sub> EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	CYP3A4 t <sub>1/2</sub> /min
3	H	H	0.025	4.6
4	H	F	0.063	52.3
5	Me	H	0.004	3.8
6	Me	F	0.046	14.8

### 2.1.2 引入氯原子封闭代谢位点

除了在易代谢位点引入氟原子之外, 研究人员还引入氯原子作为封闭基团, 提高代谢稳定性。甲苯磺丁脲 (tolbutamide, 7) 是目前广泛使用的磺酰脲类抗糖尿病药物, 但是该化合物半衰期短, 只有 5.9 h, 每天需要服用 3 次, 降低了糖尿病患者服药的依从性。

将甲苯磺丁脲的甲基替换为氯原子, 得到氯磺丙脲 (chlorpropamide, 8), 降低了该化合物的清除率, 其半衰期延长到 33 h, 每天仅需给药 1 次, 大大改善了糖尿病患者服药的依从性 (图 5)。

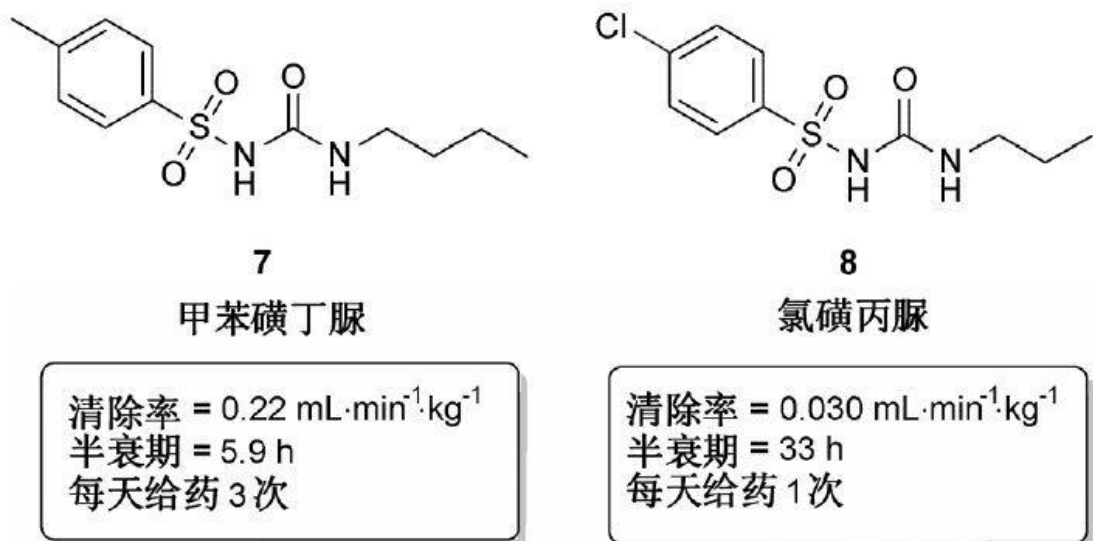


图 5 引入氯原子提高甲苯磺丁脲的代谢稳定性

### 2.1.3 引入其他基团封闭代谢位点

除了引入氟原子和氯原子，还可以引入其他基团封闭代谢位点，提高化合物的代谢稳定性。化合物 9 具有较强的 CCR5 拮抗活性 ( $K_i = 66 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )，但是该化合物的苄亚甲基易发生氧化代谢，因此，该化合物在大鼠体内暴露量 (AUC) 较低，仅为  $0.04 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

为了有效地提高化合物 9 的代谢稳定性，在亚甲基位点引入次甲基结构 (化合物 10)，其 CCR5 拮抗活性提高了 8 倍 ( $K_i = 8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )，体内暴露量增加了近 15 倍；当引入脲类结构片段时 (化合物 11)，其 CCR5 拮抗活性 ( $K_i = 11 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 提高的同时，体内暴露量提高 50 倍，达到  $2.1 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (图 6)。

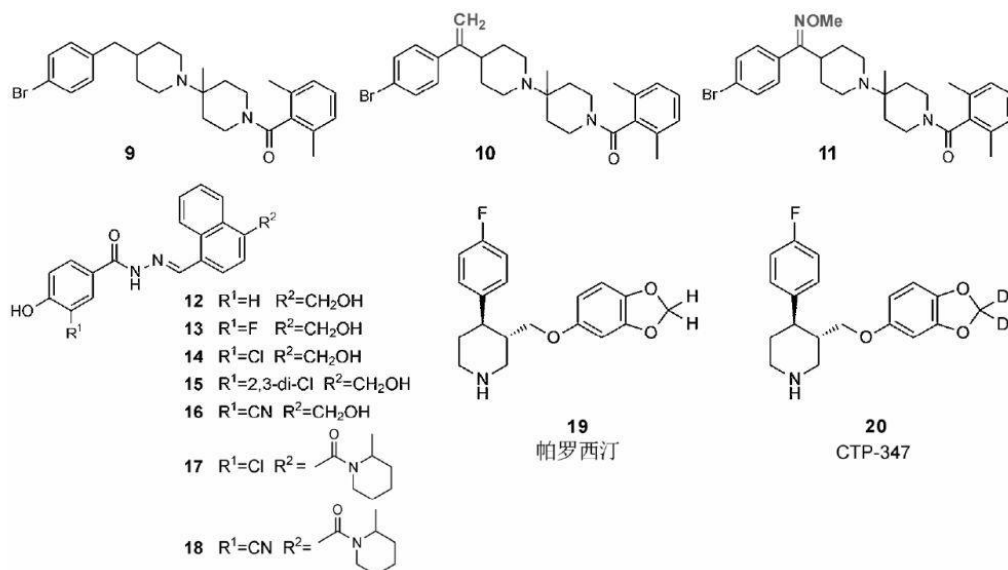


图 6 引入其他基团封闭代谢位点提高代谢稳定性

在酚羟基的邻位引入氰基，也将减少化合物与葡萄糖醛酸的结合，增强代谢稳定性。胰高血糖素受体拮抗剂是近年来糖尿病治疗药物研究的热点之一。辉瑞公司研发的酰肼类胰高血糖素受体拮抗剂(化合物 12) 具有较强的受体结合活性 ( $230 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 但是由于酚羟基在体内迅速与葡萄糖醛酸结合, 使得该类化合物代谢清除率高 ( $225 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )。

研发人员在苯环 3-位引入 F、Cl、氰基等取代基对该类化合物进行结构修饰, 均能有效地降低酚羟基与葡萄糖醛酸结合, 减缓该类化合物的代谢清除率, 提高与受体的结合活性(图 6)。

采用氘封闭代谢位点, 也是提高化合物代谢稳定性的重要结构改造策略之一。氘是氢的一种稳定形态同位素, 由于 C-D 键比 C-H 键稳定 6~10 倍, 使得 C-D 键难以断裂, 这种现象被称为动力学同位素效应(kinetic isotope effect, KIE)。利用氘的动力学同位素效应, 可以有效地阻断小分子的代谢位点, 延长药物在体内的作用时间, 增加其代谢稳定性。

帕罗西汀(paroxetine, 19) 是一种选择性血清素再吸收抑制剂(SSRI) 型的抗抑郁药, 临床上常用于抑郁症和强迫症的治疗。但是该药物在体内经 CYP2D6

氧化代谢得到的代谢产物与 CYP2D6 形成不可逆复合物, 具有潜在的药物-药物相互作用。

将帕罗西汀的活性代谢位点亚甲基采用氘代的结构改造策略, 得到化合物 CTP-347 (20), 该化合物目前处于临床 I 期研究阶段, 用于治疗绝经期潮红。氘原子的引入, 封闭了帕罗西汀的代谢位点, 改变了帕罗西汀的代谢途径, 减少了活性代谢产物的生成, 降低了对 CYP2D6 的抑制作用, 增强了其在体内的代谢稳定性(图 6)。

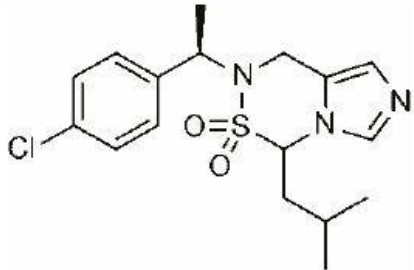
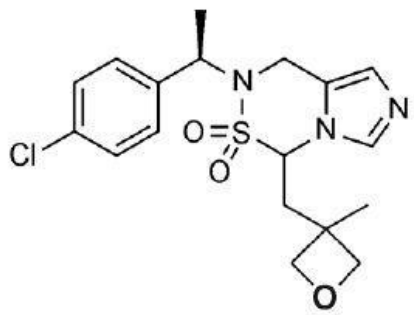
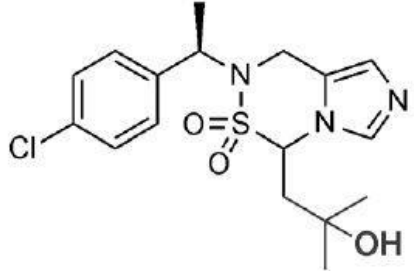
## 2.2 降低脂溶性

体内的大多数代谢酶都具有与亲脂性基团相结合的活性口袋, 通过降低化合物的亲脂性能减弱化合物与代谢酶的结合活性, 延缓化合物的体内代谢, 改善代谢稳定性。

化合物 21 具有较强的醛固酮合成酶抑制活性, 但是该化合物中的异丁基结构片段在体内代谢酶的作用下会迅速代谢失活, 其人肝微粒体中的半衰期仅为 6 min。

对异丁基进行结构改造, 降低化合物 21 的脂溶性, 引入氧杂环丁基团得到化合物 22, 其脂溶性降低了一个 log 单位, 代谢稳定性提高 10 倍; 将氧杂环丁基替换为极性更强的叔羟基结构片段(化合物 23), 脂溶性进一步降低, 代谢稳定性提高, 其人肝微粒体中的半衰期大于 300 min (表 2)。

表 2 醛固酮合成酶抑制剂的脂溶性和代谢稳定性

化合物	结构式	hCYP11B2 IC <sub>50</sub> nmol·L <sup>-1</sup>	人肝微 粒体 t <sub>1/2</sub> /min	clog D <sub>7.4</sub>
21		9.4	6	3.28
22		7.8	76	2.06
23		11.4	>300	1.69

日本武田公司开发的抗凝血酶因子 Xa 抑制剂 24 具有较强的 FXa 抑制活性 (IC<sub>50</sub>= 28 nmol·L<sup>-1</sup>), 虽然该化合物具有较强的生物活性, 但是在人肝微粒体中的消除率极高, 达到 91.2% (表 3)。

表 3 抗凝血酶因子 Xa 抑制剂的脂溶性和代谢稳定性

化合物	R	FXa IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	logD <sub>7.4</sub>	人肝微粒体 消除率/%
24		28	2.52	91.2
25		9.1	2.19	31.6
26		14	1.96	8.0
27		3.5	1.81	6.4

将七元内酰胺环替换为六元 (25) 和五元 (26) 内酰胺环, 脂溶性降低, 活性提高, 消除率下降; 当 R 基团替换为六元环脲基团时, 得到的化合物 TAK-442 (27) 抑制活性最强, 代谢稳定性最好, 目前处于临床 II 期研究阶段。通过降低脂溶性, 增强了抗凝血酶因子 Xa 抑制剂的代谢稳定性。

## 2.3 骨架修饰

骨架修饰也是改变代谢途径提高代谢稳定性的重要化学结构改造策略之一。骨架修饰包括改变环的大小、成环修饰以及骨架迁越, 通过骨架修饰可以改变化合物的母核, 调节化合物的理化性质, 进而提高代谢稳定性。采用代谢稳定的环系结构替代不稳定的结构片段, 进而改变整个化合物的代谢途径, 提高代谢稳定性。

### 2.3.1 改变环的大小

5-HT<sub>2C</sub> 激动剂 28 具有较强的激动活性 (EC<sub>50</sub>= 14 nmol·L<sup>-1</sup>), 但是该化合物在人肝微粒体中的清除速率较高 (36 μL·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>)。通过改变中间连接片段吡咯环对该类化合物进行结构修饰, 将吡咯环分别替换为六元的哌啶环

(29) 和四元的氮杂环丁烷 (30), 在保持了 5-HT<sub>2C</sub> 激动活性的同时, 有效地提高了该类化合物的人肝微粒体稳定性, 清除速率分别下降为 17 和 9  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  (图 7)。

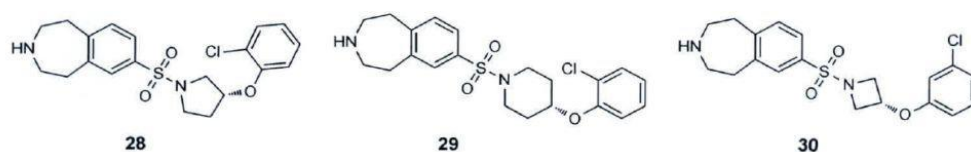


图 7 5-HT<sub>2C</sub> 激动剂示例

H<sub>4</sub> 受体拮抗剂 31 具有较强的拮抗活性 ( $\text{IC}_{50}=19 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 但是该化合物的 N-甲基哌嗪片段在大鼠肝微粒体中迅速发生 N-去甲基化反应, 代谢稳定性较差。为了提高该类化合物的代谢稳定性, 将 N-甲基哌嗪取代基通过扩环和缩环两种方式进行结构优化, 得到化合物 32~36 (表 4)。

表 4 H<sub>4</sub> 受体拮抗剂的脂溶性和代谢稳定性

化合物	R	$\text{IC}_{50}$ $/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$\log D_{7.4}$	大鼠肝微粒体保 留百分比/%
31		19	2.35	1
32		169	2.30	66
33		440	1.74	62
34		236	2.60	0
35		33	0.01	92
36		87	0.96	89

化合物 32 和 33 通过引入桥环结构增加位阻效应，有效地提高了大鼠中的代谢稳定性。哌嗪环替换为 N-甲基吡咯 (35) 和 N-甲基氮杂环丁烷 (36) 时，代谢稳定性进一步提高。

### 2.3.2 成环修饰

聚 ADP-核糖聚合酶-1 (PARP-1) 是治疗神经退行性疾病和帕金森病的重要靶标之一。2-取代喹唑啉酮 (37) 虽具有较强的 PARP-1 抑制活性，但是该化合物中间的柔性侧链易发生氧化代谢，在人肝微粒体中的代谢清除率较高。刚性的环戊烯基取代柔性的烷基链得到化合物 38，增加了分子的刚性和代谢稳定性 (图 8)，提高了对 PARP-1 的抑制活性，同时口服后中枢与血浆中的浓度比值也提高了 3 倍。

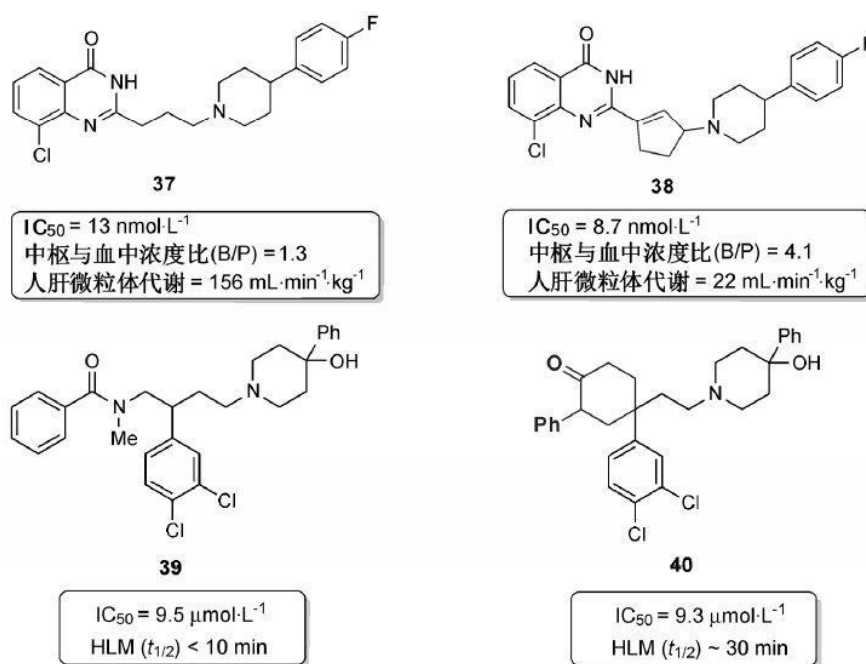


图 8 成环结构修饰提高代谢稳定性

辉瑞公司研发的 NK2 受体拮抗剂 39 具有较高的生物活性，但是该化合物在人肝微粒体中的半衰期很短，为了增强该化合物的代谢稳定性，将易代谢的苯甲酰胺基团替换为六元环酮结构 (化合物 40)，在保持了 NK2 受体拮抗活性的同时提高了代谢稳定性 (图 8)。

### 2.3.3 骨架迁越

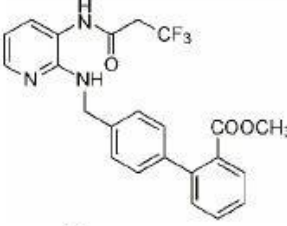
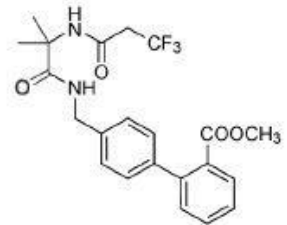
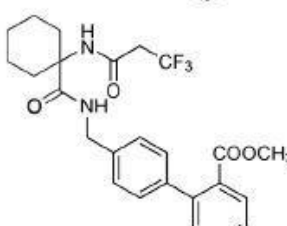
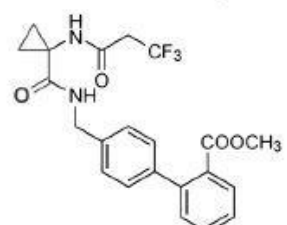
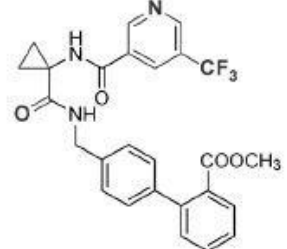
缓激肽 B1 受体 (Bradykinin B1receptor) 拮抗剂可降低炎症介质引起的疼痛，因而是治疗慢性炎症和镇痛药物的潜在靶标。

Wood 等发现化合物 41 对缓激肽 B1 受体具有强效抑制活性 ( $K_i = 11.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，但该化合物在体内的代谢清除率较高，达到  $35 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

采用骨架迁越的结构修饰策略，将二氨基吡啶环替换为氨基酰胺结构(42)，对缓激肽 B1 受体的活性大大降低，但是有效地延长了化合物的半衰期，提高了生物利用度，改善了药代动力学特性。

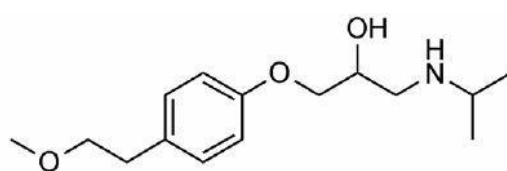
将二甲基取代替换为环己基取代(43)，活性略有提高；当采用环丙基取代模拟吡啶碳的 sp<sup>2</sup> 杂化态之后 (44)，对缓激肽 B1 受体的活性大大提高，对其进一步结构改造，得到高活性的化合物 45，同时改善了该类化合物的代谢稳定性 (表 5)。

表 5 骨架迁越改善化合物的代谢稳定性

化合物	结构式	$K_i$ /nmol·L <sup>-1</sup>	$F$ /%	$t_{1/2}$ /h	CL/ mL·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>
41		11.8	9	0.15	35
42		3 450	35	6.6	4.2
43		752	25	12	2.6
44		63	26	9.5	9.3
45		1.8	33	1.8	9

## 2.4 生物电子等排

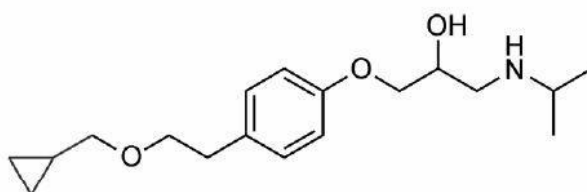
许多化合物含有易代谢基团，采用生物电子等排原理，用稳定的生物电子等排体替换易代谢基团，是改变代谢途径提高代谢稳定性的重要策略。阿斯利康公司研发的  $\beta$  受体阻断剂美托洛尔 (metoprolol, 46) 在体内发生首过效应，甲氧基在体内 CYP2D6 酶的催化作用下发生氧化脱甲基反应，半衰期较短 ( $t_{1/2} = 3.5 \sim 6$  h)，生物利用度较低。赛诺菲公司采用环丙基甲基取代甲基得到倍他索洛尔 (betaxolol, 47)，环丙基甲基的位阻效应提高了化合物的代谢稳定性和生物利用度，延长了半衰期 (图 9)。



46

美托洛尔

体内首过代谢清除 = 50%  
 微粒体  $V_{\max} = 0.46 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$   
 人体半衰期 = 3.5~6 h  
 每天给药两次



47

倍他索洛尔

体内首过代谢清除 = 15%  
 微粒体  $V_{\max} = 0.07 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$   
 人体半衰期 = 16~22 h  
 每天给药 1 次

图 9  $\beta$  受体阻断剂通过生物电子等排提高代谢稳定性

化合物 48 具有抗结核杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* 的活性 ( $\text{MIC} = 0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )，该化合物在体内易被 CYP 催化氧化断键以及发生酯水解反应而失去活性。为了有效地降低该化合物的氧化代谢速率，对喹啉与异噁唑之间的连接基团进行结构优化，其中反式双键连接的化合物 49，不仅提高了抗菌活性而且主要的药代性质得到了显著改善 (图 10)。

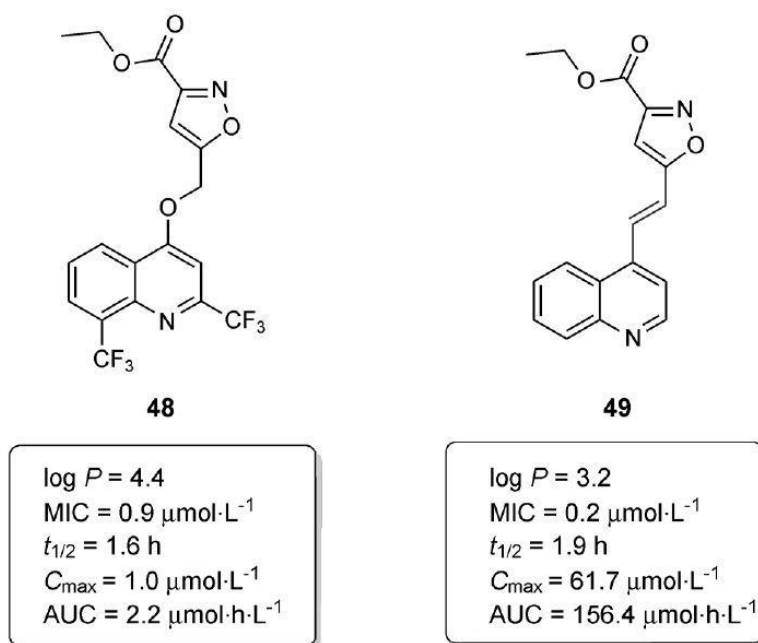
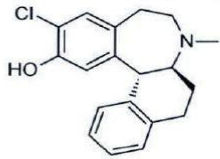
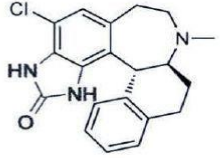
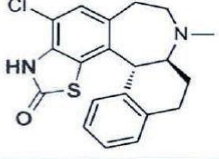


图 10 生物电子等排提高代谢稳定性

先灵葆雅公司研发的苯并氮草类 D1/D5 受体阻断剂 ecopipam (SCH 39166, 50), 曾用于精神病和肥胖病的治疗, 该化合物对 D1 和 D5 受体的结合活性分别为 1.2 和 2.0 nmol·L<sup>-1</sup>, 但其暴露量 (AUC) 和口服生物利用度 (F) 很低, 仅为 0.16 μg·h·mL<sup>-1</sup> 和 0.6%。分析其原因, 是由于酚羟基发生葡萄糖醛酸化以及 N-去甲基化等首过效应。羟基作为氢键给体是与 D1/D5 受体结合的必需基团, 用含有 NH 的环脲以及硫脲杂环作为生物电子等排体进行等效置换, 得到化合物 51 和 52, 虽然 D1/D5 受体的结合活性略有下降, 但是药代性质明显改善, 化合物 51 的口服生物利用度提高到 87% (表 6)。

表 6 将易代谢位点进行生物电子等排改善化合物的代谢特性

化合物	结构式	D <sub>1</sub> K <sub>i</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	D <sub>5</sub> K <sub>i</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	AUC /μg·h·mL <sup>-1</sup>	F /%
50		1.2	2.0	0.16	0.6
51		7.0	4.2	5.9	87
52		2.1	2.8	2.4	—

作用于病毒衣壳环节的活性化合物恩韦拉登 (envirodene, 53) 为治疗感冒的候选药物, 活性虽高 ( $IC_{50} = 0.06 \mu g \cdot mL^{-1}$ ), 但是生物利用度低。主要于连接两个芳环的丙烯基易发生氧化代谢, 该化合物在人肝微粒体代谢率为 73%, 将甲基替换为乙炔基得到化合物 54, 增加了代谢稳定性 ( $C_{max} = 70 \sim 300 ng \cdot mL^{-1}$ ), 但是该化合物的生物利用度仍很低, 仅为 9%。对化合物 54 继续进行结构改造, 将苯环的 4-位引入氟原子, 得到化合物 55, 在保持病毒抑制活性的同时进一步改善了药代性质, 在人肝微粒体代谢率降低为 12%, 生物利用度提高到 23% (表 7)。

表 7 替换不稳定基团改善化合物的代谢稳定性和生物利用度

化合物	结构式	$IC_{50}$ / $\mu g \cdot mL^{-1}$	$C_{max}$ / $ng \cdot mL^{-1}$	HLM /%	F /%
53		0.06	14-140	73	-
54		0.02	70-300	-	9
55		0.04	-	12	23

美国辉瑞公司开发的 5-脂氧酶抑制剂 CJ-12, 918 (化合物 56) 具有较强的抑制活性, 其  $IC_{50}$  达到了  $0.06 \mu mol \cdot L^{-1}$ , 但是该化合物代谢稳定性较差, 其  $C_{max}$  仅为  $0.24 \mu g \cdot mL^{-1}$ , 对其代谢产物分析, 发现该化合物的甲氧基稳定性差, 在体内迅速代谢。为了提高该化合物的药代动力学性质, 采用 N, N-二甲酰胺基替换甲氧基得到 CJ-13, 454 (57), 脂溶性降低 ( $\log D = 2.39$ ), 同时改善了代谢稳定性, 其  $C_{max}$  提高 6.5 倍, 达到  $1.57 \mu g \cdot mL^{-1}$  (图 11)。

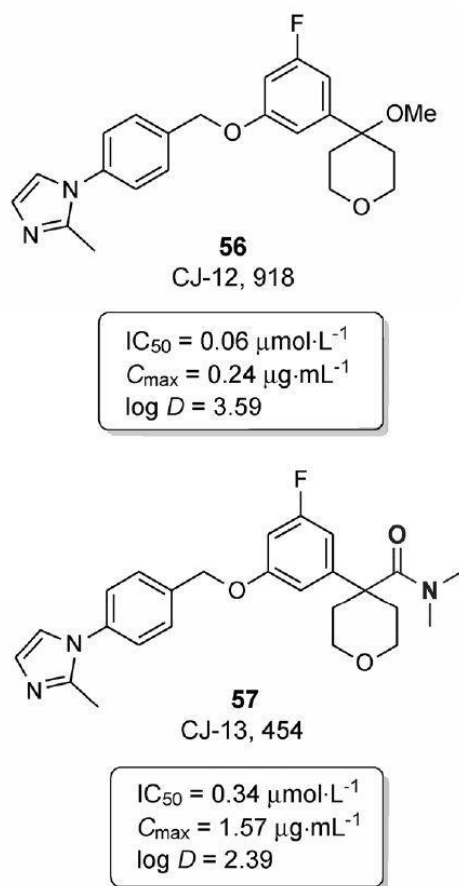


图 11 5-脂氧酶抑制剂的抑制活性和代谢稳定性

## 2.5 前药修饰

前药是指经过生物体内转化后才具有药理作用的化合物。前药本身没有生物活性或活性很低，经过体内代谢后变为有活性的物质，前药修饰的主要目的在于提高药物的代谢稳定性，延长药物在体内的作用时间、增加药物的生物利用度，加强靶向性，降低药物的毒性和副作用。

如万乃洛韦 (valacyclovir, 58) 生物利用度为 67%，比阿昔洛韦 (aciclovir, 59) 高 3~5 倍，现已成功取代阿昔洛韦成为治疗带状疱疹和生殖疱疹的一线药物；抗生素氨苄西林 (ampicillin, 60) 口服生物利用度为 40%，将其极性羧基酯化后得到前药匹氨西林 (pivampicillin, 61)，亲脂性增加，口服生物利用度达到 95%；又如抗高血压药物依那普利 (enalapril, 62) 为血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI)，口服后在体内水解成依那普利拉 (enalaprilat, 63)，依那普利拉的胃肠道吸收少于 10%，而依那普利的口服吸收达 60% (图 12)。

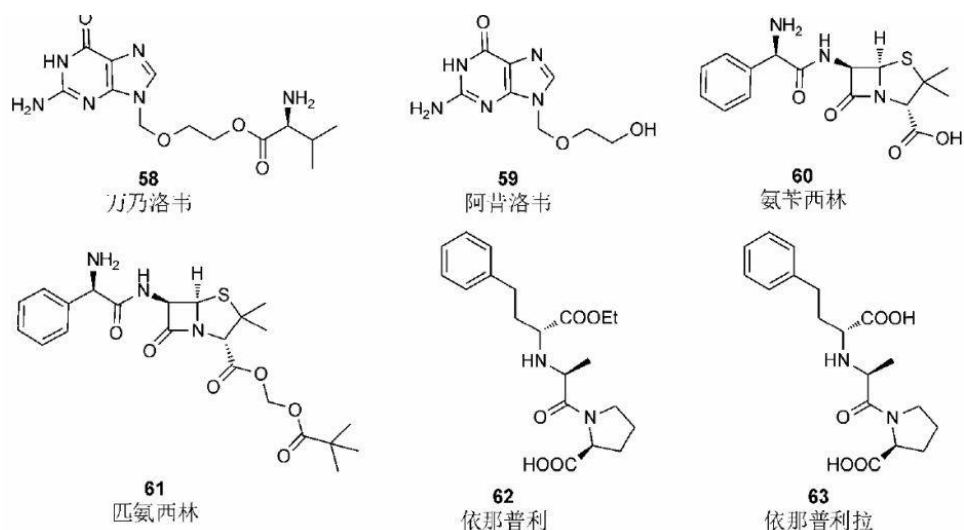


图 12 应用前药修饰策略的代表药物

血小板聚集抑制剂氯吡格雷 (clopidogrel, 64) 可用于防治心肌梗死、缺血性脑血栓、闭塞性脉管炎和动脉粥样硬化及血栓栓塞引起的并发症。氯吡格雷在体内经过 CYP450 酶两步代谢转化得到活性代谢产物，进而发挥药效 (图 13)。

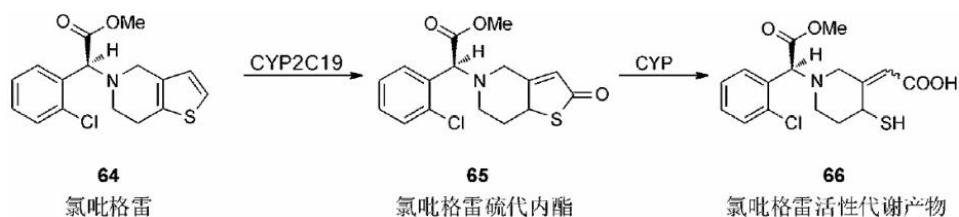


图 13 氯吡格雷代谢途径

首先经过 CYP2C19 得到氯吡格雷硫代内酯 (65)，再经过 CYP 酶的氧化，得到活性代谢产物 66。临床研究表明，对于携带 CYP2C19 2\*等位基因的弱代谢患者，服用氯吡格雷可产生较低的活性代谢物水平，减小其对血小板的抑制作用，从而导致高于非携带者患者 1~5 倍的死亡和中风风险，即所谓的氯吡格雷抵抗。

中国药科大学的孙宏斌教授等人对氯吡格雷代谢中间体的氯吡格雷硫代内酯采用前药策略进行结构改造，设计并合成了维卡格雷 (vicagrel, 67)，使该药仅需一步 CYP450 酶代谢即可转化成活性中间体，使其克服氯吡格雷抵抗，并且不增加相应的出血风险。

在大鼠上对 25 个化合物进行了 ADP 诱导的血小板聚集抑制活性的测试，氯吡格雷和普拉格雷为阳性对照，在  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量下，维卡格雷的抑制活性强于氯吡格雷。对维卡格雷进行体内代谢研究，LC-MS 确证其代谢通路如图 14 所示。

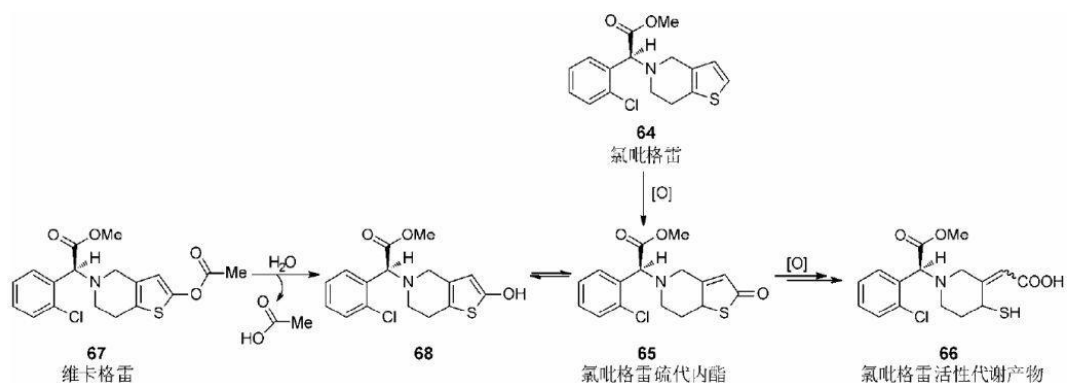


图 14 维卡格雷代谢途径

维卡格雷在酯水解后,发生 2-羟基四氢噻吩并吡啶-硫代内酯互变后,其代谢通路与氯吡格雷相同,均进行依赖于 NADPH 的氧化开环并生成活性代谢物。维卡格雷药代学性质优良,其代谢产物硫代内酯中间体的生物利用度比氯吡格雷高 6 倍。

酚羟基能够通过修饰变为前药。避开首过代谢后,可缓慢水解掉前药基团,释放出游离酚。班布特罗(bambuterol, 70)是特布他林(terbutaline, 69)的前药,通过前药修饰的策略在特布他林的酚羟基引入两个 N, N-二甲酰基基团,半衰期从 2.9 h 改善为 17 h,提高了近 6 倍;将特布他林每天给药 3 次改善为每天给药 1 次,提高了患者服药的依从性(图 15)。

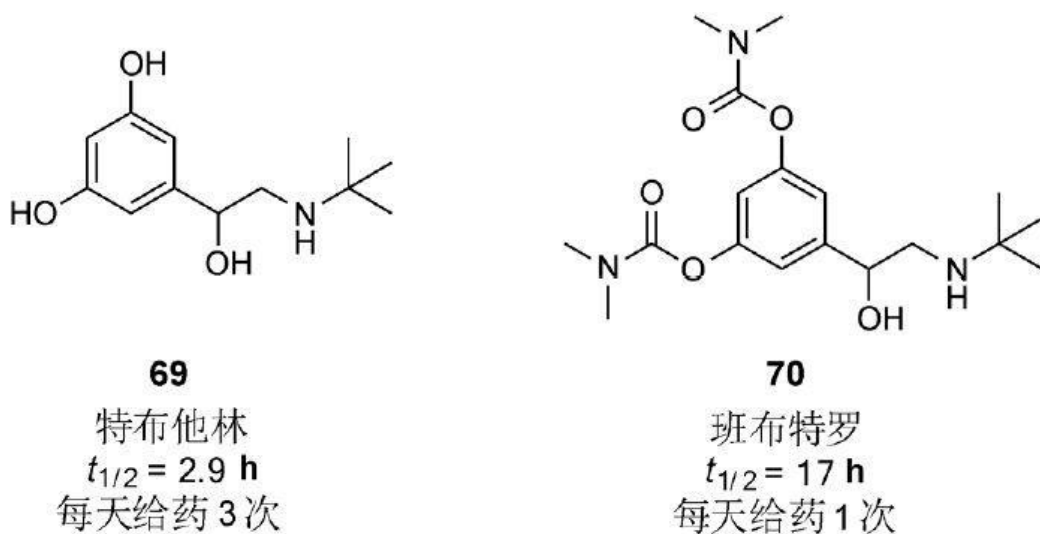


图 15 特布他林的前药修饰

## 结论

先导化合物代谢稳定性差是新药研发过程中经常遇到的问题之一。因此,在早期先导化合物结构优化时,应尽早开展药代动力学的初步研究,通过分析预测化合物的代谢产物,根据主要代谢位点的结构特征选取最佳的结构优化策略;

将封闭代谢位点、降低脂溶性、骨架修饰、生物电子等排以及前药修饰这些结构改造策略综合运用，提高先导化合物的类药性，使其进一步开发成为具有我国自主知识产权的 I 类新药。

## 先导化合物结构优化策略 (二)结构修饰降低潜在毒性

### 摘要

药物特质性毒性反应能够引发严重的药物毒副作用甚至危及患者生命。含有警惕结构的药物在体内能够产生活性代谢物，这是药物发生特质性毒性反应的一个重要原因。优化药物分子中的警惕结构以及通过结构改造避免警惕结构产生活性代谢物，是药物早期研发中降低药物毒性风险的重要手段。

本文通过比对上市与撤市药物，运用实例阐述降低药物毒性风险的结构改造策略，包括封闭代谢位点、改变代谢途径、降低警惕结构反应性、生物电子等排以及前药等。

### 正文

药物毒性是中断药物研发的重要因素之一，同时也是上市药物受到黑框警告甚至被召回的常见原因。统计数据表明，在美国每年约有 10 万人死于药物毒性。药物研发中缺乏准确的药物安全性评价，也使制药公司承受巨大的经济和名誉损失。拜耳公司的“西立伐他汀”事件和默沙东公司的“罗非昔布”事件都是近些年发生的惨痛案例。因此，降低药物毒性风险是药物研发阶段的首要目标。药物产生毒副作用的主要原因包括两个方面：一方面是由于药物的脱靶作用 (off-target)，即由于药物分子本身能与体内多个靶标相互作用，在同非目的靶标过量结合后，产生药理副作用，称为 A 型毒副作用；另一方面是由于药物分子本身结构的特殊性，引发药物特质性毒性反应 (idiosyncratic adverse drug reactions)，这类副作用难以预测，产生的后果也更加严重，称为 B 型毒副作用。

一般而言，A 型毒副作用可以通过药理学研究进行分析预测，所以在临床前研究阶段就可以判断候选药物是否适合进一步研究。而 B 型毒副作用由于其产生机制复杂，通常在药物临床研究阶段甚至上市使用以后才能被人们准确认知。因此，减少候选药物的 B 型毒性风险是先导化合物结构优化的重要方面。

B 型毒性风险产生的重要原因是药物分子结构在体内能够代谢成反应性强的活性结构。因此，对化合物进行结构改造是减少 B 型毒性风险的重要策略。

对大量上市药物的代谢途径进行总结，产生 B 型毒性的药物分子通常含有某些特定结构，能在体内代谢生成活性代谢物质，引发级联反应，产生毒性。这些结构也被称之为警惕结构 (alert structure)，以期在药物研究过程中能够避免使用或者通过合理的先导化合物结构改造降低毒性风险。

本文介绍了近年来对活性代谢物引起毒性的研究；从化学结构出发，将近年来报道的警惕结构进行分类；通过列举上市药物避免毒性的成功案例，深入探讨规避药物毒性的结构改造策略，以期能够为安全药物的设计与开发提供参考。

## 1 活性代谢物产生毒性的原因

活性代谢物 (reactive metabolites, RM) 是指药物进入人体后，经过体内代谢酶系代谢，产生反应活性强、易与体内生物大分子结合的活性代谢物。

自 1938 年 Fieser 第一次发现活性代谢物具有致癌副作用，人们对于反应性代谢物进行了大量研究。虽然目前尚没有直接证据表明活性代谢物就是产生药物毒性作用的主要原因，但是已经有大量研究间接证实了活性代谢物 (特别是亲电性活性代谢物) 能够诱发药物的毒副作用产生 (图 1)。

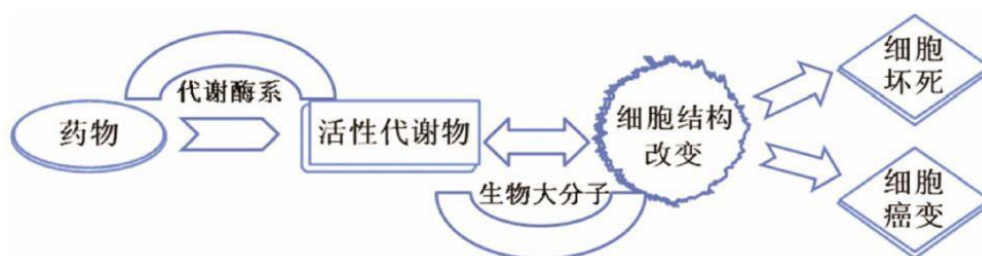


图 1 活性代谢物进入体内诱导毒性产生的方式

随着药物代谢动力学学科的发展和一些高灵敏检测技术的日益成熟，已经成功检测出多种活性代谢物质与蛋白质的共价复合物，但是由其引起下游靶标的生物学反应仍在深入研究中。目前研究推测活性代谢物主要从以下四个方面引发药物的毒性。

### 1.1 半抗原学说

药物进入体内后，活性代谢物与生物大分子共价结合成为异源蛋白，在体液循环中与抗原特异性 T-细胞表面受体(antigen-specific T-cell receptors) 结合，被免疫细胞识别，从而引起体内免疫反应而产生毒性。

磺胺类药物 (如磺胺甲噁唑) 容易产生皮疹、肝炎、肾炎等毒副作用，在产生毒副作用的患者体内检测到药物诱导的 T-细胞免疫反应佐证了上述假设。

### 1.2 过氧化作用

人体细胞内有许多活性氧物质 (如氧化酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等)，这些活性氧物质伴随着新陈代谢而产生，被细胞内的谷胱甘肽 (GSH)、维生素 C 等抗氧剂消耗而解除毒性。许多活性代谢物无需结合生物大分子就能参与活性氧物质代谢循环，引起细胞内氧化过载以及 DNA 受损，导致药物产生毒性。

### 1.3 与功能性蛋白质结合

活性代谢物能够与细胞内许多功能性蛋白质共价结合, 改变其空间构象, 从而影响其正常的生理功能, 导致细胞损伤。但是蛋白功能活性降低或丧失的过程并不是简单的单一机制或级联反应, 详细的生物学过程仍有待进一步研究。

#### 1.4 与谷胱甘肽结合

谷胱甘肽 (GSH) 是细胞内最主要的内源性抗氧化物质, 维持着细胞内的氧化还原电势, 使许多带有巯基 (-SH) 基团的氧化敏感蛋白质保持其正常的生物功能。


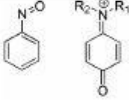
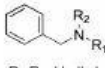



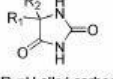

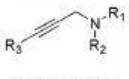
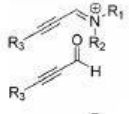
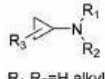
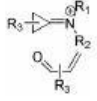
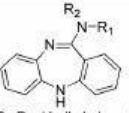
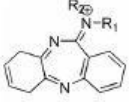




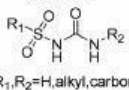



谷胱甘肽的生理功能十分广泛, GSH 可直接通过供 H<sup>+</sup>拮抗氧自由基的毒性, 清除体内的超氧离子及其他自由基, 防止肝细胞损伤; 谷胱甘肽的亲核性基团巯基与外源性亲电物质结合, 对红细胞膜具有保护作用, 可防止溶血; GSH 还能调节乙酰胆碱和胆碱酯酶之间的平衡, 从而消除过敏症状。

当药物产生的活性代谢物过量地消耗细胞内 GSH 后, 会破坏细胞内原有氧化还原电势, 造成细胞内 (尤其是肝细胞) 的氧化紊乱, 许多功能性蛋白被氧化失活而导致细胞死亡, 进而产生毒性作用。

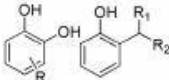
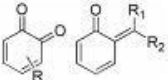

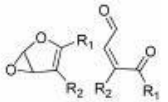

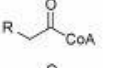
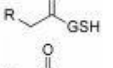

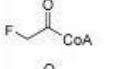
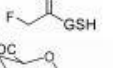
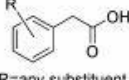
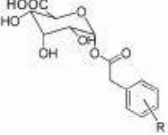

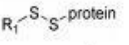

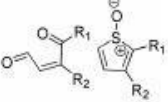
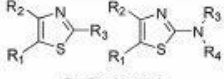
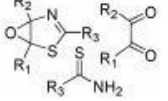

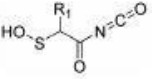


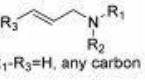
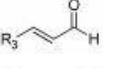

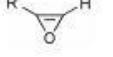
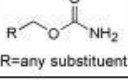

## 2 常见警惕结构

警惕结构是指本身对生物大分子无影响, 但通过体内 I 相或 II 相代谢酶系催化可产生活性代谢物(RM), 进而引起毒性风险的功能基团或结构片段。本文从文献报道及美国食品药品监督管理局 (FDA) 的公示文件中, 以代谢位置的原子相关性分类, 总结了药物中常见的警惕结构 (表 1)。

表 1 药物中常见的警惕结构

结构类型	警惕结构	代谢酶系	活性代谢物	毒性
N 原子相关警惕结构	 $R_1, R_2 = \text{H, alkyl, phenyl, acyl, acyloxy, sulfonyl}$	过氧化物酶 CYP450		肝、肾毒性
	 $R_1, R_2 = \text{H, alkyl}$	单胺氧化酶 CYP450		肝、肾毒性
	 $R_1 = \text{phenyl, aryl, heterocyclic}$	CYP450		肝、肾毒性
	 $R_1, R_2 = \text{H, alkyl, carbon}$	过氧化物酶环氧化酶		DNA 损伤
	 $R_1, R_2 = \text{H, alkyl}$	单胺氧化酶 CYP450		肝毒性
	 $R_1, R_2 = \text{H, alkyl}$	单胺氧化酶 CYP450		肝毒性
	 $R_1, R_2 = \text{H, alkyl, phenyl, acyl, acyloxy, sulfonyl}$	过氧化物酶 CYP450		血液病
	 $R = \text{any carbon}$	CYP450		肝毒性
	 $R_1, R_2 = \text{H, any carbon}$ $R_3 = \text{any nitrogen and carbon}$	CYP450		骨髓毒性
	 $R_1, R_2 = \text{H, alkyl, carbon}$	CYP450		肝毒性
	单胺氧化酶 CYP450		肝毒性	

续表

结构类型	警惕结构	代谢酶系	活性代谢物	毒性
O 原子相关警惕结构		CYP450		肝、肾毒性
	 R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> =H, alkyl, carbon or cyclizton	CYP450		肝毒性
	 R=any carbon	葡萄糖醛酸转移酶	 	肝毒性
	 R=H, carbon	葡萄糖醛酸转移酶	 	肝毒性
	 R=any substituent	葡萄糖醛酸转移酶		肝毒性
S 原子相关警惕结构	 R <sub>1</sub> -R <sub>4</sub> =H, alkyl	过氧化物酶 CYP450		肝毒性 骨髓毒性
	 R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> =H, alkyl, carbon or cyclizton	CYP450		肝毒性 血小板抑制
	 R <sub>1</sub> -R <sub>4</sub> =H, alkyl	CYP450		肝毒性
	 R <sub>1</sub> =any carbon	CYP450		肝毒性
C 原子相关警惕结构	 R=any substituent X=Cl, Br	CYP450		骨髓毒性
	 R <sub>1</sub> -R <sub>3</sub> =H, any carbon	CYP450		肝毒性
	 R=any substituent	CYP450		骨髓毒性 肝毒性
	 R=any substituent	CYP450		肝毒性 再生性障碍贫血

对于本身具有强亲电性的化学结构 (例如: 醛基、 $\alpha, \beta$ -不饱和酮或酯、亚硝基化合物、羧基结构、醌类等), 极易与体内生物大分子结合, 因此, 这些结构片段在药物中不常出现, 同时在药物发现与设计阶段也应尽量规避。

### 3 降低警惕结构潜在毒性的改造策略

鉴于警惕结构潜在的毒性风险，在先导化合物的研发过程中，对警惕结构进行结构优化是降低先导化合物潜在毒性的有效方法。

主要包括两种思路：一种思路是去除药物中的警惕结构。如果警惕结构不是药物的药效团，去除警惕结构既可简化分子，又可降低毒性；如果警惕结构对活性至关重要，或是必需的连接片段，可以考虑运用生物电子等排的原理，将易代谢的警惕结构用弱代谢基团进行生物电子等排体替换，达到降低毒性的目的。另一种思路是对警惕结构进行结构修饰，通过引入钝性基团封闭代谢位点或者引入更易代谢的基团，改变化合物的原有代谢路径，使其不能产生活性代谢物，阻断其毒性代谢途径（图 2）。

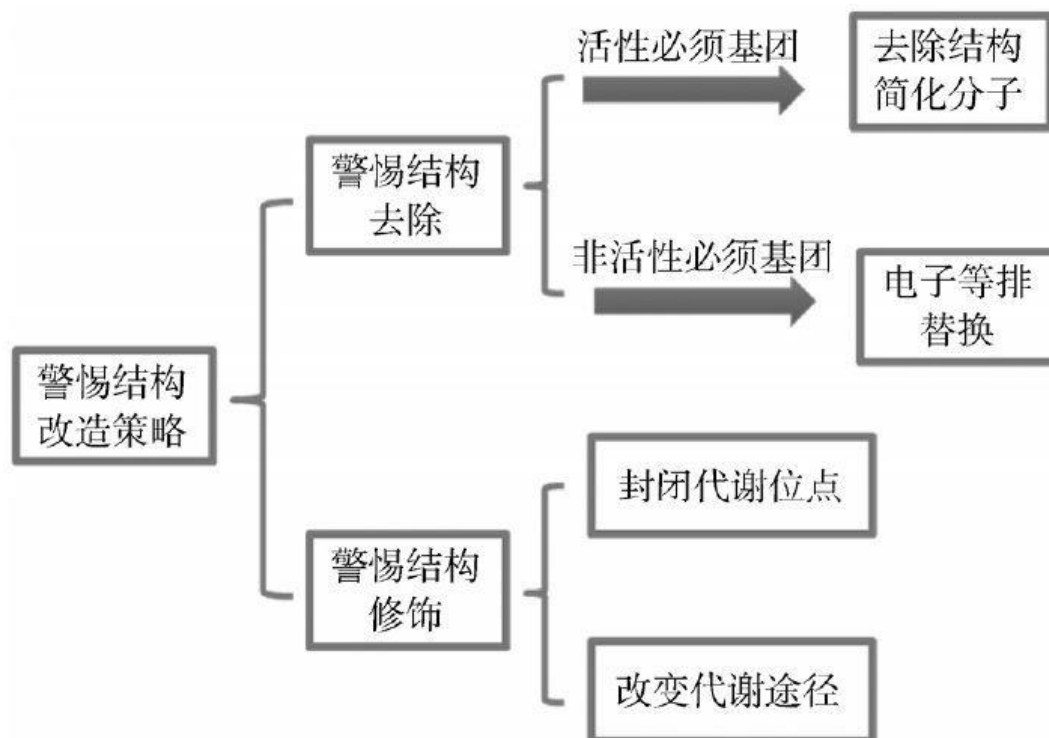


图 2 警惕结构改造策略简图

具体而言，警惕结构的优化改造策略主要包括：封闭代谢位点、改变代谢途径、降低反应性、生物电子等排以及前药原理等。

### 3.1 亚胺-醌类结构的改造策略

含有供电子取代基的苯环，由于电子云密度高易被体内的氧化酶系氧化生成亚胺-醌类结构，进一步与 GSH 等活性蛋白过量结合引发毒性。例如，对乙酰氨基酚 (paracetamol) 的酚羟基易被氧化代谢成亚胺-醌类物质而与 GSH 结合，产生毒性。

#### 3.1.1 增加代谢位点位阻

针对易被氧化代谢的酚羟基，可以通过在氧原子上引入位阻基团，增加代谢难度，阻碍亚胺-醌类活性结构的产生。长期服用解热镇痛消炎药物非那西丁 (phenacetin, 1) 可损害肾脏，甚至诱发癌症，许多国家已经禁止其销售。

从结构上分析,该化合物含有富电性苯环,易代谢成亚胺-醌类活性代谢物,从而导致临床上出现毒副作用。但是非那西丁实际体内的代谢途径与预测并不相同。进入体内后,大部分转化成 N-去乙酰化代谢产物 3 和 N-羟基化代谢产物 4,进一步氧化成亚硝基化合物 5 (图 3)。

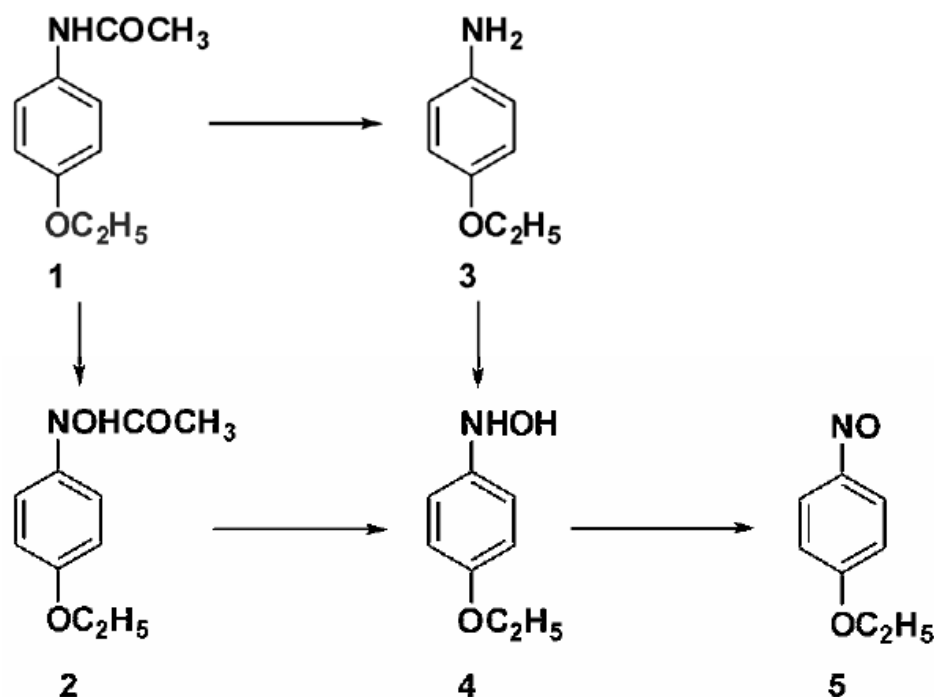


图 3 非那西丁的体内代谢途径

临床使用也表明非那西丁不具有肝毒性,其退市的主要原因是亚硝基化合物引起的“痛觉迟钝性肾炎”。非那西丁与对乙酰氨基酚的差别在于用乙基保护原结构中的酚羟基,增大了酚羟基的代谢位阻,使代谢位点转移到氨基基团,阻碍了亚胺-醌结构的产生。虽然非那西丁并不算是成功规避毒性的药物,但其阻断醌类物质形成的机制值得借鉴。

### 3.1.2 封闭代谢位点

在先导化合物结构优化中,通过封闭代谢位点阻止氧化代谢发生,减少先导化合物的潜在毒性是常见的结构改造策略。

阿莫地喹(amodiaquine, 6) 用于治疗疟疾,尤其是针对恶性疟原虫引起耐药性疟疾。临床研究结果表明:阿莫地喹进入体内被肝内 CYP 酶系和过氧化酶(MPO)氧化成亚胺-醌类活性代谢物质 7,化合物 7 与 GSH 结合引起肝毒性和血液病,因此阿莫地喹被 FDA 黑框警告。但对阿莫地喹的研究并没有终止,采用氟原子替换羟基(8)或将氮上的两个乙基换成叔丁基(9和10),都得到了毒性降低的化合物。

这些化合物在体内均未检测到醌-蛋白复合物,其主要原因是化合物 8 采用氟原子封闭羟基的氧化位点,使其难以氧化为亚胺-醌;化合物 9 和 10 引入极易代谢的 N-叔丁基改变了阿莫地喹原有的代谢途径(图 4)。

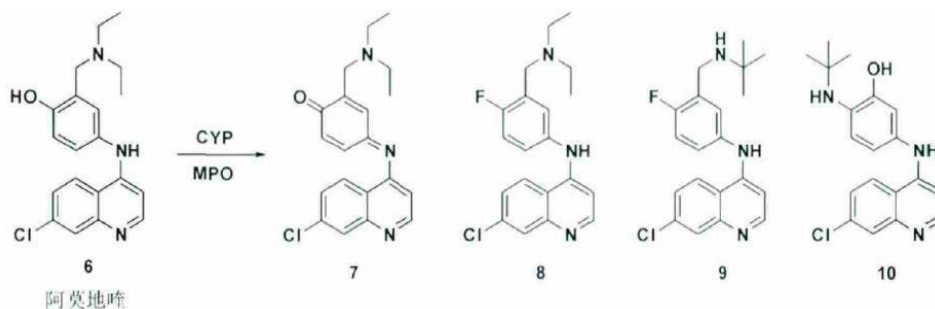


图 4 阿莫地嗪及其类似物

### 3.1.3 生物电子等排

亚胺-醌类结构产生的主要原因是富电子化苯环易被氧化。采用生物电子等排的原理，利用 N 杂芳香杂环替代苯环，增加氧化难度，图 4 能够减少醌类结构的产生。曲格列酮 (troglitazone, 11) 由于肝脏毒性受到黑框警告，并于 2000 年 5 月被 FDA 撤市。

曲格列酮含有两个警惕结构基团：其一是左侧易产生醌类的富电性苯环，其二是右侧的噻唑二酮结构片段，LC-MS/MS 检测到曲格列酮代谢产生的活性代谢物与蛋白质的共价复合物。后续上市的 PPAR $\gamma$  激动剂吡格列酮 (pioglitazone, 12) 和罗格列酮 (rosiglitazone, 13) 的肝毒性报道较少，药物毒性大幅下降。采用吡啶环替代含酚羟基的苯环，增加了氧化难度，阻碍醌类结构产生；同时由于吡格列酮 (30 mg·d<sup>-1</sup>) 和罗格列酮 (<20 mg·d<sup>-1</sup>) 的日服用剂量远远低于曲格列酮 (200~600 mg·d<sup>-1</sup>)，降低了毒性风险 (图 5)。

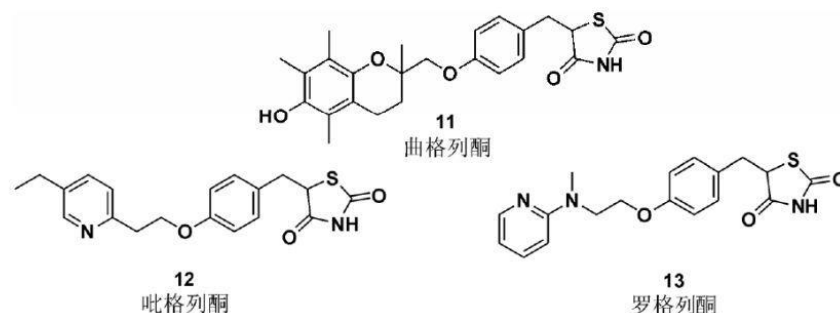


图 5 曲格列酮、吡格列酮和罗格列酮

精神病治疗药物奈法唑酮 (nefazodone, 14) 1994 年上市，但由于大量的肝毒性病例报道，最终在欧洲撤市，美国市场也受到黑框警告。奈法唑酮肝毒性产生原因如图 6 所示。

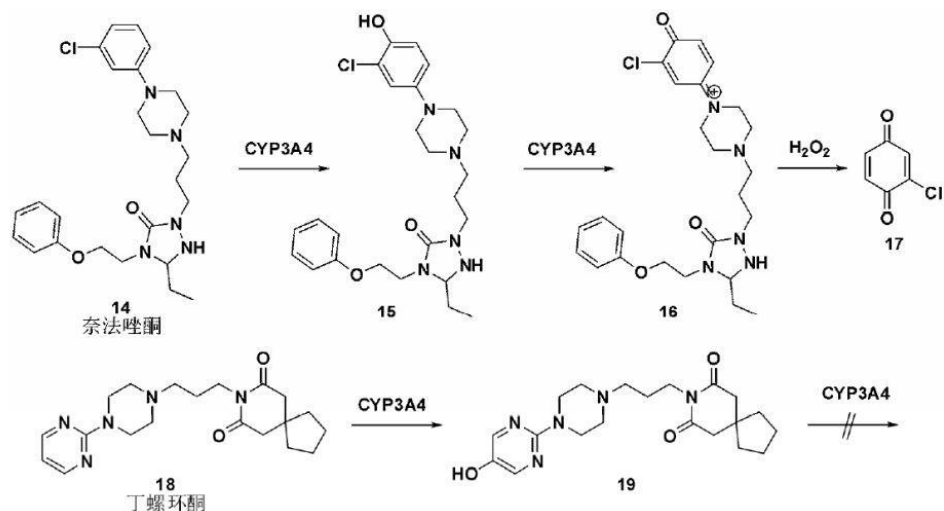


图 6 奈法唑酮和丁螺环酮的代谢途径

奈法唑酮被体内 CYP3A4 氧化,得到 4-羟基氧化代谢产物 15, 进一步氧化得到对亚胺-醌类代谢产物 16, 活性代谢物 16 本身可与 GSH 结合产生毒性, 也可继续代谢成活性更强的化合物 17, 增加毒性风险。

丁螺环酮 (buspirone, 18) 与奈法唑酮结构相似, 二者都含有哌嗪取代的疏水性芳香结构片段以及与酶特异性结合的功能性片段, 但丁螺环酮上市以来, 并未有由药物诱发肝毒性的报道。推测其原因为嘧啶环等排替代苯环后, 增加氧化难度, 阻碍了亚胺-醌结构的产生, 减少了肝毒性风险(图 6)。

### 3.1.4 改造中的注意事项

应用上述策略的同时还应注意取代基对芳环反应性的影响, 否则仍可能产生亚胺-醌类结构。广谱抗菌药甲氧苄啶 (trimethoprim, 20)和首个 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼 (gefitinib,23) 是该类结构改造的代表 (图 7)。

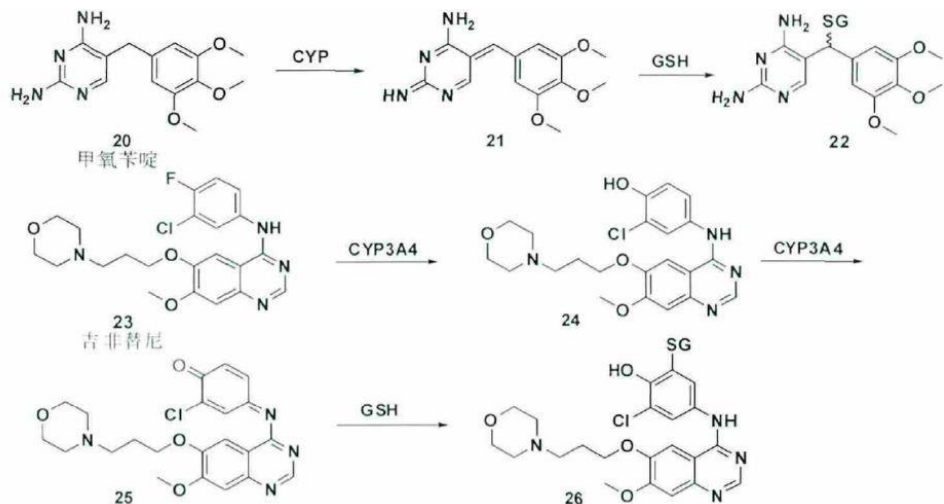


图 7 甲氧苄啶和吉非替尼的体内代谢途径

甲氧苄啶虽然含有嘧啶环, 并且采用甲基保护酚羟基, 看似难以产生亚胺-醌类活性代谢物, 但在实际体内代谢过程中, 由于嘧啶环上两个强供电子基团氨基的

活化作用，使得甲氧苄啶在 CYP 酶氧化作用下得到杂环亚胺-醌类结构而产生毒性。

吉非替尼于 2003 年上市用于治疗非小细胞肺癌。吉非替尼苯环的对位采用氟原子封闭代谢位点，但不能阻止亚胺-醌类毒性结构的产生。受邻位氯原子的影响，在 CYP3A4 的氧化作用下，氟原子离去被羟基替代而活化苯环，产生亚胺-醌类毒性结构 25，化合物 25 进一步与谷胱甘肽结合产生毒性。

### 3.2 芳香酸类结构的改造策略

芳香酸类结构片段主要存在于一些含羧基、酯类结构的药物中，多见于非甾体抗炎药。芳香酸在体内通过葡萄糖醛酸转移酶催化的一系列代谢反应，与蛋白质等活性生物大分子结合而引起严重的肝毒性，上市的非甾体抗炎药中已有 5 种药物退出美国市场(溴芬酸、佐美酸、异丁芬酸、吡洛芬和苯恶洛芬)。

该类结构的代谢通式如图 8 所示：药物经葡萄糖醛酸转移酶催化，首先形成 1-O-β-葡萄糖酸苷 27，化合物 27 经多步反应得到 3-O-β-葡萄糖酸苷 28，其互变异构体 29 与体内蛋白结合形成蛋白-糖苷 30，最后经阿马多尔重排使葡萄糖酸苷与蛋白质稳定结合，阻碍蛋白质功能而导致细胞凋亡。

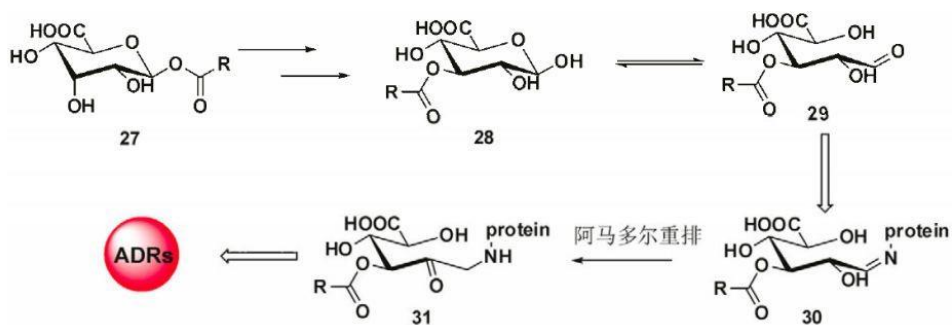
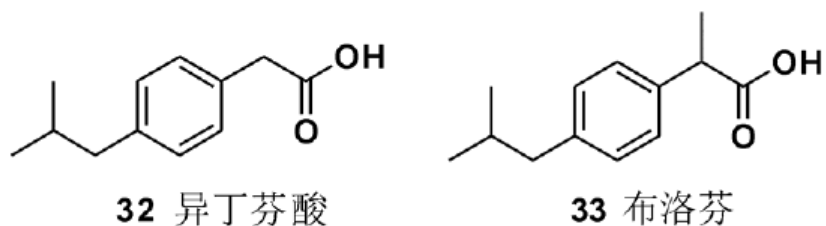


图 8 芳香酸类化合物的体内代谢通式

由于 β-葡萄糖苷化是芳香酸类化合物在体内代谢的关键环节，其本质是羟基氧原子亲核进攻羧基的碳原子，如果能降低酸度或增大羧基反应位阻，均能影响羧基的反应活性，减少对体内蛋白质的影响。

#### 3.2.1 增加位阻减少“葡萄糖酸苷”生成

异丁芬酸 (ibufenac, 32) 和布洛芬 (ibuprofen, 33) 均为非甾体抗炎药物，异丁芬酸由于肝毒性已经从美国市场撤市，但布洛芬安全性良好，仍是畅销药物。二者的化学结构极为相似，唯一的区别是布洛芬在羧基的 α 位引入甲基，二者的乙酰糖苷化降解速率的差异，使布洛芬更难形成“葡萄糖酸苷”(图 9)。



乙酰糖苷降解速率  $t_{1/2}$ : 1.1 h

3.6~4.6 h

图 9 异丁芬酸和布洛芬

### 3.2.2 减弱酸性减少“葡萄糖酸苷”生成

从结合蛋白质的过程可以看出, 1-O- $\beta$ -葡萄糖酸苷转变成 3-O- $\beta$ -葡萄糖酸苷是这一转化的关键步骤, 这一步反应速率越快, 越利于与蛋白质的结合 (图 10)。

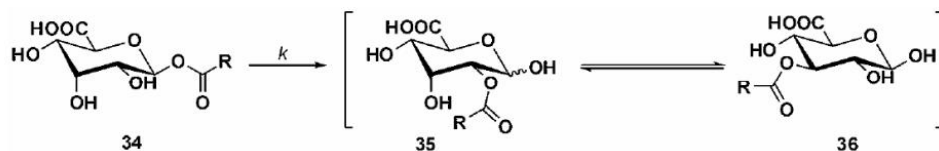
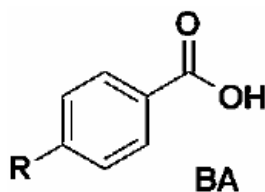


图 10 3-O- $\beta$ -葡萄糖酸苷形成过程

若降低这一反应的反应速率, 可减弱芳香酸对蛋白质的破坏作用。对于不同取代基的 1-O- $\beta$ -苯甲酸葡萄糖酸苷的酰基转移反应速率常数 ( $k$ ) 研究显示: 化合物酸性与迁移速率常数  $k$  呈正相关。

从表 2 中可以看出, 随着酸性的减弱, 迁移速率递减。

表 2 取代基对苯甲酸迁移速率影响



R	$k / \text{h}^{-1}$	$\text{p}K_{\text{a}}$
H	$0.35 \pm 0.00$	4.20
Cl	$0.61 \pm 0.00$	3.97
OMe	$0.165 \pm 0.002$	4.37
CF <sub>3</sub>	$1.79 \pm 0.08$	3.69
Ph	$0.35 \pm 0.01$	4.19

较强供电子基团取代可以减弱酸性, 有效降低迁移速率常数  $k$ , 从而减少 3-O- $\beta$ -葡萄糖酸苷的形成, 降低结构潜在毒性风险。

### 3.3 杂环类化合物结构改造策略

呋喃环、噻吩环、吡咯环等富电性芳香杂环由于电子云密度较高，尤其当 2, 3-位 (或 4, 5-位) 无取代时，易被体内氧化酶氧化，生成亲电性基团产生肝肾毒性。以替尼酸 (tienilic acid, 37) 为例，其代谢途径主要代谢位点在噻吩环 C-5 位，在 CYP2C9 的催化作用下，C-5 位既可以被大分子亲核基团进攻，又可进行双键的环氧化，由于 C-5 位与生物大分子结合，产生 CYP 酶抑制和肝损伤等毒副作用。

与替尼酸类似，氯吡格雷 (clopidogrel, 38) 和噻氯匹定 (ticlopidine, 39) 均含有未取代的噻吩环，易被氧化代谢而存在潜在毒性风险。实际临床应用中也证实，这两种药物都具有较强的毒副作用。氯吡格雷和噻氯匹定分别由于心脏病风险和血液病而受到黑框警告 (图 11)。



图 11 具有毒性风险的含噻吩环药物

通过上述分析看出，富电性杂环潜在的毒性风险主要原因在于未取代的杂环位点易发生氧化开环，进一步产生亲电性强的活性代谢物。因此，针对此类杂环的改造策略十分明确，在活性代谢位点引入取代基团，通过封闭代谢位点和改变体内代谢途径降低化合物的毒性。

#### 3.3.1 引入易代谢基团改变代谢途径

非甾体抗炎药物舒多昔康 (sudoxicam, 40) 由于肝毒性已经在美国撤市。药代动力学研究表明：由于舒多昔康的噻唑环 4, 5-位无取代基，CYP 酶氧化为化合物 41 和 42，化合物 42 氧化开环释放出亲电物质乙二醛，影响细胞内生物大分子的活性。

在舒多昔康噻唑环的 5-位引入甲基取代，得到美洛昔康 (meloxicam, 44)，甲基的引入阻碍了氧化代谢途径，使其与舒多昔康具有完全不同的噻唑环代谢方式，从而减少了毒性风险(图 12)。

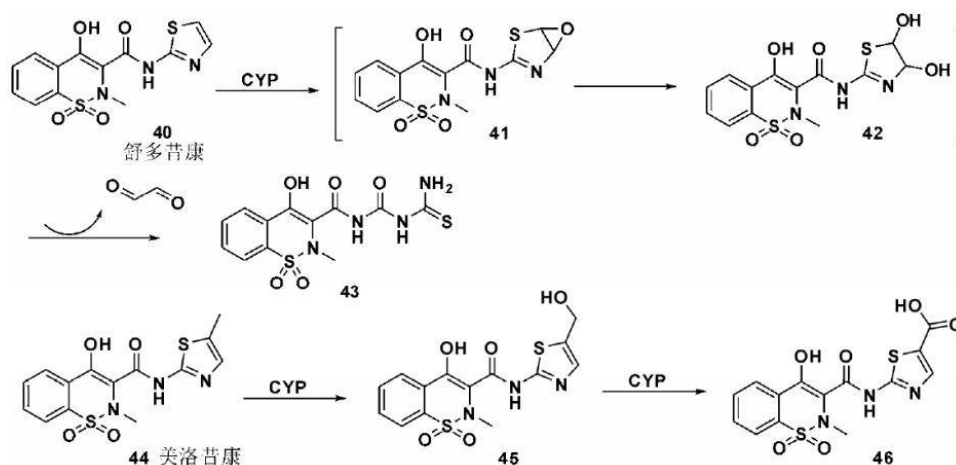


图 12 舒多昔康和美洛昔康的体内代谢途径

### 3.3.2 前药设计封闭代谢位点

前药修饰能够改善药物代谢性质、增强靶向性、降低药物的毒副作用。分析药物结构特点和体内代谢方式，巧妙的引入前药设计能有效降低药物毒性风险。对氯吡格雷代谢中间体的氯吡格雷硫代内酯采用前药策略进行改造,得到维卡格雷 (vicagrel, 47), 该药仅需一步 CYP450 酶代谢即可转化成活性中间体, 克服氯吡格雷抵抗的同时不会增加出血风险。

氯吡格雷临床应用中发现, 其心脏毒性风险与氯吡格雷抵抗相关, 而维卡格雷由于引入前药基团, 无需 CYP2C19 代谢成硫代内酯形式, 能够有效减少氯吡格雷抵抗 (图 13)。同时由于维卡格雷起效剂量更低, 大大降低了毒性风险。

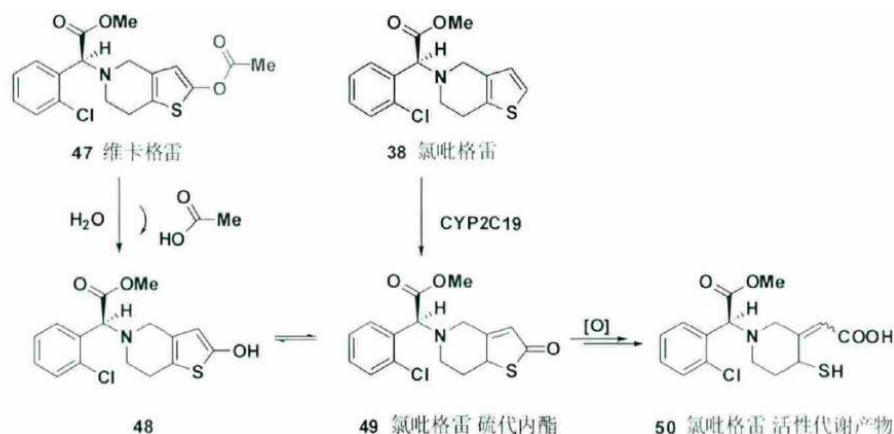


图 13 维卡格雷和氯吡格雷代谢途径

### 3.3.3 其他杂环类结构的改造策略

含有苯并含氮杂环结构的药物存在产生活性代谢物的风险。抗抑郁药物氯氮平 (clozapine, 51) 疗效显著, 但由于其日服用剂量较高 (300~900 mg·d<sup>-1</sup>) 及其结构的特殊性, 具有较强的肝毒性。

氯氮平进入体内后, 在 CYP 氧化酶的作用下氧化成亚胺-醌类化合物 52, 化合物 52 与生物大分子结合引发肝毒性和血液病等副作用。

其同类药物喹硫平 (quetiapine, 54) 与其结构相似, 区别在于用硫原子替换二氮杂草环中的一个氮原子, 使其难以氧化形成亚胺-醌类结构 55, 减少毒性风险 (图 14)。

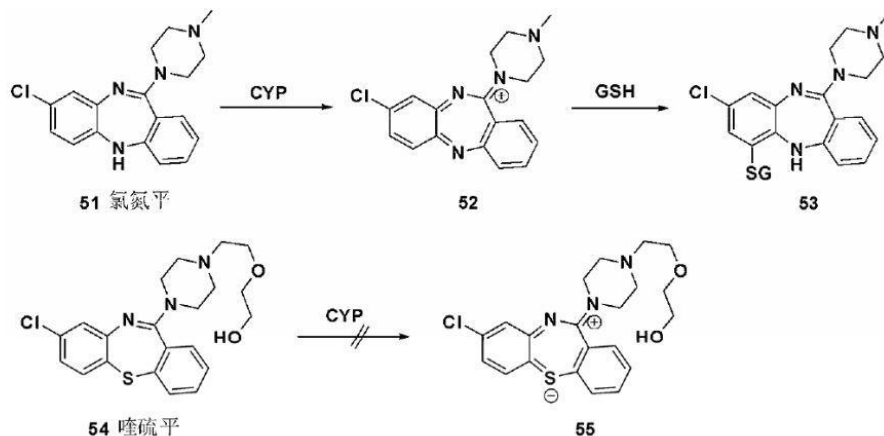


图 14 氯氮平与喹硫平的体内代谢途径

### 3.4 易代谢生成醛类结构的改造策略

#### 3.4.1 典型结构举例

当碳原子处于端位且被多个卤素原子取代时 (F 原子除外), 易被体内酶系氧化成醛或酰氯, 使得该类结构存在与生物大分子结合的风险。由于骨髓毒性已经不再口服使用的氯霉素(chloramphenicol, 56) 是这类结构的典型代表。其末端双氯取代碳原子在 CYP 酶的作用下羟化, 脱去一分子氯化氢形成酮酰氯 58, 与生物大分子结合产生毒性 (图 15)。

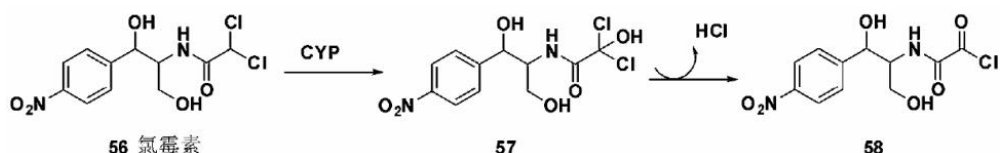


图 15 氯霉素的体内代谢途径

当碳原子被易代谢的杂原子 (如酯、酰胺、位阻小的仲胺、叔胺等) 取代时, 其  $\alpha$  位应当避免引入不饱和碳-碳键, 否则在体内存在产生  $\alpha, \beta$ -不饱和结构的危险。抗真菌药物特比萘芬 (terbinafine, 59) 正是因此而产生肝毒性和血液毒性。

特比萘芬进入体内, 在 CYP450 酶作用下叔胺基团发生氧化断键, 形成  $\alpha, \beta$ -不饱和醛 60, 化合物 60 作为 Michael 受体本身具有很高的亲核活性, 通过 1, 4-加成或 1, 6-加成形成共价复合物 62 和 63, 过量消耗 GSH 而产生毒性(图 16)。

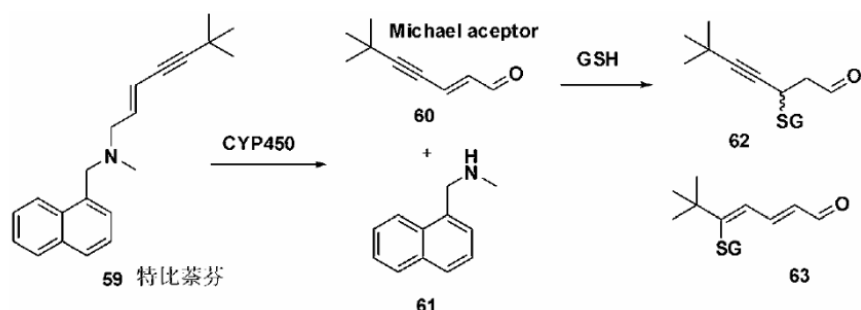


图 16 特比萘芬的体内代谢途径

#### 3.4.2 改造策略——引入 F 原子封闭代谢位点

通常在易代谢位置引入 F 原子可以降低代谢产生的风险。非尔氨酯 (felbamate, 64) 是 1993 年上市的治疗癫痫的药物, 自其上市以来, 有大量的肝毒性和再生性贫血障碍的病例报道, 也因此受到 FDA 的黑框警告。其代谢途径如图 17 所示, 非尔氨酯进入体内, 在体内酯酶的作用下一分子酰基水解得到 65, 随后被醛脱氢酶氧化成醛 67, 其互变异构体 68 可通过电子转移脱氢得到  $\alpha, \beta$ -不饱和醛而产生毒性。

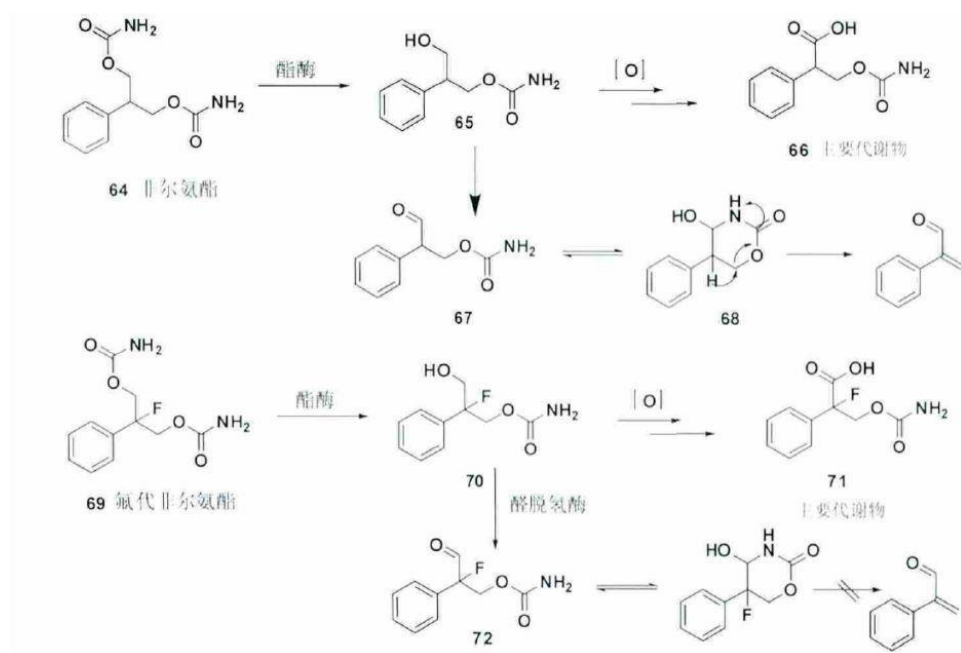


图 17 非尔氨酯和氟代非尔氨酯的体内代谢途径

其同系物氟代非尔氨酯 (fluorofelbamate, 69) 在代谢位点引入 F 原子, 与非尔氨酯相同, 69 也通过同样的途径代谢生成含醛产物 72。但 F 原子的引入, 使得 72 在互变异构体中不能进行脱氢转变, 阻碍了  $\alpha,\beta$ -不饱和醛的产生, 降低了药物毒性。

### 3.5 芳香硝基类化合物结构优化策略

#### 3.5.1 引入双键改变代谢途径

由于硝基在体内易发生还原反应产生毒性, 因此含有硝基的药物也具有一定的毒性风险。治疗帕金森综合症药物托卡朋 (tolcapone, 74) 1998 年在美国上市, 临床研究表明:托卡朋具有严重的肝毒性, 目前已经被 FDA 强制撤市。

虽然托卡朋体内的主要代谢途径是被葡萄糖醛酸化而代谢出体外, 但仍有一部分的托卡朋在体内经还原酶将硝基还原成芳胺 74, 进而被 CYP 氧化与 GHS 结合, 或经 N-乙酰化后被氧化成醌类结构 75, 与体内活性亲核蛋白结合。在人肝微粒体中均能检测到蛋白的复合物 76 和 79。与托卡朋类似的恩他卡朋 (entacapone, 80) 并没有表现出与其相似的毒性。

恩他卡朋同样含有芳香硝基和儿茶酚结构片段, 甚至取代基位置都一样, 但其体内代谢研究结果表明:绝大部分恩他卡朋首先发生双键的顺反异构化, 然后经儿茶酚途径代谢出体外 (图 18)。

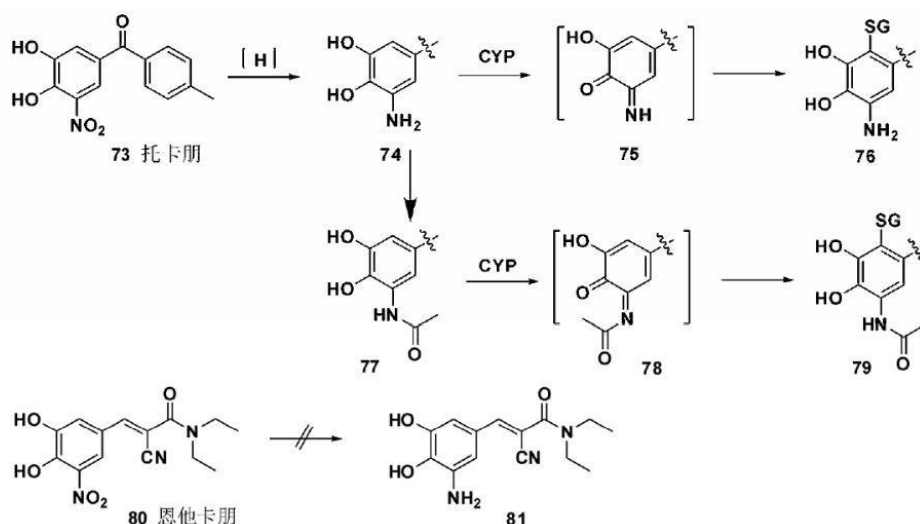


图 18 托卡朋和恩他卡朋的体内代谢途径

推测上述结果主要有两个原因：① 由于引入更易代谢的基团，改变了芳香硝基的代谢途径；② 双键顺反异构化导致了恩他卡朋不能作为还原酶的底物而被识别。

### 3.5.2 吡啶环等排替代

尼美舒利 (nimesulide, 82) 作为 COX-2 选择性抑制剂，具有显著的抗炎、解热作用。但上市以来，肝毒性病例报道不断增加，已在芬兰、比利时和西班牙撤市。随后由于“尼美舒利事件”，中国在 2011 年发布通知，禁止 12 岁以下儿童使用尼美舒利口服制剂。

尼美舒利产生肝毒性的分子学机制尚不完全明确，但是尼美舒利在肝中的代谢产物，尤其是硝基还原产物与其毒性密切相关。

研究表明：在人肝微粒体中，芳香硝基还原后产物 83 可经 P450 酶和单胺氧化酶氧化成醌亚胺类结构 84 和亲电产物 85。代谢物 85 可进一步与体内一些强亲核物质 (例如蛋白质、DNA 等) 共价结合，从而可能导致肝毒性的产生 (图 19)。

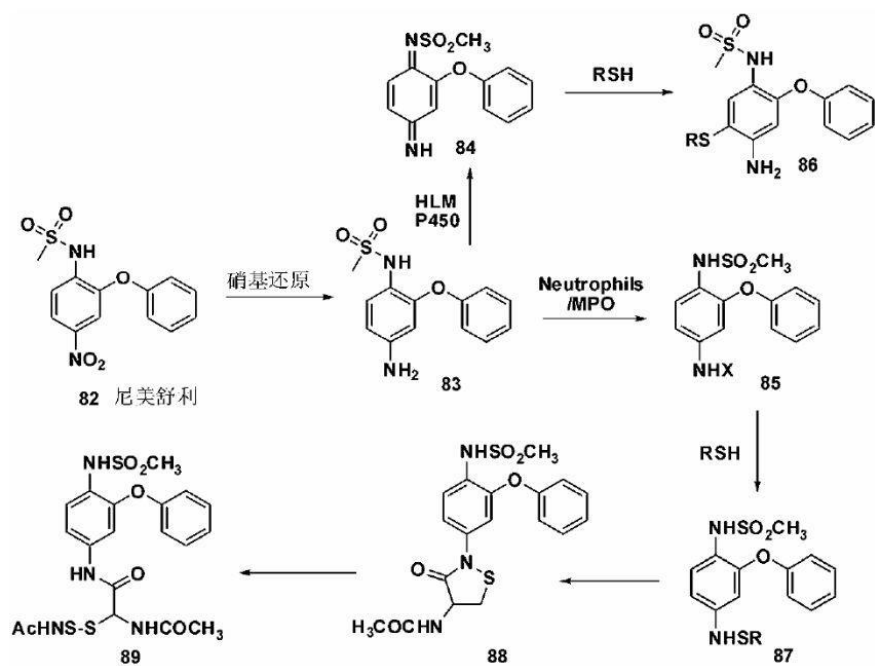


图 19 尼美舒利在人肝微粒体内代谢途径

在后续对尼美舒利的改造研究中发现，将硝基苯结构生物电子等排成吡啶环结构 (91)，能够提高酶水平活性和选择性，同时能够保持在大鼠体内的抗炎活性 (表 3、4)。

表 3 尼美舒利及改造体体外活性测试结果

化合物	COX-1/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	COX-2/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	选择性
尼美舒利 (82)	$3.76 \pm 1.02$	$0.70 \pm 0.23$	5.37
91	$0.91 \pm 0.05$	$0.12 \pm 0.14$	7.48

表 4 尼美舒利及改造体体内 (大鼠) 活性测试结果

化合物	渗出液抑制率/%		
	$5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
尼美舒利 (82)	$31.05 \pm 7.85$	$48.44 \pm 3.09$	$61.53 \pm 6.75$
91	$42.07 \pm 3.74$	$52.16 \pm 2.63$	$64.52 \pm 3.21$

这一策略的应用成功避免了芳香硝基结构，使得先导化合物的预期毒性风险显著降低 (图 20)。

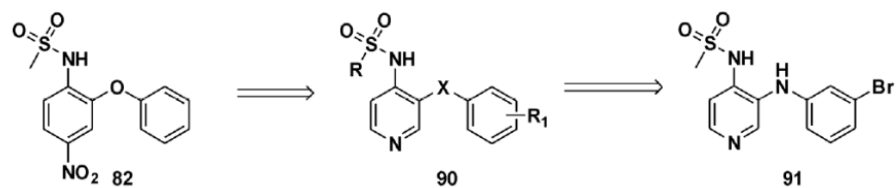


图 20 尼美舒利改造结果

### 3.6 药物剂量与毒性的初步关系

由于不同药物的吸收、分布、代谢、蛋白结合率千差万别，所以对于将安全药物和产生毒性药物的剂量进行比较分析十分困难，也更加难以定义一个对于所有药物研发的安全剂量标准。但通过对大量上市药物剂量分析，安全药物的日服用剂量远远低于产生毒性药物的日服用剂量。

对具有肝毒性药物日服用剂量进行统计，结果表明：日服用剂量低于 100 mg·d<sup>-1</sup> 的仅占 8%，高于 200 mg·d<sup>-1</sup> 的占 80%以上。对美国市场撤市或者受到黑框警告的药物进行统计，日服用剂量高于 100 mg·d<sup>-1</sup> 的药物分别占 84%和 81%。

从以上分析可以看出，低起效剂量是安全药物的一个趋势。如果先导化合物中含有某些难以改造的警惕结构时，可以从另外的角度着手，增强先导化合物的活性，降低起效剂量，从而推动先导化合物的进一步研发。

抗精神病药物安奈普汀 (amineptine, 92) 含有警惕结构脂肪酸，由于脂肪酸的代谢产生肝毒性(图 21),已被 FDA 撤市。

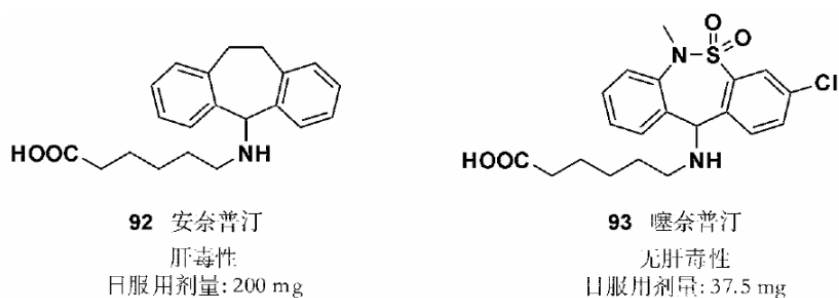
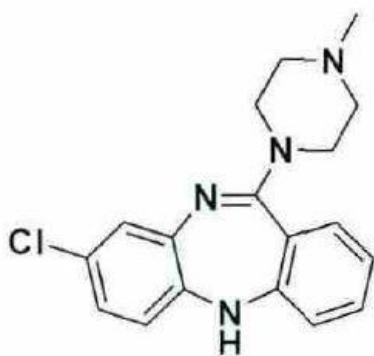


图 21 安奈普汀和噻奈普汀

其同类药物噻奈普汀(tianeptine, 93)与安奈普汀代谢途径相似，但由于其日服用剂量仅为 37.5 mg，肝毒性较低，仍然是临床重要的抗精神病治疗药物。

对氯氮平 (51) 毒性规避的另一种方法是提高活性，降低服用剂量。奥氮平 (olanzapine, 94) 是应用此种策略的成功例子，其日服用剂量从最高 900 mg·d<sup>-1</sup> 降低到 10 mg·d<sup>-1</sup>，下降了 90 倍(图 22)。



51 氯氮平

肝毒性  
日服用剂量: 300~900 mg



94 奥氮平

无肝毒性  
日服用剂量: 10 mg

图 22 氯氮平和奥氮平

由于奥氮平具有良好的临床疗效和安全性，在 2010 年全美 top200 销售药物中排名第 13。

4

## 结论

随着对新药安全性要求的日益增高，安全性研究在整个药物研发物过程中所占的比重也日益加大。对大量药物毒副作用研究发现，由警惕结构代谢出的活性代谢物是诱发药物毒性的关键因素。鉴别出警惕结构并对警惕结构进行合理结构改造，减少活性代谢物的产生是许多制药公司进行先导化合物结构优化时采取的重要结构改造策略。熟悉常见警惕结构，了解对这些警惕结构的基本改造策略，对于药物的安全性评价研究和先导化合物结构优化具有重要意义。

虽然警惕结构的存在增加了药物的毒性风险，同时活性代谢物与药物毒性有着密切的联系，但并不是所有的活性代谢物都会引发药物的毒副作用。目前尚不能精准预测含有警惕结构是否一定会在体内代谢生成活性代谢物诱发毒性，但是随着对活性代谢物引发药物毒性机制的深入研究和阐明，势必给警惕结构的化学结构改造提供明确的方向和适合的方法，使其成为合理药物设计与改造的有力工具。

## 先导化合物结构优化策略 (三)-化学修饰改善水溶性

### 摘要

水溶性是有机小分子药物极为重要的物理化学性质，也是小分子药物研发过程中的关键问题之一。良好的水溶性有助于药效的发挥和药代动力学性质的改

善。在药物化学领域，通过化学结构修饰方法改善药物的水溶性，是从溶解的本质考虑和解决问题的基本方法。

本文综述了通过化学结构修饰改善水溶性的基本策略,包括成盐修饰、引入极性基团、降低脂溶性、构象优化、前药修饰等。

## 正文

先导化合物的发现及结构优化是创新药物研究成败的核心问题之一。一个全新的分子实体能否成为最终上市的药品，通常需要经过药效学、药代动力学、安全性等多方面的综合评价。在先导化合物结构优化过程中，化合物的水溶性起着至关重要的作用。

良好的水溶性可以提升化合物的类药性质，提高药物在人体内的吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 等药代动力学特性。因此，重视化合物水溶性的结构改造，将使我们在先导化合物结构优化过程中事半功倍。

本文从讨论溶解的热力学本质出发，综述了通过化学修饰改善先导化合物水溶性的理论基础和基本策略，包括成盐、引入极性基团、降低脂溶性、构象优化、前药修饰等方面。

## 1 水溶性的重要性

一般来说，理想药物分子应是具备高活性、低毒性、良好的药代动力学性质等各项优良性质的综合体。在药物发现的初期阶段，人们往往会更强调对化合物活性的优化。在此过程中，亲脂性结构往往由于与蛋白靶标作用更强从而被引入药物分子,使得化合物的水溶性问题变得突出。

据统计，根据美国 FDA 使用的生物药物分类系统

(Biopharmaceutic Classification System, BCS)，约有 40% 的上市药物和近 90% 的在研药物属于低溶解度的范畴。

药物水溶性的降低会带来一系列问题，主要包括以下几个方面：① 较差的水溶性会降低化合物的暴露量，影响药效的发挥；② 低水溶性会影响药物在体内的代谢；③ 水溶性差的药物为了达到药效往往需要增大给药剂量，这会造成药物在体内蓄积或产生结晶，增加了毒副作用的风险；④ 水溶性差的药物不易制成口服或静脉制剂，会造成后期研发投入的增加。所以，在药物研发的各个时期都应该注重对药物水溶性的关注。

## 2 水溶性的本质及其影响因素

### 2.1 水溶性的本质

水溶性是化学分子的一种基本物理化学性质。溶解的热力学过程主要包含两个部分：过程一是物质晶体在溶液中解离成单个分子，过程二是单个分子被水分子包裹形成水合物。从能量过程来看，两个过程分别对应着晶格能和水合能(式 1)。

$$\Delta G (\text{溶解}) = \Delta G (\text{水合}) - \Delta G (\text{晶格}) (1)$$

通常来说,分子克服晶格能是吸收能量的过程,而水合过程是释放能量的过程。所以,减小晶格能,增加水合能,即可促进溶解。

晶格能与化合物本身的结构、极性等有关,分子之间作用力越大,晶格能越高,化合物表现出较高的熔点和较差的溶解性;水合能由药物与水分子的作用方式所决定,与化合物本身的结构、极性和离子化性质相关。所以,改善药物水溶性的一个基本思路,应是通过改造分子本身的相关性质来影响分子的溶解热力学。

## 2.2 水溶性的影响因素

有文献报道,大部分上市的口服药物的溶解度(S)在 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,若化合物的分子量为400,则对应的溶解度约为 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 到 $4 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。溶解度并没有固定限制,对于起效剂量很低的化合物,较低的溶解度已经足够发挥药效;而水溶性过高的化合物也可能带来脂溶性低或渗透性差等问题。理想药物的亲水性和亲脂性应处于最适的状态。

能够影响水溶性的理化参数有LogP、分子量、熔点、PSA(极性表面积)和pKa等。根据经典的“Lipinski 五规则”,药物分子的LogP值应不大于5,而目前普遍认为的范围和已经上市的药物的LogP值大部分介于0~4之间;小分子药物的分子量应在500以下,分子量过高不利于溶解。

熔点是直观的表征晶格能的参数,一般来说,熔点越高的化合物固态形态越稳定,其水溶性越差。根据Yalkowsky溶解度计算公式: $\text{LogS} = 0.5 - \text{LogP} - 0.01(\text{mp} - 25)$ ,可以看出化合物LogP值和熔点对溶解度S影响。

PSA(polar surface area, 极性表面积)指分子中极性原子表面积的总和。根据Veber规则,药物分子的PSA要小于 $140 \text{ \AA}^2$ ,最适宜的PSA范围一般为 $50 \sim 80 \text{ \AA}^2$ 。

pKa显示的是化合物的离子化能力,现今上市的药物大部分都具有弱酸性或弱碱性,这使得化合物可被一定程度的离子化,易于溶解。

## 3 通过化学修饰改善水溶性的策略

### 3.1 成盐修饰

成盐是改善物理化学性质、提高成药性的重要手段之一。大部分药物分子都具有一定酸碱性,成盐可通过增加离子水合能,促进溶解(式2)。

$$\Delta G (\text{溶解}) = \Delta G (\text{阴离子水合}) + \Delta G (\text{阳离子水合}) - \Delta G (\text{晶格}) (2)$$

据统计,美国FDA橙皮书(FDA Orange Book)收录了截止2006年上市的1356个化学实体药物,超过一半的药物被制成盐:碱性化学实体的酸式盐占38.6%;酸性化学实体的阳离子盐占12.8%。

另据国内统计,在2010版中国药典所收录的736个有明确化学结构的药物中,与酸成盐的碱性分子占23.0%;与阳离子成盐的酸性分子占10.0%。从以上的数据可以看出,药物的成盐修饰已经被广泛的接受和使用。

在成盐过程中,选择合适的反离子是核心环节。首先需要考虑的因素是合适的pKa值。药物分子的pKa与反离子的pKa差距越大,成盐过程越容易,盐的稳定性也越好。通常来讲,这个差值应该大于2。

如表1统计,使用最多的阴离子是氯离子,硫酸盐其次,是因为这两种酸均具有较低的pKa。

**表 1** FDA 批准的药物中最常使用的成盐离子及出现频率 (截止 2006 年)

酸 (阴离子)	频率/%	pKa	碱 (阳离子)	频率/%	pKa
盐酸	53.4	-6.1	Na <sup>+</sup>	75.3	14.7
硫酸	7.5	-3.0, 1.96	Ca <sup>2+</sup>	6.9	12.9
氢溴酸	4.6	4.6	K <sup>+</sup>	6.3	16.0
甲磺酸	4.2	-1.2	葡甲胺	2.9	8.03
马来酸	4.2	1.92, 6.23	氨基丁三醇	1.7	8.02
酒石酸	3.8	3.02, 4.36	Zn <sup>2+</sup>	1.2	8.96
乙酸	3.3	4.76	Mg <sup>2+</sup>	1.2	11.4
磷酸	2.7	2.15, 7.20, 12.38	二乙胺	0.6	10.9

同理,在所有碱性盐中,钠盐占据了75.3%。无机酸碱的使用频率远远高于有机酸碱,这与有机酸碱本身的酸碱性较弱有关。

除了对溶解性的提高以外,还须考虑盐的稳定性(溶液中的稳定性、热稳定性、吸湿性等)、安全性、药代动力学性质、结晶性、晶型等综合因素。有研究人员全面考察了药物普鲁卡因的各种盐型的溶解度、饱和溶液pH值和稳定性等性质(表2)。

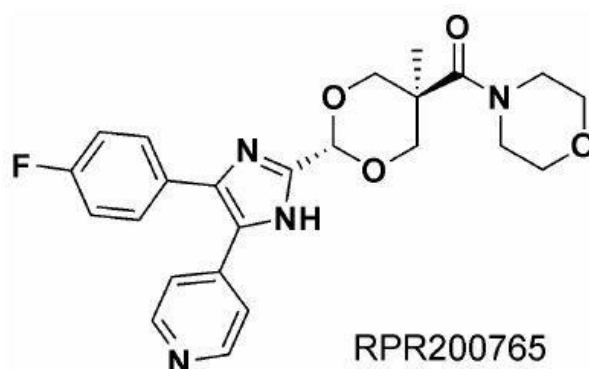
**表 2** 普鲁卡因成盐的溶解性和稳定性分析。—: 代表无相应数据

盐型	溶解度 /mol·L <sup>-1</sup>	饱和溶液 pH	水解速率 /k (10 <sup>-5</sup> )
硫酸氢盐	2.64	1.35	539
甲酸盐	2.89	6.42	921
磷酸盐	0.488	4.50	2.38
柠檬酸盐	0.697	3.72	4.85
甲磺酸盐	2.78	4.68	36.6
盐酸盐	2.58	4.82	51.2
普鲁卡因 (原型)	0.04	—	—

硫酸氢盐的饱和溶液 pH 值过低，甲酸盐的饱和溶液 pH 值过高，使普鲁卡因本身带有的酯键容易水解而失效。磷酸盐和柠檬酸盐的稳定性突出，但水溶性较差。相比之下，盐酸盐和甲磺酸盐溶解度最好，也相对稳定。总体来说，成盐以后化合物的溶解性比普鲁卡因原型药物均有了一定的提高。

化合物 RPR200765 是赛诺菲-安万特公司开发的一种用于治疗类风湿性关节炎的候选药物。该分子为弱碱性化合物，pKa 为 5.3。由于用药拟定的口服剂量为 100~125 mg，而化合物本身在水中的溶解度仅为 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，所以对化合物进行了成盐优化 (表 3)。

表 3 RPR200765 的成盐性质研究



理化参数	甲磺酸盐	樟脑磺酸盐	盐酸盐	氢溴酸盐
分子量	566.61	684.79	524.98	569.43
熔点/ $^{\circ}\text{C}$	214	265 - 267	245 - 248	276 - 277
溶解度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	39	19.95	16.68	3.29
结晶性	稳定单晶	稳定单晶但易聚集	固体粉末	固体粉末
吸湿性	无吸湿性	无吸湿性	吸湿形成多水合物	吸湿形成多水合物

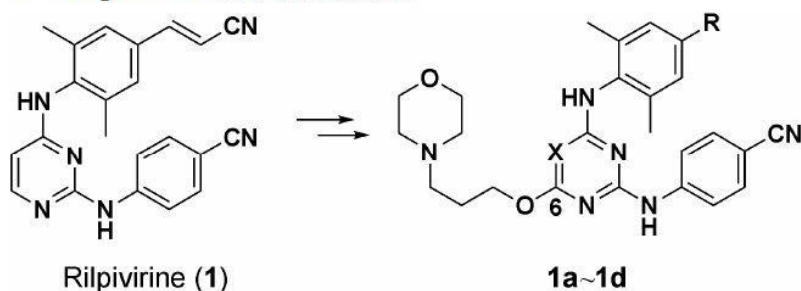
成盐后化合物的水溶性有了极大的提升，甲磺酸盐的溶解度达到了 39  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，提高了近 4 000 倍。盐酸盐和氢溴酸盐结晶性不佳并具有吸湿性；樟脑磺酸形成的晶体易聚集，并且分子量过大也不适合于制剂开发。最终，拥有最好溶解度、无吸湿性和良好结晶性的甲磺酸盐被用于进一步的开发。

### 3.2 引入极性基团

引入极性基团实际上是增加化合物的水合作用，促进溶解的热力学过程。另外，很多极性基团也是可离子化的基团，离子化过程会提供额外的能量，促进溶解。可供选择的极性基团一般为直链或环状的含有 N、O 原子的基团，如直链的胺类、醇类，环状的哌嗪、吗啉、氧杂或氮杂环烷烃、酸碱等可离子化片段等。值得注意的是，这个策略成功的关键在于引入恰当的极性基团而不影响化合物的其他重要指标，如活性和安全性。

吗啉环的应用是该策略的典型代表。Rilpivirine(1) 是一个非核苷类逆转录酶抑制剂, 对野生型 HIV-1 和两种主要的突变体均有较好的活性, 但水溶性仅有  $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在含氮母环的 6 位引入吗啉后, 化合物的溶解度得到了较大的提高。化合物 1d 在野生型和突变体的活性得到了较好的保持, 其溶解度提高到  $14.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 提高了 700 余倍(表 4)。

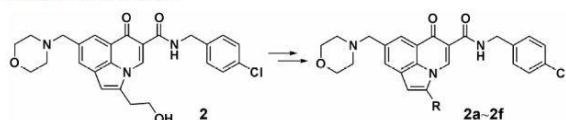
表 4 Rilpivirine 的水溶性改造



化合物	R	X	EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>			溶解度/ μg·mL <sup>-1</sup>
			wt	Y181C	Y181C/ K103N	
<b>1</b>	-	-	0.000 67	0.000 65	0.002	0.02
<b>1a</b>	-CH <sub>3</sub>	CH	0.008 6	0.480	0.038	27.3
<b>1b</b>	-CH <sub>3</sub>	N	0.008 1	0.310	0.031	15.3
<b>1c</b>	-CN	N	0.006 8	1.0	0.042	13.3
<b>1d</b>	(E)-cyanovinyl	N	0.001 2	0.012	0.001 3	14.2

各种链状和环状的醇和胺也是常用的极性基团。当分子含有较大或较多的芳香体系时, 可以引入两个或更多的极性片段调节水溶性。由辉瑞公司开发的 DNA 聚合酶抑制剂 2 活性达到了  $350 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 但水溶性仅为  $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当在吡咯并喹啉的 2 位引入链状和环状的醇和胺时, 水溶性提升, 活性保持。其中, 化合物 2f 的溶解度达到  $168 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 提高了 280 倍。从熔点数据上来看, 经改造的化合物随着水溶性的提高, 熔点有降低的趋势 (表 5)。

表 5 一类 DNA 聚合酶抑制剂的水溶性结构改造



化合物	R	DNA polymerase. IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	溶解度/μg·mL <sup>-1</sup>	mp/°C
<b>2</b>		0.35	0.6	169 - 172
<b>2a</b>		0.29	1.4	205 - 206
<b>2b</b>		0.51	5.8	147 - 149
<b>2c</b>		0.35	16.1	145 - 148
<b>2d</b>		0.45	6.2	153 - 155
<b>2e</b>		0.39	23	-
<b>2f</b>		0.39	168	-

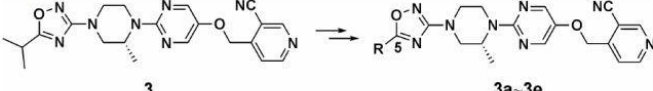
在这个例子中，有另外 3 点值得关注。① 二甲基哌嗪环 (化合物 2f) 对水溶性的贡献远远大于其他取代基 (化合物 2, 2a~2e)。这是由于二甲基哌嗪具有更大的体积，有利于打破分子本身的紧密堆积。







② 哌嗪环和二级胺对水溶性的贡献大于吗啉环和醚类侧链 (2e > 2d; 2c > 2b)，主要的原因是胺类化合物具有较强的碱性，在水合过程中伴随了离子化，有助于化合物的溶解。

③ 化合物 2a 的熔点比化合物 2 异常升高，很有可能的原因是链上多出的羟基使化合物在晶体中互相形成氢键作用，使晶格能升高，造成熔点的上升。

一类 GPR119 拮抗剂是新型的糖尿病治疗药物，其中化合物 3 的 pEC<sub>50</sub> 值达到了 8.1，但溶解度仅有 6 μg·mL<sup>-1</sup>。在噁二唑取代基的 5 位直接引入含氧极性基团，化合物 3a~3e 的水溶性有了较大的提高(溶解度 30~72 μg·mL<sup>-1</sup>)。但化合物 3e 在引入羟基后熔点大幅度提高 (235~236 °C)，导致水溶性下降至 8 μg·mL<sup>-1</sup>，其原因很可能也是由于羟基的引入增加了分子晶体间氢键作用力(表 6)。

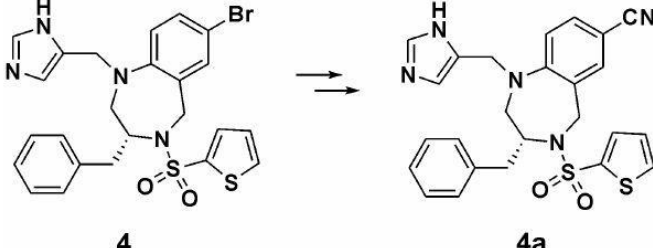
表 6 一类 GPR119 拮抗剂的水溶性改造



化合物	R	pEC <sub>50</sub>	溶解度/μg·mL <sup>-1</sup>	LogP	mp/°C
3		8.1	6	3.3	117 - 118
3a		7.2	59	3.0	128 - 129
3b		7.8	61	2.9	79 - 80
3c		7.8	72	2.8	77 - 78
3d		7.0	30	2.3	162 - 163
3e		6.2	8	2.4	235 - 236

一些小体积的极性基团也会对化合物水溶性的提高带来积极的影响。氰基常被认为是一个可改善类药性质的极性基团。在施贵宝公司开发用于治疗慢性髓细胞样白血病的法尼基转移酶抑制剂中，将化合物 4 的溴原子用氰基替换后，化合物 4a 的溶解性提高了 8 倍，活性也有较大提高(表 7)。

表 7 一类法尼基转移酶抑制剂的水溶性改造



化合物	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	溶解度/ng·mL <sup>-1</sup>
4	60	9.7
4a	1.35	81

磺酰基也可以起到调节药物水溶性的作用。在辉瑞公司开发磷酸二酯酶-5 (PDE-5) 抑制剂西地那非的过程中,磺酰基被成功的引入到先导化合物 **5** 中,使化合物  $\text{LogP}$  值明显下降。最终化合物 **5b** 被成功开发成药物西地那非,溶解度为  $3.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。而为了进一步增加药物的溶解度以便制成口服制剂, **5b** 被制成柠檬酸盐的形式最终上市 (表 8)。

表 8 一类磷酸二酯酶-5 抑制剂的水溶性改造

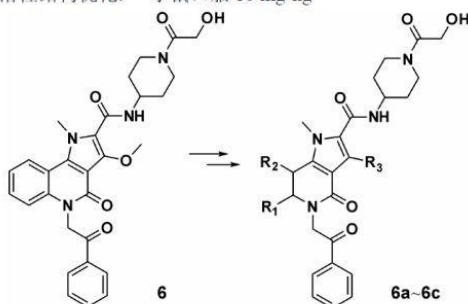
化合物	R	$\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$			$\text{LogP}$
		PDE-1	PDE-3	PDE-5	
<b>5</b>	H	790	$> 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	27	4.0
<b>5a</b>		390	$> 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5.7	1.5
<b>5b</b>		260	65 000	3.6	2.7

### 3.3 降低脂溶性

减少脂溶性基团是增加水溶性的另一种方法。特别是在化合物结构中含有数量较多或体积较大的芳香体系时,减少芳香环可以降低晶体中的分子堆积作用,提高化合物的水溶性。另外,也常见采用饱和环替代芳香环,利用破坏分子平面性的作用降低晶格能。

刺猬信号通路 (hedgehog signaling) 的过度激活与肿瘤疾病密切相关。武田公司报道的吡咯并喹啉类化合物 **6** 具有抑制刺猬信号通路相关基因  $\text{Gli}$  表达的活性,但水溶性仅为  $8.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。若将吡咯并喹啉母核中的苯环去掉,引入相邻的  $\text{R1}$  和  $\text{R2}$  烷基基团,得到的化合物 **6a~6c** 溶解度最高提高了近 10 倍 (**6c**,  $81 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),化合物的血浆暴露量  $\text{AUC}$  从  $12.1 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$  提高到最高  $31.647 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$  (化合物 **6a**) (表 9)。

表 9 一类刺豚信号通路抑制剂的水溶性结构优化。\*小鼠口服 10 mg·kg<sup>-1</sup>

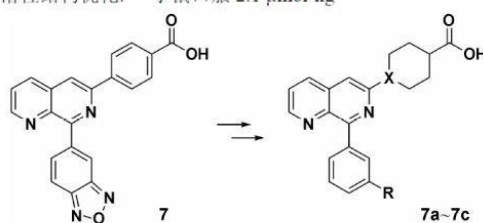


化合物	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	溶解度/μg·mL <sup>-1</sup>	mp/°C	AUC/μg·h·mL <sup>-1</sup> *
6	-	-	-	4.6	8.4	223	12.1
6a	Et	H	-OMe	5.7	63	146	31.647
6b	Et	H	-OEt	6.9	58	204	20.678
6c	Et	H	-OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	4.4	81	169	28.346

化合物 7 是诺华公司开发的一个强效的磷酸二酯酶 (PDE) 抑制剂, 由于化合物芳香共轭区域太大, 溶解度仅有 2.3 μg·mL<sup>-1</sup>, 大鼠体内的生物利用度仅为 8%。研究人员成功地将其中一个苯环替换为环己烷或哌啶环, 同时将另一个噁二唑环去除并引入各种取代基。

结果显示: 经改造的化合物 7a~7c 溶解性大大提高。其中 7a 的溶解度达到了 430 μg·mL<sup>-1</sup>, 良好的溶解性使它的暴露量提高到 112 900 μmol·L<sup>-1</sup>·min, 生物利用度达到了 92% (表 10)。

表 10 一类磷酸二酯酶抑制剂的水溶性结构优化。\*小鼠口服 2.1 μmol·kg<sup>-1</sup>



化合物	X	R	PDE-4A			溶解度/μg·mL <sup>-1</sup>	AUC/μmol·L <sup>-1</sup> ·min*	F/%
			IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	PDE-4B IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	PDE-4D IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>			
7	-	-	602	34	1.5	2.3	523	8
7a	CH	-CN	160	93	41	430	112 900	92
7b	N	-CN	271	168	19	> 4 000	2 768	158
7c	N	-OCF <sub>3</sub>	371	255	30	1 950	3 267	149

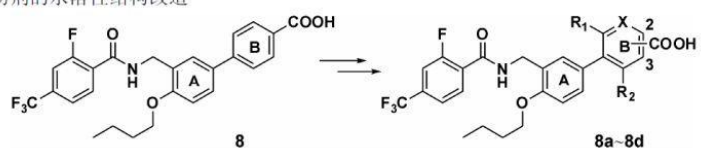
### 3.4 构象优化增加水溶性

一般来说, 平面型分子, 特别是含有共轭芳香环的分子, 由于分子之间紧密堆积和 π-π 作用, 导致较难溶解。这时, 可以通过化学修饰方法干扰分子的平面性, 进而影响晶格能, 增加化合物的溶解性。

第一种干扰化合物平面性的方法是增加共轭体系间的位阻。PPARδ 激动剂可作为胰岛素增敏剂治疗糖尿病。为了改善先导化合物 8 的水溶性, 研究者将相连芳香环的邻位引入不同的 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 基团, 破坏平面性。实验结果表明: 在 R<sub>1</sub> 或 R<sub>2</sub> 其中一个位置引入取代基后, 化合物熔点明显降低, 在 50% 乙醇水溶液中的溶解度显著增加。若计算芳环 A 与 B 两平面之间的二面角, 可以发现引入取代基后, 二面角开始增大。进一步将苯环变为吡啶环时, 由于碱性增强, cLogP 减小, 水溶性进一步提高。同时引入两个甲基以后, 二面角增加到了

78.1°, 使得化合物 8d 的水溶性比 8c 提高了 350 倍, 熔点下降了约 50 °C (表 11)。

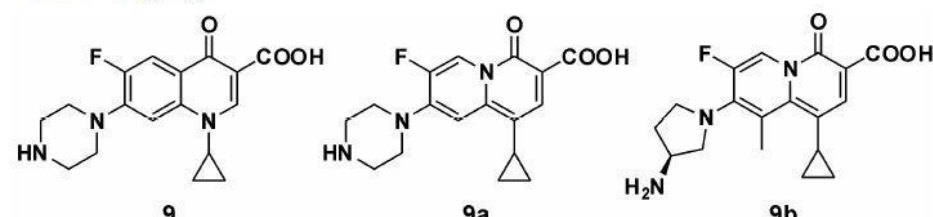
表 11 一类 PPAR $\delta$  激动剂的水溶性结构改造



化合物	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	-COOH	EC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	溶解度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		mp/°C	二面角/ $^\circ$	cLogP
						50% EtOH	PBS			
8	CH	H	H	4	170	375	<1	259-262	43.5	7.1
8a	CH	Me	H	2	11	985	<1	241-243	52.5	7.3
8b	CH	Me	H	3	1.6	9 950	<1	146-149	57.5	7.0
8c	N	H	H	3	220	9 030	7.62	152	37.4	6.0
8d	N	Me	Me	3	76	17 700	2 700	104-106	78.1	6.1

第二种干扰平面性的方法是改变稠环体系的电性。雅培公司在开发喹诺酮类抗菌药物时应用了此策略。将经典的喹诺酮类抗菌药如环丙沙星 (9) 的桥原子由碳原子改为氮原子后, 化合物 9a 和 9b 对螺旋酶介导的 DNA 剪切的抑制活性得到了一定的提高, 水溶性增加了 3 倍。他们认为氮原子的引入在一定程度上可以改变稠环的极性, 也可能扰动了分子的平面性, 进而使分子之间的堆积作用变弱, 水溶性增加(表 12)。

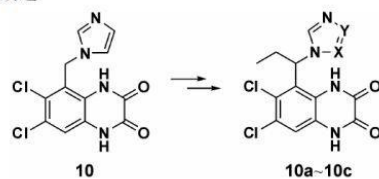
表 12 一类喹诺酮类抗菌药物的水溶性结构改造。\*SD 大鼠口服 5 mg·kg<sup>-1</sup>



化合物	IC <sub>50</sub> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	溶解度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	LogP	F/%*
9	0.24	0.08	-1.2	16
9a	0.15	0.25	-0.89	46
9b	0.03	0.25	0.09	32

第三种干扰化合物平面性的方法是引入平面外取代基, 常见于在两个芳环的苄位引入体积较小的烷基。N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体拮抗剂主要用于治疗中风、帕金森和精神分裂症等疾病。辉瑞公司发现的先导化合物 10 的 IC<sub>50</sub> 达到了 25 nmol·L<sup>-1</sup>, 但水溶性很差。通过在化合物芳环苄位引入乙基, 化合物 10a~10c 的甲磺酸盐的溶解性均提高了上百倍。其中, 化合物 10c 具有最低的熔点和最好的溶解性(>5 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 同时活性也提高到了 90 nmol·L<sup>-1</sup>(表 13)。

表 13 一类 NMDA 拮抗剂的水溶性结构改造



化合物	X	Y	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	EC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	溶解度/μg·mL <sup>-1</sup>	mp/°C
10	-	-	23	ND	-	315 - 316
10a	CH	CH	3.1	90	~ 5 000	> 300
10b	N	CH	0.75	290	~ 1 000	> 300
10c	CH	N	2.6	90	> 5 000	224 - 226

## 4 通过前药修饰提高化合物水溶性

前文提到的策略的共同点是直接修饰化合物的结构，但不适当的化学修饰可能会影响化合物的活性或安全性。而前药策略是不改变原药结构，只靠添加助溶基团来提高水溶性，这是前药策略的一个优势。

据文献统计，在近年来上市的小分子药物中，前药的比例占到 15% 左右。用于改善水溶性的前药设计有很多不同的方法，但其改变化合物溶解热力学的本质是一致的。为了方便归纳，作者将前药修饰按以下结构分类：磷酸化、氨基酸酯、糖基化、羧酸酯化、酰胺化和水溶性聚合物等。

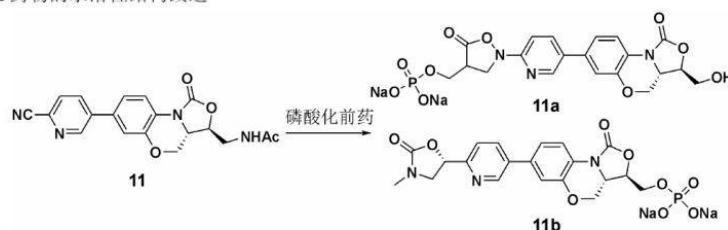
### 4.1 磷酸 (盐) 修饰的前药

磷酸 (盐) 类前药是常用的前药设计方法之一。由于磷酸本身溶解性好，极性大，磷酸 (盐) 类前药的一个主要作用就是用来解决药物的水溶性问题。经典的磷酸前药福沙那韦，不仅提高了原药安瑞那韦的水溶性近 10 倍，还使葛兰素史克公司延长了原药的专利保护期。

中国科学院上海药物研究所的杨玉社研究员课题组对具有抗耐药金葡萄菌 (MRSA) 的化合物 11 尝试了利用磷酸前药修饰来改善其水溶性。

化合物 11a 和 11b 使用了两种不同的修饰方式，均具有与先导化合物相当的抗菌活性，水溶性提高了几万倍，同时对 hERG 通道的抑制活性 IC<sub>50</sub> 达到 40 μmol·L<sup>-1</sup> 以上。化合物 11b 的生物利用度为 52.5% (表 14)。

表 14 一类抗 MRSA 药物的水溶性结构改造



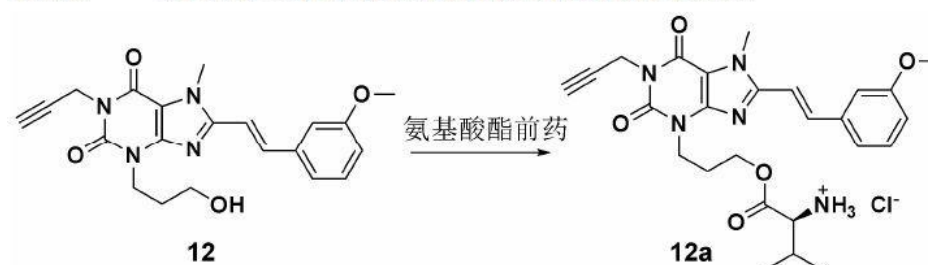
化合物	MIC/mg·mL <sup>-1</sup>	溶解度/mg·mL <sup>-1</sup>	F/%	hERG IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
11	0.5 - 1.0	< 0.01	-	2.78
11a	0.5 - 1.0	534	19.7	> 40
11b	0.5 - 1.0	227	52.5	> 40

### 4.2 氨基酸前药

氨基酸前药由于氨基酸良好的水溶性和代谢性质占有重要的地位。黄嘌呤衍生物 **12** 是一个选择性高的腺苷 A<sub>2A</sub> 受体拮抗剂，可被用来开发成治疗帕金森疾病的药物。该化合物对 A<sub>2A</sub> 受体的结合活性为 21 nmol·L<sup>-1</sup>，但溶解度仅为 0.1 mg·mL<sup>-1</sup>。

将端位羟基制备成缬氨酸酯并制成相应的盐酸盐 **12a** 后，溶解度达到 7.3 mg·mL<sup>-1</sup>(表 15)。

表 15 一类 A<sub>2A</sub> 受体拮抗剂的氨基酸酯前药策略



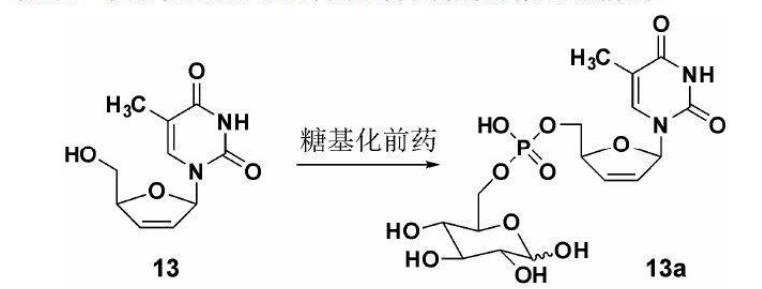
化合物	溶解度/mg·mL <sup>-1</sup>
<b>12</b>	0.1
<b>12a</b>	7.3

傅晓钟等合成了灯盏乙素昔元的 4'-L-氨基酸前药衍生物，其缬氨酸前药的水溶性最高达到灯盏乙素的 280 倍。以上两个利用缬氨酸制备前药的例子说明了缬氨酸的独特优势，它既具有很好的水溶性，成酯后又具有适中的水解性。

### 4.3 糖基化前药

一些大极性的片段也可用于前药的构建，比如糖类。其中多以葡萄糖基化或葡萄糖醛酸基化为主。核苷类 HIV-1 逆转录酶抑制剂 stavudine(**13**) 的溶解度为 5.4 mg·mL<sup>-1</sup>。其糖基化前药 **13a** 的溶解度增加到了 16.7 mg·mL<sup>-1</sup>，提高了大约 3 倍 (表 16)。

表 16 核苷类 HIV-1 逆转录酶抑制剂的糖基化前药



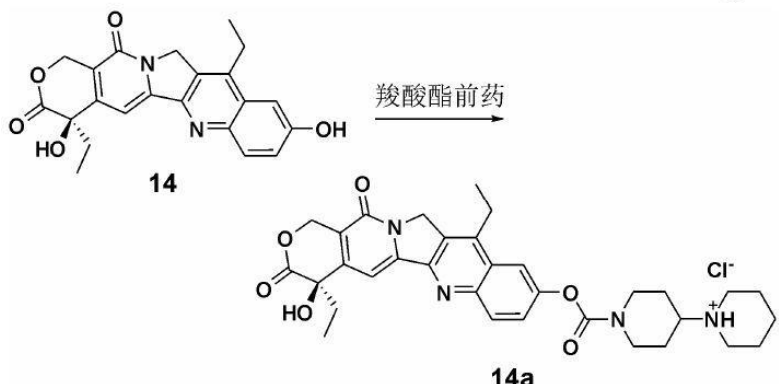
化合物	Anti-HIV-1 EC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	Anti-HIV-1 EC <sub>90</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	溶解度 /mg·mL <sup>-1</sup>
<b>13</b>	0.073	0.37	5.4
<b>13a</b>	0.34	2.0	16.7

13a 也具有一定的抗病毒活性, 在体内水解后, 可以更进一步发挥药效。另外, 分子量较大的难溶化合物紫杉醇 (taxol) 也有采用葡萄糖基化增加水溶性的例子。紫杉醇通过不同的方式连接葡萄糖基或葡萄糖醛酸基, 可使水溶性提升 100~300 倍。

#### 4.4 羧酸酯修饰的前药

羧酸酯类前药是常用的前药设计方法之一。羧酸酯制备方便, 体内水解容易, 可以方便地引入水溶性基团。伊立替康 (14a) 的水溶性为  $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 相比 10-羟基喜树碱 (14) 本身(水溶性为  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 提高了上万倍。从药代力学参数看, 药物的达峰浓度和暴露量分别提高了 30~40 倍以上(表 17)。

表 17 10-羟基喜树碱的水溶性结构改造。\* 人注射  $240 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$

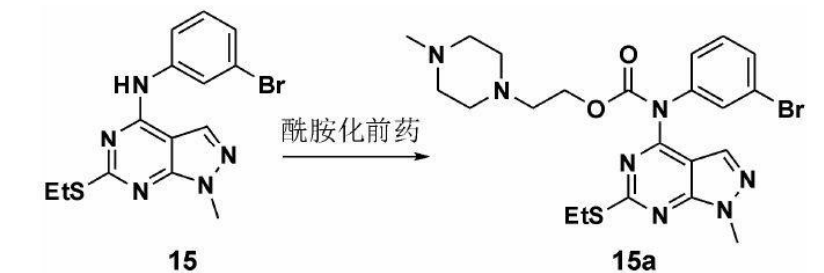


化合物	溶解度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	AUC/ $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ *	$C_{\text{max}}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
14	0.002	40	0.08
14a	20	1 347	3.8

#### 4.5 酰胺修饰的前药

化合物 15 是一个 Src/Abl 双重抑制剂, 在 Src 和 Abl 两种酶水平均具有纳摩尔的活性, 但细胞活性并不高, 究其原因很可能水溶性较差 (仅为  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。对 15 进行酰化的前药修饰后, 化合物 15a 的溶解度提高了 600 倍, 而相应的细胞水平活性也有了显著的改善(表 18)。

表 18 一类 Src/Abl 双重抑制剂的水溶性结构改造

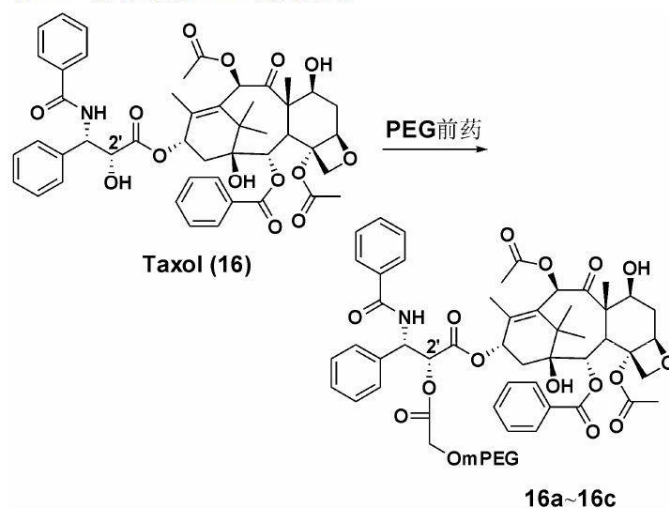


化合物	$K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$		$\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$		溶解度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
	c-Src	c-Abl	32D-p210	32D-T315I	
15	0.02	1.07	6.2	5.8	0.01
15a	-	-	2.8	2.6	6.47

## 4.6 水溶性聚合物前药

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 常被用作水溶性聚合物载体参与前药设计。紫杉醇 (16, taxol) 本身的溶解度仅有  $0.03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 在它的 2' 位引入不同分子量的聚乙二醇片段后得到化合物 16a~16c, 水溶性均有了上万倍的提升 (表 19)。

表 19 紫杉醇的 PEG 前药策略



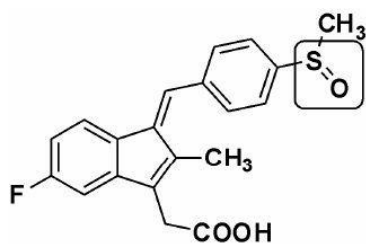
化合物	mPEG 分子量	溶解度 / $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	
			P388/O	L1210/O
16	—	0.03	6	6
16a	5 000	660	15	17
16b	20 000	200	17	14
16c	40 000	125	10	16

另外, 还有利用水溶性聚合物多聚谷氨酸 (poly- $\alpha$ -Lglutamic acid, PG) 对喜树碱进行的前药研究。

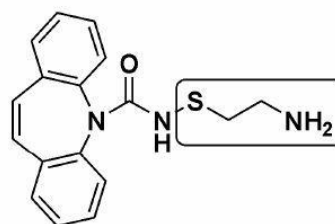
## 4.5 其他可改善水溶性的前药策略

除了以上常见的修饰以外, 还有其他的前药策略用于改善水溶性, 这些修饰的共同特点都是增加原有化合物的极性。借助氧化-还原酶系构造的亚砷前药舒林酸 (17) 体现了一类特殊的策略。其原药硫化舒林酸是非甾体抗炎药, 水溶性仅为  $0.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将硫醚基团替换为极性更大的亚砷基团后, 前药 17 的水溶性提高了 20 倍。17 在体内还原酶系的催化下发生还原反应成为原药, 从而发挥药效。

另一个特殊的例子是前药半胱胺卡马西平。卡马西平是一个强效的镇痛和抗癫痫药物, 但溶解度仅有  $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将半胱胺引入分子中制成前药 18 (溶解度大于  $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 可利用与人体内的谷胱甘肽 (GSH) 的作用脱去半胱胺基释放原药 (图 1)。



舒林酸 (亚砷前药, 17)



半胱氨基卡马西平 (18)

图 1 舒林酸的亚砷形式前药策略和卡马西平的半胱氨化前药策略

5

### 总结与展望

水溶性在药物开发过程中的重要性无需多言,通过化学修饰手段改善水溶性的成效也显而易见。化学修饰的具体方法是多种多样的,但从理论策略层面均可归类于改善晶格能和水合能这两个方面,并可以从化合物的熔点、logP、构象等性质的变化趋势做出预测。充分理解和掌握这些策略并对症下药,将对指导先导化合物的优化起到事半功倍的效果。

## 先导化合物结构优化策略(四)-改善化合物的 血脑屏障通透性

### 摘要

血脑屏障是人体的天然屏障,它在保护中枢神经系统免受外来物质干扰和伤害的同时,也阻碍了许多潜在的中枢神经系统药物进入中枢,增加了中枢神经系统药物研发的难度。

本文简述了化合物透过血脑屏障研究的最新进展,从药物化学角度综述了几种通过结构优化改善化合物透过血脑屏障的方法,旨在为中枢神经系统药物的优化提供思路。

常用的几种改善化合物血脑屏障通透性的策略包括:增加脂溶性、减少氢键供体、简化分子、增加刚性、降低极性表面积、剔除羧基、前药策略、修饰为主动转运体底物及规避易被 P-糖蛋白识别的结构等。

### 正文

随着社会老龄化和竞争压力的增大,中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 疾病已成为继心血管疾病之后的第二大疾病。然而,中枢神经系统药物研发的成功率却很低,与心血管疾病药物 20%的成功率相比,中枢药物的成功率只有 8%。

影响中枢药物研发成功的一个主要因素就是血脑屏障(blood-brain barrier, BBB), 几乎阻挡了 100% 的大分子药物及大于 98% 的小分子药物。因此, 除了需要具有较好的活性和代谢性质及较低的毒性等性质之外, 中枢神经系统药物还需要克服血脑屏障, 在中枢系统达到足够的暴露量, 这是中枢药物研发成功的关键前提。

本文基于化合物透过血脑屏障的最新研究概况, 综述了几种通过结构优化改善化合物透过血脑屏障的策略。这些策略包括增加脂溶性、减少氢键供体、简化分子、增加刚性、降低极性表面积、剔除羧基、前药策略、修饰为主动转运体底物及规避易被 P-糖蛋白识别的结构等, 期望这些改造策略能够为中枢神经系统药物的研发提供理论指导和实践经验。

## 1 血脑屏障及其转运机制

血脑屏障由脑毛细血管内皮及其细胞间的紧密连接、基底膜、周细胞以及星形胶质细胞等围成的神经胶质膜构成, 其中内皮细胞是血脑屏障的主要结构, 中枢药物必须透过内皮细胞才能进入脑细胞。除内皮细胞与星形胶质细胞等形成的物理屏障外, 血脑屏障还包括各种酶与转运体形成的生化屏障。

血脑屏障通透机制包括被动扩散、主动转运和外排转运等。被动扩散是小分子药物进入大脑的主要方式。在正常情况下, 脑毛细血管内皮细胞的有效孔径为 1.4~1.8 nm, 直径小于 1.8 nm 的小分子可由被动扩散透过血脑屏障。主动转运是一类需要能量和载体蛋白参与的逆浓度差、逆电化学梯度的特殊转运方式。而外排转运系统主要通过 P-糖蛋白 (Pglycoprotein, P-gp) 主动将毒性代谢物和异源性物质排出, 以维持大脑正常的生理功能(图 1)。

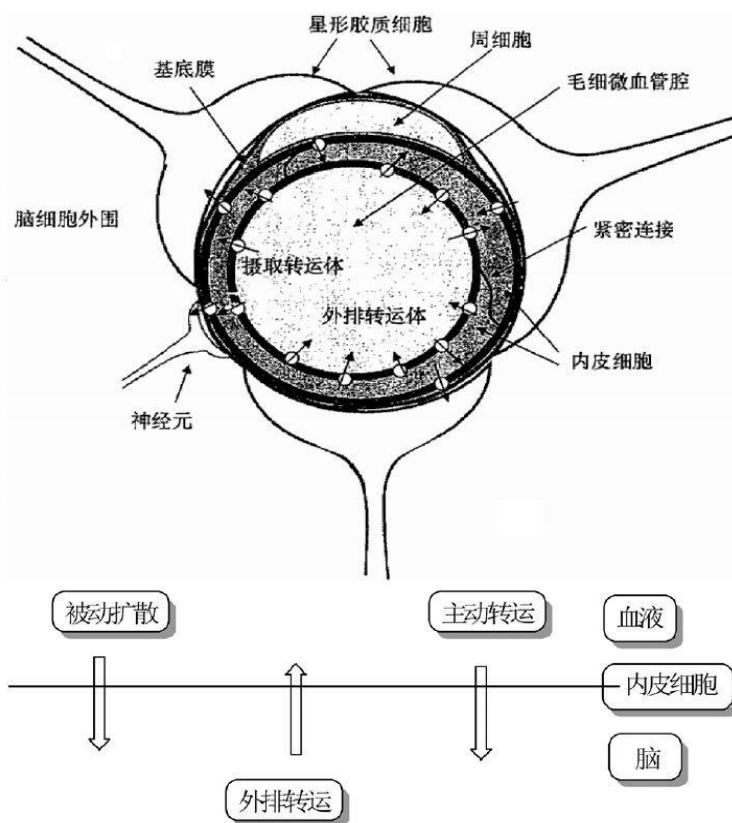


图 1 脑毛细血管截面示意图及血脑屏障的通透机制<sup>[7]</sup>

## 2 评价血脑屏障的常用参数

### 2.1 评价血脑屏障的理化参数

与非中枢神经系统药物相比,氢键、脂溶性和分子大小等理化性质较大地影响化合物的血脑屏障通透能力,如 ① 中枢神经系统药物脂溶性一般较高,其  $\text{LogP}$  在 2~5 之间; ② 分子质量通常小于 450Da; ③ 多为中性或弱碱性分子,  $\text{pK}_a$  在 7.5~10.5 之间; ④ 较少的氢键供体数目 (HBD), 一般小于 3; ⑤ 较低的氢键结合能力,  $\Delta\text{LogP}$  通常小于 2; ⑥ 较低的分子极性表面积 (PSA), 一般低于  $90 \text{ \AA}^2$ ; ⑦ 多为球形分子, 增加支链会降低透过血脑屏障的能力; ⑧ 分子柔性较低, 可旋转键数目少(表 1)。

表 1 中枢药物的常用理化性质参数

主要参数	建议范围	评价
$\text{LogP}$	2~5 <sup>[6]</sup>	亲脂性分子更容易进入 CNS
MW	$\leq 450$ <sup>[8]</sup>	CNS 药物的分子通常较小
PSA	$< 90 \text{ \AA}^2$ <sup>[8]</sup>	CNS 药物的 PSA 较小
$\text{pK}_a$	7.5~10.5 <sup>[5]</sup>	中性及弱碱性化合物易进入 CNS
HBD	$< 3$ <sup>[8]</sup>	CNS 药物的 HBD 数目较少
$\Delta\text{LogP}$	$< 2$ <sup>[7]</sup>	CNS 药物的 $\Delta\text{LogP}$ 更低
分子柔性	$< 7$ 个环外的支链; 0~8 个可旋转键 <sup>[8]</sup>	CNS 药物的柔性更小

### 2.2 评价血脑屏障的实验参数

常用评价血脑屏障透过性质的实验参数包括:脑与血浆中全药浓度的比值 (B/P)、表观渗透系数 ( $P_{\text{app}}$ )、外排率 (ER)、游离药物在脑与血浆中比值 ( $K_{\text{p,uu}}$ )、游离药物在血浆和脑及脑脊液中的浓度 ( $C_{\text{p,u}}$ 、 $C_{\text{b,u}}$ 、 $C_{\text{CSF}}$ ) 等(表 2)。

表 2 常用衡量血脑屏障通透性的实验参数。CNS<sup>+</sup>表示可进入中枢的化合物, CNS<sup>-</sup>表示不可进入中枢的化合物

主要参数	建议范围	评价
B/P	CNS <sup>+</sup> : B/P $> 0.3$ CNS <sup>-</sup> : B/P $< 0.1$ <sup>[9]</sup>	反映化合物的分布情况
$P_{\text{app}}$	CNS <sup>+</sup> : $P_{\text{app}} > 15 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ CNS <sup>-</sup> : $P_{\text{app}} < 15 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[8]</sup>	衡量化合物过脑速率
ER	CNS <sup>+</sup> : ER $< 2.5$ CNS <sup>-</sup> : ER $> 2.5$ <sup>[8]</sup>	反映化合物被运送出大脑的能力
$K_{\text{p,uu}}$	—	反映游离化合物的分布情况
$C_{\text{p,u}}$ , $C_{\text{b,u}}$ , $C_{\text{CSF}}$	—	评价药物在各组织中的游离浓度

### 3 血脑屏障常用参数的测定方法

血脑屏障常用参数的测定方法主要包括计算机预测、体外模型测试和体内模型测试等。计算机模拟具有高效快捷的优点，但是其准确性相对较差；体外测试高效快速，但与血脑屏障性质也存在一定的差异，准确度相对较高；体内测试可以提供准确的数据，但操作繁琐、花费较高，无法实现高通量。

#### 3.1 计算机模拟

计算机模型的测定方法具有廉价、高效及快捷的优点，常用于化合物库的筛选，极大地节约了药物研发成本；但因体内数据有限，计算机模型的构建会受到影响，使得不能准确预测化合物真实参数。

目前，已经有多种商业软件可以用于血脑屏障常用参数的预测，如 ADMETUS、Chemoffice、Physico-chemical property predictors、PhysChem 等软件可以预测 LogP；Chemoffice 等软件可以计算化合物的分子量和分子极性表面积；ADMETUS、Physico-chemical property predictors、PhysChem 等软件可以预测化合物的 pKa；ADMET predictor、PreADME、QikProp 等软件可预测化合物 B/P 和表观渗透系数；CSBBB 软件可预测化合物的 Log BB 值(表 3)。

表 3 部分用于预测化合物理化性质参数及血脑屏障通透性的商业软件

软件名称	软件开发公司	网址
ADMETUS	中国科学院上海药物研究所药物发现与设计中心	<a href="http://202.127.19.75:8080/ADMET_Predictor/Desktop.jsp">http://202.127.19.75:8080/ADMET_Predictor/Desktop.jsp</a>
Chemoffice	PerkinElmer	<a href="http://www.cambridgesoft.com">www.cambridgesoft.com</a>
Physico-chemical property predictors	ChemAxon	<a href="http://www.chemaxon.com">www.chemaxon.com</a>
PhysChem	ACD/Labs	<a href="http://www.acdlabs.com">www.acdlabs.com</a>
ADMET predictor	Simulations Plus	<a href="http://www.simulationsplus.com">www.simulationsplus.com</a>
Volsurf+	Molecular Discovery	<a href="http://www.moldiscovery.com">www.moldiscovery.com</a>
QikProp	Schrodinger	<a href="http://www.schrodinger.com">www.schrodinger.com</a>
CSBBB	ChemSilico	<a href="http://www.chemsilico.com">www.chemsilico.com</a>
PreADME	Bioinformatics and Molecular Design Research Center	<a href="http://www.bmdrc.org">www.bmdrc.org</a>

#### 3.2 体外测定模型

体外血脑屏障通透性的测定模型虽然不能精确反映转运蛋白和酶等因素的影响，但其快速且花费较低，对药物研发早期的决策具有重要的指导意义。

体外测定的常用细胞模型有犬肾传代 (MDCK)细胞、人结肠癌-2 (Caco-2) 细胞、膀胱癌 ECV304/C6 细胞模型，以及磷脂膜色谱法 (IAM) 和平行人工膜渗透性测试 (PAMPA) 等非细胞技术(表 4)。

表 4 体外血脑屏障通透性测定模型

测定模型	优点	缺点
MDCK 细胞	重现性好; 被动运输和 排测定更接近体内情况; 检测 P-糖蛋白外排最灵敏	外排转运体表达水 平较低, 需进行细胞 培养, 消耗人力多
Caco-2 细胞	适合定向进行 P-糖蛋白外 排测试	与 BBB 差异较大
ECV304/C6 细胞	具有 BBB 的主要特征	无 P-糖蛋白的表达
IAM	与 Caco-2 等生物膜实验相 关性良好	不能模拟双分子膜 的扩散
PAMPA	适用于被动扩散模型, 与 Caco-2 模型和体内研究相 关性好; 可以实现高通量 筛选, 价格较低	缺少 BBB 的转运体; 只能测量血脑屏障 的速率, 不能预测体 内的 B/P

另外, 还可以使用离体的脑血管和内皮细胞进行测定, 如小牛脑毛细血管内皮细胞 (BMEC) 模型等。这些方法较体内测定模型省时省力, 且保留了酶和转运体等特征; 但在体外培养的过程中, 转运体表达会逐渐降低, 且实验条件缺乏整体的神经-体液调节机制。

### 3.3 体内测定模型

体内测定模型可以提供准确的数据, 但是也存在筛选方法相对昂贵、操作繁琐且不能实现高通量筛选等缺点。常用的体内测定模型有体内药动学测试、脑摄取指数、原位脑灌注、静脉注射法、定量自动射线照相法、脑微透析法、脑脊液测定法、正电子成像法和核磁共振成像法等(表 5)。

表 5 体内血脑屏障通透性测定模型

名称	优点	缺点
体内药动力学测试 (B/P、 $K_p$ 、log BB)	数据可靠	筛选效率低, 费用高, 消耗资源多
脑摄取指数法	快速, 适合于易代谢的药物	药物在脑部暴露时间短, 注射的药物不能全部进入脑部
原位脑灌注	实验更加准确, 避免快速代谢	需同位素标记及对照化合物, 筛选效率较低
静脉注射技术	灵敏度高、实验难度小	需要放射性同位素标记及对照物, 增加实验难度
定量自动射线照相法	操作简单、花费较少	不能较好地地区分药物、代谢物及与蛋白结合的药物
脑微透析法	数据可靠、筛选高效、费用低	该法要求分析方法的灵敏度较高, 缺乏转运体, 受非特异性结合影响
脑脊液测定法 <sup>[11]</sup>	取样难度低, 脑脊液周转迅速	易受外排等因素的影响
正电子成像	非侵入型、快速、重现性高、灵敏度高	药物、代谢物及结合蛋白的药物不易区分, 示踪物的准备较为复杂, 昂贵
核磁共振成像	非侵入型、灵敏度高	昂贵, 不宜作日常筛选方法

## 4 通过结构优化改善血脑屏障透过性质

综合考虑中枢药物的特征及药物进出血脑屏障的特点, 通过结构优化可以有效地改善化合物透过血脑屏障的能力。常用的优化策略包括: 针对被动扩散的改造——增加脂溶性、减少氢键供体、简化分子、增加刚性、降低极性表面积、剔除羧基以及前药策略等; 针对主动运输的改造——将化合物修饰为主动转运体的底物; 针对外排率较高的化合物——规避易被外排转运体识别的基团。

### 4.1 针对被动扩散的改造策略

#### 4.1.1 增加脂溶性

研究表明, 脂溶性高的化合物更易透过血脑屏障, 且能较快地达到分布平衡。因此, 在改善血脑屏障透过性质时, 可以通过引入脂溶性基团 (如氟、氯)、替换大极性基团等策略增加化合物的脂溶性。

如化合物 4 (AZD3839) 是 AstraZeneca 公司报道的用于阿尔兹海默症治疗的 BACE1 抑制剂。研发过程中, 通过引入氟、甲基、二氟甲基等脂溶性基团增加化合物血脑屏障透过能力。在吡啶环引入氟后, 嘧啶环 2、6 位分别引入一个甲基得到化合物 2, 其 eLogD 由 0.7 增加到 1.4, 同时, Papp 由  $3.4 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  提升至  $1.9 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 当嘧啶环 2 位引入甲氧基取代后 (3), 化合物 eLogD 增加到 2.0, 同时 Papp 提升至  $2.1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 但该化

合物甲氧基的存在使得其代谢稳定性较差；当嘧啶环 2 位引入二氟甲基后 (4)，其  $e\text{Log}D$  由 0.7 提高至 2.0，同时  $P_{\text{app}}$  由  $3.4 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  提升至  $3.4 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ，大大增加了化合物的透膜性质。

AstraZeneca 公司通过对化合物活性、Caco-2 细胞透膜性质、代谢稳定性、hERG 毒性等性质综合衡量后，选择了化合物 4 作为临床候选药物，目前该化合物处于临床 I 期研究中 (图 2)。

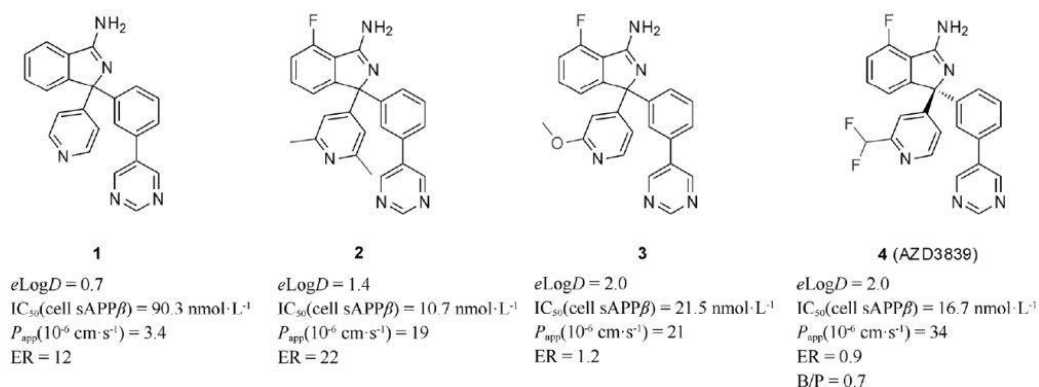


图 2 增加脂溶性提高 BACE1 抑制剂的表现渗透系数

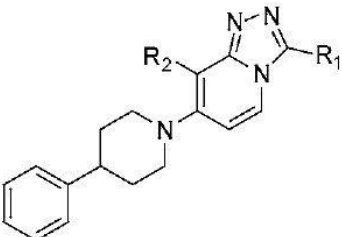
化合物 (S)-8 (RG1678) 是 Roche 公司报道的第一个选择性 GlyT1 抑制剂，用于精神分裂症的治疗。向化合物 5 引入氟后，化合物 6 的脂溶性及脑通透性均有一定的提高，其  $c\text{Log}P$  由 3.92 提高至 4.13, B/P 由 1.10 提升至 1.15。引入极性的吡啶环时，化合物 7 的脂溶性下降， $c\text{Log}P$  由 3.92 降为 2.82, B/P 由 1.10 降低至 0.2；然而，再次引入脂溶性的氟原子，获得了活性和脑通透性质均更好的化合物 8。目前，化合物 (S)-8 已经进入临床 II 期研究，用于精神分裂症的治疗 (表 6)。

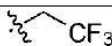
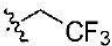
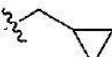
表 6 脂溶性对 GlyT1 抑制剂 B/P 的影响

编号	结构	GlyT1 $\text{EC}_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$c\text{Log}P$	B/P
5		0.03	3.92	1.10
6		0.013	4.13	1.15
7		0.037	2.82	0.20
(S)-8 (RG1678)		0.03	3.00	0.50

化合物 11 (JNJ-42153605) 是 Janssen 公司研发的 mGlu2 受体正向变构调节剂, 是潜在的抗焦虑和治疗精神疾病的治疗药物。通过改变其骨架取代基 R1 和 R2, 较大的改善了化合物的脂溶性。不同的取代基对给药后的血和脑内药物浓度有较为明显的影响。如当 R1 为-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> 时, 在 R2 位引入脂溶性更强的 Cl 原子, 其脂溶性有了较大的提高 (化合物 9 和 10)。通过引入环丙甲基和 CF<sub>3</sub> 取代基, 进一步改善了化合物的脂溶性, 获得了临床候选化合物 11 (表 7)。

表 7 脂溶性对 mGlu2 正向变构调节剂 B/P 的影响



编号	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	mGlu2 EC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	cLogP	B/P
9		CN	696	3.3	0.2
10		Cl	55	4.6	1.8
11 (JNJ-42153605)		CF <sub>3</sub>	17	5.3	1.3

化合物 12 是喹啉类 5-HT<sub>3</sub> 激动剂, 可调节中枢的乙酰胆碱释放, 用于神经变性和失调疾病的治疗。然而大鼠静脉给药后, 化合物 12 血脑屏障通透性较差, 其 B/P 值仅为 0.1。通过引入极性较小的羟甲基后, 化合物 13 的脂溶性大大提高, cLogP 由 0.19 升高至 2.3, B/P 达到 20.3。化合物 12 具有羧基, 在生理条件下, 易在体内以离子状态存在, 难以透过血脑屏障, 通过羟甲基替代羧基, 不仅使化合物的脂溶性有了较大的提高, 同时避免了羧酸基团, 极大地改善了化合物的血脑屏障通透性 (图 3)。

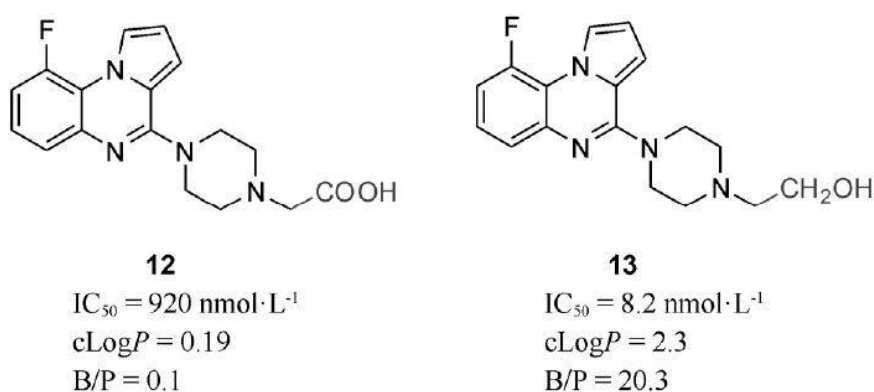


图 3 增加脂溶性对 5-HT<sub>3</sub> 激动剂 B/P 的影响

增加化合物的脂溶性可以有效的改善血脑屏障通透性, 然而也可能对血脑屏障通透性带来负面效应。按照“药动学规则”, 增加化合物的脂溶性往往会增加其在脑中的非特异性结合, 这将会降低脑细胞外液中游离化合物的浓度, 从而降低化

化合物的活性。因此，进行脂溶性的结构改造时要注意平衡各项参数，既要优化化合物的通透性，又要减少与脑蛋白的非特异性结合，提高脑内的药物浓度。

#### 4.1.2 减少氢键供体

中枢药物普遍具有更少的氢键供体数目，且许多具有裸露 NH 的化合物具有较为明显的 P-糖蛋白外排，故减少化合物氢键供体是中枢药物优化的重要改造策略之一。常用减少氢键供体的方法包括：封闭氢键供体、生物电子等排替换氢键供体及形成分子内氢键等。

化合物 14 是 GlaxoSmithKline 公司报道的 CB<sub>2</sub> 激动剂先导化合物，在急性疼痛模型中有较好活性 ( $EC_{50} = 11 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，但该化合物结构中的吡咯环含有裸露的 NH，为 P-糖蛋白底物，存在较为显著的外排 ( $ER = 74$ )，所以在大鼠脑中的通透性较差，B/P 小于 0.05。直接对吡咯环裸露的 NH 进行 N-甲基化得到的化合物活性有了较为明显的降低 ( $EC_{50} = 654 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。通过对化合物骨架的修饰，引入了含有 5-氮杂吡咯环的异构体，并通过 N-甲基化封闭吡咯的氢键供体，得到衍生物 15，其外排率降低为 2.9，B/P 升高至 1.04，同时保持了较好的 CB<sub>2</sub> 激动活性 ( $EC_{50} = 8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (图 4)。

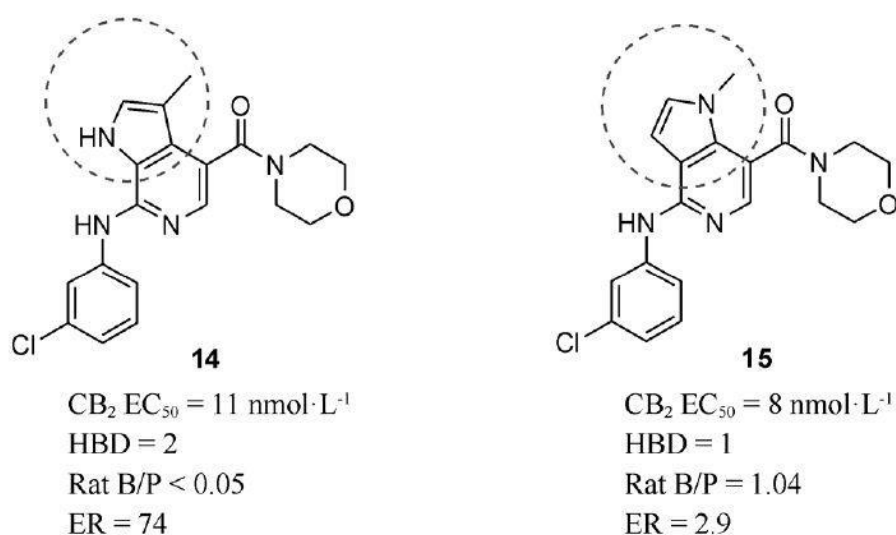


图 4 减少氢键供体对 CB<sub>2</sub> 激动剂 B/P 的影响

化合物 16 是 Lundbeck 公司与中国科学院上海药物研究所通过高通量筛选获得的 GPR139 激动剂，该化合物 B/P 仅为 0.03。采用生物电子等排策略，引入亚甲基替换胺基，减少氢键供体数目，同时规避了易被 P-糖蛋白识别的脲结构，得到衍生物 17，其 B/P 值升高到 2.8，是化合物 16 的 93 倍 (图 5)。

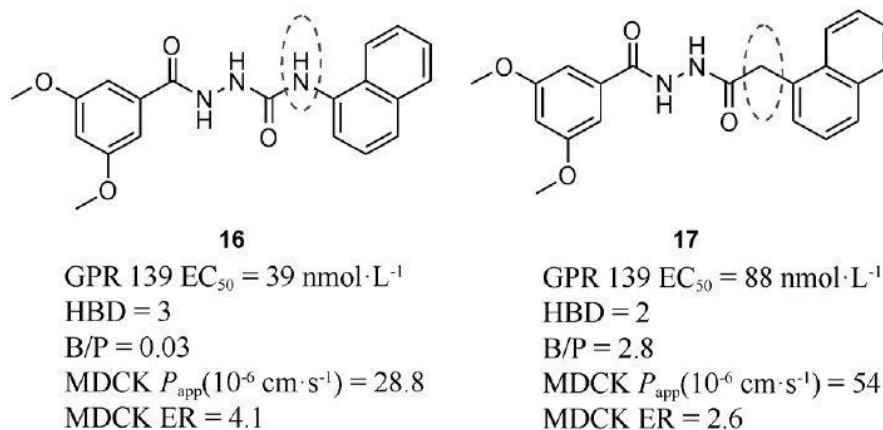


图 5 减少氢键供体对 GPR139 激动剂 B/P 的影响

化合物 18 是 Valerie 等设计的选择性 NK<sub>1</sub> 受体拮抗剂, 可用于镇痛药物的研发。该化合物具有极好的活性和药代动力学性质 ( $IC_{50} = 1.05 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $F = 50\% \sim 60\%$ ,  $t_{1/2} > 6 \text{ h}$ ), 但其血脑屏障通透性较低, B/P 仅为 0.6。化合物 19 通过引入 N, N-二甲氨基与邻近的两个酰胺键的 NH 形成了分子内氢键, 提高了血脑屏障通透性, B/P 达到 6.0, 是 18 的 10 倍, 同时活性得到保持 ( $IC_{50} = 0.46 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 图 6)。

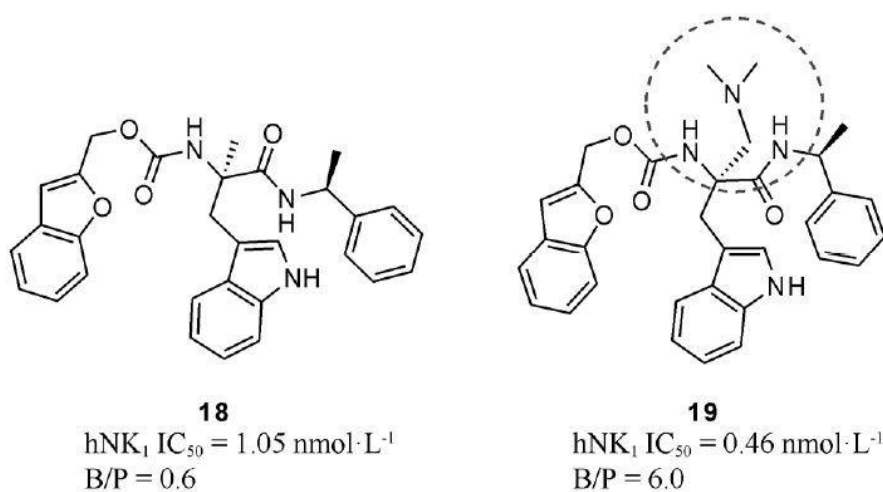


图 6 分子内氢键对 NK<sub>1</sub> 受体拮抗剂 B/P 的影响

#### 4.1.3 简化结构

对化合物结构进行简化, 从而减小体积和降低相对分子质量, 可以有效改善化合物的脑通透性, 增加中枢的药物浓度。mGlu<sub>4</sub> 受体正向变构调节剂是帕金森症的潜在治疗药物, 但是报道的大部分 mGlu<sub>4</sub> 受体正向变构调节剂具有类药性、药代动力学性质或血脑屏障通透性差的不足, 如化合物 20 具有较好的 mGlu<sub>4</sub> 受体正向变构调节活性, 但是其脑通透性较差, B/P 不足 0.1; 而结构简化的化合物 21 和 22 的脑通透性则大大提高, 尤其是化合物 22 的 B/P 值可达到 4.1, 有效地改善了化合物的脑通透性。

Jones 等通过进一步的结构修饰, 最终获得活性和脑通透性均适中的化合物 **23** (ML182), 用作 mGlu4 受体正向变构调节剂工具分子, 在氟哌啶醇介导的肌肉僵直模型中表现出较好的疗效 (图 7)。

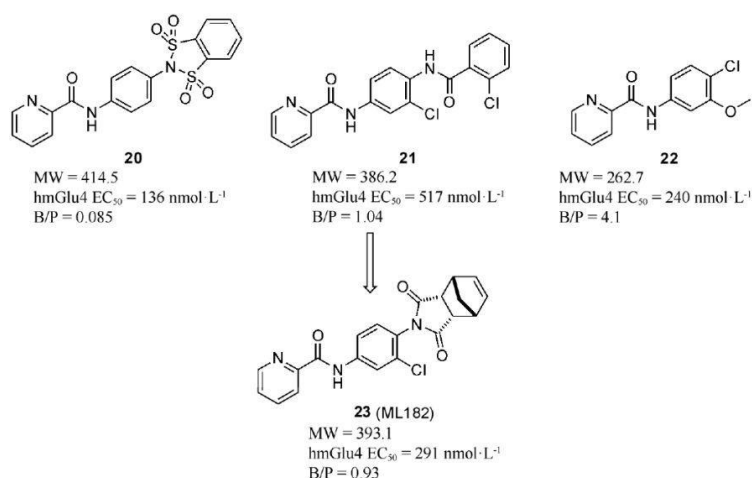
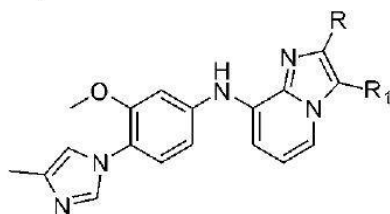


图 7 相对分子质量对 mGlu4 正向变构调节剂 B/P 的影响

化合物 **24**~**27** 是 Johnson & Johnson 公司报道的  $\gamma$ -分泌酶调控剂。在对其进行 SAR 研究时, 发现化合物脑通透性呈现较为明显的随分子减小而增大的趋势。如将 R1 中的三氟甲基苯基简化为苯基时, 化合物 B/P 值提升至 0.34; 去掉 R 取代基, 化合物 B/P 值进一步提高; 将 R1 位的苯基替换为甲基时, 化合物的 B/P 值达到 0.88, 获得了更好的脑通透性 (表 8)。

表 8 分子大小对  $\gamma$ -分泌酶调节剂 B/P 的影响



编号	R	R <sub>1</sub>	A $\beta$ <sub>42</sub> IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	MW	B/P
<b>24</b>	Me	2-CF <sub>3</sub> -Ph	26	477.18	0.24
<b>25</b>	Me	Ph	78	409.19	0.34
<b>26</b>	H	Ph	339	395.17	0.66
<b>27</b>	H	Me	442	333.16	0.88

化合物 **13** 是一个 5-HT<sub>3</sub> 激动剂, 羟甲基被萘环置换后, 化合物 **28** 的脂溶性得到较大的提高 (cLogP 由 2.3 提高到 6.0), 但是其 B/P 值却下降到 2.8, 这可能是由于萘基的引入增大了分子体积, 使透过血脑屏障的能力下降。同样, 在化合物 **29** 和 **30** 的改造中, 也发现了类似的规律。因此, 在改善化合物血脑屏障通透性时, 需综合考虑分子大小等因素, 不能盲目引入脂溶性大基团来调节脑通透性(图 8)。

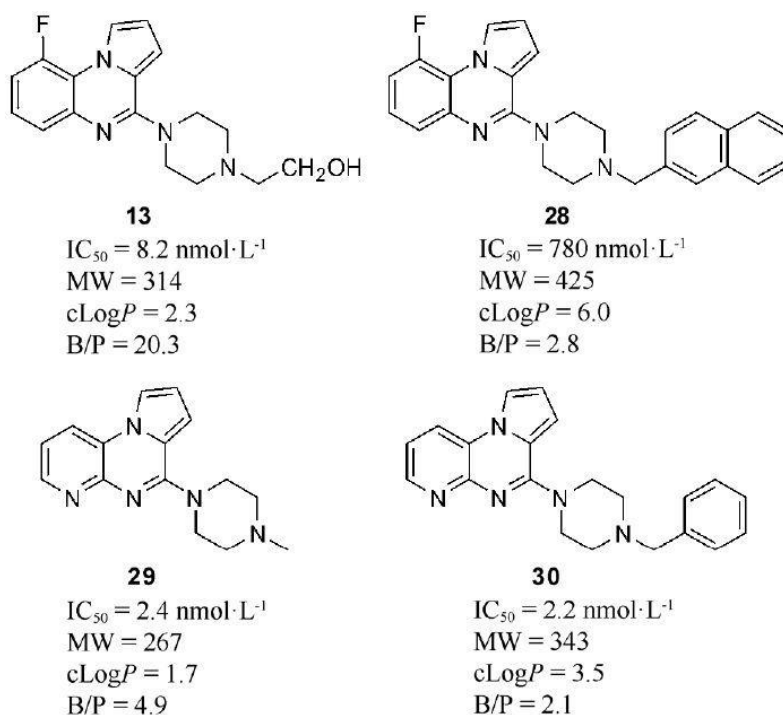


图 8 分子大小对 5-HT<sub>3</sub> 激动剂 B/P 的影响

#### 4.1.4 增加刚性

中枢神经系统药物普遍含有更低的分子柔性，因此通过成环等手段增加分子刚性也是改善化合物血脑屏障通透性的策略之一。

化合物 31 (SB-271046) 是第一个进入临床 I 期的 5-HT<sub>6</sub> 受体选择性拮抗剂，但因其血脑屏障通透性较差 (B/P = 0.05) 被中止研发。GlaxoSmithKline 公司通过对其骨架进行修饰形成并环，增加了分子刚性，成环后化合物 32~34 的 B/P 值均有较为明显的提升，分别达到 3.0、2.6 和 0.7，明显改善了化合物的脑通透性(图 9)。

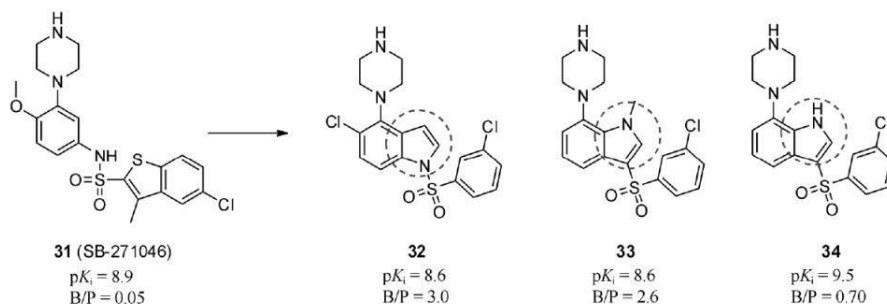


图 9 增加分子刚性对 5-HT<sub>6</sub> 受体选择性拮抗剂 B/P 值的影响

化合物 35 是 Wyeth 公司研发的胍类 BACE1 抑制剂，其脑通透性较低，B/P 仅为 0.04。将酰胍基替换为 2-氨基吡啶，增加了分子刚性，有效地增加了化合物的脑通透性，化合物 36 的 B/P 值升高至 1.7，是化合物 35 的 42 倍 (图 10)。

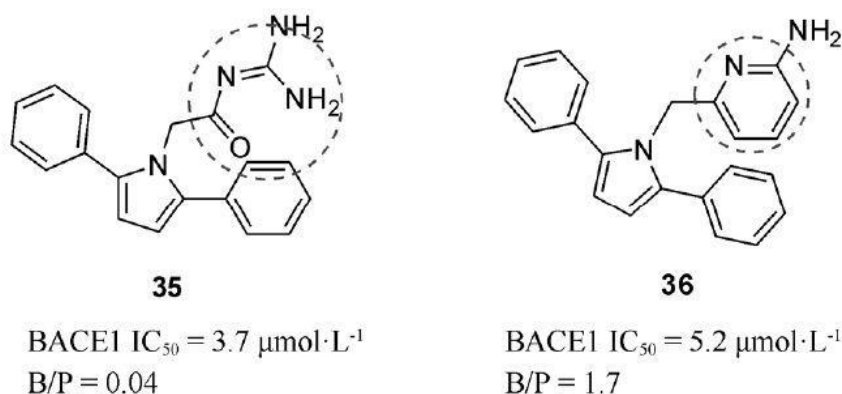


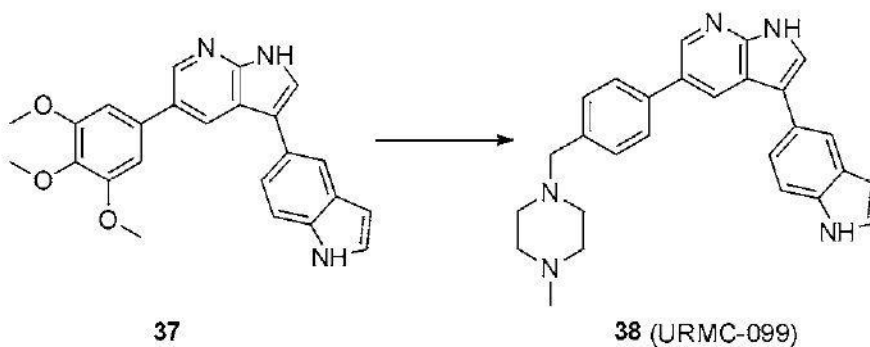
图 10 增加分子刚性对 BACE 抑制剂 B/P 的影响

#### 4.1.5 降低极性表面积

近年来，分子极性表面积(PSA) 参数引起了人们越来越多的关注，中枢药物的分子极性表面积较其他治疗领域药物分子更小。降低化合物的分子极性表面积，可以有效的增加化合物的血脑屏障通透性。

化合物 38 (URMC-099) 是 Biofocus 公司报道的蛋白激酶 3 (MLK3) 抑制剂,可用于帕金森及伴随 HIV-1 的认知失调的治疗。在其研发中，通过降低化合物 37 的分子极性表面积获得化合物 38 (PSA 从 72 Å<sup>2</sup> 降低至 51 Å<sup>2</sup>)，有效地增加了化合物的脑通透性，最大脑浓度 C<sub>max</sub> 由 3 736 μg·kg<sup>-1</sup> 提高至 4 685 μg·kg<sup>-1</sup>，同时 B/P 由 0.99 提高至 1.6 (表 9)。

表 9 分子极性表面积对 MLK3 抑制剂 B/P 的影响



化合物	PSA/Å <sup>2</sup>	MLK3 IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>max</sub> /μg·kg <sup>-1</sup>	B/P
<b>37</b>	72	3	3 736	0.99
<b>38</b> (URMC-099)	51	14	4 685	1.6

#### 4.1.6 剔除羧基

含有羧基的药物在体内 pH 条件下易以离子形式存在，难以透过血脑屏障而发挥药效。因此，在中枢药物设计时，应尽量规避羧酸基团。

如 Bristol-Myers Squibb 公司开发的第一代 γ-分泌酶抑制剂 39，由于羧基的存在，使得脑通透性较差，其 B/P 值仅为 0.2，在临床 I 期试验中被终止。他们在

其基础上剔除了羧酸基团，研发出第二代  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 **40** (BMS-708163)，其 B/P 值获得了较大的突破，由 0.2 提高至 2.4，且活性也获得一定的提升。目前，该化合物已经进行临床 II 期试验，用于阿尔兹海默症的治疗 (图 11)。

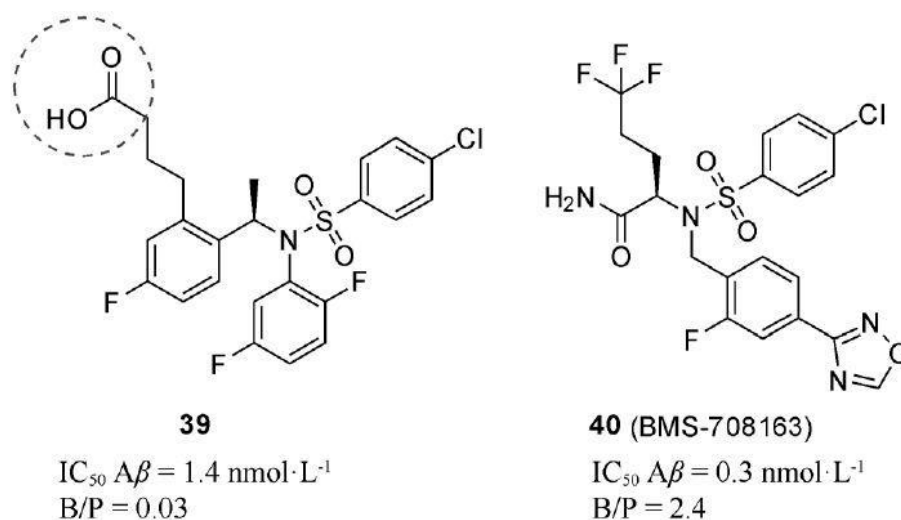


图 11 剔除羧酸基因对  $\gamma$ -分泌酶 B/P 的影响

#### 4.1.7 前药策略

通过对化合物进行前药修饰是中枢药物研发的常用策略之一。前药修饰策略通常包括酯化、酰化、酰胺化和拼合等。经典的前药包括镇痛药吗啡的乙酰化药物海洛因、神经递质左旋多巴的酯化药物左旋多巴甲酯和左旋多巴乙酯、赛奥芬的乙酰化前药乙酰化赛奥芬及酯化前药醋托酚等。

化学递送系统 (chemical delivery system, CDS) 是一种较为独特的前药递送方式 (图 12)。

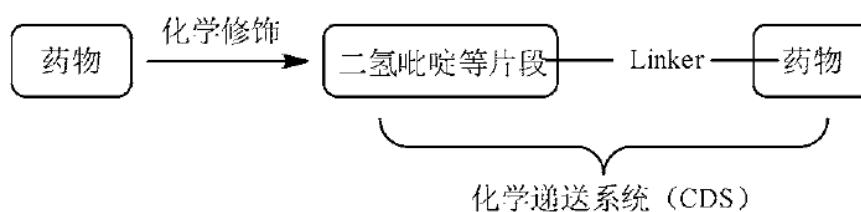


图 12 化学递送系统示意图

活性化合物需要与二氢吡啶等片段进行拼合，形成脂溶性前药，进而快速达到中枢及外周的分布平衡。达到分布平衡后，二氢吡啶部分氧化形成渗透性较差的吡啶盐，中枢外的吡啶盐可以被快速清除，而中枢系统中的吡啶盐则会停留在中枢系统，通过水解缓慢释放出活性化合物。采用化学递送系统的前药修饰策略，可以有效增加药物进入中枢系统的浓度。但二氢吡啶前药不稳定，需要注射给药。

将  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 **41** 与 N-甲基二氢吡啶片段拼合，形成化学递送系统前药 **42**。其给药后，2 h 脑浓度可达到  $345 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ，约为化合物 **41** ( $240 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 的 1.5 倍。因此，通过化学递送系统前药修饰，可以有效改善化合物的脑通透性，增加了化合物的脑内浓度(图 13)。

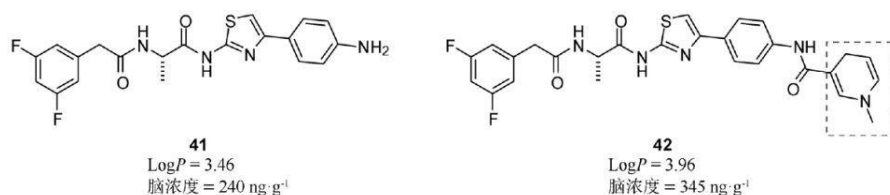


图 13 CDS 增加  $\gamma$ -分泌酶抑制剂的脑浓度

## 4.2 修饰为主动转运体底物

对于不能通过被动扩散进入中枢神经系统的化合物，可以将其修饰为主动转运体的底物以增加其进入中枢系统的能力，提高脑内化合物浓度。尽管化合物需同时与靶标蛋白和转运体结合，在一定程度上限制了该策略的广泛应用，但是该方法能有效改善某些化合物的跨膜能力，具有良好的应用前景。

目前研究较多的主动转运体主要包括：氨基酸转运体(LAT1)、葡萄糖转运体(GLUT1)、钠依赖转运体(SVCT2)、单羧酸转运体(MCT1)、阳离子氨基酸转运体(CAT1)和核苷转运体(CNT2)等。

中枢神经介质多巴胺(dopamine, 44)具有儿茶酚基结构，在体内生理 pH 的条件下易完全电离并以质子化形式存在，极难通过血脑屏障。多巴胺的前体化合物左旋多巴(43)具有氨基酸结构，可以被氨基酸转运体识别；透过血脑屏障后，在脑内脱羧酶的作用下，脱羧生成多巴胺而发挥药理作用。NMDA 受体拮抗剂 L-4-氯犬尿素(45)也是利用该方式进入中枢神经系统，进而发挥药效(图 14)。

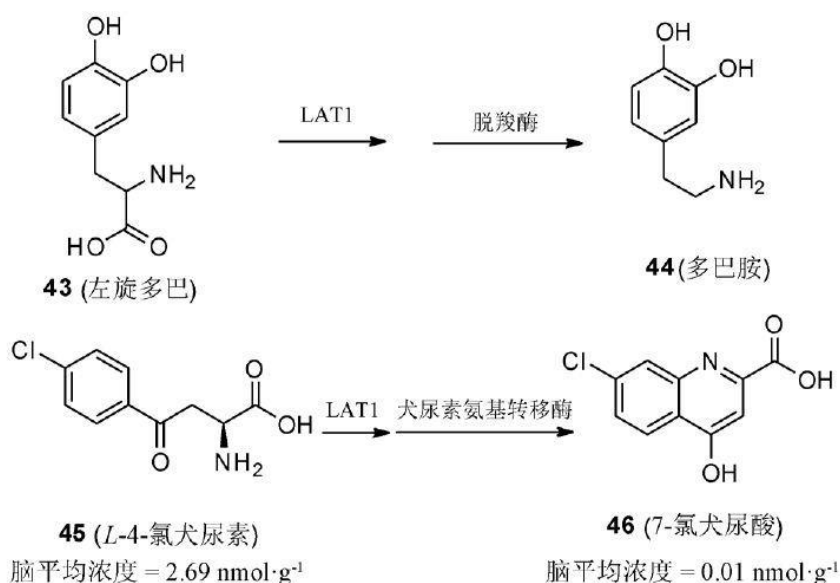


图 14 通过修饰为转运体底物的策略增加脑通透性

另外，通过与转运体的底物拼合也是增加药物进入中枢能力的改造策略之一。如将化合物 47 和 49 分别与 L-酪氨酸、葡萄糖、L-抗坏血酸进行拼合，可使得化合物易被氨基酸转运体、葡萄糖转运体和钠依赖转运体识别，增强化合物脑通透性，提高化合物脑内含量(图 15)。

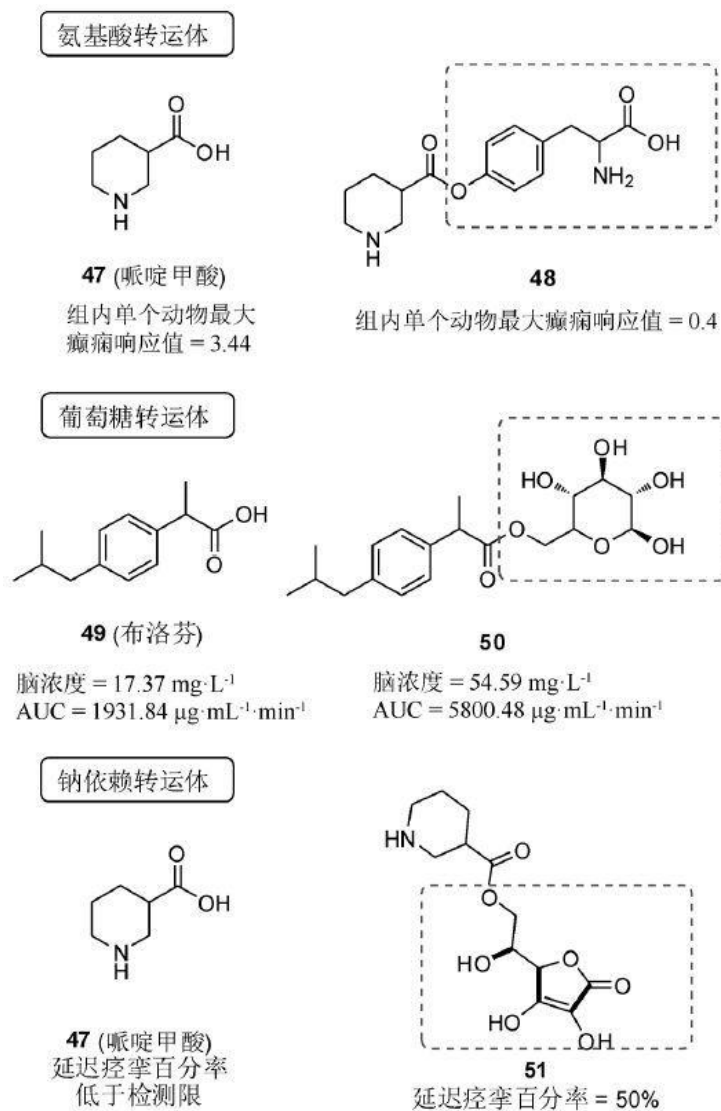


图 15 药物与转运体底物拼合

### 4.3 减少外排

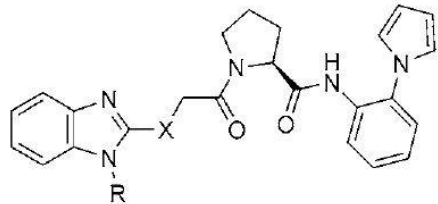
外排使得中枢药物研发变得更加复杂。中枢的外排转运体包括 P-糖蛋白 (P-gp) 转运体、多药耐药蛋白 (MRP) 转运体、乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 转运体、有机阴离子转运体 (OAT) 和谷氨酸转运体 (EAAT) 等，其中 P-糖蛋白是最主要的外排转运体。

为减少化合物的 P-糖蛋白外排，化合物不仅要符合非 P-糖蛋白底物的一般理化特征 (如氮氧数目之和不大 于 4，相对分子质量小于 400，pKa 小于 8 等)，还应尽量避免易被 P-糖蛋白识别的基团，如含有 NH 的杂环、磺胺基、脲等。

#### 4.3.1 含有 NH 杂环的结构优化

化合物 52 是 Merck 公司发现的 OX1/OX2 双重抑制剂的先导化合物，用于睡眠失调治疗药物的研发。尽管化合物 52 具有较好的生物活性 ( $hOX1Ki = 28 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $hOX2Ki = 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，但是对其 SAR 研究发现化合物 52 和 53 都是 P-糖蛋白的底物，其外排率高达 6.8 和 13。他们通过 N-甲基化，封闭了 P-糖蛋白的识别的杂环 NH，使化合物 54 和 55 外排明显下降 ( $ER = 2$ )，提高了脑内化合物含量 (表 10)。

表 10 N-甲基化对 OX<sub>1</sub>/OX<sub>2</sub> 双重抑制剂外排率 (ER) 的影响



**52** X=S, R=H  
**53** X=CH<sub>2</sub>, R=H  
**54** X=S, R=Me  
**55** X=CH<sub>2</sub>, R=Me

编号	$K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$		外排率
	hOX <sub>1</sub>	hOX <sub>2</sub>	
52	28	1	6.8
53	130	11	13
54	9	0.3	2
55	49	2	2

### 4.3.2 磺胺基的结构改造

化合物 56 是 Glaxo Smith Kline 公司报道的 AMPA 受体正向变构调节剂, 用于阿尔兹海默症、帕金森症、抑郁症和注意力缺陷多动症等的治疗。口服后在体内的 B/P 值仅为 0.1。研究发现该化合物是 P-糖蛋白的底物 (ER = 5.8), 通过对磺胺进行 N-甲基化, 化合物 57 的外排率降低至 3.2, 其 B/P 由 0.1 提高到 0.4; 引入 2-氟吡啶环后, 化合物不再是 P-糖蛋白底物, 外排率降低为 1.1, B/P 升高至 2.1, 有效地提高了脑内药物浓度 (图 16)。

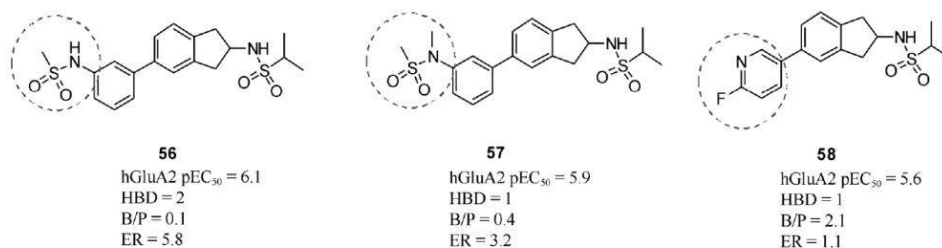


图 16 规避磺胺基对 AMPA 受体正向变构调节剂 B/P 和 ER 的影响

## 5 总结与展望

近年来, 全球范围内中枢神经系统药物发展迅猛, 但是血脑屏障的存在使很多活性化合物不能进入中枢神经系统发挥药效, 因此如何使活性化合物透过血脑屏障成为近年来研究的热点, 也是中枢神经系统药物开发中亟待解决的难题。通过增加分子的脂溶性、降低氢键数目和减小分子大小、将化合物修饰成主动转运体底物或者规避易被外排转运体识别的结构, 可以有效改善化合物血脑屏障通透性、提高脑内浓度; 但是对化合物进行结构修饰时, 仍需综合考虑药物的理化性质、结构及靶点特点等, 通过合理的结构优化, 使药物达到活性、代谢和毒性及脑暴露量的最佳平衡, 才能有效提高中枢神经系统药物的研发成功率。随着人们对血脑屏障研究的日益成熟, 相信会有许多很有价值的治疗中枢神经系统疾病的药物问世, 为患者带来福音, 同时也为社会产生巨大的经济效益。

## 先导化合物结构优化策略(五)——降低药物 hERG 心脏毒性

### 摘要

由人类果蝇相关基因 (hERG) 编码的钾离子通道在人类生理、病理过程中扮演着十分重要的角色。

在心肌细胞中, hERG 钾通道影响心脏动作电位的复极过程。近年来, 一些药物因阻断该通道引起 QT 间期延长而被撤市。本文总结了降低与 hERG 相关心脏毒性的先导化合物结构优化策略, 包括: 降低脂溶性、降低碱性、引入羟基、引入酸性基团以及构象限制等。

### 正文

近年来, 众多药物由于心脏突发死亡事件而被撤出市场 (表 1)。

**Table 1** Withdrawal of marketed drugs due to prolonging QT interval or leading torsades de pointes (Tdp)

Drug	Therapeutic class	Year of withdrawal
Prenylamine	Anti-anginal	1988
Lidoflazine	Anti-anginal	1989
Terodiline	Anti-anginal/ urinary incontinence	1991
Terfenadine	Antihistamine	1998
Sertindole	Antipsychotic	1998
Astemizole	Antihistamine	1999
Grepafloxacin	Antibiotic	1999
Cisapride	Gastric prokinetic	2000
Droperidol	Tranquilizer/analgesic	2001
Levacetylmethadol	Methadone substitution	2001
Dofetilide	Atrial fibrillation	2004
Thioridazine	Antipsychotic	2005
Clobutinol	Antitussive	2007
Dextropropoxyphene	Opioid analgesic	2009

在药物临床前研究阶段, 24%的药物由于心血管毒副作用终止开发, 45%的药物由于引起心脏毒副作用而撤市。

药物引起心脏毒性的主要原因为: 阻断心脏的快速延迟整流电流 (IKr),造成心脏动作电位时程中 QT 间期延长, 进而诱发尖端扭转性室性心动过速 (TdP), 严重时可引起突然死亡。

IKr 由 hERG 基因编码的 Kv11.1 钾离子通道传导, 在整个动作电位时程中起到至关重要的作用,各国的药物监管部门规定新化学实体必须按照国际协调会议 (ICH) 指南进行全面的 hERG 活性和 QT 间期评价。尽早有效地预测、评价、优化, 避免药物对 hERG 钾通道的抑制活性, 有助于降低药物开发的成本, 提高药物开发的成功率。

## 1hERG 钾通道与心脏毒性

### 1.1 hERG 钾通道的结构与功能

hERG 钾通道是由 KCNH2 基因编码的 4 个相同亚单位所构成的四聚体结构。每个亚单位由  $\alpha$ -亚基(6 个跨膜结构域 S1~S6) 和  $\beta$ -亚基 (细胞膜内侧 N 端和 C 端) 构成。主要功能区  $\alpha$ -亚基上的 S1~S4 结构域是 hERG 钾通道的电压传感器, S4 链带 6 个正电荷, 随膜电压的变化在膜内移动, 调节孔道的开放与关闭。S5 到 S6 结构域及中间的链接区 P 链上的氨基酸残基 (关键氨基酸残基 Phe656 和 Tyr652) 构成了 hERG 钾通道的中心疏水孔道, 形似漏斗结构。P 链和 S6 结构域上 3 个氨基酸残基 (Thr623、Ser624 和 Val625) 构成了 hERG 钾通道上方的选择性滤膜。

hERG 钾通道属于电压门控型离子通道, 存在 3 种构象状态, 分别为: 关闭态 (closed)、开放态 (open) 和失活态 (inactive), 在动作电位的不同阶段 hERG 钾通道开放、关闭的速度和程度不同, 呈现动态的构象变化。

### 1.2 药物诱导的 QT 间期延长的可能机制

药物引起 QT 间期延长的作用机制主要分为:① 直接抑制 hERG 钾通道; ② 阻碍 hERG 钾通道蛋白转运。

绝大多数撤市药物均能直接作用于 hERG 钾通道, 降低 IKr, 影响心肌动作电位复极化, 进而诱发 TdP, 严重时造成突然死亡。临床上主要表现为心电图 (ECG) 上 QT 间期延长。大量同源模建和定点突变实验研究表明: 药物中的脂溶性片段或芳杂环能够与疏水性 hERG 钾通道中的氨基酸残基 Phe656 形成  $\pi$ - $\pi$  疏水作用; 药物分子中的碱性氮原子在生理条件质子化后, 与氨基酸残基 Tyr652 形成  $\pi$ -阳离子相互作用; 此外, 药物还可以与过滤膜区的氨基酸残基如 Thr623、Ser624 和 Val625 产生相互作用。药物在 hERG 通道开放状态进入孔道, 随后 hERG 钾通道立即进入失活状态, 离子孔道的空间变小, 与药物的结合变强。

此外, 近期研究表明一些药物还可以通过抑制内质网上 hERG 钾通道蛋白的转运, 减少心肌细胞膜表面 hERG 钾通道的表达, 缓慢地降低 IKr, 从而影响心脏的复极化, 造成 QT 间期延长。例如: 降血脂药物普罗布考、抗抑郁药氟西汀、抗真菌药酮康唑等通过阻碍 hERG 钾通道蛋白转运, 降低 IKr。

近来, Wang 等研究表明: 微小 RNA (miR-17-5p)在慢性氧化应激条件下, 通过靶向多个压力相关的分子伴侣 (Hsp70、Hsc70、CANX 和 Golga2), 阻碍 hERG 钾通道蛋白转运。

### 1.3 降低药物 hERG 心脏毒性策略

采用计算机辅助药物设计 (CADD) 预测药物潜在 hERG 毒性, 指导药物设计与改造, 方便、快捷且成本较低。研究人员开发了很多预测 hERG 毒性的模型和工具。

预测药物 hERG 毒性模型的构建方法主要分为两类: 一类是基于配体的构建方法。如中国药科大学尤启冬等开发了 3D-QSAR 药效团和 2D-QSAR 联合模型, 表明强效的 hERG 抑制剂具有类似高级脂肪胺的药效团模型。

中国科学院上海药物研究所新药设计发现中心构建了 Bayesian 分类模型, 论述了药物抑制 hERG 钾通道的活性与化合物的相对分子质量、脂溶性、极性表面积和碱性等性质的相关性, 概括总结了一系列对 hERG 钾通道具有较强抑制活性的药效团片段, hERG 抑制剂多为脂溶性高、碱性强、缺乏氢键受体、柔性较大的分子。

另一类是基于受体的预测模型构建方法。由于 hERG 钾通道的晶体结构尚未被解析, 研究人员通过钾通道的同源建模和分子对接, 研究药物与 hERG 钾通道的相互作用, 并总结概括 hERG 钾通道为疏水型构象多变的离子孔道; hERG 抑制剂与钾通道氨基酸残基可形成  $\pi$ - $\pi$  疏水、 $\pi$ -阳离子等相互作用。采用计算方法预测药物潜在 hERG 心脏毒性的优点在于快速、方便、节约合成及测试成本。但由于构建模型多样、建模数据库不统一 (样本数目、实际测试方法涉及配体结合、电生理膜片钳等)、内源 hERG 钾通道构象多变的特点, 同源建模和分子对接的精准度仍是目前钾离子通道研究的一大难点。

目前, 通过先导化合物结构优化解决药物的 hERG 抑制问题, 仍是改善心脏毒性最为直接和有效的策略。Jamieson、Kerns 和 You 等分别于 2006、2008 和 2011 年对降低药物 hERG 抑制活性的结构修饰策略进行了综述。

本文基于前人的工作, 重点综述了 2010 年之后降低 hERG 抑制作用的结构优化策略, 具体包括: 降低脂溶性、降低碱性、引入氢键受体或可生成负离子的基团以及构象限制等。

本文通过对典型实例分析, 直观地反映了所采用的化学结构修饰对改造前后药物的理化性质、靶标活性、hERG 抑制活性 (off-target 效应) 以及药代性质等多方面的综合影响, 为新药开发中解决药物潜在的的心脏毒性问题提供一些思路 and 参考。

## 2 化学修饰降低药物 hERG 心脏毒性的策略

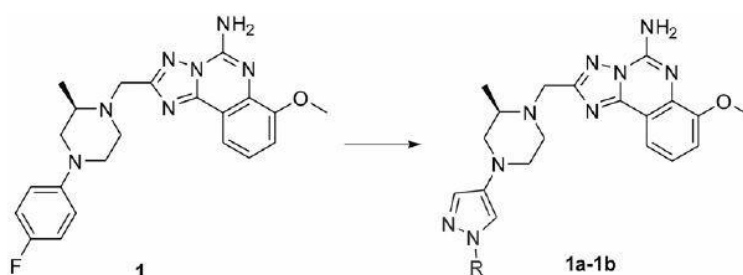
### 2.1 降低脂溶性

Levoine 等通过 QSAR 分析指出分子的脂溶性(clogP、clogD 或极性表面积 PSA) 和芳香性与 hERG 抑制活性关系密切。药物分子中的脂溶性芳香环, 与 hERG 钾通道产生  $\pi$ - $\pi$  疏水作用。降低分子的脂溶性, 如在药物分子的芳环上

引入吸电子基团或者极性基团、或通过电子等排将苯环替换成杂环等，可以有效地阻碍该疏水作用，降低 hERG 抑制活性。

腺苷受体 A<sub>2A</sub> 拮抗剂可用于治疗帕金森，化合物 **1** 是默克公司报道的 A<sub>2A</sub> 拮抗剂先导化合物 (IC<sub>50</sub>=5.5 nmol·L<sup>-1</sup>)，对腺苷受体 A<sub>1</sub> 具有较好的选择性，但具有较强的 hERG 抑制活性 (IC<sub>50</sub>=1.5 μmol·L<sup>-1</sup>)。采用降低脂溶性的策略，将末端苯环替换为吡唑得到化合物 **1a** 和 **1b**，脂溶性 clogP 分别下降 1.9 和 0.7 个单位，hERG 抑制活性显著下降 (IC<sub>50</sub>>60 μmol·L<sup>-1</sup>)，同时保持了化合物对 A<sub>2A</sub> 的活性及对 A<sub>1</sub> 的选择性(表 2)。

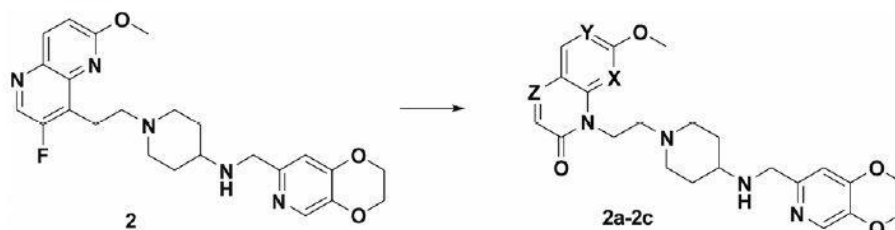
**Table 2** Reducing hERG inhibitory activity through attenuation of lipophilicity on adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists **1**



Compd.	R	Human A <sub>2A</sub> IC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>	Human A <sub>1</sub> IC <sub>50</sub> / μmol·L <sup>-1</sup>	hERG IC <sub>50</sub> / μmol·L <sup>-1</sup>	clogP
<b>1</b>	—	5.5	14.5	1.5	4
<b>1a</b>	Me	24.6	15.9	> 60	2.1
<b>1b</b>	<i>t</i> -Bu	9.4	19.1	> 60	3.3

化合物 **2** 是广谱的抗菌药物，抑菌活性较好，对拓扑异构酶 IV 具有较强的抑制作用，hERG 抑制活性 IC<sub>50</sub> 为 3 μmol·L<sup>-1</sup>。将氮杂喹啉等排替换为极性更大的喹诺酮得到化合物 **2a**~**2c**，脂溶性 logD<sub>7.4</sub> 下降 0.6~1.6 个单位，hERG 抑制活性显著下降 (IC<sub>50</sub>> 30 μmol·L<sup>-1</sup>) (表 3)。

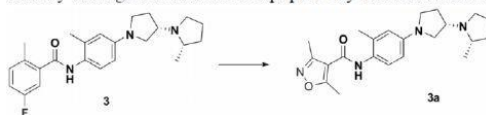
**Table 3** Reducing hERG inhibitory activity through attenuation of lipophilicity on antibiotics **2**



Compd.	X	Y	Z	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Topo IV $\text{IC}_{50}/$ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	hERG/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\log D_{7.4}$
<b>2</b>	—	—	—	0.01–4	1.3	3	1.46
<b>2a</b>	N	CH	N	0.02–4	1.5	31	0.83
<b>2b</b>	N	N	CH	0.13–8	13	206	0.20
<b>2c</b>	N	N	N	0.25–8	2.0	81	-0.14

增加极性表面积 (PSA) 和降低  $\text{clogP}$ , 可以协同作用降低脂溶性, 用于改善 hERG 抑制作用。组胺 H<sub>3</sub> 受体拮抗剂 **3**,  $\text{IC}_{50}$  达到  $2.4\sim 3.5\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 但 hERG 抑制活性较强 ( $\text{IC}_{50}=1.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 将末端苯环替换成二甲基取代的噁唑环,  $\text{clogP}$  和  $\text{clogD}$  下降  $0.3\sim 0.4$  个单位, 同时噁唑环上二甲基取代使得 PSA 增加近一倍, 化合物 **3a** 的脂溶性下降, 其 hERG 钾通道的抑制活性显著降低 ( $\text{IC}_{50}=37\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 同时对 H<sub>3</sub> 受体拮抗活性有所提高 ( $\text{IC}_{50}=0.1\sim 0.8\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (表 4)。

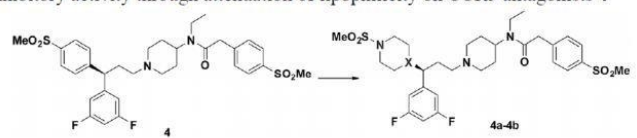
**Table 4** Reducing hERG inhibitory activity through attenuation of lipophilicity on histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists **3**



Compd.	h-H <sub>3</sub> R $K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	rh-H <sub>3</sub> R $K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	r-H <sub>3</sub> R $K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	hERG $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{clogP}$	$\text{clogD}_{7.4}$	PSA/ $\text{\AA}^2$
<b>3</b>	3.4	2.5	3.0	1.1	3.2	0.7	36
<b>3a</b>	0.1	0.4	0.8	37	2.8	0.4	62


将苯环替换为含有氮或氧的脂肪杂环, 如哌啶、哌嗪、四氢吡喃等, 可以有效地降低药物分子的脂溶性 ( $\text{clogP}$ ), 阻碍药物分子与 hERG 钾通道的疏水相互作用。

化合物 **4** 是阿斯利康公司研发的 CCR5 拮抗剂 ( $\text{IC}_{50}=0.32\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), hERG 钾通道抑制活性为  $7.3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在口服给予  $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量下, 化合物 **4** 在犬模型上引起 QT 间期延长。采用降低脂溶性的结构改造策略, 将苯环替换成哌啶或哌嗪,  $\log D_{7.4}$  下降  $0.7\sim 1.0$  个单位, hERG 抑制活性大大降低 ( $\text{IC}_{50}=24\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 同时 CCR5 拮抗活性保持 (表 5)。

**Table 5** Reducing hERG inhibitory activity through attenuation of lipophilicity on CCR5 antagonists **4**


Compd.	X	CCR5 IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	hERG IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	logD <sub>7.4</sub>	F/%
<b>4</b>	–	0.32	7.3	2.2	38–86
<b>4a</b>	CH	0.26	24	1.5	41–51
<b>4b</b>	N	3.7	> 32	1.2	7.3–22

类似的策略也被成功应用于 H3 受体拮抗剂 **5** 的结构优化中。化合物 **5** 对 H3 受体的拮抗活性为 1.2~16.5 nmol·L<sup>-1</sup>, hERG 抑制活性较强 (IC<sub>50</sub>=0.48 μmol·L<sup>-1</sup>)。将苯环替换成四氢吡喃环, clogP 下降 2.3 个单位, hERG 抑制活性降为原来的 1/39 (IC<sub>50</sub>=18.9 μmol·L<sup>-1</sup>), 同时化合物 **5a** 对 H3 受体上的拮抗活性提高 (IC<sub>50</sub> 为 0.8~1.0 nmol·L<sup>-1</sup>) (表 6)。

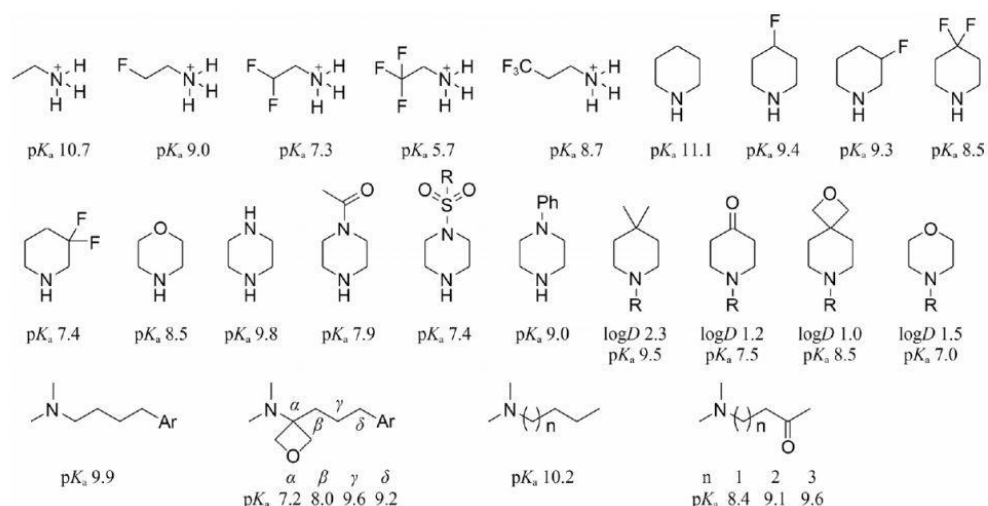
**Table 6** Reducing hERG inhibitory activity through attenuation of lipophilicity on histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists **5**


Compd.	h-H <sub>3</sub> R K <sub>i</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	rh-H <sub>3</sub> R K <sub>i</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	r-H <sub>3</sub> R K <sub>i</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	hERG IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	clogP
<b>5</b>	8.6	1.2	16.5	0.48	4.4
<b>5a</b>	1.0	0.8	1.0	18.9	2.1

## 2.2 降低碱性

降低碱性是先导化合物结构优化降低 hERG 抑制活性的一个重要策略。一些药物分子碱性较强, 在生理条件下可质子化, 同源模建和定点突变实验研究表明可与 hERG 钾通道中的氨基酸残基 Tyr652 形成较强的 π-阳离子相互作用。

降低药物的碱性 (pKa), 可阻碍该 π-阳离子相互作用, 使 hERG 抑制活性降低。降低碱性 (pKa) 包括: 引入吸电子基团 (如引入 F、磺酰基、杂原子、羰基、酰胺等); 或将氨基替换为酰胺、磺酰胺等。图 1 总结了这些策略对于降低氨基碱性 (pKa) 的作用。



**Figure 1** Introduction of withdrawing group to reduce  $pK_a$

通过引入极性片段 (如羰基和氧杂环等) 降低  $pK_a$  时, 也会导致脂溶性 ( $\log D$ ) 的下降, 因此, 降低碱性和降低脂溶性相互联系相互影响。然而有时降低药物分子中氨基的碱性, 会对活性和理化性质造成影响, 因为有些氨基与靶标蛋白发生关键的氢键相互作用, 而另一些则作为成盐位点, 用于改善药物的溶解性, 此为该方法的一些局限性, 在实际应用中应加以注意。

广谱抗菌药物化合物 **6** 对拓扑异构酶 IV 具有较好的抑制活性 ( $IC_{50}=3.2$   $nmol \cdot L^{-1}$ ), hERG 抑制活性  $IC_{50}$  为  $44 \mu mol \cdot L^{-1}$ , 但在几内亚猪模型上会引起 QT 间期延长。在哌啶环上引入吸电性的氟原子,  $pK_a$  降低 1.3 个单位, hERG 抑制活性降至 1/5 ( $IC_{50}=233 \mu mol \cdot L^{-1}$ ), 同时抗菌活性保持不变 (表 7)。

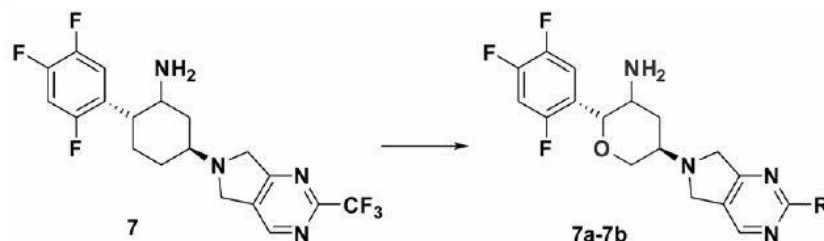
**Table 7** Attenuation of  $pK_a$  to reduce hERG inhibitory activity on antibacterial agents **6**

Compd.	MIC $/\mu g \cdot mL^{-1}$	Topo IV $IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$	hERG $IC_{50}/\mu mol \cdot L^{-1}$	$pK_a$	$\log D_{7.4}$
<b>6</b>	0.03→8	3.2	44	8.27/5.75	0.68
<b>6a</b>	0.06→8	48	233	7.03/4.47	0.96

化合物 **7** 是环己基胺类 DDP-IV 抑制剂 ( $IC_{50}$  达到  $0.5 nmol \cdot L^{-1}$ ), hERG 抑制活性较强 ( $IC_{50}=4.8 \mu mol \cdot L^{-1}$ ), 在犬模型上会导致 QT 间期延长。在环己基

环上碱性氨基的  $\beta$  位引入氧原子,  $pK_a$  从 8.6 降低为 7.3, hERG 抑制活性大大降低 ( $IC_{50}=23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),同时对 DPP-IV 抑制活性不受影响 (表 8)。

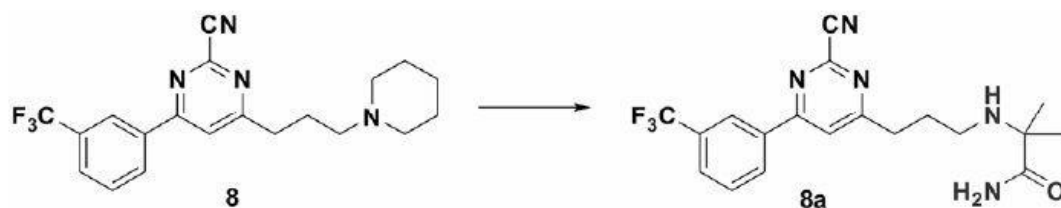
**Table 8** Attenuation of  $pK_a$  to reduce hERG inhibitory activity on DPP-IV inhibitors **7**



Compd.	R	DPP-IV $IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	hERG $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$pK_a$
<b>7</b>	—	0.5	4.8	8.6
<b>7a</b>	$\text{CF}_3$	1.3	23	7.3
<b>7b</b>		0.66	> 30	7.3

化合物 **8** 是 Merck 公司开发的 2-氰基嘧啶类组织蛋白酶 K (CatK) 抑制剂, hERG 抑制活性  $IC_{50}$  为  $0.16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将结构中哌啶替换成氨基酰胺片段,碱性 ( $pK_a$ ) 和脂溶性 ( $clogP$ ) 分别下降 1.8 和 2.2 个单位, hERG 抑制活性降为原来的 1/30 ( $IC_{50}= 3.16\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 大鼠给药化合物 **8a**  $100 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  两周, 未见心脏不良反应 (表 9)。

**Table 9** Attenuation of  $pK_a$  to reduce hERG inhibitory activity on CatK inhibitors **8**

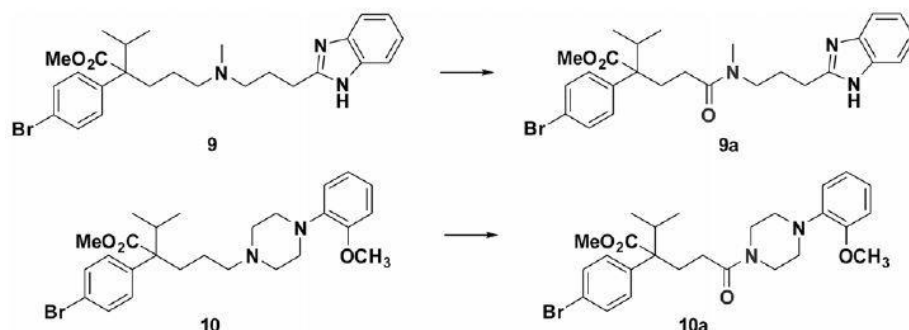


Compd.	CatK $IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	hERG $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$clogP$	$pK_a$
<b>8</b>	4	0.16	4	9.2
<b>8a</b>	3	3.16	1.8	7.4

将氨基替换成酰胺可以显著降低碱性, 改善对 hERG 钾通道的抑制活性。化合物 **9** 和 **10** 是 Shin 等报道的一类三级胺类的 T-型钙通道阻滞剂, 是潜在的用于治疗心血管疾病的先导化合物, hERG 抑制活性较强, 分别为  $0.18$  和  $1.38 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将氨基替换成酰胺, 碱性和脂溶性均下降, hERG 抑制活性  $IC_{50}$  分

别降为 12.5 和 16.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 但该方法导致钙通道阻滞活性略微下降 (表 10)。

**Table 10** Attenuation of  $pK_a$  to reduce hERG inhibitory activity on T-type calcium channel blockers **9** and **10**



Compd.	T-type $\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	hERG $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	clogP	F/%
<b>9</b>	8.17	0.178	5.84	—
<b>9a</b>	56	12.5	5.40	60.3
<b>10</b>	95	1.38	5.70	—
<b>10a</b>	654	16.8	4.77	9.2

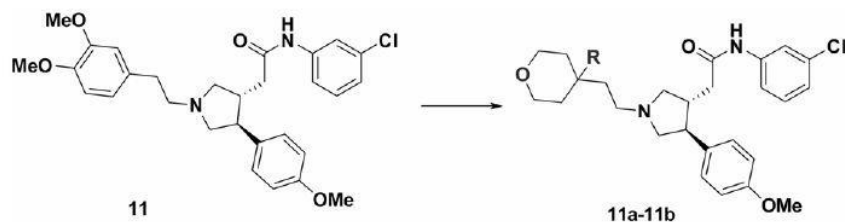
### 2.3 引入羟基

羟基是一个强极性氢键供体基团, 引入羟基可以显著地改变分子的理化性质, 降低脂溶性和碱性, 阻碍药物分子与 hERG 钾通道的疏水作用和  $\pi$ -阳离子相互作用。近年来, 越来越多的研究实例证明引入羟基对于改善 hERG 抑制活性具有重要作用。

化合物 **11** 是黑色素聚集激素受体 (MCHR) 拮抗剂 ( $\text{IC}_{50}$  为 13  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但 hERG 抑制活性极强 ( $\text{IC}_{50}=0.002 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。采用上述降低脂溶性的策略, 将苯环替换成四氢吡喃环, hERG 抑制活性下降至 **11** 的 1/60 ( $\text{IC}_{50}=0.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 抑制活性仍较强。

在四氢吡喃环上引入羟基, hERG 抑制活性进一步下降至 **11** 的 1/4 000 ( $\text{IC}_{50}=8.24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 同时 MCHR 拮抗活性保持, 可见羟基在改善 hERG 抑制活性的重要作用 (表 11)。

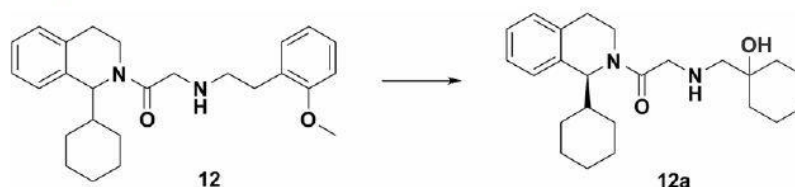
**Table 11** Introducing hydroxy group to reduce hERG inhibition on MCHR antagonists **11**



Compd.	R	MCHR IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	hERG IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>11</b>	–	0.013	0.002
<b>11a</b>	H	0.021	0.12
<b>11b</b>	OH	0.025	8.24

N-型钙离子通道 (NVDCC) 是治疗神经疼痛的潜在靶点, 化合物 **12** 是由 Ogiyama 等报道的有效的 N-型钙离子通道阻滞剂 (IC<sub>50</sub>=0.6 nmol·L<sup>-1</sup>), hERG 抑制活性较强 (IC<sub>50</sub>=8.3 μmol·L<sup>-1</sup>)。采用类似的结构优化策略, 将 2-甲氧基取代的苯环替换成羟基取代的环己基片段, hERG 活性下降至 98 μmol·L<sup>-1</sup>(表 12)。

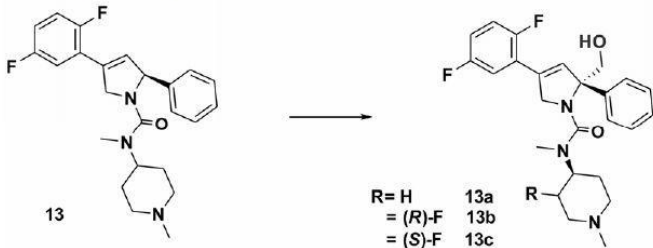
**Table 12** Introducing hydroxy group to reduce hERG inhibition on N-type calcium channel blockers **12**



Compd.	NVDCC IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	hERG IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>12</b>	0.6	8.3
<b>12a</b>	1.0	98

纺锤体蛋白 (KSP) 抑制剂可用于抗肿瘤。化合物 **13** 是 Merck 公司开发的 KSP 抑制剂 (IC<sub>50</sub>= 4nmol·L<sup>-1</sup>), hERG 抑制活性较强 (IC<sub>50</sub>=1.2 μmol·L<sup>-1</sup>)。在二氢吡咯 2-位引入羟甲基得到化合物 **13a**, logP 从 2.5 降到 1.7, hERG 抑制活性下降到原来的 1/12(IC<sub>50</sub>=14.6 μmol·L<sup>-1</sup>), 但化合物 **13a** 多药耐药性比值(MDR) 较高, 易被细胞外排, 通过调节侧链在氨基哌啶引入氟原子, pKa 下降 1.2~2.2 个单位, hERG 抑制活性进一步下降 (IC<sub>50</sub>>20.5 μmol·L<sup>-1</sup>), 同时 MDR 下降至 10 以下, 细胞活性提高 (表 13)。

**Table 13** Introducing hydroxy group to reduce hERG inhibition on kinesin spindle protein inhibitors **13**

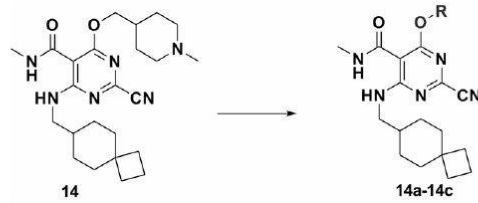


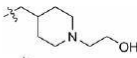
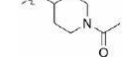
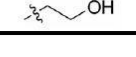
Compd.	KSP IC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>	Cell EC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>	MDR ratio	hERG IC <sub>50</sub> / μmol·L <sup>-1</sup>	pK <sub>a</sub>	logP
<b>13</b>	4	400	10	1.2	–	2.5
<b>13a</b>	6.2	125	21.2	14.6	8.8	1.7
<b>13b</b>	2.2	5.3	4.5	20.5	7.6	–
<b>13c</b>	11.5	16.5	2.4	36.9	6.6	–

化合物 **14** 是一类选择性较高的组织蛋白酶 S(CatS) 抑制剂 (IC<sub>50</sub>=3 nmol·L<sup>-1</sup>, CatL/CatS=120)。CatS 是一类半胱氨酸蛋白酶, 主要在树突状细胞、B 细胞、巨噬细胞和脑小神经胶质细胞上表达, 负责水解蛋白和抗原呈递, 选择性抑制脊髓小胶质的 CatS 可以逆转神经性疼痛。化合物 **14** 过血脑屏障的能力较好, 但 hERG 抑制活性较强 (IC<sub>50</sub>=0.71 μmol·L<sup>-1</sup>), 在氨基侧链上引入羟基, 对 hERG 抑制活性影响不大。

通过采用上述的降低碱性的策略, hERG 抑制活性达到 IC<sub>50</sub> 大于 30 μmol·L<sup>-1</sup>, 但化合物 **14b** 过血脑屏障能力下降, 脑中的药物浓度小于 13 nmol·L<sup>-1</sup>。将氨基侧链替换成羟乙基, hERG 抑制活性大于 30 μmol·L<sup>-1</sup>, 同时化合物 **14c** 在 Cat 上的活性、选择性以及过血脑屏障的能力均保持 (表 14)。

**Table 14** Introducing hydroxy group to reduce hERG inhibition on cathepsin S inhibitor **13**. <sup>a</sup>Brain concentration profiles for several compounds **14–14c** in Sprague-Dawley rats (*po* 10 mg·kg<sup>-1</sup>, 3 h)



Compd.	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>			Brain concentration <sup>a</sup> /nmol·L <sup>-1</sup>
		CatS	CatL	hERG	
<b>14</b>	–	3	360	0.71	718
<b>14a</b>		3	300	0.89	–
<b>14b</b>		10	2 500	>30	<13
<b>14c</b>		6	1 200	>30	849

## 2.4 引入酸性基团

在药物分子中巧妙地引入酸性片段，可以与碱性氨基形成内盐，能够显著降低了分子的脂溶性，降低分子的碱性，降低其与疏水性较强的 hERG 钾通道相互作用；同时降低化合物的透膜性，使其难以通过 hERG 钾通道的滤膜区。

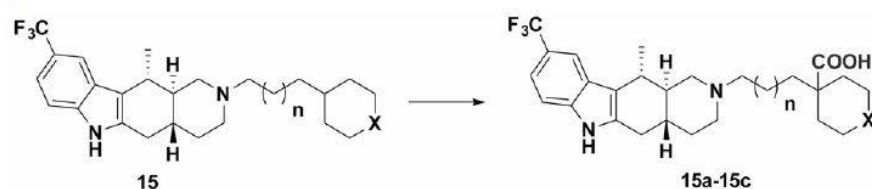
酸性片段的引入是阻断小分子配体与 hERG 通道相互作用直接有效的结构修饰策略，然而有时引入酸性基团，对药物分子的理化性质影响较大，对药物分子的药效学和药代动力学性质产生较大影响。

化合物 15 是美国安进公司开发的高效选择性黑色素聚集激素受体 MCHR1 拮抗剂 ( $K_i=0.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{IC}_{50}=0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，用于肥胖治疗。化合物 15 对 hERG 钾通道具有较强的抑制作用 ( $\text{IC}_{50}=0.03 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

在四氢吡喃的 4-位引入羧酸基团得到化合物 15a，其 hERG 抑制活性下降至 1/10 ( $\text{IC}_{50}=0.3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，但 MCHR1 拮抗活性显著下降，缩短碳链后化合物 15b 和 15c 的 MCHR1 的拮抗活性提高。

将四氢吡喃替换成环己基得到化合物 15c，MCHR1 活性保持 ( $\text{IC}_{50}=0.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，而 hERG 抑制活性下降到化合物 15 的 1/166 之下 ( $\text{IC}_{50}>5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，在大鼠、犬、猴等模型上表现出良好的药代性质，且未观察到 QT 间期延长的不良反应，此外，化合物 15c 透过血脑屏障的能力较强，在大鼠、犬、猴等动物模型上均有效(表 15)。

**Table 15** Adding acidic group to reduce hERG inhibition on MCHR1 antagonists 15. <sup>a</sup>Dose:  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (iv) and  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (po)



Compd.	n	x	MCHR1 $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	hERG $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$F/\%^a$		
					Rat	Dog	Cyno
15	1	O	0.000 5	0.03	81	33	70
15a	1	O	0.04	0.3	—	—	—
15b	0	O	0.00 9	> 5	—	—	—
15c	0	CH <sub>2</sub>	0.000 6	> 5	70	40	29

## 2.5 构象限制

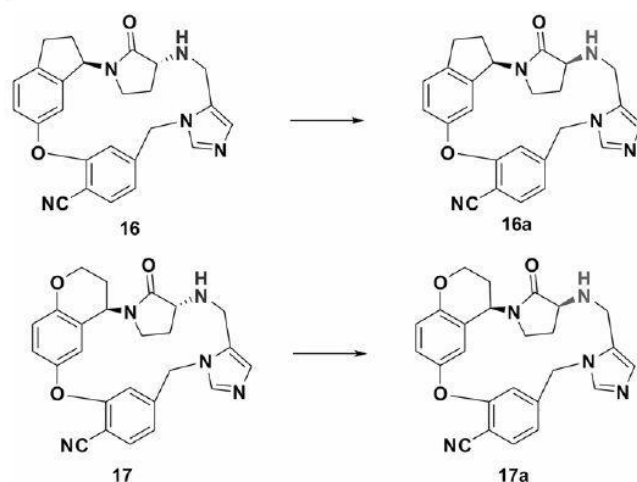
对药物分子基本骨架进行细微的调整，比如改变手性、引入甲基、并环扩环或者引入双键增加分子刚性，限制药物分子构象或减少柔性构象数目，可有效地阻碍药物分子与 hERG 钾通道 (off-target) 相互作用；同时由于药效团不变，该

策略对药效影响不大。近年来, 通过构象限制改善 hERG 抑制活性的报道越来越多, 为改善药物 hERG 抑制活性提供新思路。

### 2.5.1 改变手性

上市药物中手性药物越来越普遍, 手性不同往往会导致药物药效学、药代动力学和毒理等性质各不相同。同样, 手性药物分子的不同异构体对于 hERG 钾通道的抑制作用不尽相同, 如化合物(R, R)-16 和 (R, R)-17 是法尼基转移酶抑制剂, 体外具有良好的活性 ( $IC_{50} < 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), hERG 抑制活性分别为 0.08 和  $0.15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 改变手性得到化合物(R, S)-16a 和 (R, S)-17a, hERG 抑制活性分别下降为 4.7 和  $9.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因此通过改变药物的手性是 hERG 改造中的一个不容忽视的改造思路 (表 16)。

**Table 16** Changing the chiral center to reduce hERG inhibition of farnesyltransferase inhibitors (FTIs) **16** and **17**

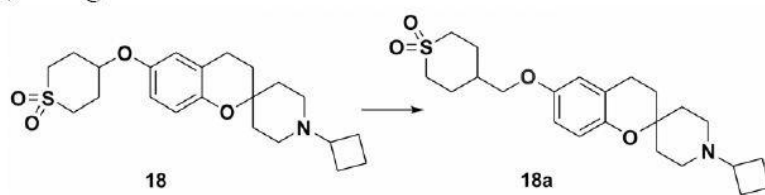


Compd.	FTIs $IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	hERG $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>16</b>	0.15	0.08
<b>16a</b>	3.6	4.7
<b>17</b>	<1	0.15
<b>17a</b>	<1	9.1

### 2.5.2 甲基策略改变构象

甲基策略在药化结构改造中作用广泛, 在分子中引入一个碳原子可以改变分子的线型。化合物 18 是 H3 受体拮抗剂, 体外具有良好的活性 ( $K_i = 7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但 hERG 抑制活性较强 ( $IC_{50} = 7 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 在分子中引入一个亚甲基, 使分子由折线型趋向线型, 化合物 18a 对 hERG 抑制活性大大降低 ( $IC_{50} > 30 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (表 17)。

**Table 17** Reducing the hERG inhibitory activity on H<sub>3</sub> receptor (H<sub>3</sub>R) antagonist **18**

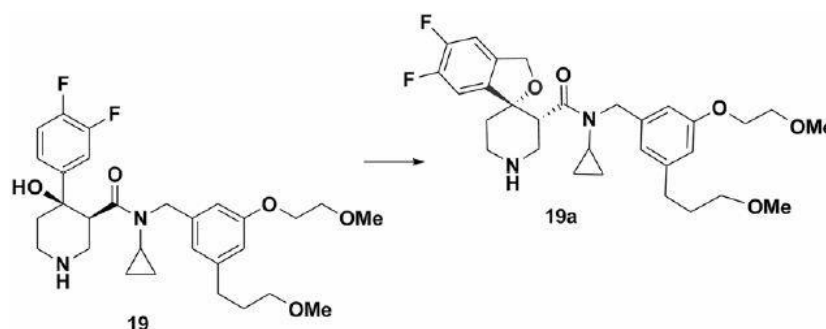


Compd.	H <sub>3</sub> R $K_i$ /nmol·L <sup>-1</sup>	hERG IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>18</b>	7	7
<b>18a</b>	4	>30

### 2.5.3 增加分子刚性

肾素抑制剂 **19** 可用于抗高血压, 但其 hERG 抑制活性较强 (IC<sub>50</sub>=5 μmol·L<sup>-1</sup>), 通过并入螺环增加分子刚性, 成功限制了芳环平面旋转, 化合物 **19a** hERG 抑制活性下降至 **19** 的 1/5 以下 (IC<sub>50</sub>= 24 μmol·L<sup>-1</sup>), 同时肾素抑制活性显著提高。此策略巧妙地实现了骨架跃迁, 降低 hERG 抑制活性的同时得到结构新颖的候选化合物 (表 18)。

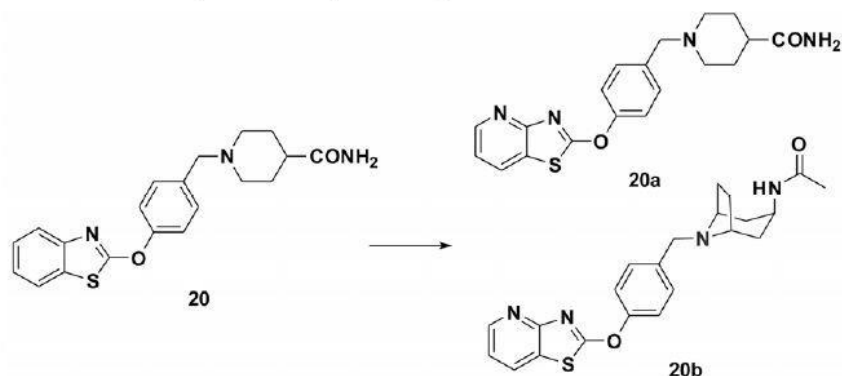
**Table 18** Intramolecular cyclization to reduce hERG inhibition on renin inhibitors **19**



Compd.	Renin potency IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	hERG IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>19</b>	320	5
<b>19a</b>	5	24

化合物 **20** 是白三烯 A<sub>4</sub> 水解酶 (LTA<sub>4</sub>H) 抑制剂, 具有较强的 hERG 抑制活性 (IC<sub>50</sub>=1.5 μmol·L<sup>-1</sup>), 采用上述的杂环替换策略, 脂溶性 clogP 降低, 化合物 **20a** 抑制 hERG 的活性下降至 **20** 的 1/6 (IC<sub>50</sub>= 8.9 μmol·L<sup>-1</sup>)。基于此引入刚性托品烷结构, 可以减少化合物 **20b** 分子柔性构象数目, hERG 抑制活性进一步降低 (IC<sub>50</sub>>10 μmol·L<sup>-1</sup>) (表 19)。

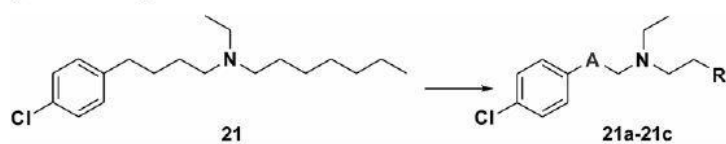
**Table 19** Increasing the rigidity to reduce hERG inhibition on leukotriene A4 hydrolase (LTA4H) inhibitor **20**



Compd.	LTA4H IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	hERG IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
<b>20</b>	17	1.5
<b>20a</b>	6	8.9
<b>20b</b>	1	>10

化合物 **21** 的乙基季铵盐氯非胺具有抗心律失常作用，但 hERG 抑制活性较强 (IC<sub>50</sub>= 4.3 nmol·L<sup>-1</sup>), 结构中存在较强的碱性氮和两个较长的柔性疏水链。Louvel 等研究表明碱性氮对抗心律失常活性重要, 因此考察分子骨架刚性和连接链对 hERG 抑制活性的影响。当引入双键得到的化合物 **21a**, 对构象改变无明显影响, 仍可以与关键的氨基酸残基 Tyr652 和 Phe656 发生相互作用, hERG 抑制活性较强; 而当引入炔基得到化合物 **21b**~**21c**, 分子刚性增强, hERG 抑制活性下降至 1/13~1/110 (表 20)。

**Table 20** Increasing the rigidity to reduce hERG inhibition on antiarrhythmic agent **21**



Compd.	A	R	K <sub>i</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	hERG IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>
<b>21</b>		<i>n</i> -pent	8.3 ± 0.58	4.3
<b>21a</b>		<i>n</i> -pent	9.5 ± 5.0	<5
<b>21b</b>		<i>n</i> -pent	478 ± 85	58
<b>21c</b>		Et	1 921 ± 329	473

## 总结与展望

降低脂溶性、降低碱性、引入羟基、引入酸性片段和构象限制是降低药物对 hERG 钾通道抑制的 5 种常用的化学结构改造策略。由于脂溶性和 hERG 抑制之间关系紧密，使其成为降低 hERG 抑制活性首选的结构优化策略，应用也最为广泛。其次应用较多的是降低药物分子碱性 pKa，值得注意的是降低碱性和降低脂溶性两种方法具有内在联系，可以相互影响。

合理地引入含氧原子的氢键供体 (羟基) 可以显著地降低 hERG 抑制活性。引入酸性片段，可以显著地改变药物分子的理化性质，导致 hERG 抑制活性显著降低，但局限性在于可能会影响生物利用度和脑透膜性。

构象限制是近年来逐渐发展和扩充的策略,涉及到转变手性、引入甲基、骨架跃迁、增加刚性等新方法，此类改造对理化性质改变较小，通过改变构象或限制构象数目阻碍药物分子与 hERG 钾通道的相互作用，为先导化合物结构改造提供新的研究思路。

随着越来越多药物与 hERG 钾通道构效关系(SAR) 的研究报道以及计算化学的发展，预测模型精准度的提高，CADD 的研究策略将为化合物设计和优化、避免 hERG 毒性提高更精准的指导。

未来减低药物 hERG 心脏毒性的先导化合物结构优化策略，将与药效团模型预测、同源建模和分子对接等策略联合使用，相互影响、相互辅助，为新药开发中降低潜在心脏毒性提供更加理性和丰富的改造思路。

## 先导化合物结构优化策略 (六)-改善化合物血浆稳定性

### 摘要

血浆稳定性是影响先导化合物成药性的关键因素。通过化学结构修饰方法提高化合物的血浆稳定性有助于改善化合物在体内的药动学和药效学性质。

本文综述了通过化学结构修饰改善化合物血浆稳定性的基本策略，包括：生物电子等排、增加空间位阻、成环修饰以及骨架跃迁等。

### 正文

在药物发现过程中，先导化合物的代谢稳定性(包括肝代谢稳定性和血浆稳定性等) 是影响其成药性的关键因素。在药物研发案例中，很多先导化合物都存在代谢稳定性差的问题，而很多具有良好药理活性的化合物由于不够稳定最终导

致研发失败终止。因此，改善化合物的代谢稳定性是在寻找候选药物过程中亟待解决的重要问题。

尽管化合物的肝代谢稳定性被普遍认为是药物发现过程中所面临的最主要的挑战之一，化合物的血浆稳定性仍然是新药研发过程中一个重要的影响因素。

一些含有特定官能团的化合物在血液中易分解，而不稳定的化合物常常具有较高的清除率和较短的半衰期，从而导致体内药动学和药效学性质不佳。

如果在新药研发过程中只关注化合物的肝代谢稳定性而忽视其血浆稳定性，就可能无法有效地解决化合物的体内稳定性问题。因为肝脏中的代谢酶和血液中的酶不同，在体外稳定性评估中，化合物在肝微粒体中稳定并不能代表它在血浆中也同样稳定。因此，提高先导化合物的血浆稳定性对于新药研发同样具有重要意义。

通过对先导化合物进行结构优化，提高化合物的血浆稳定性、延长药物在体内的作用时间、增加体内的暴露量、降低化合物的清除率、提高生物利用度，进而改善其药动学和药效学性质对于先导化合物结构优化十分必要。

本文主要介绍了通过化学结构修饰提高化合物血浆稳定性的策略，包括：生物电子等排、增加空间位阻、成环修饰以及骨架跃迁等。通过总结提高化合物的血浆稳定性的结构修饰策略，以期能够为候选药物的设计与开发提供参考。

1

## 血浆稳定性的基本原理

血浆是血液的重要组成部分，其主要成分是水、血浆蛋白、葡萄糖、激素、矿物离子以及多种水解酶等。血浆中的水解酶主要有胆碱酯酶、脱氢肽酶、脂肪酶和磷酸酶等。血浆和肝脏中的水解酶是存在差异的。

例如假性胆碱酯酶 (**pseudocholinesterase**) 由肝脏合成，但主要存在于血浆中，可水解乙酰胆碱和其他胆碱类化合物。血浆中还存在淀粉酶和脂肪酶，其主要来源于胰腺和唾液腺等，淀粉酶和脂肪酶对多糖类及脂肪类化合物的水解起重要作用，而肝脏中则不含该类水解酶。

醛缩酶 **B (aldolase B)** 在糖酵解和糖异生过程中具有重要作用，其主要存在于骨骼肌和肝脏中，而在血浆中的含量较低。

磷酸二酯酶 **3B (phosphodiesterase 3B)** 的主要作用是参与磷酸脂类的水解，其主要存在于脂肪组织和肝脏中，在血浆中的含量较少。血浆中的各种水解酶的含量和活性取决于个体的种族、性别、年龄和健康状况等。

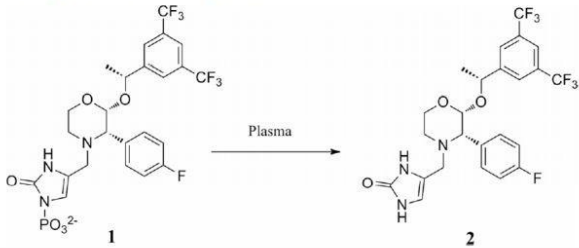
当小分子化合物与血浆中的某种水解酶具有一定亲和力的时候，其结构中特定的官能团就会被水解酶水解，从而导致具有生物活性的化合物在血浆中的浓度迅速降低，以致无法发挥有效的治疗作用。在选择活性化合物开展体内药效学评价时，血浆稳定性数据可以直观地反映出化合物可能会出现稳定性问题，这将有助于研究人员挑选稳定性更好的化合物进行后续研究。

在血浆中容易被降解的官能团主要有酯基、酰胺、内酯、氨基甲酸酯、内酰胺、磺酰胺以及肽类结构等。由于对映异构体与血浆中水解酶的亲和力差异，化合物的血浆稳定性也受到手性因素的影响。

另外，化合物在不同种属之间的血浆稳定性有时也存在较大差异，这可能与不同种属中水解酶的活性、含量以及结构差异有关。

如表 1 所示, 化合物 1 是人神经激肽-1 (hNK-1) 受体拮抗剂的磷酸酯前药, 其在血浆中的稳定性顺序如下: 大鼠<犬<人。

**Table 1** The plasma stability of compounds in different species



Time /min	Rat/mol·L <sup>-1</sup>		Dog/mol·L <sup>-1</sup>		Human/mol·L <sup>-1</sup>	
	1	2	1	2	1	2
0	23	0.6	26	1.2	26	0.8
15	18	5.8	26	1.8	27	1.0
30	13	8.0	25	2.4	26	1.1
60	6.4	11	24	3.9	26	1.4
120	1.9	15	20	6.0	26	2.3

一般情况下, 化合物在啮齿动物体内的稳定性要低于人体内的稳定性。因此, 在药物研发的初期阶段, 有必要对先导化合物的血浆稳定性进行评估, 尽早发现潜在的不稳定结构并对其进行必要的结构修饰, 或者挑选稳定性更佳的前导化合物开展进一步的药理活性和代谢性质的优化。

## 2 血浆降解特性的应用

通常情况下, 提高化合物在血浆中的稳定性, 从而增加化合物在体内的暴露量以及延长药效作用时间等是研发人员进行先导化合物类药性优化的主要目标。但是, 血浆的降解作用也并非有弊无益, 药物化学家可以利用它的降解特性来进行前药和软药的设计优化。

为了提高化合物的渗透性和代谢稳定性, 可以采用前药策略增加进入血液的前药浓度, 使得前药在血液中水解并释放出活性成分。

另一种利用血浆降解特性的策略是设计软药。软药是指容易代谢失活的药物, 使药物在完成治疗作用后, 按预先设定的代谢途径和可以控制的速率分解、失活并迅速排出体外, 从而避免药物的蓄积毒性, 这类药物被称为软药。软药和前药相反, 软药在局部使用时是有药理活性的, 但进入血液后会迅速降解成非活性成分。

早期开发的糖皮质激素在长期使用后会出现较多的不良反应, 例如: 诱发或加重感染、引起物质代谢和水盐代谢紊乱、诱发高血压和动脉粥样硬化、白内障和青光眼等。因此, 人们迫切需要研发一类安全有效的糖皮质激素类药物。

氯替泼诺 (loteprednol, 3, 图 1) 是用于治疗眼部炎症的药物, 在血浆中氯替泼诺会转变为一种无活性的羧酸代谢产物, 这样可明显降低它的不良反应。

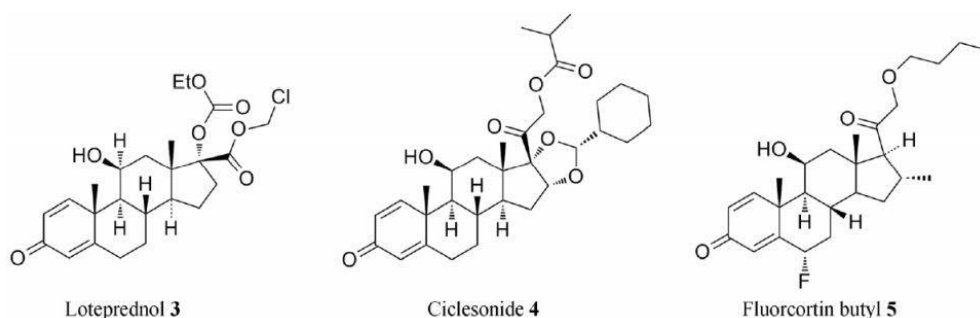


Figure 1 Examples of anti-inflammatory soft drugs

环索奈德(ciclesonide, 4) 作用于肺部, 可用于治疗哮喘和慢性阻塞性肺病。相比于早期开发的吸入性糖皮质激素, 环索奈德由于能在血浆中快速降解为无活性产物, 因此其具有更高的安全性。

氟考丁酯(flurcortin butyl, 5) 为局部皮肤用药, 在血浆中也可迅速降解失活。这些局部给药的酯类化合物在进入血液循环后会迅速通过水解酶水解失活, 从而降低化合物在体内的不良反应。

### 3 通过化学修饰提高血浆稳定性的策略

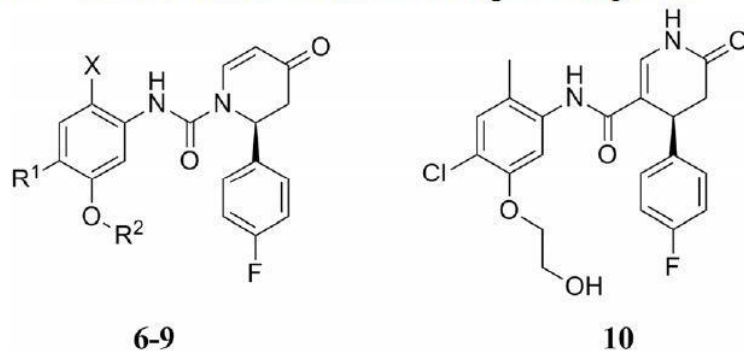
#### 3.1 生物电子等排

##### 3.1.1 酰胺替代易水解基团

根据血浆稳定性实验结果, 当化合物结构中存在易水解的基团时, 可以考虑用更加稳定的基团替换不稳定结构, 以提高化合物的血浆稳定性。

生物电子等排是改善化合物稳定性的重要结构修饰策略之一。它能以较小的结构变化达到提高化合物血浆稳定性的效果, 同时尽可能保持化合物的药理活性。由于酰胺基团相对于相同位置的酯基等易水解基团更稳定, 因此酰胺基团常常被用来替代一些易水解基团。

化合物 6 是由罗氏制药公司开发的一类结构新颖的 P2X7 受体拮抗剂 (表 2), P2X7 受体可能在炎症、免疫、神经性疾病和肌肉骨骼疾病等方面发挥重要作用。

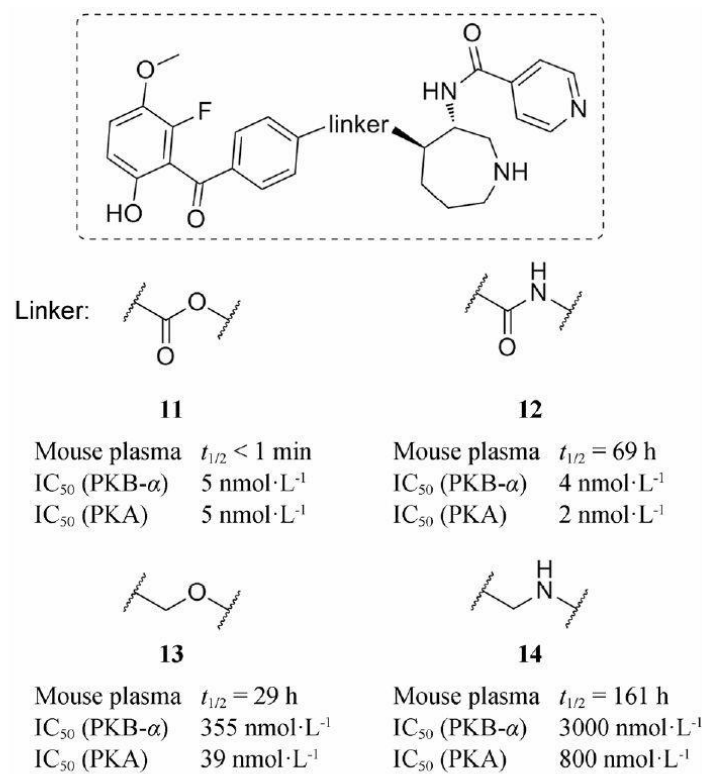
**Table 2** Plasma stabilities of P2X7 receptor antagonists

Compd.	X	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>	Plasma stability
6	Br	MeO	Me	9	—
7	Br	F	Me	32	—
8	Br	Cl	Me	37	—
9	Me	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	9	50% Degradation in human plasma at 4 h
10	—	—	—	23	Stable in both human and rat plasma

由于化合物 **9** 在人血浆中不稳定，其在血浆中孵育 **4 h** 就有 **50%** 的原型药物被降解。因此，研发人员将化合物结构中的脲基替换为酰胺基团得到化合物 **10**，从而大大提高了化合物的血浆稳定性，同时其活性也得到了较好的保持 (IC<sub>50</sub>=23 nmol·L<sup>-1</sup>)。

酯基是一类在药物结构中的常见基团，但有时药物中的酯基在体内易被酯酶水解，从而导致化合物失去活性。对于血浆水解作用，酰胺相对于酯更加稳定。研究表明：蛋白激酶 **B (PKB)** 的过度激活与肿瘤的发生发展密切相关。

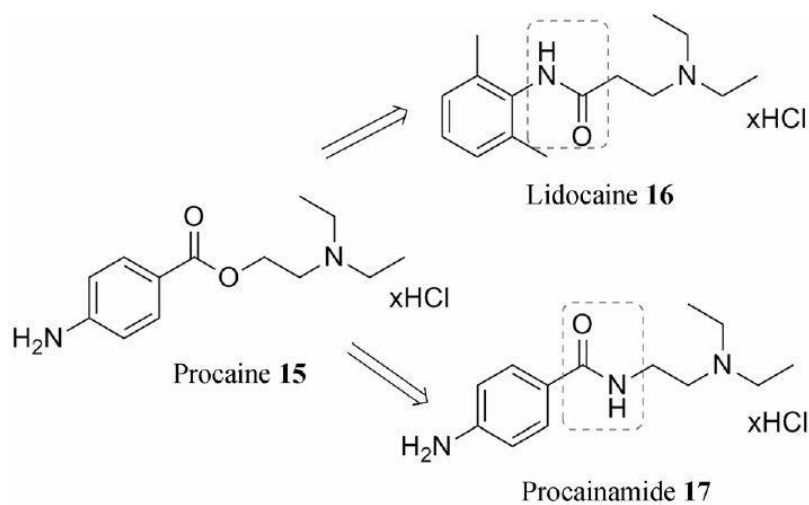
化合物 **11** (图 2) 是由罗氏制药公司开发的一种蛋白激酶 **B** 抑制剂 [IC<sub>50</sub>(PKB-α) = 5 nmol·L<sup>-1</sup>]，其结构中的酯基在血浆中极其不稳定，其在小鼠血浆中的半衰期小于 1 min。



**Figure 2** Plasma stabilities of PKB inhibitors

若用酰胺基团替换酯基得到化合物 12，其血浆半衰期可延长至 69 h，并且其对 PKB- $\alpha$  的抑制活性也得到了保持[ $IC_{50}$  (PKB- $\alpha$ )=4 nmol·L<sup>-1</sup>]。若将酯基替换为醚或者胺 (化合物 13 和 14)，尽管化合物的血浆稳定性大大提高 ( $t_{1/2}$ =29~161 h)，但是其抑制活性明显下降。

盐酸普鲁卡因 (procaine, 15) 是一类短效酯类局麻药 (图 3)，其药效维持时间约为 30~60 min。造成局部麻醉作用持续时间短的主要原因之一是由于其在体内易水解失效。



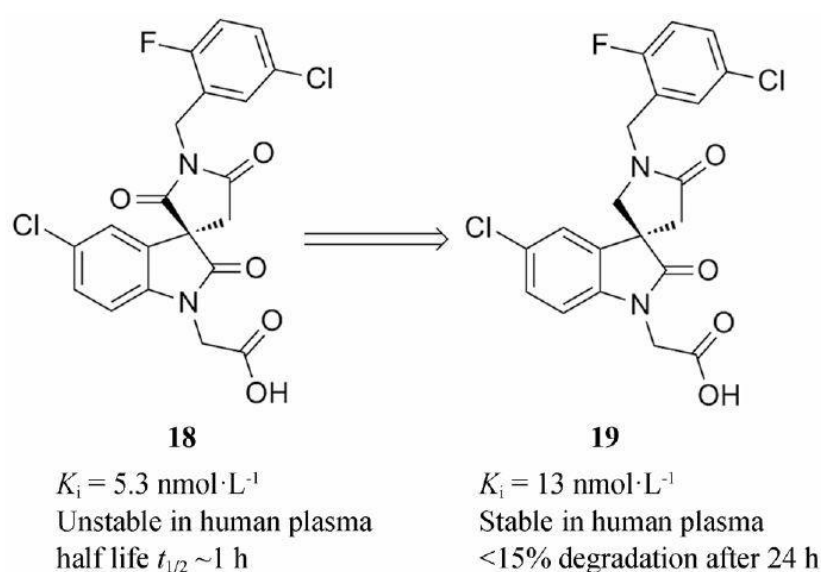
**Figure 3** Improving the plasma stability of local anesthetics by structural modification

盐酸普鲁卡因在体内的代谢过程主要是被血浆中的假性胆碱酯酶催化水解。为了延长其麻醉作用时间，研究人员随后开发出了盐酸利多卡因 (lidocaine, 16)。盐酸利多卡因与普鲁卡因结构的主要区别就在于其用酰胺键替换了普鲁卡因结构中的酯键，酰胺较酯的血浆稳定性更佳。

另外，在利多卡因酰胺键邻位引入两个甲基，增加了空间位阻作用，使得利多卡因在体内的水解速度明显减慢，同时其麻醉作用比普鲁卡因强 2~9 倍。

另外，仅从体内稳定性角度而言，将普鲁卡因结构中的酯基替换为酰胺得到抗心律失常药普鲁卡因胺(procainamide, 17)，其在体内的半衰期可提高至 3 h 左右。研究发现，前列腺素 D2 受体 (CRTH2) 在炎症和过敏性疾病中发挥重要作用。

化合物 18 是一种由默克公司研发的前列腺素 D2 受体 (CRTH2) 拮抗剂 (图 4)，该化合物在啮齿类动物和犬体内均展现了较好的药代动力学性质。



**Figure 4** Improving the plasma stability of CRTH2 receptor antagonists by structural modification

然而，在进一步的实验过程中发现化合物 18 在人血浆中的半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 约 1 h。通过分析代谢产物，研究人员发现，该化合物结构中的琥珀酰亚胺环结构易被水解酶水解开环。因此，他们对化合物 18 进行结构优化，将琥珀酰亚胺环替换为内酰胺环得到化合物 19。

化合物 19 在人血浆中孵育 24 h 后仅有不到 15% 的化合物发生降解代谢，使其活性得到保持。在药物开发初期阶段评价化合物的血浆稳定性具有重要意义，它可以避免化合物在进入药物研发后期由于稳定性问题而被迫终止的潜在风险。

### 3.1.2 含氮杂环替代易水解基团

许多含氮杂环都是酯基和酰胺基的生物电子等排体，采用含氮杂环替换易水解基团，可以提高药物的血浆稳定性。

头孢噻肟(cefotaximesodium, 20) 是一类对革兰阴性菌具有较强活性的抗生素 (图 5)，由于其结构中 C-3 位的酯基在血浆中易被水解，因此药物化学家将酯基

替换为较难水解的四氮唑杂环，提高了化合物的血浆稳定性，开发获得新型抗生素如头孢甲肟 (cefmenoxime,21) 等。

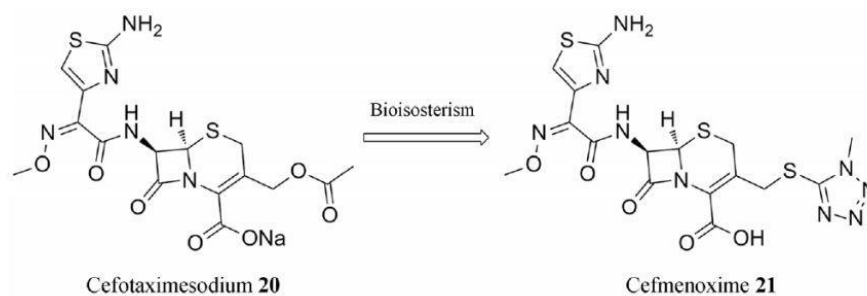


Figure 5 Plasma stability of cephalosporin antibiotics

化合物 22 是由葛兰素史克公司开发的人巨细胞病毒 (HCMV) 蛋白酶抑制剂 (表 3)，该化合物在分子水平具有较好的抑制活性和选择性，但是该化合物在人血浆中不稳定 ( $t_{1/2}=0.5$  h)。

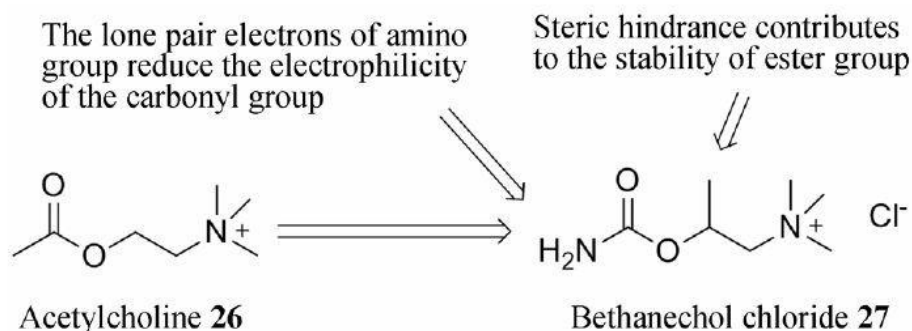
Table 3 Improving the plasma stability of HCMV inhibitors by structural modification

Compd.	R	Human plasma $t_{1/2}/h$	HCMV protease		Cytotoxicity $CCID_{50} / \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
			$IC_{50} / \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$K_i / \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	
22		0.5	0.2	24	274
23		>24	8.7		69
24		>24	1.5	446	280
25		>24	0.18	10	>500

血浆稳定性差影响了这类结构的后续研发。通过生物电子等排策略，将环丙烷基替换为苯环或者芳杂环，得到的化合物 23~25 在人血浆中的稳定性均显著提高 ( $t_{1/2} > 24$  h)，其中化合物 25 对人巨细胞病毒蛋白酶抑制活性也有所提高 ( $IC_{50}=0.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

### 3.1.3 改变易水解基团的电子效应

乙酰胆碱(acetylcholine, 26) 是体内一种重要的神经递质, 在血液内能迅速被胆碱酯酶破坏 (图 6)。

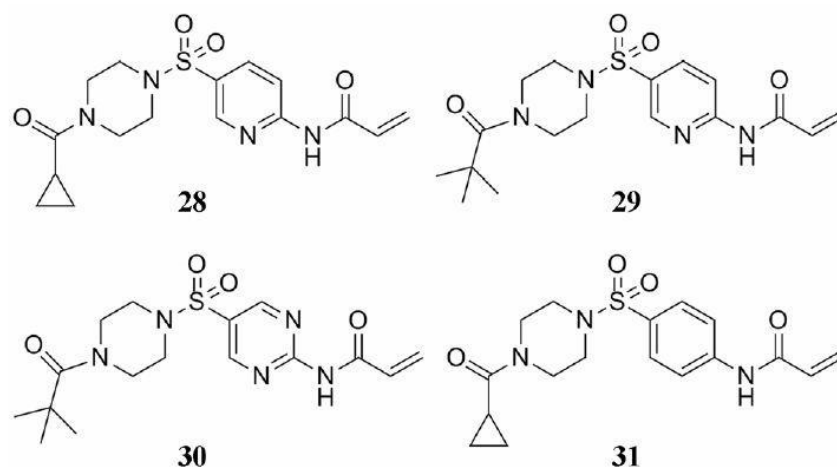


**Figure 6** Plasma stability of cholinergic drugs

为了寻找性质更稳定的拟胆碱药, 人们以乙酰胆碱为先导化合物, 将羰基邻位的甲基替换为氨基, 氨基的供电子效应能够有效降低羰基的亲电性, 另外, 在酯基邻位引入甲基还可以通过增加空间位阻效应, 提高氯贝胆碱(bethanechol chloride, 27) 的血浆稳定性。

化合物 28 是由 Evotec 公司开发的一种组织型转谷氨酰胺酶 2 (TG2) 抑制剂, 研究表明 TG2 的过度活化与脂泻病和亨廷顿舞蹈病密切相关 (表 4)。

**Table 4** Improving the plasma stability of transglutaminase 2 inhibitors by structural modification



Compd.	TG2 IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	Mouse plasma t <sub>1/2</sub> /min
28	0.18	33.5
29	0.097	31.5
30	0.026	14.3
31	0.11	209

化合物 28 对 TG2 具有较好的抑制活性, 但是其在小鼠血浆中的稳定性较差 (t<sub>1/2</sub>=33.5 min)。与其具有类似结构的化合物 29 和 30 的血浆稳定性也很差,

其中化合物 **30** 结构中由于氨基邻位嘧啶取代的吸电子效应更强，使其在血浆中被降解的速度更快，小鼠血浆中的半衰期仅为 **14.3 min**。利用生物电子等排策略，将结构中的吡啶环或嘧啶环替换为苯环，降低其取代基的吸电子效应，使酰胺键不易被水解酶水解，有助于提高化合物的血浆稳定性。化合物 **31** 不仅活性得到保持，而且在小鼠血浆中的稳定性也得到了明显改善 ( $t_{1/2}=209$  min)。

### 3.2 增加空间位阻作用

增加易水解基团附近的的空间位阻作用，可降低化合物与水解酶之间的亲和力，从而提高化合物的血浆稳定性。在前面的例子中 (表 3)，化合物 **22** 在人血浆中不稳定。研究人员在化合物 **22** 的环丙烷部分引入两个甲基取代，以增加酰胺键附近的的空间位阻，分别得到两个不同构型的化合物 **32** 和 **33**，它们在人血浆中的稳定性均有显著提高，并且化合物 **33** 的酶抑制活性也得到保持 (表 5)。

**Table 5** Improving the plasma stability of HCMV inhibitors by structural modification

Compd.	R	Human plasma	HCMV protease		Cytotoxicity
		$t_{1/2}$ /h	IC <sub>50</sub> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$K_i$ / $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	CCID <sub>50</sub> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>22</b>		0.5	0.2	24	274
<b>32</b>		1.5	1.8		375
<b>33</b>		6	0.3	16	219
<b>34</b>		16	>20		38

在环丙烷环上继续引入两个甲基增加位阻，尽管化合物 **34** 的血浆稳定性增加了，但是化合物的抑制活性大大下降。因此，通过增加空间位阻提高化合物的血浆稳定性需要精细修饰，才能获得较优的改造结果。同时，从这个例子也可以看出，手性对化合物的血浆稳定性和药理活性也有重要影响，这也是在进行结构改

造的过程中需要考虑的重要因素。研究表明,组织蛋白酶 C (Cathepsin C) 在败血症和炎症相关疾病中具有重要作用。

化合物 35 是由葛兰素史克公司开发的一种组织蛋白酶 C 抑制剂,由于化合物 35 在大鼠血浆中的稳定性不佳(表 6),对其苯环进行衍生化得到化合物 36 和 37,它们对组织蛋白酶 C 的抑制活性得到提高,但是其血浆稳定性并未得到改善。

**Table 6** Improving the plasma stability of cannabinoid receptor agonists

Compd.	Structure	Cat C pIC <sub>50</sub>	Cat B pIC <sub>50</sub>	Cat K pIC <sub>50</sub>	Cat S pIC <sub>50</sub>	Rat plasma (% left @ 30 min)
35		6.5	5.0	6.7	5.8	30
36		8.1	5.2	8.1	6.5	18
37		8.0	4.9	7.1	5.7	23
38		<4.6	<4.6	5.3	<4.6	95
39		<4.6	<4.6	<4.6	<4.6	≥100
40		8.7	<4.6	7.4	6.0	88

研究人员认为可能是结构中的氰基部分被血浆中水解酶降解,因此他们将氰基替换为醛基或者叔丁氧羰基得到化合物 38 和 39,尽管化合物在血浆中很稳定,但是化合物对组织蛋白酶 C 的抑制活性基本丧失。鉴于氰基对活性的重要影响,研究人员考虑通过降低氰基的亲电性同时增加邻位的空间位阻来稳定氰基。在吡咯环 C-5 位引入甲基得到化合物 40,其在血浆中的稳定性明显提高,同时化合物对组织蛋白酶 C 的抑制活性也进一步提高。

化合物 41 是一种蛋白酶激活受体 1 (PAR1)抑制剂(表 7),具有抗血小板活化功能。

**Table 7** Plasma stability of a series of PAR1 inhibitors

Compd.	Structure	Inhib./% IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	Plasma stability (% left @ 5 h) human/mouse
41		>99 0.26	80/2
42		60	73/1
43		>99 0.34	99/97
44		21	>99/>99
45		>99 0.29	90/65

化合物 41 具有较好的 PAR1 抑制活性和良好的理化性质,但是其在大鼠血浆中的稳定性较差。首先,研究人员采用生物电子等排策略,将结构中的一个酰胺基替换为苄胺基,得到化合物 42,但其血浆稳定性并未得到提高。然而,将另一个酰胺基用烷基胺替代,得到化合物 43,化合物 43 在保持活性的同时,其在人和大鼠的血浆中均能稳定存在(孵育 5 h 后分别有 99%和 97%的原型化合物剩余)。通过在酰胺键邻位引入位阻基团得到化合物 44 和 45。

尽管化合物 44 在人和鼠的血浆中足够稳定(孵育 5 h 后均有 99%的原型化合物剩余),但是其活性大大降低(在  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度时抑制率仅为 21%);而化合物 45 不仅对 PAR1 抑制活性得到保持,同时其在大鼠血浆中的稳定性也得到了明显改善(表 7)。

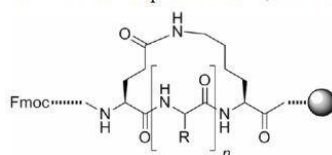
### 3.3 成环修饰

成环修饰是药物结构改造中的重要策略,通过限制化合物结构中某些化学键和基团的自由转动,使其能以特定构象与靶点作用,从而提高化合物的药理活性和稳定性。

多肽类药物的血浆稳定性较差。因此,提高肽类药物在血浆中的稳定性是药物研发过程中不可忽视的环节。对肽类化合物进行成环修饰,限制其分子构象,在不影响药理活性的同时,降低其与体内水解酶的亲和性,从而提高肽类药物的稳定性。而在利用成环修饰策略的时候,研究者需要考虑到成环的位置、氨基酸残基的选择以及环大小等因素。

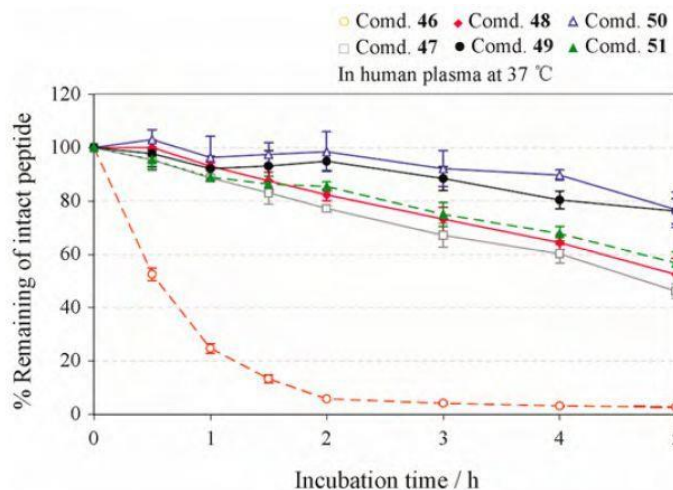
胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 静脉给药后,其在人体内的消除半衰期小于 2 min。化合物 47 是将 8 位丙氨酸替换为甘氨酸的 GLP-1 类似物(表 8),其表现出了较好的结合活性 ( $\text{IC}_{50}=2.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和功能活性 ( $\text{EC}_{50}=0.014 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

Table 8 A series of GLP-1 receptor agonists. \*CRE: cAMP response element; Luc: Luciferase



Compd.	Peptide	Binding affinity $\text{IC}_{50} \pm \text{SD}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	CRE/Luc*activation $\text{EC}_{50} \pm \text{SD}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
46	GLP-1(7-37)-NH <sub>2</sub>	$1.7 \pm 0.6$	$0.006 \pm 0.003$
47	[Gly <sup>8</sup> ]GLP-1(7-37)-NH <sub>2</sub>	$2.8 \pm 2.2$	$0.014 \pm 0.006$
48	[Gly <sup>8</sup> ,Aib <sup>22</sup> ]GLP-1(7-37)-NH <sub>2</sub>	$2.9 \pm 1.1$	$0.027 \pm 0.018$
49	c[Glu <sup>18</sup> -Lys <sup>22</sup> ][Gly <sup>8</sup> ]GLP-1(7-37)-NH <sub>2</sub>	$3.6 \pm 2.8$	$0.006 \pm 0.0003$
50	c[Glu <sup>18</sup> -Lys <sup>26</sup> ][Gly <sup>8</sup> ]GLP-1(7-37)-NH <sub>2</sub>	$2.1 \pm 1.7$	$0.010 \pm 0.004$
51	c[Glu <sup>18</sup> -Lys <sup>27</sup> ][Gly <sup>8</sup> ]GLP-1(7-37)-NH <sub>2</sub>	$1.9 \pm 1.1$	$0.008 \pm 0.007$

若进一步将若干连续的氨基酸成环得到化合物 49~51,这类化合物均保持了很好的药理活性,同时它们在人血浆中的稳定性也得到明显改善(图 7)。因此,利用成环修饰也是一种有效的提高化合物稳定性的结构改造策略。



**Figure 7** The stability of GLP-1 receptor agonists in human plasma

异羟肟酸基团是药物结构中常见的活性片段,例如伏立诺他 (SAHA) 结构中就含有该基团。然而,异羟肟酸基团在血浆中易被水解,影响了其药代动力学性质和药效作用的发挥。化合物 52 是一类疟原虫的锌金属蛋白酶抑制剂,其在小鼠血浆中的半衰期只有 0.8 h (表 9)。

**Table 9** Rat plasma stabilities of analogues of malonylhydroxamic acid

**52-55**

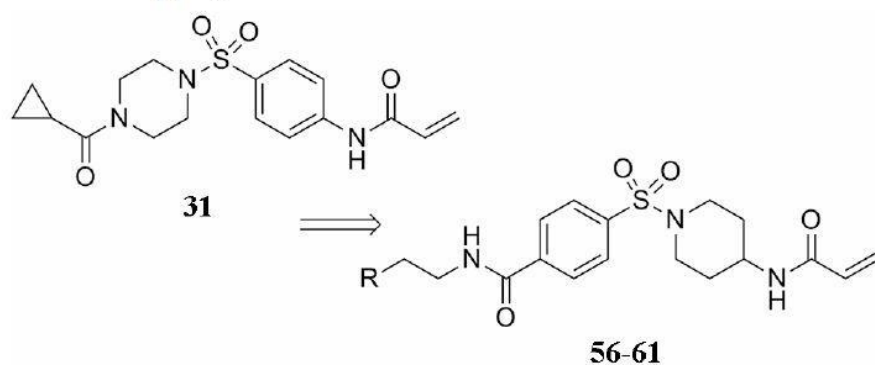
Compd.	R	Rat plasma $t_{1/2}$ /h
52		0.8
(Z)-53		22.0
(E)-54		4.1
55		>48.0

通过在异羟肟酸基团邻位引入双键考察其不同构型对化合物血浆稳定性的影响,发现化合物 (Z)-53 的血浆稳定性优于化合物 (E)-54,这可能是由于 Z 构型中苯环更靠近异羟肟酸基团,增加了空间位阻作用,使得水解酶不易接近该部位。进一步结构修饰得到化合物 55,其在血浆中的稳定性进一步提高 ( $t_{1/2}>48\text{ h}$ )。尽管文献中未给出这些化合物的药理活性数据,但是这类改造策略成功提高了化合物的血浆稳定性,为含有异羟肟酸结构片段化合物的结构改造提供了新的思路。

### 3.4 骨架跃迁

前述的化合物 31 对 TG2 的  $IC_{50}$  为  $0.11\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而其在血浆中的半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 为 3.5 h,仍然不够长。为了进一步提高化合物 31 的血浆稳定性,研究人员利用骨架跃迁的策略,得到一系列结构新颖的不可逆抑制剂(表 10, 化合物 56~61)。

**Table 10** Improving the plasma stabilities of compounds by scaffold hopping



Compd.	R	TG2 $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{h}$
<b>31</b>	—	0.11	3.5
<b>56</b>	$\text{C}_6\text{H}_5$	0.18	>6
<b>57</b>	4- $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4$	0.11	>6
<b>58</b>	7-quinoliny	0.31	>6
<b>59</b>	2- $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4$	0.23	>6
<b>60</b>	3- $\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4$	0.17	>6
<b>61</b>	3,4- $(\text{CH}_3)_2-\text{C}_6\text{H}_3$	0.18	>6

这些化合物对 TG2 的抑制活性均得到保持,同时它们在人和鼠血浆中的半衰期均大于 6 h。这可能是由于脂肪型的酰胺键反应性弱于芳香型的酰胺键,从而提高了其在血浆中的稳定性。

端锚聚合酶 (tankyrases) 属于聚 ADP-核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 蛋白家族成员,它能够促进  $\beta$ -catenin 降解,从而调节 Wnt 信号通路。抑制 tankyrases 对于治疗 APC (adenomatous polyposis coli) 突变的结直肠癌提供新的研究方向。

化合物 62 是 tankyrase-1 抑制剂 (tankyrase-1, TNKS1,  $IC_{50} = 10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但其在大鼠血浆中的半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 仅为 35 min。因此, 为了提高化合物在大鼠血浆中的稳定性, 研究人员对化合物 62 进行了一系列的结构改造。

在酰胺键邻位引入甲基增加位阻效应, 化合物 63 的血浆半衰期 ( $t_{1/2} = 43 \text{ min}$ ) 与 62 相当, 然而其对 TNKS1 的抑制活性有显著下降 ( $IC_{50} = 210 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

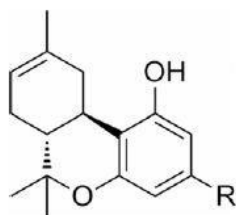
在酰胺键的邻位引入甲基得到化合物 64, 虽然其在大鼠血浆中的稳定性得到明显改善, 但是其抑制活性下降 ( $IC_{50} = 1.75 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。随后研究人员采用骨架跃迁的策略得到环己烷环骨架的化合物 65 和 66, 其中化合物 65 对 TNKS1 的抑制活性不仅得到保持, 其在大鼠血浆中的稳定性也大大提高( $t_{1/2} > 1000 \text{ min}$ ) (表 11)。

**Table 11** Improving the plasma stability of tankyrase-1 (TNKS1) inhibitors

Compd.	R	TNKS1 $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{min}$
62		0.01	35
63		0.21	43
64		1.75	270
65		0.03	>1 000
66		7.46	>1 000

化合物 67 是一种大麻素受体-1 (cannabinoid receptor-1, CB-1) 激动剂, 由于该结构中的酯基易水解, 其在大鼠血浆中的半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 仅为 0.7 min。当在酯基邻位引入偕二甲基增加空间位阻时, 化合物 68 对大鼠的大麻素受体的亲和力提高 50 倍以上, 同时血浆半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 也增加了 13 倍。而引入环丁烷骨架, 化合物 69 在大鼠血浆中的半衰期进一步提高 ( $t_{1/2}= 36.3$  min), 提升了化合物的血浆稳定性 (表 12)。

**Table 12** Improving the plasma stability of cannabinoid receptor-1 (CB1) agonists



Compd.	R	Rat CB1 ( $K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$t_{1/2}/\text{min}$
67		$27.1 \pm 4.5$	0.7
68		$0.5 \pm 0.1$	9.5
69		$0.7 \pm 0.2$	36.3

#### 4 结论

活性化合物的稳定性是影响其成药性的关键因素。化合物的血浆稳定性与肝代谢稳定性有时并不一致, 这是一个经常容易被人们忽视的因素。因此, 在早期先导化合物开发过程中, 有必要开展化合物的血浆稳定性研究, 尽早发现潜在的不稳定结构并对其进行必要的结构修饰, 或者挑选稳定性更佳的先导化合物开展进一步的新药研发。

通过将生物电子等排、增加空间位阻、成环修饰以及骨架跃迁这些结构改造策略综合运用, 改善化合物的血浆稳定性, 提高化合物的成药性质, 以期能够为候选药物的开发提供帮助。

## 先导化合物结构优化策略(七) —— 肽类分子结构修饰与改造

## 摘要

多肽分子大多为天然的内源性配体，与受体的亲和力强，选择性好，是一类比较容易成为先导化合物及药物的分子。许多药物都是从多肽分子进行结构优化改造而得，如降压药物卡托普利、抗丙肝药物特拉匹韦等。

目前多肽分子开发面临的主要问题包括稳定性差、半衰期短、血浆清除率高等低成药性缺陷；通常只能注射使用，患者的依从性较差；生产工艺复杂，生产成本较高。因此，对多肽分子进行合理的修饰和改造既可以降低肽类分子的生产成本，又可以改善肽类分子的成药性。

本文从改善肽类分子成药性的角度综述了肽类分子结构修饰与改造策略，根据是否对肽链骨架进行修饰，将修饰策略分为两类：一类是针对肽链骨架的改造，包括非天然氨基酸修饰、伪肽化策略、逆肽策略、环化策略、末端结构修饰等；另一类是在多肽骨架不变的基础上，引入其他基团进行结构优化和性能改造，包括高级脂肪酸修饰、聚乙二醇修饰、蛋白融合策略、胆固醇修饰等。

## 关键词

多肽；结构改造；药物设计；先导化合物

## 正文

多肽是由各种氨基酸分子之间脱水形成肽键相连的有机物，其分子质量在 1~10 kDa，介于小分子和生物大分子之间。存在于体内的诸多信号分子都属于肽或蛋白质，疾病的发生发展离不开这些肽或蛋白质。就目前已知的活性肽而言，大部分都是由机体分泌或代谢转化而来。

因此，按照活性肽的来源可以将肽分为两类：第一类是来源于生物体本身的蛋白质及活性肽，称为内源性活性肽。内源性活性肽在体内含量少、分布广、效应极强。第二类是来源于动植物的活性多肽以及抗生素等，称为外源性活性肽。外源性活性肽作用强、分布广泛。内源性活性肽和外源性活性肽构成的多肽库为药物研发提供了新颖的结构骨架，许多上市药物都源自多肽化合物的发现。

但是经典的多肽结构对体内蛋白酶的稳定性较差，进入体内很快会被降解；此外，大多生物活性肽生物利用度比较差，无法口服，需要通过改变剂型进而研发获取适合的给药途径。基于以上这些因素，需要对活性肽进行结构修饰与化学改造[1]。

活性肽改造的目的多种多样，主要包括提高活性肽与受体的亲和力及选择性；增强多肽分子的药代稳定性，降低活性肽在体内的降解或者减少活性肽在体内的消除；提高活性肽的透膜能力；改善疏水肽的水溶性等。本文针对不同改造目的总结归纳了肽类分子结构修饰改造策略，根据是否对肽链骨架进行修饰，将这些修饰策略分为两类：一类是针对肽链骨架的改造，包括非天然氨基酸修饰、伪肽化策略、逆肽策略、环化策略、末端结构修饰等；另一类是在多肽骨架不变的基础上，引入其他基团进行结构优化和性能改造，包括高级脂肪酸修饰、聚乙二醇修饰、蛋白融合策略、胆固醇修饰等。通过综合运用这些先导化合物结构修饰策略，能够显著提高多肽类化合物的成药性，为开发多肽类创新药物提供理论指导和实践经验。

内容由凡默谷小编查阅文献选取，排版与编辑为原创。如转载，请尊重劳动成果，注明来源于凡默谷公众号。

## 1 提高肽类分子活性

药物的化学结构与药理活性之间的关系一直都是药物化学领域的重要研究内容。活性是化合物开发成药物的前提，多肽也是如此。部分天然肽类分子或人工合成的肽生物活性差，需要通过化学修饰提高肽类分子与受体的亲和力，改善肽的活性。提高肽类分子活性的主要方法包括末端结构修饰、拼接策略、环化策略、非天然氨基酸修饰、伪肽策略以及胆固醇修饰等。

### 1.1 肽链骨架改造

对肽链骨架进行修饰和改造以提高肽类分子活性的主要方法包括末端结构修饰、拼接策略、环化策略、非天然氨基酸修饰、伪肽策略等。

#### 1.1.1 N-Cap 结构修饰

N 端裸露和 C 端裸露的多肽容易受到肽链外切酶的认识，从而被切割降解失去活性。而将 N 末端和 C 末端进行结构修饰，一方面可以提高肽类分子的代谢稳定性，另一方面可以保持甚至提高肽类分子的活性。Stoermer 等[2]报道了三肽(KKR 序列) 醛类化合物作为西尼罗病毒(west Nilevirus, WNV) 蛋白酶抑制剂；尹正课题组报道了三肽(KRR 序列) 醛类化合物作为登革热病毒(Denguevirus, DENV) 蛋白酶抑制剂，并且相较于其他四肽醛类化合物活性显著提高[3]。

基于此类研究报道,Andreas 等[4]认为不同氨基末端结构修饰的三肽醛类化合物对活性有不同影响，因此他们对 N 端 Cap 区进行考察，得到不同酰基化修饰的三肽醛类化合物，并且发现不同酰基化修饰对化合物的抗病毒活性有较大影响(表 1)[4]，可以看出 N 端苯乙酰基修饰的三肽醛 2 对登革热病毒和西尼罗病毒都有较好的抑制活性，而 N 端 4-苯基苯乙酰基修饰的三肽醛 11 相比于 2 对西尼罗病毒的抑制活性提高近 7 倍。这一点表明氨基末端的结构修饰对肽类化合物的活性有一定影响，可以作为肽类化合物改造的一种策略。

**Table 1** N-cap structure modification to affect anti-viral activity against viral protease [4]

Compd.	Peptide inhibitor	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	
		DENV2	WNV
1	Benzoyl-n-K-R-R-H	9.5 ± 0.21	2.6 ± 0.02
2	Phenylacetyl-K-R-R-H	6.7 ± 1.1	0.39 ± 0.21
3	Phenylacetyl-K-K-R-H	167 ± 47	0.70 ± 0.04
4	4-Aminobenzoyl-K-R-R-H	201 ± 33	22.4 ± 4.6
5	4-Aminobenzoyl-K-K-R-H	>300	33.5 ± 0.62
6	Acetyl-K-R-R-H	58 ± 7.2	2.4 ± 0.02
7	Acetyl-K-K-R-H	115 ± 23	0.97 ± 0.64
8	Propionyl-K-R-R-H	218 ± 18	8.5 ± 0.40
9	Propionyl-K-K-R-H	>300	0.85 ± 0.11
10	4-Phenylphenylacetyl-K-R-R-H	23.4 ± 1.4	0.99 ± 0.04
11	4-Phenylphenylacetyl-K-K-R-H	12.2 ± 0.38	0.056 ± 0.004
12	4-Aminophenylacetyl-K-R-R-H	11.2 ± 0.28	1.9 ± 0.03
13	2-Naphthoyl-K-R-R-H	26.7 ± 0.11	1.8 ± 0.03
14	Cinnamoyl-K-R-R-H	15.8 ± 4.5	1.4 ± 0.11
15	Phenylpropionyl-K-R-R-H	>300	19.7 ± 1.29
16	Benzoyl-K-K-R-H	127 ± 2.1	0.42 ± 0.18
17	Cyclopropionyl-K-K-R-H	172 ± 10	0.38 ± 0.02
18	Trifluoroacetyl-K-K-R-H	274 ± 27	1.8 ± 0.21

### 1.1.2 C-末端结构修饰

与氨基端结构修饰相对应,羧基端结构修饰在肽类分子的修饰改造也具有广泛应用, C-末端结构修饰策略成功地在各类病毒蛋白酶抑制剂的结构改造中使用。丙肝病毒 NS3/4A 蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶, 目前大部分丝氨酸蛋白酶抑制剂都含有亲电基团, 与催化三联体的丝氨酸羟基形成共价键。

研究人员从十肽底物出发经过肽链的简化以及羧基末端结构修饰得到活性肽醛 19, 其对 HCV NS3/4A 蛋白酶的结合常数为 12 μmol·L<sup>-1</sup>, 但醛基的化学和代谢稳定性较差。

因此, 研究人员对醛基末端进行结构修饰, 以 α-卤代酮、杂代酮、α-二酮和 α-酮酰胺替换醛基, 得到的酮酰胺化合物 20 对丝氨酸蛋白酶 NS3/4A 的结合常数提高了 12 倍。分析酮酰胺 20 与丝氨酸蛋白酶的相互作用(图 1), 研究人员发现酮酰胺结构既可以与 139 位丝氨酸形成共价结合, 又可以与附近的 137 位谷氨酸和 138 位丝氨酸残基形成氢键作用, 增强了化合物与 NS3/4A 蛋白酶的结合, 因而其抗病毒活性提高[5]。

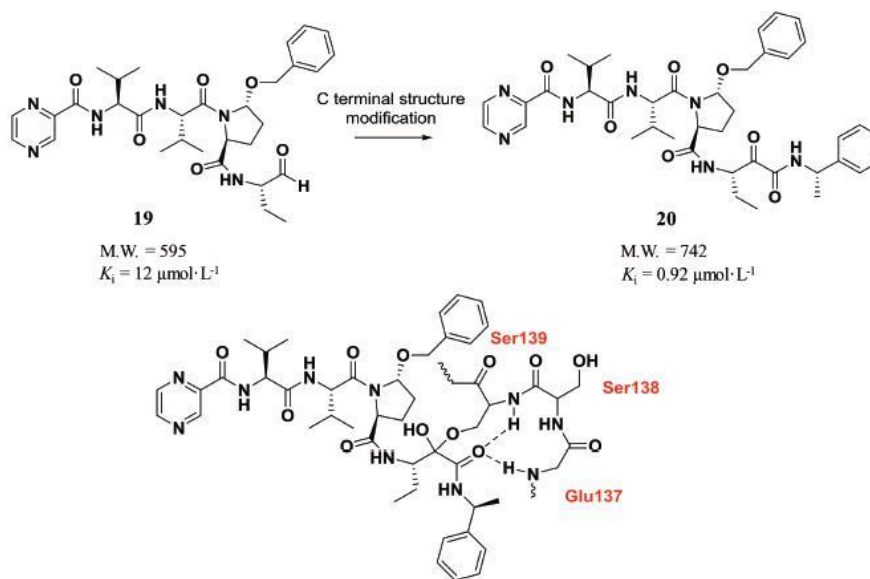


Figure 1 C-terminal structure modification to improve activity against serine protease

EV71 3C 蛋白酶是一种半胱氨酸蛋白酶。尹正等[6]发现了对 EV71 病毒具有较好抑制活性的肽醛分子 21 ( $EC_{50} = 0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 考虑到醛基的稳定性较差, 成药性质不佳。他们在进一步的结构修饰中, 针对醛基进行结构优化, 得到羟基氰类化合物 22, 该化合物对 EV71 的活性为  $0.056 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

通过分子对接, 分析化合物 22 与 EV71 3C 蛋白酶的相互作用, 分子对接结果表明(图 2), 相比于醛基, 羟基氰结构中的氰基与 146 位谷氨酰胺和 24 位谷氨酸通过水分子形成氢键, 增强了化合物与 EV71 3C 蛋白酶的结合, 因而活性得以提高[6,7]。

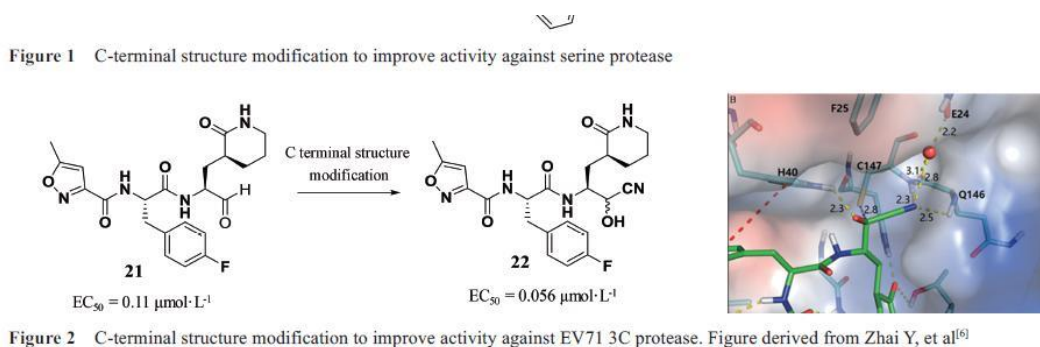


Figure 2 C-terminal structure modification to improve activity against EV71 3C protease. Figure derived from Zhai Y, et al<sup>[6]</sup>

### 1.1.3 拼接策略

在肽类化合物的改造中, 往往需要对不同位点同时进行优化和改造, 拼接策略是一个高效的结构优化方法。首先, 分别对 N 端和 C 端结构修饰改造得到活性较优的化合物, 然后将优势片段进行拼接, 即可快速获得活性更高的化合物。拟肽化合物 23 是一个登革热病毒蛋白酶抑制剂, 其抑制活性  $IC_{50}$  为  $13.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

在该化合物改造的过程中，研究人员就采用了分别优化 N 端和 C 端的研究策略。在 N 端结构改造中，研究人员发现肽类分子 24，即 N 端 Cap 结构修饰的化合物，活性提升，其  $IC_{50}$  达到  $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 C 端侧链改造过程中研究人员也发现将正丁基侧链替换为苯基得到化合物 25，同样可以提高化合物对登革热病毒的抑制活性，活性提升近 4 倍。考虑到这两个修饰策略都可以提高化合物的活性，研究人员将两个优势片段组合拼接，得到化合物 26，其对登革热病毒的抑制活性为  $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，活性提高了近 20 倍(图 3)[8]。

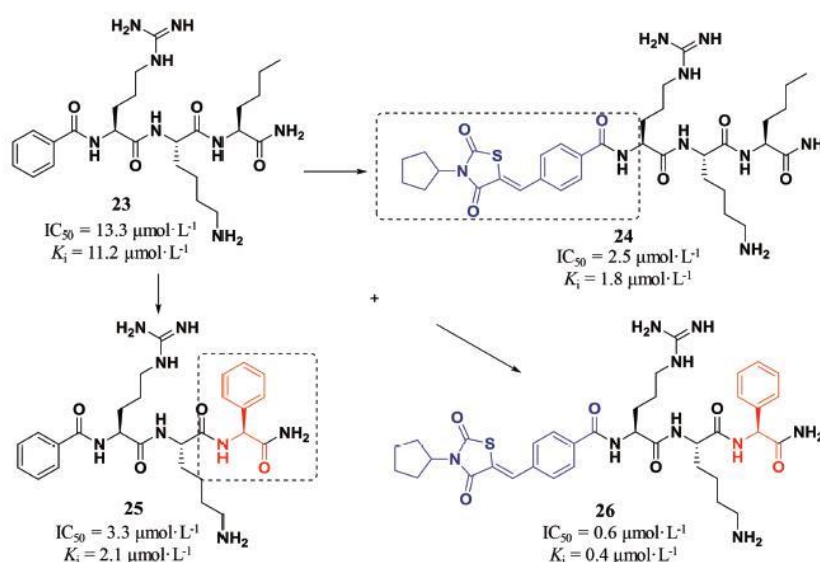


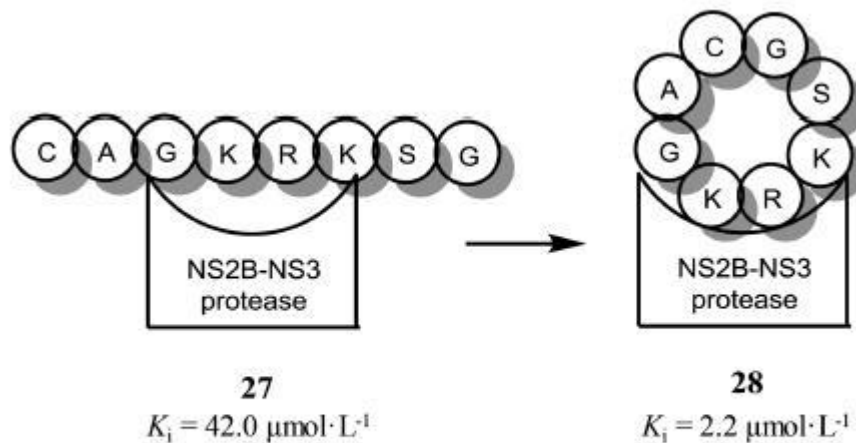
Figure 3 Splicing strategy to improve DENV inhibitory activity

#### 1.1.4 环化策略

许多情况下，直链肽的分子柔性造成构象发生变化，使其与受体结合的强度及选择性下降。此外，生物体内的氨肽酶及羧肽酶也易于从直链肽两个端基逐步切割肽链，使之降解。因此肽链的环化改造，使其构象限定是改善肽类分子生物稳定性、提高生物活性的重要结构改造策略[9]。

研究表明，从直链肽改为环肽后，许多化合物的生物活性提高十几倍至几万倍。许多具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等活性的天然产物肽往往含有不同类型的主链环化结构。因此，环化策略是多肽结构修饰改造的一个重要策略。

线性八肽化合物 27 对登革热病毒 NS2B-NS3 蛋白酶有较弱的结合活性( $K_i = 42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。Xu 等[10]推测线性肽结合活性较差的原因可能是线性肽占用的空间较大，无法与蛋白酶有效地结合；而用环肽则可以改变线性肽所占用的空间，提高化合物对 NS2B-NS3 蛋白酶的结合活性。他们设计合成了系列环肽结构，并且对这类环肽的结合活性进行测试。发现环肽 28 的构象使得其可以较好地与登革热病毒 NS2B-NS3 蛋白酶结合，相较于线性肽活性提高近 20 倍， $K_i$  值达到  $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 4)。



**Figure 4** Cyclization strategy to improve activity against NS2B-NS3 protease. Figure derived from Xu SQ, et al<sup>[10]</sup>

除了首尾相连的大环化策略，局部环化往往能够局部限定环化区域的肽类化合物构象，稳定肽类化合物与受体的相互作用，提高肽类化合物的活性。信号传导及转录激活因子 **STAT3** 是一种直接将细胞外受体的信号传递至核内的转录因子。**STAT3** 的持续激活会促进细胞增殖从而形成肿瘤并且抑制肿瘤细胞凋亡 [11-13]。

美国密歇根大学王少萌等[14]早期发现 gp130pYLPQTV 肽 29 与 **STAT3** 受体有较强的亲和力。研究表明，gp130 磷酸肽中的苏氨酸和缬氨酸可以被苄胺替代而不改变肽和 **STAT3** 之间的结合活性，因此，研究人员切断苏氨酸和缬氨酸并用苄胺封闭碳端，得到了截断磷酸肽 30，30 与 **STAT3** 受体的结合力  $K_i$  为  $350 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过分子对接，他们发现亮氨酸侧链异丁基和脯氨酸五元环可以并环形成双环内酰胺结构而不破坏肽 30  $\beta$  转角的构象。因此，采用局部环化策略，他们设计合成了构象限制的双环类肽化合物 31，其与 **STAT3** 受体的结合力  $K_i$  为  $17 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，活性提高了近 20 倍。分子对接结果表明，双环内酰胺结构可以很好保持 30 的  $\beta$  转角构象。为了验证 Cbz 保护基是否和肽 31 与 **STAT3** 受体结合相关，他们将苄氧羰基替换为乙酰基，得到的肽 32 与 **STAT3** 受体的结合力  $K_i$  值为  $15 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，与肽 31 活性相当，说明 Cbz 并非活性必须。随后，他们评价了肽 32 对两种含有高磷酸化 **STAT3** 受体的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MDAMB-468 的抑制活性，但 32 在  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  水平下对这两种肿瘤细胞并没有表现出抑制活性，可能是磷酸肽的极性太大，无法通过细胞膜。为了增强 32 对肿瘤细胞的抑制活性，他们将高级脂肪酸引入磷酸肽的氮端，得到了脂肪酸修饰的磷酸肽 33，33 与 **STAT3** 受体的结合力  $K_i$  值为  $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而且肽 33 对两种细胞的抑制活性  $IC_{50}$  分别为 25 和 35  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，在细胞水平显示了一定的抑制活性，也表明脂肪酸修饰可以改变肽类化合物的性质，提高肽类化合物的透膜性(图 5)[15]。

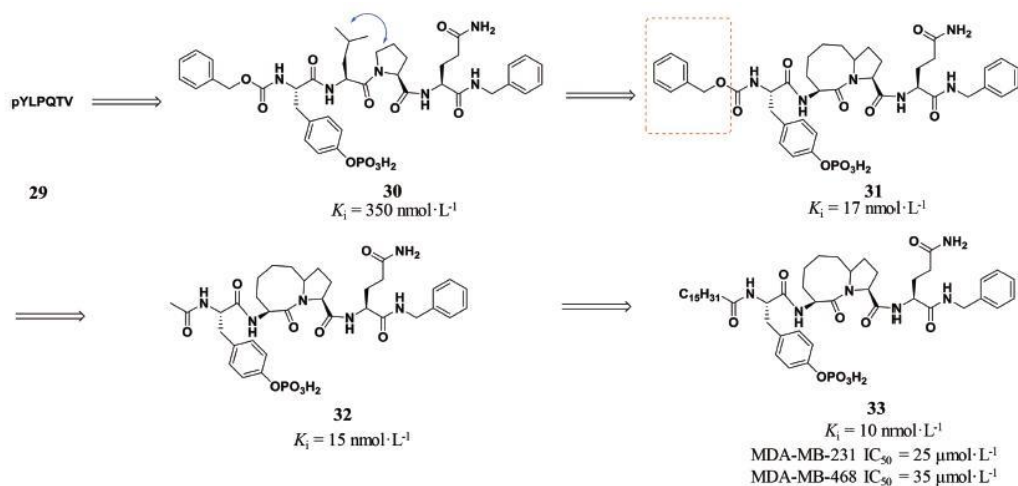


Figure 5 Partial cyclization strategy to improve peptide binding affinity with STAT3 receptor

### 1.1.5 非天然氨基酸修饰

卡托普利是第一个报道的血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme,ACE) 抑制剂, 1981 年被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗高血压。临床研究表明, 卡托普利的巯基可能会引起患者皮疹和食欲减退等不良反应。为了解决这一问题, 研究人员研发新型 ACE 抑制剂作为降压药物。

在卡托普利研发早期, 活性化合物 **34** 具有一定的 ACE 抑制活性, 其  $\text{IC}_{50}$  为  $4.9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对 **34** 的亚甲基用氮原子进行生物电子等排, 得到二肽先导化合物 **35**, 其活性提高 1 倍[16]。由于氮原子的引入, 化合物的亲水性有所增强; 为了平衡氮原子引起的亲水性增强, 研究人员尝试在氨基酸的  $\alpha$  位引入烷基侧链平衡亲水性变化, 结果得到的化合物 **36** 活性进一步增强至  $0.09 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

随后, 研究人员对  $\alpha$  位烷基侧链进行了详细的构效关系考察, 最终确定苯乙基取代时, 活性最优[17], 将羧基乙酯化开发获得前药依那普利 **37**, 依那普利于 1985 年被美国 FDA 批准用于高血压和心力衰竭的治疗。**37** 对 ACE 的抑制活性相比于 **36** 活性提高了 74 倍, 表明非天然氨基酸的引入可以增强肽类分子的药理活性(图 6)。

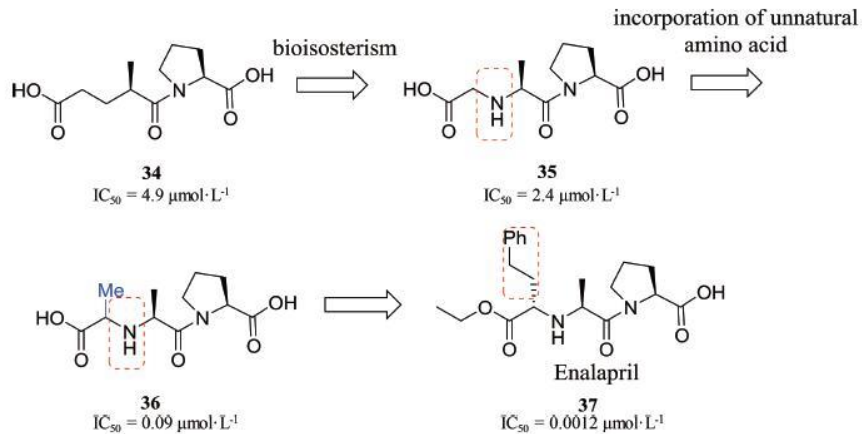


Figure 6 Introduction of unnatural amino acids to improve ACE inhibitory activity

### 1.1.6 伪肽策略

伪肽则是通过模拟多肽水解的过渡态，利用生物电子等排原理对易水解的酰胺键进行替换，使多肽免于蛋白酶的水解切割从而保留甚至提高肽类化合物的药理活性。图 7 列出了一些伪肽的代表结构[18]。

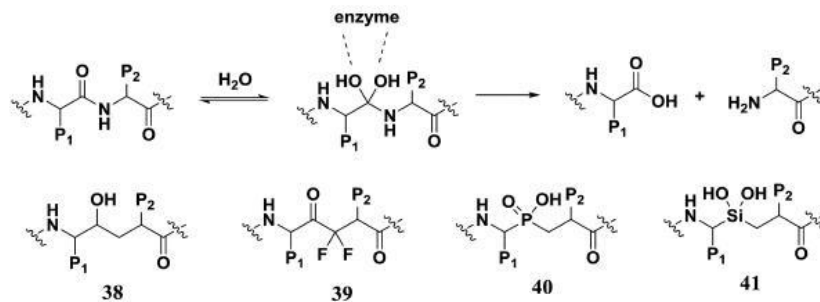


Figure 7 Representative structures of pseudopeptides

片段 38 (羟基亚甲基) 是众多 HIV 蛋白酶抑制剂、肾素抑制剂和  $\beta$ -分泌酶抑制剂[19]共有的结构片段。其基本的设计原理就是利用伪肽策略，模拟酰胺键水解过程中的过渡态，替换易水解的酰胺键。Szelke 等[20]通过在肾素底物 42 的亮氨酸-缬氨酸(Leu-Val) 片段中采用羟基亚甲基替换酰胺键，得到伪肽抑制剂 43，对 HIV-1 蛋白酶抑制活性显著提高(图 8)，其 IC<sub>50</sub> 值为 0.000 7  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

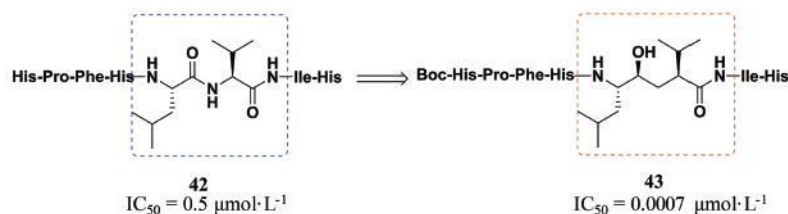


Figure 8 Pseudopeptide strategy to improve anti-HIV-1 protease activity

其中缩硅酮片段 41 也有广泛应用，由于碳原子和硅原子同属一个主族，两个原子的性质十分相似，而硅原子相比碳原子更倾向于  $sp^3$  杂化，片段 41 不容易发生消除反应生成硅酮，缩硅酮的稳定性要高于缩酮，因此在设计和改造活性肽的时候引入 41 片段既可以增强与酶活性中心的相互作用，又具有一定的化学稳定性，在药物化学化合物设计中具有广泛应用(图 9)。

片段 41 在很多活性肽类似物分子上显示出良好活性，例如含有片段 41 的 ACE 抑制剂 44，其对 ACE 酶的抑制活性达到了  $3.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ；而含有片段 41 的 HIV 蛋白酶抑制剂 45 对蛋白酶的抑制活性也达到  $2.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，表明该类结构在活性肽结构改造中有重要意义[21]。

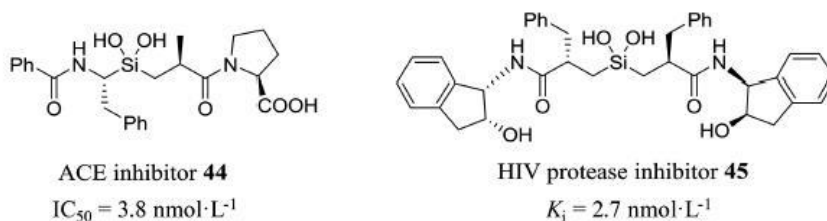


Figure 9 Representative silicon containing pseudopeptide inhibitors

## 1.2 外接基团修饰

外接基团修饰以提高肽类分子活性的主要方法是胆固醇修饰。

胆固醇修饰也是多肽类分子的重要结构修饰策略。胆固醇的引入常常可以在提高其在体内半衰期的同时增强多肽的药理活性。Wang 等[22]用细胞-细胞融合实验评价多肽分子的抗病毒活性，发现多肽 m4HR 具有一定抗 HIV-1 活性 ( $IC_{50} = 36\ 910 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。当在 m4HR C 末端外接胆固醇分子得到化合物 46，其抗病毒活性提高 200 倍 ( $IC_{50} = 57.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。进一步在 N 端修饰，得到的肽类化合物对 HIV-1 的抑制活性进一步提升(表 2)。其中活性最好的是肽类分子 47，其  $IC_{50}$  达到  $8.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，该类化合物结构优化的实例进一步证明了胆固醇修饰在多肽药物活性优化的重要应用。

**Table 2** Cholesterol conjugation to improve anti-viral activity against HIV-1

Compd.	Structure	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>
m4HR	Ac-IEELIKKSEELIKKIEEQIKKQE ESIKK-NH <sub>2</sub>	36 910 ± 2 047
46	Ac-m4HR-βAla-C(Chol)-NH <sub>2</sub>	57.2 ± 15.9
47	Aoc-βAla-m4HR-βAla-C(Chol)-NH <sub>2</sub>	8.3 ± 2.6
48	Noc-βAla-m4HR-βAla-C(Chol)-NH <sub>2</sub>	8.9 ± 1.8
49	Apc-βAla-m4HR-βAla-C(Chol)-NH <sub>2</sub>	17.0 ± 11.3
50	Npc-βAla-m4HR-βAla-C(Chol)-NH <sub>2</sub>	15.8 ± 0.9

内容由凡默谷小编查阅文献选取，排版与编辑为原创。如转载，请尊重劳动成果，注明来源于凡默谷公众号。

2

## 增强多肽分子的药代稳定性

多肽的基本组成单元是氨基酸,其本质与蛋白质相同,因而多肽类分子是许多蛋白酶水解的底物,而这一特点严重限制了多肽类药物的开发研究。一般而言,大部分多肽类药物无法口服,否则就会被胃蛋白酶以及胰蛋白酶等消化破坏;其次,即使通过注射给药,多肽类药物也有可能在血液以及组织中被蛋白酶降解失活,因此多肽类药物的生物利用度很低,以至于多肽类分子在临床治疗中受到很大限制[23]。为了减弱或避免蛋白酶对多肽类分子的降解,必须要利用化学方法或其他方法对多肽分子进行修饰改造,以提高多肽的代谢稳定性,为新药研发中解决多肽的代谢稳定性问题提供一些思路和参考。增强多肽分子代谢稳定性的主要方法包括非天然氨基酸修饰、伪肽化策略、逆肽策略、环化策略以及高级脂肪酸修饰、蛋白融合策略、聚乙二醇修饰等。

### 2.1 肽链骨架改造

对肽链骨架进行修饰和改造以增强多肽分子代谢稳定性的主要方法包括非天然氨基酸修饰、伪肽化策略、逆肽策略、环化策略等。

#### 2.1.1 非天然氨基酸修饰

天然活性肽的组成常常都是天然氨基酸。天然活性肽容易受到体内蛋白酶降解,从而降低其在体内的半衰期,导致天然活性肽在体内发挥药效时间缩短,不利于成药。β氨基酸作为非天然氨基酸,在体内不易被蛋白酶识别水解,在活性肽的结构改造与修饰中发挥重要作用。

化合物 51 是一个神经降压素,其作用于神经降压素受体 1 和 2(NTSR1 和 NTSR2)两个亚型。神经降压素及其受体与痛觉缺失的调节、食物摄取以及肿瘤生长具有密切关系[24]。研究人员对神经降压素 51 进行结构优化,经过截断策略得到了含有第八位到第十三位氨基酸序列的简化肽

52(NTSR1 $K_i=0.24\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; NTSR2 $K_i=1.2\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),其对 NTSR1 和 NTSR2 受体的活性均比神经降压素 51 有所提高。然而,简化肽 52 容易受到体内酶代谢作用,因此其在体内半衰期很短。针对这一特点,研究人员尝试引入  $\beta$  氨基酸(图 10),得到活性肽 53,其对 NTSR1 和 NTSR2 受体的活性虽然下降(NTSR1 $K_i=8\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; NTSR2 $K_i=25\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),但半衰期延长至 32h。

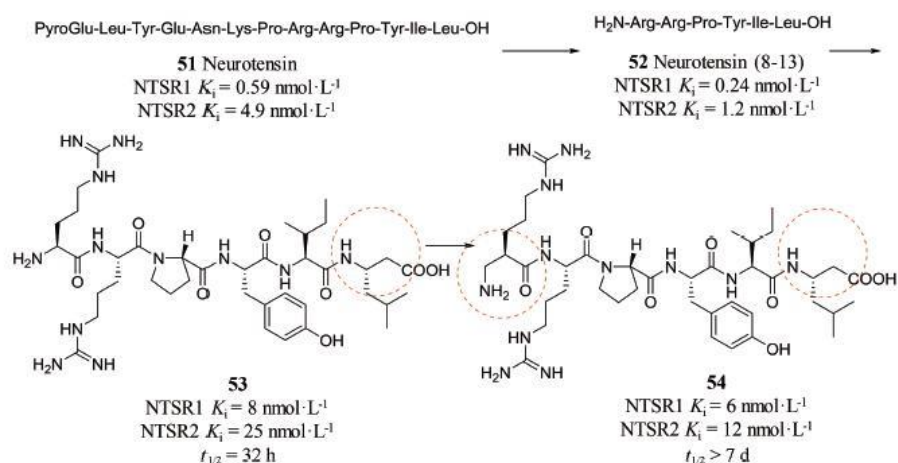


Figure 10 Introduction of  $\beta$ -amino acids to improve the metabolic stability of peptides

之后研究人员又将 N 端的精氨酸替换为  $\beta$ -精氨酸得到肽 54。54 相比于 53 活性略有提高(NTSR1 $K_i=6\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; NTSR2 $K_i=12\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),而且 54 的半衰期大于 7 天[25,26],极大地提高了活性肽在体内的停留时间,增强了活性肽在体内的药代稳定性。

肽类小分子 55 是一个广泛研究的金属蛋白酶 EP24.15(endopeptidase)抑制剂。EP24.15 与下丘脑对垂体功能的调节及血压调节有重要关联,文献报道 EP24.15 还可能与  $A\beta$  蛋白的聚集和阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)相关,因此 EP24.15 是精神系统疾病的研究热点。虽然肽类小分子 55 对 EP24.15 的抑制活性很强( $IC_{50}=0.06\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),但它容易受到与 EP24.15 相关的蛋白酶——中性内肽酶 EP24.11 水解。因此,研究人员的主要研发目标是提高 55 对中性内肽酶 EP24.11 的稳定性。他们尝试将 55 中的丙氨酸、酪氨酸和羧基末端分别用  $\beta$ -丙氨酸、 $\beta$ -苯丙氨酸和  $\beta$ -氨基丙氨酸替换,得到  $\beta$  肽 56 对 EP24.15 的抑制活性虽然有所下降( $IC_{50}=2.8\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),但对中性内肽酶 EP24.11 的稳定性显著提高(图 11),几乎不受其降解影响[27]。

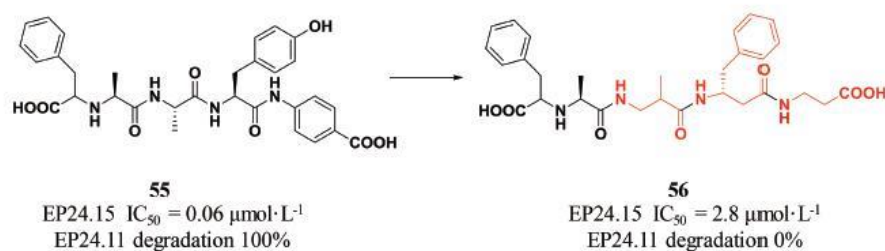


Figure 11 Modification of 55 with  $\beta$ -amino acids to yield an inhibitor with complete stability against EP24.11

研究人员用图 12 的示意图解释引入  $\beta$  氨基酸可以提高肽类分子对中性内肽酶的稳定性。对于天然  $\alpha$  多肽,在特异性的蛋白酶切割位点,水分子首先与酰胺键形成氢键作用,从而有利于水分子对酰胺键的进攻最后完成酰胺键的切割;对  $\beta$  多肽而言,由于增加了一个亚甲基,多肽整体的构象发生变化,原本蛋白酶切割中心的水分子无法与酰胺键形成氢键,不利于蛋白酶对酰胺键的切割,因而  $\beta$  多肽比  $\alpha$  多肽具有更强的抗水解能力[28]。

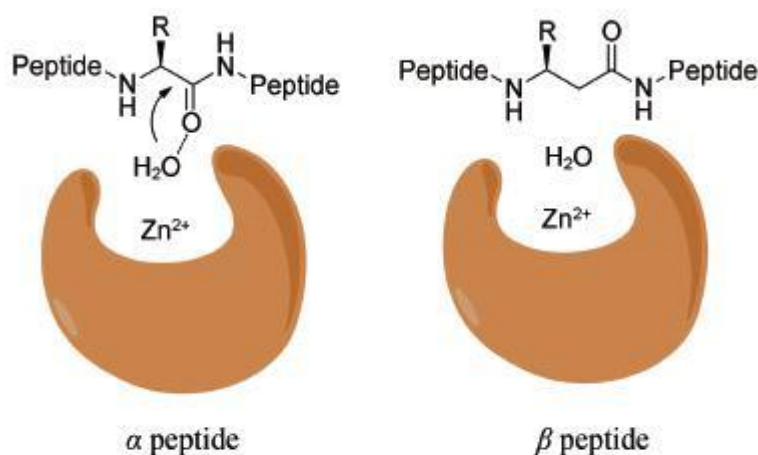


Figure 12 Schematic diagram of how a  $\beta$ -peptide may not be cleaved by the peptidase

阿片受体与疼痛密切相关,主要包括  $\mu$  受体、 $\delta$  受体和  $\kappa$  受体等几种亚型。阿片肽则是一种内源性神经递质,通过与这些受体结合发挥药理作用。研究人员发现内吗啡肽 57 是  $\mu$  受体的内源性底物肽,具有较强的药理活性,其对  $\mu$  受体的激动活性为  $14.40\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,相较于吗啡不会产生严重的不良反应;而且,内吗啡肽在有效剂量下不易诱发呼吸抑制和心血管疾病。因此,内吗啡肽引起了科学家的广泛关注。然而,内吗啡肽仍存在问题,其中之一就是其代谢稳定性较差,半衰期仅为 16.9min。兰州大学王锐团队发现含有非天然氨基酸的内吗啡肽类似物具有较强的代谢稳定性(图 13),而且可以在一定程度上进一步提高内吗啡肽对  $\mu$  受体的活性。

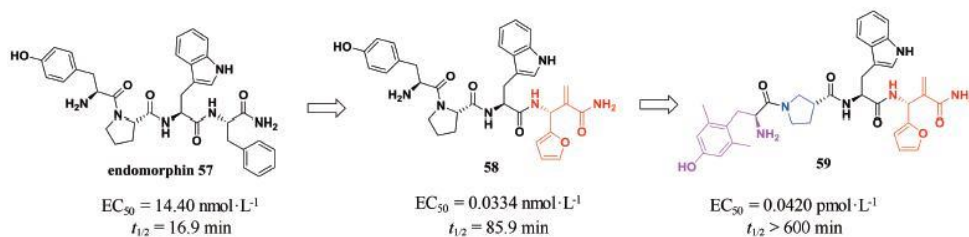


Figure 13 Introduction of unnatural amino acids to improve the stability of endomorphin and its potent analogues

他们首先将 C 末端苯丙氨酸替换为非天然氨基酸,得到化合物 58,其对  $\mu$  受体的激动活性为  $0.0334 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,相比于内吗啡肽 57 提高了 430 倍;而且该化合物在脑膜匀浆中的半衰期延长至 85.9min,与内吗啡肽相比提高了近 4 倍[29];随后,他们在此工作的基础上进一步把酪氨酸和脯氨酸片段用非天然氨基酸替换,得到化合物 59,其对  $\mu$  受体的活性进一步提高,达到  $0.0420 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而且化合物 59 在脑膜匀浆中的半衰期超过 600min[30],解决了内源性吗啡肽半衰期短的问题。因此,非天然氨基酸的引入对改善肽类化合物的代谢稳定性具有重要意义。

天然多肽大多由 L 型氨基酸组成,容易受到各种蛋白酶的降解而失去活性。蛋白酶的水解反应一般都是立体专一的,引入 D 型氨基酸使多肽的构型发生变化,进而使得修饰的多肽不易被蛋白水解酶水解,因此 D 型氨基酸修饰的多肽可以提高对蛋白酶的降解作用。

黄体激素释放激素(luteinizing hormone releasing hormone,LHRH)是由下丘脑分泌的具有调节生殖功能的十肽,该激素与垂体前叶的黄体激素释放激素受体(gonadotropin-releasing hormone receptor,GnRHR)结合,可以调控黄体激素的合成和分泌。除此之外,在人类多种恶性肿瘤中,LHRH 与其他生长因子一起调节肿瘤细胞生长。LHRH 及类似物可以通过抑制垂体-性腺轴的功能从而抑制激素依赖性肿瘤细胞的增殖,因此 LHRH 及类似物目前在临床上用于治疗激素依赖性肿瘤如前列腺癌和乳腺癌等。

然而天然的 LHRH 第 5、6 位以及第 6、7 位氨基酸残基间肽键稳定性较差,在体内极易受到肽链内切酶的作用而裂解,LHRH 在体内的半衰期仅有 2~4min。为了提高 LHRH 在体内的稳定性,研究人员尝试在 6 位引入不同种类的 D 型氨基酸,得到上市药物如那法瑞林 60 和曲普瑞林 61,半衰期相较于 LHRH 均有不同程度的提高,其半衰期分别为 3h 和 4h(表 3)[31]。

**Table 3** Introduction of *D* amino acids to improve the stability of peptides

Compd.	Sequence	$t_{1/2}$
LHRH	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	2-4 min
Nafarelin 60	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- <b>D-Nal</b> -Leu-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	3 h
Triptorelin 61	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- <b>D-Trp</b> -Leu-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	> 4 h

### 2.1.2 伪肽化策略

肽键(-CONH<sub>2</sub>-)是肽类分子的特征,而肽键在体内容易被蛋白酶识别降解,这是肽类分子稳定性差的原因之一。伪肽则是利用生物电子等排原理将肽键中的一种或两种以上的原子用其他原子替代。由于伪肽从本质上改变了酰胺键的化学结构,与蛋白或多肽同源结构不同,因此可以避免体内蛋白酶的识别和水解,从而提高肽类分子的稳定性及活性。

N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate,NMDA)受体与其胞内突触后致密蛋白(postsynaptic density protein-95,PSD-95)的蛋白-蛋白相互作用是治疗缺血性脑病、神经疼痛以及阿尔兹海默症的一种潜在策略[32]。

Bach 等[33]报道,N-烷基化的谷氨酸-苏氨酸-丙氨酸-缬氨酸四肽化合物(N-甲基-ETAV)62 是 NMDA/PSD-95 蛋白-蛋白相互作用抑制剂( $K_i=9.65\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),他们通过结构修饰得到一系列活性较强的四肽衍生物,但是研究人员在改造过程中发现这类化合物的血浆稳定性较差,例如,化合物 62 在人血浆中的半衰期只有 113min,较差的代谢稳定性限制了该类化合物的进一步开发。为了改善化合物的血浆稳定性,Bach 等对该类化合物进行伪肽化结构修饰,将酰胺键的氧原子用硫原子进行替换,得到不易被蛋白酶识别并水解的硫杂酰胺键。

比较含硫杂酰胺键的伪肽 63、64 和含有酰胺键的化合物 62,可以发现含硫杂酰胺键的化合物虽然活性有所下降,但血浆稳定性显著提高(图 14),尤其是化合物 63,在活性基本不变( $K_i=10.8\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的同时血浆半衰期提高了 50 倍。研究结果表明,硫杂酰胺键的伪肽化修饰是提高肽类化合物血浆稳定性的有效策略。

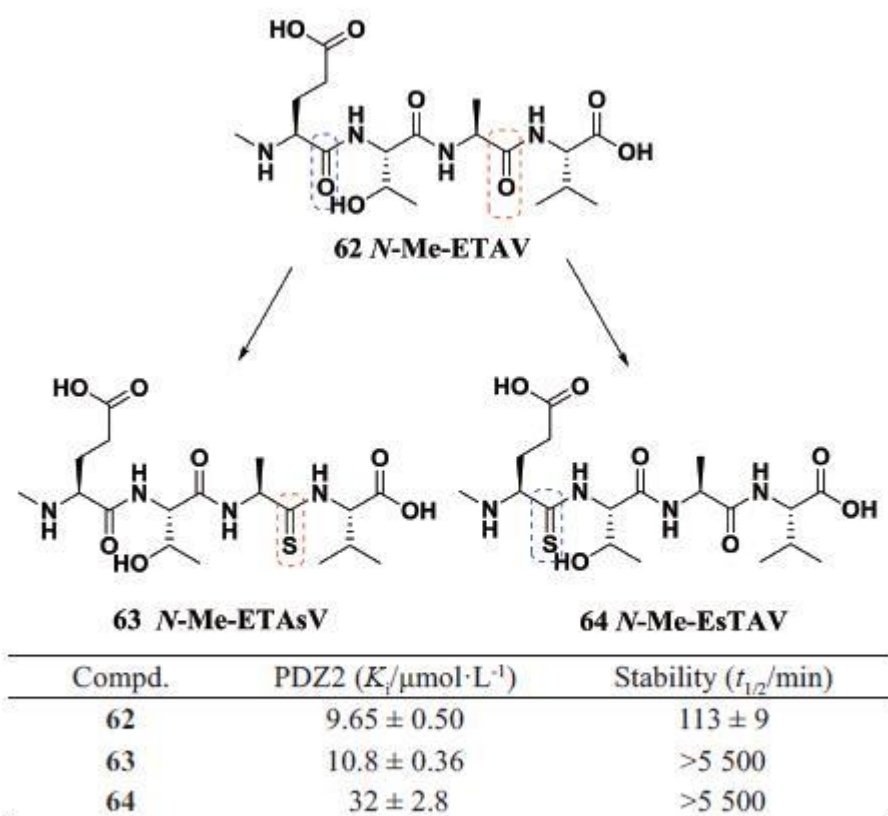


Figure 14 Thionamide pseudopeptides to improve stability of peptides

### 2.1.3 逆肽策略

蛋白质、激素、活性肽以及天然产物多肽是各种蛋白酶降解的底物,因此存在着易受蛋白酶降解以及半衰期较短的特点。除了之前介绍的策略可以有效耐受蛋白酶的水解,肽键方向的改变同样可以改变蛋白酶对底物的识别作用,从而达到抗降解的作用。这类改变肽键方向的多肽结构修饰策略称为逆肽化修饰,相关的肽称为逆肽或逆反肽。

$\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid $\beta$ -protein,A $\beta$ )沉积物的形成可能是引起AD的重要过程。研究表明A $\beta$ 可溶性寡聚体有细胞毒性,并且对大脑的记忆能力和学习能力具有潜在影响。在A $\beta$ 聚集的早期进行抑制可有效治疗AD。

Taylor等[34]报道了能有效抑制A $\beta$ 聚集的九肽65,尽管65对A $\beta$ 寡聚体的聚集有较强的抑制作用,但65存在多个水解位点,因此需要对65进行结构修饰以提高其代谢稳定性。对65进行逆肽修饰,得到逆肽66,理论上逆肽可以保持与65相似的三维结构从而使活性得到保持,实验结果也表明逆肽66对A $\beta$ 寡聚体的聚集抑制活性并没有发生显著变化。Taylor等用蛋白质降解实验评价65和66的代谢稳定性,即将肽与人血浆或脑提取物共孵育24h,通过高效液相色谱法(HPLC)测定溶液中原型肽含量。可以发现无论血浆还是脑提取物中,逆肽66的

含量均远远高于 65,而且 65 的含量接近 100%,表明逆肽可以一定程度上提高化合物的代谢稳定性(图 15)。

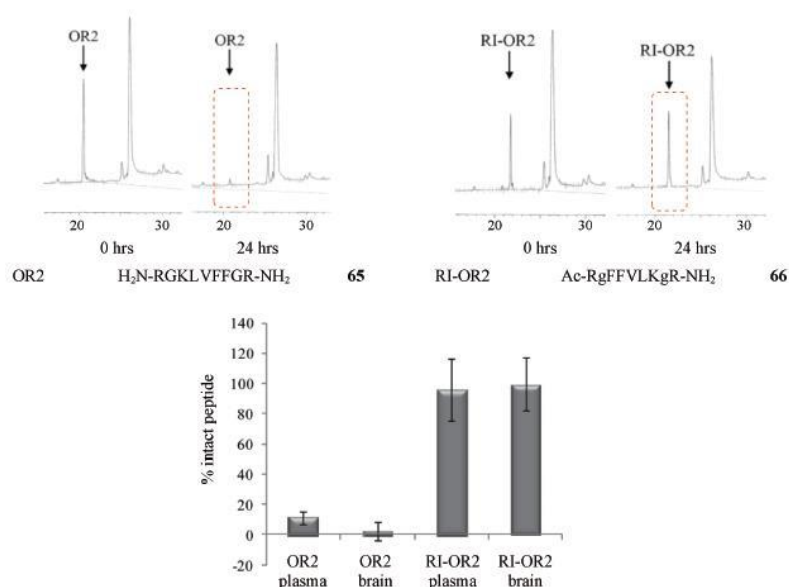


Figure 15 Inverse-peptide strategy to improve stability of peptides. Figure derived from Taylor M, et al<sup>[34]</sup>

#### 2.1.4 环化策略

肽去甲酰基酶(peptide deformylase,PDF)是参与细菌蛋白质生物合成和成熟的重要酶,在细菌和真核生物的细胞器中,蛋白质的合成始于 N-甲酰蛋氨酸,因此新合成的多肽都含有甲酰化的 N 末端。PDF 催化这些多肽的去甲酰化过程。PDF 在细菌细胞中发挥的重要作用使其成为设计新型抗生素,治疗耐药性病原体的新靶标。研究人员在前期工作基础上发现化合物 67 具有一定的抗菌活性,其对大肠杆菌 PDF 抑制活性  $K_i$  值为  $92\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

但 67 在大鼠血浆中容易受到类胰蛋白酶的降解作用而失活。从图 16 中可以发现,67 在大鼠血浆中孵育 5h 约 25%被降解。为了提高血浆稳定性,研究人员将 P1'与 P3'进行环化,设计合成环肽类似物 68。研究结果表明,相比于 67,环肽类似物 68 的抗菌活性有所提高, $K_i$  值为  $74\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而且血浆稳定性大幅提高,将 68 与大鼠血浆孵育 5h 基本不被降解[35]。

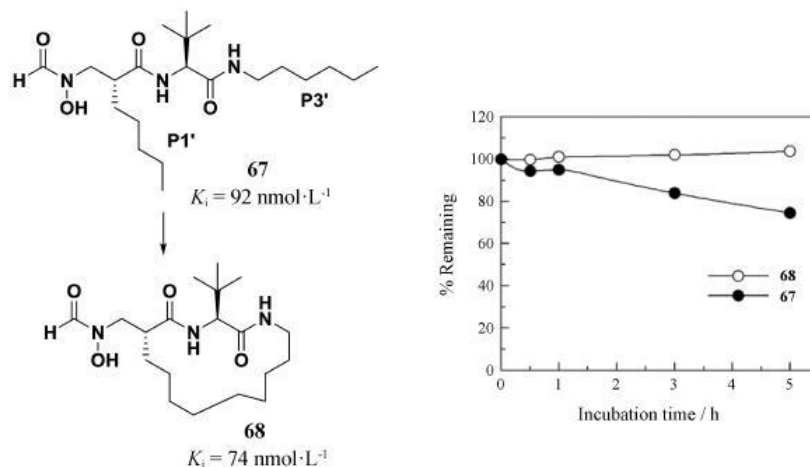


Figure 16 Cyclization strategy to improve stability of peptides. Figure derived from Hu XB, et al<sup>[35]</sup>

$\alpha$  螺旋是大部分多肽分子都具有的二级结构特征,然而人工合成的多肽分子在水溶液中并不能保持稳定的  $\alpha$  螺旋结构[36],因此科研人员开发了一种以碳-碳键或其他连接链为支撑的骨架稳定多肽  $\alpha$  螺旋结构,由这类方法得到的多肽称为订书肽(staple peptide),该方法本质上属于环化修饰策略的一种。线性肽柔性大,在舒展的构象下,容易暴露出更多酶解位点,增加了多肽被水解的概率,从而导致多肽稳定性降低[37]。形成订书肽可以约束线性多肽的构象,减少多肽被降解的概率。

$\beta$  连环蛋白-B 细胞淋巴瘤 9(B-celllymphoma,BCL9)蛋白-蛋白相互作用对  $\beta$  连环蛋白的转录活性至关重要,而这一相互作用是由 BCL9 蛋白中 25 个残基的螺旋片段和  $\beta$  连环蛋白的结合槽介导。王少萌等发现,372 位突变的 BCL9 肽 69 具有一定抑制  $\beta$  连环蛋白的活性( $K_i=0.94\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),然而 69 稳定性较差,在细胞培养液中 1h 降解 75%(图 17)。因此王少萌等设计了一类结构稳定,不容易被代谢的 BCL9 肽[38]。在设计过程中,他们采用了点击化学(click chemistry)形成的三氮唑为支撑结构,合成订书肽 70 和 71。订书肽 70 和 71 对  $\beta$  连环蛋白的抑制活性分别为  $0.61\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.19\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,活性保持。同时提高了线性肽的稳定性,70 和 71 在细胞培养液中 1h 仅分别降解 30%和 25%。

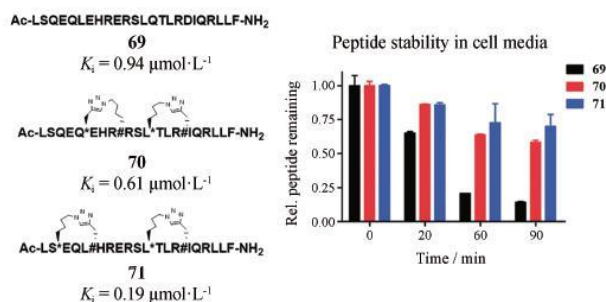


Figure 17 Click chemistry mediated stapled peptide to improve stability of peptides. Figure derived from Kawamoto KA, et al<sup>[38]</sup>

## 2.2 外接基团修饰

外接基团修饰以增强多肽分子代谢稳定性的主要方法包括高级脂肪酸修饰、蛋白融合策略、聚乙二醇修饰等。

### 2.2.1 高级脂肪酸修饰

高级脂肪酸修饰是指在肽类药物的特定位点通过化学方法以共价键的形式引入高级脂肪酸以改善肽类药物的性质,延长半衰期。一般认为,高级脂肪酸修饰可以稳定其结构,提高多肽的稳定性,从而延长多肽药物在体内的半衰期。同时,高级脂肪酸与细胞膜表面的磷脂结构类似。因此,脂肪酸修饰的多肽药物往往也可以提高多肽药物的脂溶性,改善药物在肠道内的吸收以及黏膜透过性。此外,高级脂肪酸可以与血清白蛋白(human serum albumin,HSA)结合,结合后的复合体因分子过大而不容易转运,从而可以延长多肽在体内的循环时间[39]。

目前,高级脂肪酸作为修饰结构的研究发展仍然比较缓慢,但高级脂肪酸作为体内的一种内源性物质,一直吸引了研究人员的广泛关注。根据水蛭素结构简化得到的水蛭肽比伐卢定 **72**(Bivalirudin)是由 The Medicines Company 开发的抗凝药物,于 2000 年 12 月年被 FDA 批准上市,作为抗凝剂用于经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty,PTCA)治疗中出现的不稳定型心绞痛和经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention,PCI)。但是作为多肽类药物,72 在体内的暴露量较低( $AUC_{0-t}$  为  $23.7\text{nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),半衰期短( $t_{1/2}=15.1\text{min}$ ),药代动力学性质较差。在进行经皮冠状动脉介入治疗之前,需要先进行静脉注射,随后静脉滴注至手术结束,患者依从性差。针对这一缺点,研究人员对比伐卢定类似物 **73** 进行化学修饰,主要的策略是用高级脂肪酸对氨基酸侧链进行修饰。对比肽 **73** 和 **74**,其药理活性基本保持不变,而高级脂肪酸修饰的多肽 **74** 暴露量( $AUC_{0-t}$  为  $1371.7\text{nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ )和半衰期( $t_{1/2}=212.2\text{min}$ )相较于未修饰的多肽 **73**( $AUC_{0-t}$  为  $25.7\text{nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $t_{1/2}=13.5\text{min}$ )明显改善(表 4),暴露量和半衰期分别提高了 58 倍和 14 倍[40]。

Table 4 Introduction of fatty acid to improve the pharmacokinetic properties of bivalirudin analogs

Peptide	Sequence	$K/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$		PK parameter	
		Rat	Human	$AUC_{0-t}/\text{nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{min}$
Bivalirudin (72)	D-FPRP-GGGG-QGDFEIEPEEYL	$20.50 \pm 0.62$	$11.77 \pm 0.09$	$23.7 \pm 2.8$	$15.1 \pm 1.3$
73	D-FPRP-GGGG-QGDFEIPEDAYDE	$13.40 \pm 0.46$	$5.80 \pm 0.55$	$25.7 \pm 2.6$	$13.5 \pm 2.6$
74	D-FPRP-GK(stearic acid)GG-QGDFEIPEDAYDE	$15.24 \pm 0.18$	$11.75 \pm 0.46$	$1371.7 \pm 207.8$	$212.2 \pm 58.4$

上市的降糖多肽药物利拉鲁肽[41]和索马鲁肽[42]也都引入了高级脂肪酸修饰,高级脂肪酸的引入增加了药物的疏水性,掩盖二肽基肽酶 4(DPP-4)的结合位点,降低肾排泄,提高半衰期。利拉鲁肽是由诺和诺德公司研发的长效 GLP-1 受体激动剂,其与天然 GLP-1 有 97%的氨基酸序列相似性,仅在 34 位将赖氨酸替换为精氨酸,同时在 26 位赖氨酸侧链引入由谷氨酸作为 linker 的 16 碳棕榈酸侧链。

皮下注射利拉鲁肽后,其可在注射部位形成稳定的七聚体,在皮下组织缓慢吸收;另外,由于引入了长链脂肪酸修饰,掩盖了 DPP-4 结合位点;同时,长链脂肪酸的引

入还使利拉鲁肽与血清白蛋白形成可逆复合物,极大地延长了利拉鲁肽在体内的吸收时间,提高了多肽类药物的体内半衰期。天然的 GLP-1 半衰期极短,只有 2min 左右;而棕榈酸修饰的利拉鲁肽半衰期延长至 13h,提高了 390 倍(图 18)[43,44]。索马鲁肽则是 GLP-1(7-37)的第 8 位丙氨酸用氨基异丁酸替换,34 位的赖氨酸用精氨酸替换,同时在 26 位赖氨酸侧链由谷氨酸作为 linker 引入十八烷酸,疏水性也更强,同时经过短链的聚乙二醇修饰,其半衰期大大延长至一周。

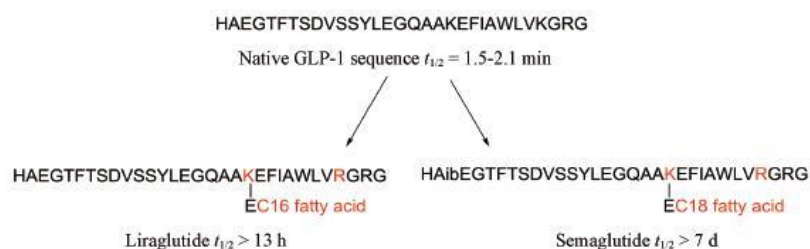


Figure 18 Introduction of fatty acid to improve the half-life of GLP-1 analogues

除了利用可逆的结合方式结合 HSA,共价不可逆的结合方式也常常用于多肽类药物的改造中。艾博卫泰(albuvirtide)是由南京前沿生物技术有限公司开发的全球首个长效抗 HIV-1 药物,其结构如图 19 所示。

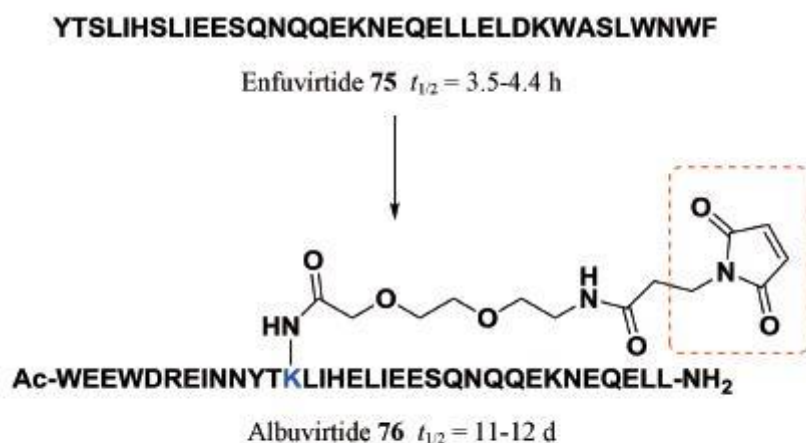


Figure 19 Introduction of MPA to improve the half-life of anti-HIV-1 drug

恩夫韦肽(enfuvirtide)是 FDA 批准的第一个临床使用的 HIV-1 融合抑制剂。然而恩夫韦肽 75 作为一个多肽药物,其在人体内的半衰期只有 3.5~4.4h,需要每天注射两次,患者的依从性较差。

针对恩夫韦肽 75 半衰期较短的缺点,前沿生物技术有限公司开发了艾博卫泰,艾博卫泰 76 是在多肽序列 13 位的赖氨酸侧链中引入了 3-马来酰亚胺-丙酸(MPA)修饰(图 19),MPA 可与血清白蛋白中的巯基形成不可逆的共价结合,而且结合速率快,大大提高了多肽在人体内的半衰期,给药频率一周一次即可[45]。艾博卫泰已于 2018 年获得国家食品药品监督管理局(CFDA)批准上市,用于与其他抗逆转录病毒药物联合使用,治疗 HIV-1 感染。

### 2.2.2 蛋白融合策略

蛋白融合策略是指利用基因工程技术,将蛋白或多肽分子与免疫球蛋白 Fc 片段或血清白蛋白 HSA 融合而产生新型分子的修饰策略。融合 Fc 或 HSA 片段之后的多肽分子,分子尺寸显著增大,降低了肾对多肽药物的清除率,从而延长多肽药物的半衰期[46]。

礼来公司开发的降糖药物度拉糖肽(dulaglutide)就是将 GLP-1 与 IgG4(Fc)融合而成的长效降糖药物[47],其生物半衰期大于 90h,并且疗效不弱于利拉鲁肽,其在 2019 年前三季度的销售额达到 29.20 亿美元,超过利拉鲁肽(2019 年前三季度销售额为 24.47 亿美元)。人血清白蛋白是血浆中含量最丰富的蛋白质,其半衰期长达 19 天,因此 HSA 蛋白融合可以延长多肽药物的半衰期。

葛兰素史克公司研发的长效降糖药物阿必鲁肽(albiglutide)是第一个被 FDA 批准上市的 HSA 蛋白融合药物,阿必鲁肽的半衰期长达 6~10 天[48]。因此,蛋白融合策略是多肽药物长效化的有效手段。

### 2.2.3 聚乙二醇修饰

聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)在体内具有可降解、低毒性、无抗原性等特点,是一种常见的肽类分子修饰方法。PEG 修饰可以改善肽类分子的稳定性、减少蛋白酶的降解、不易被肾小球滤过,从而提高多肽药物的稳定性,延长药物的半衰期。

目前已有诸多 PEG 修饰的多肽药物上市,其中 PEG 修饰的干扰素  $\alpha$  是这一结构修饰策略的成功案例。干扰素  $\alpha$  可以有效地抑制或清除乙型肝炎或丙型肝炎病毒,但干扰素  $\alpha$  作为多肽类药物具有自身不可克服的缺点,其半衰期短,仅为 4h,需要每天注射一次。为了克服这一缺点,先灵葆雅研究所(Schering[1] PloughResearch Institute,SPRI)致力于长效干扰素  $\alpha$  的研究。

他们分析了干扰素  $\alpha$  半衰期较短的原因,认为其分子过小容易被肾脏清除,因此研究人员将 PEG 引入到干扰素  $\alpha$  中(图 20),而修饰后的干扰素  $\alpha$  整体分子尺寸变大,不易被肾小球滤过,从而 PEG 修饰的干扰素  $\alpha$  半衰期得到延长,达到 40h[49]。另一方面,由于 PEG 的引入掩盖了干扰素  $\alpha$  与受体的结合,降低了干扰素  $\alpha$  的抗病毒活性,因而先灵葆雅研究所对 PEG 的尺寸进行考察,最终确定 PEG

的大小为 12kDa 可以在延长半衰期的同时最大程度保留了干扰素  $\alpha$  的抗病毒活性。因此,采用 PEG 修饰策略要注意平衡半衰期和活性的关系。

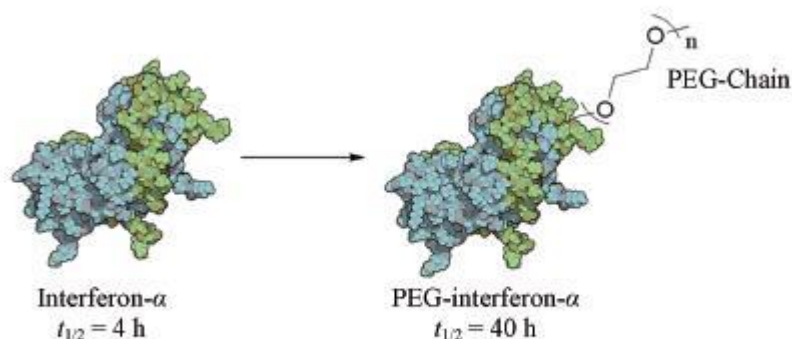


Figure 20 PEG modification to improve half-life of interferon- $\alpha$

3

### 提高肽类分子的渗透性

除了少数疏水肽,大部分多肽都具有极性侧链;同时,多肽分子中的肽键可以与水分子形成氢键。因此,大部分多肽都具有很好的水溶性。而多肽药物必须透过细胞膜才能吸收入血,发挥药理学活性。因此,必须要对多肽进行结构修饰与改造,提高肽类分子的渗透性,以利于多肽分子进入细胞,发挥活性。提高肽类分子渗透性的方法包括引入卤素原子、去除极性侧链、手性策略、N-烷基化、高级脂肪酸修饰和其他方法等。

#### 3.1 引入卤素原子

在小分子药物的化学修饰中,往往采用引入卤素的修饰策略以提高小分子药物的亲脂性。在肽类分子的修饰改造中,卤素的引入也可以提高肽类分子的脂溶性。神经多肽内吗啡肽具有很强的镇痛活性,然而内吗啡肽 57 作为一种肽类分子,很难通过血脑屏障进入大脑发挥药效。

通常药物分子进入血脑屏障需要一定的亲脂性,兰州大学王锐等采用了引入卤素原子的策略,将 2 位脯氨酸变换为 D-丙氨酸,4 位苯丙氨酸上引入卤素以提高整体肽分子的脂溶性[50],通过该策略可以明显提高内吗啡肽类似物的渗透性,可以通过血脑屏障。内吗啡肽 57 的脂水分配系数 D 仅有 12.5,而引入卤原子,内吗啡肽类似物的 D 值上升至 120,提升了近 9 倍(图 21)。通过动物实验,脑实质中检测到了肽 77,进一步验证了通过引入卤素原子可以使肽类分子通过血脑屏障[51]。

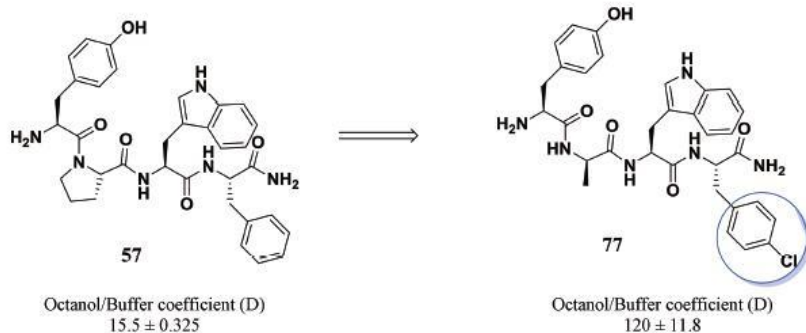
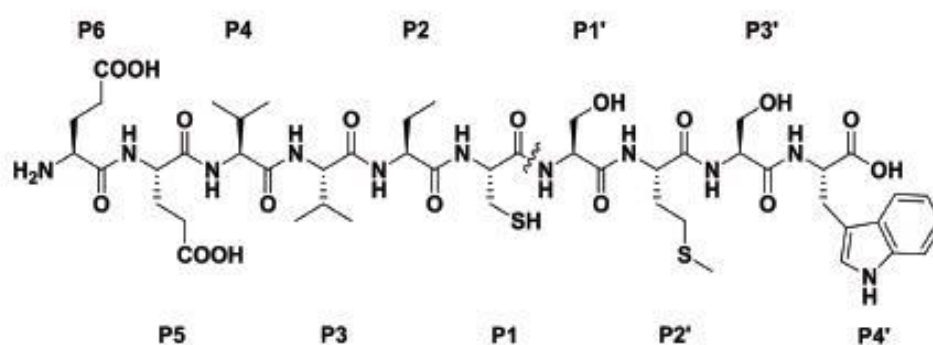


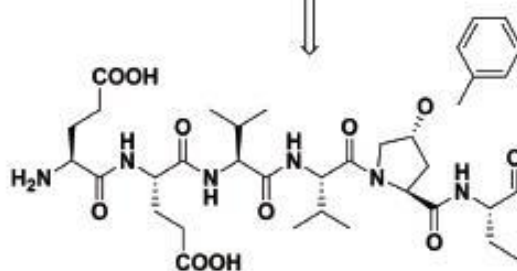
Figure 21 Introduction of halogen to improve permeability of endomorphin

### 3.2 去除极性侧链

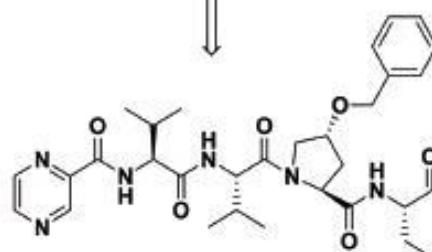
肽类分子中常含有极性的羧基片段,这些富含谷氨酸和天冬氨酸的肽细胞渗透性比较差,针对这类肽分子的改造一般采用去除极性侧链的策略。一方面,去除极性侧链可以缩小肽分子的尺寸,降低肽链多肽的性质,使其更具有类似有机小分子的性质;同时也可以改善肽类分子的细胞渗透性,有利于其进入细胞发挥药效。比较典型的案例就是抗丙肝病毒药物特拉匹韦的研发(图 22)。



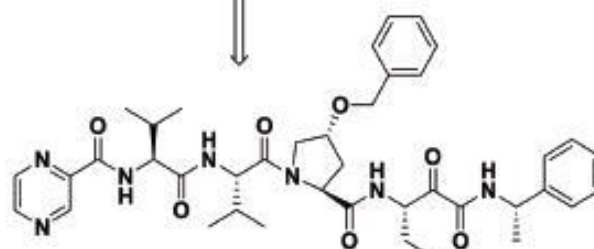
78  
M.W. = 1097  $K_i = 0.89 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



79  
M.W. = 773  $K_i = 0.89 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



19  
M.W. = 595  $K_i = 12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



20  
M.W. = 742  $K_i = 0.92 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

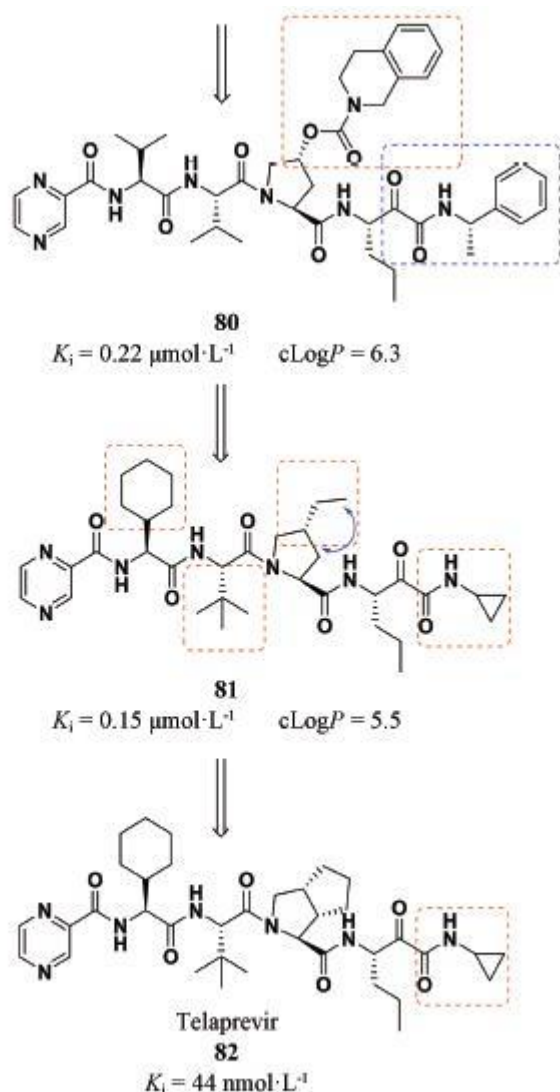


Figure 22 Optimization of anti-HCV drug telaprevir

Vertex 公司早期发现了底物十肽 78 的活性为  $0.89\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,然而该化合物的分子量大,需要首先对分子大小进行优化。研究人员考察了去除不同氨基酸片段对化合物抗病毒活性的影响,研究表明去除 P4'氨基酸片段对活性影响较大,而去除 P2'和 P3'氨基酸片段对酶的亲和力几乎无影响。

去除 P5 和 P6 两个含有酸性侧链的氨基酸片段,活性明显降低。另外,去除 P3 和 P4 两个疏水性氨基酸片段也会导致活性的下降。同时考虑到对丝氨酸蛋白酶的结合能力,研究人员在 C 末端引入亲电性的醛基作为弹头,得到了跨越 S6~S1 的六肽醛 79,其活性与底物十肽相同,但是分子量显著降低。

虽然 P5 和 P6 两个酸性氨基酸片段对活性很重要,但是由于两个羧基的存在,六肽醛 79 的极性很大,不利于化合物进入病毒感染的细胞,因此下一步结构改造的重点是提高分子的透膜性。研究人员进一步切断 P5 和 P6 两个氨基酸片段,并以杂环进行替换得到四肽醛 19,其抗病毒活性明显下降,但是相比于底物十肽 78,

分子量减小一半,整个分子的成药性更好[52]。由于醛基的代谢性质较差,因此醛弹头被其他弹头替换得到酮酰胺化合物 20,其抗病毒活性与稳定性俱佳,至此,肽类分子的透膜性问题得以解决。

化合物 20 的活性仍有提高的空间,因此研究人员对 P1~P4 片段进行了系统性优化。他们发现脯氨酸的疏水性基团对酶的亲和力影响很大,因此首先对 P2 片段进行改造,通过比较不同的疏水基团如醚、酯以及氨基甲酸酯等衍生物,最后得到的含有四氢异喹啉氨基甲酸酯衍生物 80,其对 NS3/4A 酶的抑制活性提高至  $0.22\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

进一步优化 P1,发现 S1 口袋仅能容纳尺寸较小的疏水性基团,最终确定乙基侧链为最优;同时优化 P3 和 P4,得到的化合物 81 活性与 80 相当,但是 81 的  $\text{cLogP}(5.5)$  更符合 Lipinski 五规则,因而对 81 进一步研究。将 P2 乙基侧链与脯氨酸环化,进一步考察最终确定化合物 82,其对丙肝病毒 NS3/4A 蛋白酶的抑制活性为  $44\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,是一个活性很高的丝氨酸蛋白酶抑制剂,被命名为特拉匹韦[53]。特拉匹韦于 2011 年被 FDA 批准上市,用于治疗丙型肝炎病毒感染。

### 3.3 手性策略

环肽类化合物的二级结构与其理化性质和药理学性质密切相关。北京大学深圳研究院李子刚等提出了一种假设——在约束肽的连接链上引入一个手性中心以改变肽类分子的理化性质和二级结构,从而影响肽类分子的透膜性。为验证这一策略的合理性,他们设计合成了两条 FITC 标记的含有手性中心的环肽化合物 83 和 84。由于手性中心的存在,环肽 83 和 84 存在一对非对映异构体,分离出这些异构体 83a/b 和 84a/b 并且将之与 HEK293T 细胞于  $37^\circ\text{C}$  共孵育 2h,用荧光共聚焦显微镜成像(图 23)。

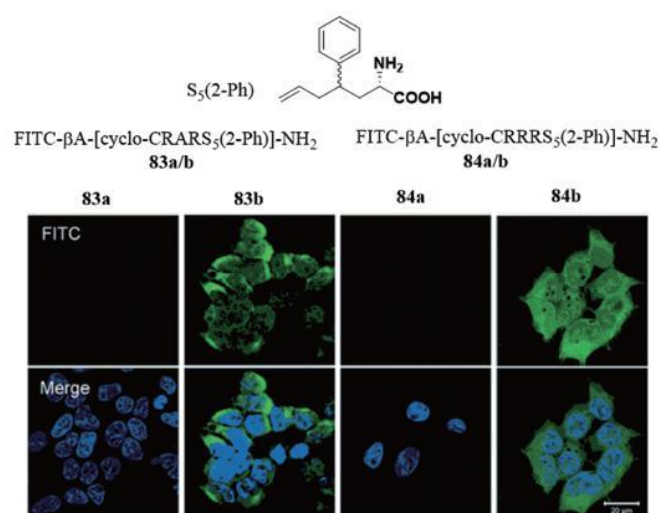


Figure 23 Introduction of chiral center in cyclopeptide linker to change permeability of peptide. Figure derived from Hu K, et al<sup>[54]</sup>

研究结果表明,其中一种构型的异构体 83b 和 84b 可以穿入 HEK293T 细胞,而另一构型的异构体 83a 和 84a 无法穿入细胞。说明手性中心的引入可以使肽的螺旋结构发生变化,从而影响肽类分子的透膜性[54]。

### 3.4 N-烷基化

N-烷基化的酰胺键往往可以改变肽类分子内或分子间的氢键相互作用,从而影响肽类分子的空间结构进而改变其物理化学性质。柔性肽类分子中的分子内氢键是被动扩散中的决定性因素。通过在特定的酰胺键进行烷基化,可以使肽类分子以最优势的构象穿过细胞膜[55]。

Beck 等[56]对丙氨酸环六肽进行 N-甲基化修饰以考察 N-甲基化对丙氨酸环六肽透膜性的影响。实验结果表明,在 1,5 位、1,6 位或 1,2,4,5 位酰胺氮原子进行甲基化修饰可以明显提高肽类分子对 Caco-2 细胞的渗透性,其渗透性与对照鞣酐(细胞透膜性标志物)相当。分析 1,6 位 N-甲基化修饰的环六肽的空间构象发现,2 位酰胺氢与 5 位酰胺羰基可以形成分子内氢键,而 3 位 4 位氨基酸所形成的  $\beta$  转角也形成了分子内氢键,整个分子以疏水的构象存在(图 24),因而细胞渗透性提高。

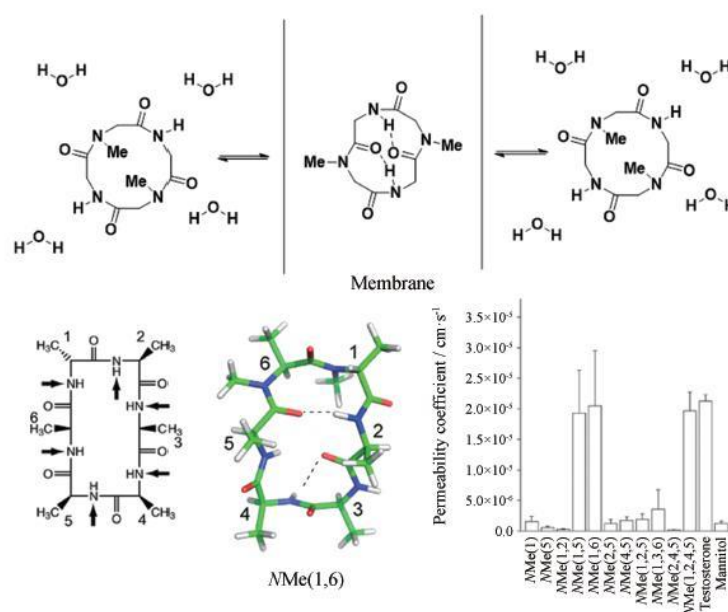


Figure 24 N-alkylation to improve permeability of peptides. Figure derived from Beck JG, et al<sup>[56]</sup>

### 3.5 高级脂肪酸修饰

提高肽类分子透膜性的常用策略是对多肽进行高级脂肪酸修饰。脂肪酸包括不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸,目前有一些饱和脂肪酸修饰的多肽药物已经上市用于疾病的治疗,或者开发处于临床研究阶段。

脂肪酸是构成磷脂双分子层以及人体脂肪的重要成分,因此对多肽进行脂肪酸修饰可以提高多肽与细胞膜表面的亲和能力,从而提高肽类分子的透膜性,促进上皮细胞对肽类分子的吸收。Hashizume 等[57]对胰岛素分子的侧链进行棕榈酸修饰,棕榈酸酰化胰岛素的亲脂性提高。

研究人员用同位素标记胰岛素,并通过测定给药后 6h 内血浆中的放射性推断胰岛素在血浆中的含量。

结果表明,双棕榈酰胰岛素的含量最高时是天然胰岛素的 6 倍,单棕榈酰胰岛素的含量是天然胰岛素的 3 倍(图 25)。这也说明高级脂肪酸修饰可以提高肽类分子的透膜性。

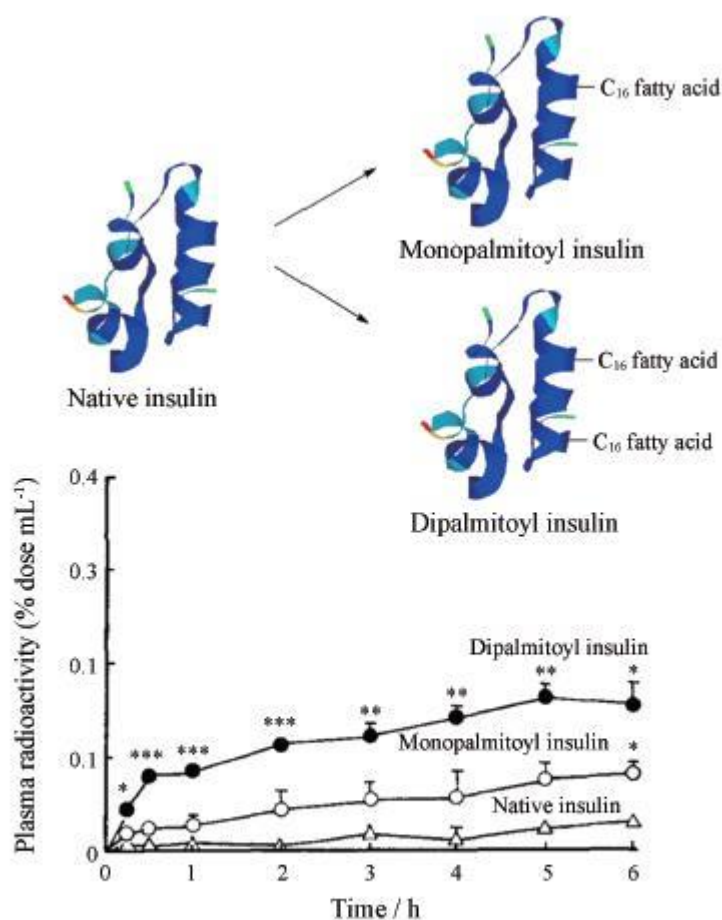


Figure 25 Introduction of fatty acid to improve the permeability of insulin. Figure derived from Hashizume M, et al<sup>[57]</sup>

### 3.6 其他方法

除了化学方法,某些制剂手段也可以影响肽类化合物的渗透和吸收。N-[8-(2-羟苯基)氨基]辛酸钠(sodium N-[8-(2-hydroxybenzyl) amino]caprylate, SNAC)是由 Emisphere 开发的一种基于各种促吸收剂的大分子递送技术。SNAC 能够递送 0.5~150kDa 的大分子,且不会影响大分子的高级结构,不影响药物释放。同时 SNAC 还具有很高的安全性,不影响胃肠黏膜结构。

吸收促进剂与药物分子存在较弱的非共价相互作用,可形成暂时稳定的中间体。促进剂一般是疏水性物质,通过与药物分子相互作用形成的药物促进剂复合体具有更强的亲脂性,从而促进药物分子透过上皮细胞膜。由于复合体只存在较弱的非共价相互作用,随着复合物透过细胞进入血液循环,药物与促进剂解离释放出药物(图 26)[58]。

## Transport Mechanism

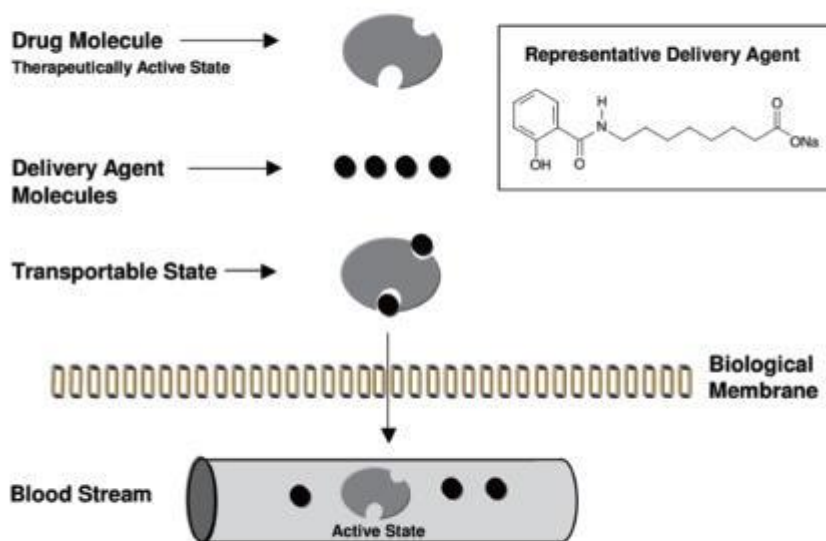


Figure 26 Mechanism of absorption enhancer. Figure derived from Arbit E, et al<sup>[58]</sup>

2017年,诺和诺德便宣布 FDA 批准了索马鲁肽改善 II 型糖尿病患者的血糖控制。虽然索马鲁肽是长效的 GLP-1 激动剂,但糖尿病患者仍需每周注射一次。为了提高患者的依从性,诺和诺德很早就开始了口服索马鲁肽的研究。研究人员将索马鲁肽与吸收促进剂 SNAC 制成口服配方。

SNAC 与索马鲁肽结合使得其在胃部吸收,而且溶解的 SNAC 在胃部形成局部相对较高的 pH 环境,既可以增加索马鲁肽的溶解度,在该环境下索马鲁肽受胃肽酶的影响很小,又促进了索马鲁肽的吸收[59]。从图 27 中可以看出,口服索马鲁肽在胃部可以充分吸收并快速释放。2019 年 9 月 20 日,口服索马鲁肽被 FDA 批准用于结合饮食和运动以改善 II 型糖尿病患者的血糖控制。

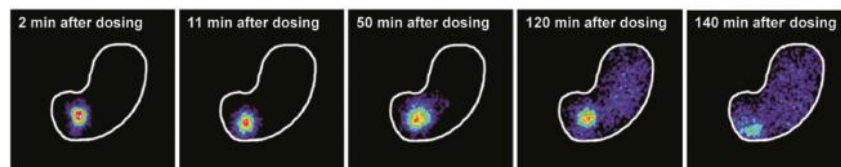


Figure 27 Absorption and release of oral semaglutide. Figure derived from Knudsen LB, et al<sup>[59]</sup>

4

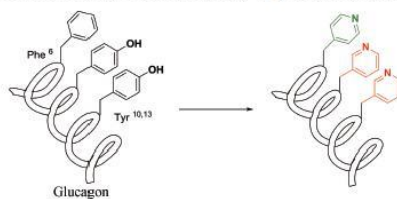
## 总结和展望

含有疏水侧链的多肽往往水溶性较差,而含有极性侧链的多肽水溶性相对较好。不同的多肽因其组成不同而具有不同的溶解性。有些临床使用的多肽药物常常含有芳香性氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸等,但是这类含有芳香性氨基酸的多肽常常溶解性很差。胰高血糖素含有半数以上疏水性侧链,且含有多个芳香性氨基酸,因此,其在水溶液中溶解性差。

临床上通常使用胰高血糖素治疗急性低血糖。临床使用的胰高血糖素通常以冻干粉末的形式保存,使用时需要用无菌酸性溶剂溶解,但溶解时常常产生不溶性纤维<sup>[60,61]</sup>。因此,通过合适的修饰改造策略提高胰高血糖素的溶解性对胰高血糖素的临床使用有重要意义。

天然的胰高血糖素 85 在 PBS 中的溶解度很小,Morz 等<sup>[62]</sup>将胰高血糖素中的苯丙氨酸或酪氨酸替换为吡啶基丙氨酸 3-pal 或 4-pal,尤其是多个位点替换(表 5),得到的肽在 PBS 溶液中的溶解性有了一定程度提高,其中肽 87 和 88,在保持胰高血糖素活性的同时,溶解度提高,大于 15mg·mL<sup>-1</sup>。

Table 5 Replacing Phe/Tyr with pyridine motif to improve water-solubility of glucagon (Aib, aminoisobutyric acid)



Peptide	Structure	EC <sub>50</sub> /pmol·L <sup>-1</sup> (SDV)	Solubility/mg·mL <sup>-1</sup>
85	Glucagon	21.2 (13.7)	<1
86	HSQGTFTSDYSKYLD(Aib)SRRAQDFVQWLMNT	39.9 (11.3)	<1
87	HSQGTFTSD(3-pal)SK(3-pal)LD(Aib)SRRAQDFVQWLMNT	35.9 (19.3)	>15
88	HSQGTFTSD(4-pal)SK(4-pal)LD(Aib)SRRAQDFVQWLMNT	30.9 (10.1)	>15
89	HSQGT(3-pal)TSD(3-pal)SK(3-pal)LD(Aib)SRRAQDFVQWLMNT	71.4 (52.8)	>15
90	HSQGT(4-pal)TSD(4-pal)SK(4-pal)LD(Aib)SRRAQDFVQWLMNT	84.3 (33.4)	>15

这也表明引入吡啶基团可以提高多肽分子的水溶性。Mayer 等[63]也报道了利用吡啶基替换苯丙氨酸或酪氨酸中的苯环以提高多肽类降钙素基因相关肽受体拮抗剂的水溶性。

5

## 总结与展望

随着全球小分子药物研发的难度增加以及生物大分子药物研发速度的不断加快,介于两者之间的多肽类药物也成为全球制药公司关注的焦点,多肽药物的销售额也在逐年稳步上升。目前全球批准上市的多肽药物已超过 80 多种,进入临床的多肽分子数量也在不断增加,疾病领域涉及肿瘤、代谢性疾病、感染性疾病、免疫、心血管疾病以及泌尿生殖系统疾病等,其中还有诸如甘精胰岛素和利拉鲁肽这种重磅炸弹级的多肽药物,因此多肽药物的前景非常广阔。

多肽药物均衡了小分子药物和生物药的优点,具有活性强、选择性好、安全性高,不容易在体内蓄积、与其他药物相互作用少、代谢途径可预测等优点,是一类理想的可用于开发成为药物的先导化合物。然而多肽药物本身也存在着半衰期短、血浆清除率高、不容易透过细胞膜、大多数药物不能口服,通常需要注射给药,患者依从性差以及生产成本较高等问题,这些问题制约了多肽类药物的发展。

采用多种化学修饰策略如末端结构修饰、拼接策略、环化策略、非天然氨基酸修饰、伪肽策略以及胆固醇修饰等可以提高肽类分子的活性;除了上述部分方法可以提高肽的稳定性,还可采用逆肽策略以及高级脂肪酸修饰、蛋白融合策略、聚乙二醇修饰等策略提高肽类分子的代谢稳定性;采用引入卤素原子、去除极性侧链、手性策略、N-烷基化、高级脂肪酸修饰等策略可以改善肽类分子的渗透性。许多成功上市的多肽药物都用到了这些改造策略中的一种或几种。

目前,通过对肽类分子的修饰和改造解决多肽药物的缺点,仍然是最直接和有效的策略。熟悉了解多肽药物的基本改造策略,对于多肽类药物的研究和开发具有重要意义。虽然多肽药物的发展仍然面临着一些挑战,但随着未来药物化学改造策略的完善以及新型药物递送系统以及吸收促进剂的不断发展,这些技术都将会应用到多肽药物的开发之中,为多肽药物的开发提供更合理更丰富的思路。

# 先导化合物结构优化策略（八）——药物转运体及其相关药物设计策略

## 摘要

转运体会对药物在人体中的转移和分布产生极大的影响。一方面可溶性载体转运体可以将药物转运进入组织器官,从而提升药物生物利用度以及改变药物的

组织分布；另一方面，细胞上的 ATP 结合盒转运体会将某些药物排出细胞，从而降低细胞内药物浓度，产生耐药性。

本文总结了人体中几种重要的药物转运体的底物特征以及针对药物转运体进行药物设计的策略，包括前药修饰提高生物利用度、引入酸性基团改善肝脏选择性、改善化合物极性降低外排比等。

## 关键词

转运体；药物设计；先导化合物

## 正文

在药物研发过程中，先导化合物的药代动力学性质优化是先导化合物成药性优化的重要部分。药物的药代动力学性质一方面受药物自身理化性质的影响，另一方面，人体中的代谢酶以及转运体也极大地影响了药物的药代动力学特性，代谢酶可将药物代谢生成水溶性更强的代谢产物，从而加速药物排出体外，而膜转运体则通过对部分药物的选择性转运影响药物的体内分布。

通常情况下，脂溶性较强的药物以被动扩散的方式在体内进行跨膜转运，因此该类药物在各器官组织分布较为均一；但是亲水性的药物一般透膜性较差，部分药物需要膜上的转运体参与进行跨膜转运，由此导致药物的吸收转运受到转运体的类型和组织分布的影响，进而引起药物在各个器官和组织之间的浓度水平产生较大差异，同时也会导致血药浓度难以反映药物在靶器官或者靶细胞内的真实浓度水平。

另一方面，当两种药物竞争同一种转运体或者转运体活性被药物抑制时，药物的药代动力学特性会发生极大改变，导致药物-药物相互作用（**drug-drug interaction, DDI**）的发生。此外，转运体还与肿瘤细胞耐药性的产生相关，部分肿瘤细胞可以通过高表达外排转运体降低细胞内的药物浓度，从而降低药物效能[1, 2]。因此，了解各类转运体的性质与功能对于药物研发具有重要的指导意义。

人体中与药物相关的转运体可按照功能分为两大类（表 1）：一类是介导药物吸收进入细胞的可溶性载体（**solute carrier, SLC**）超家族，其广泛分布于人体各个组织器官，利用细胞膜两侧的离子浓度梯度作为动力进行底物的跨膜运输。大多数 **SLC** 转运体含有 7~14 个跨膜螺旋，并且有一个胞内或胞外的柔性结构域，它可以协助跨膜螺旋形成跨膜通道[3]。目前已发现和鉴定 400 多种 **SLC** 转运体，分为 65 个亚家族，其中与药物转运相关的 **SLC** 转运体主要包括：寡肽转运体（**peptide transporters, PEPTs**）、有机阴离子转运体（**organic**

anion transporters,OATs)、有机阴离子多肽转运体 (organic anion transporting polypeptide, OATP)、有机阳离子转运体 (organic cation transporters, OCTs)。另一类转运体是 ATP 结合盒转运体 (ATP-binding cassette, ABC) 超家族, ABC 转运体可以通过水解 ATP 提供能量将药物转运出细胞。人类基因组中一共含有 49 个编码 ABC 转运体的基因, 按照进化差异分为 A~G 共 7 个亚家族。

在结构上, ATP 结合盒转运体一般由跨膜区(transmembrane domains, TMDs)和核苷酸结合区 (nucleotide-bindingdomains, NBDs) 组成, 其中 TMDs 由多个跨膜螺旋组成, 它们形成了跨膜通道并且可以识别结合底物, 而 NBDs 则可以水解 ATP 提供能量, 从而引起构象改变将药物分子排出细胞[4, 5]。参与药物转运的 ABC 转运体主要包括 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP)、多药耐药相关蛋白(Multidrug resistance protein, MRP)等。

**Table 1 Classification of drug transporters**

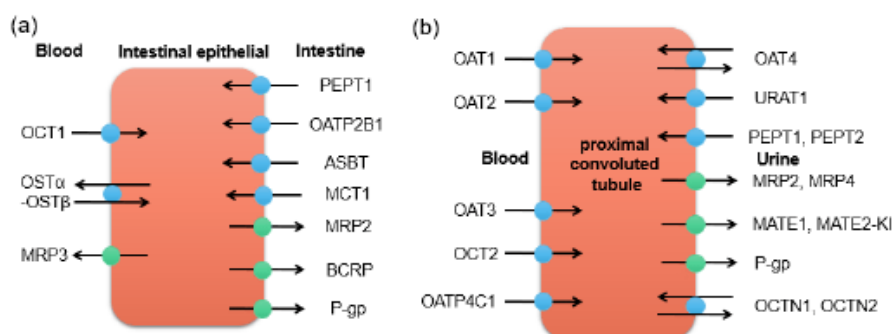
Superfamily of transporters	Function	Series of drug transporters
		Peptide transporters
		Organic anion transporters
Solute carrier transporters (SLC)	Mediates the absorption of drugs into cells, which could be used to improve bioavailability and hepatic selectivity	Organic anion transporting polypeptide
		Organic cation transporters
		Organic solute transporter alfa-beta
		Novel organic cation transporters
		Sodium-dependent bile salt transporter
		Monocarboxylic acid transporter
		Urate transporter
ATP-binding cassette (ABC)	Mediates the expulsion of drugs from cells, which may cause multidrug resistance	P-glycoprotein
		Breast cancer resistance protein
		Multidrug resistance protein
		Multidrug and toxin extrusion transporter
		Bile salt export pump

小肠、肾脏、肝脏以及血脑屏障中含有多种转运体 (图 1), 在药物的体内转运中发挥重要作用。小肠上的转运体主要负责吸收食物中的营养物质, 排出药物及其代谢物[6]; 而肾近曲小管上的转运体可以从尿液中重吸收营养物质, 并介

导部分药物从尿液排出[7]；肝细胞上的转运体负责将药物从血液中转运至肝脏，促进药物分子的代谢和排出[8]。

血脑屏障是由紧密连接的血管内皮细胞和神经胶质细胞构成的一道屏障，作用于脑内靶标的药物一般需要具有较高的脂溶性以及较小的分子质量（小于 400 Da） [9, 10]，从而可以通过被动扩散的方式透过血脑屏障入脑发挥药效。此外，血脑屏障上含有多种转运体，其中 OATP 转运体可以将部分阴离子型化合物转运进入大脑，但其在血脑屏障中表达量较低，转运的通量不高；而表达 P-gp、BCRP 以及 MRP 则具有广泛的底物范围，可以将多种药物泵出血脑屏障 [11-13]，因此部分药物尽管具有较好的脂溶性却难以入脑，目前可采用针对 P-gp 进行结构改造的策略促进药物透过血脑屏障[14, 15]。

鉴于转运体对于药物的药代动力学特性具有重要影响，研究人员需要考察药物是否是某种转运体的底物或者抑制剂，进而推测其可能产生的不良反应或者相关的药物-药物相互作用；此外，近年来，研究人员也试图通过将药物分子进行结构改造或前药修饰，使其成为摄取转运体的底物或者避免被外排转运体排出，从而增加药物的口服吸收，使药物富集于靶器官增强药物疗效。本文旨在介绍人体中常见的药物相关转运体的研究进展，以及针对转运体进行的药物改造和设计策略，以期为转运体相关的药物设计提供新的研究思路。



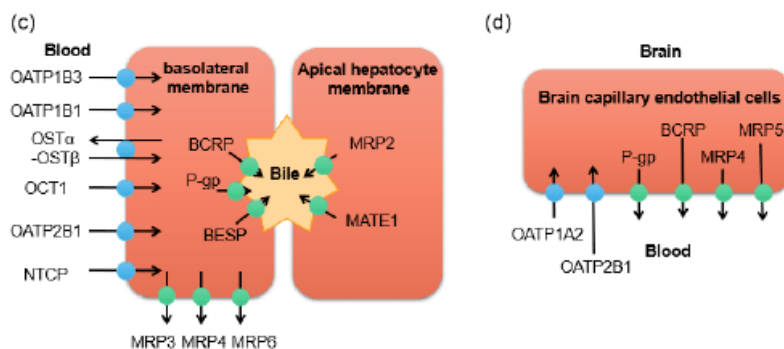


Figure 1 (a) Transporters in plasma membrane domains of intestinal epithelia; (b) Transporters in plasma membrane domains of kidney proximal tubules; (c) Transporters in plasma membrane domains of hepatocytes; (d) Transporters in plasma membrane domains of brain capillary endothelial cells

1

## 可溶性载体超家族

### 1.1 寡肽转运体 (peptide transporters, PEPTs)

PEPTs 是一种质子耦合的转运蛋白，人体的 PEPTs 分为两种亚型：PEPT1 和 PEPT2，二者具有不同的动力学性质以及组织分布。PEPT1 对底物的容量高、底物范围广，但亲和力低，主要分布于小肠上皮细胞，用于转运膳食蛋白分解成的二肽以及三肽；而 PEPT2 对底物的亲和力高，但容量低、底物范围相对较窄，对多肽的侧链具有一定的选择性，主要在肾脏、脑和肺中表达，可以从肾小球滤液中重吸收肽，在生物体中分布较广[16-19]。

PEPTs 在药物转运过程中发挥重要作用，小肠中的 PEPT1 含量丰富，可以将底物从肠道中转运进入上皮细胞，促进底物吸收。PEPTs 的底物一般具有以下特点：

①PEPTs 的底物大多含有肽键或者类似肽键的结构片段（亚甲基酮、硫代羰基等）[20]；

②含有  $\alpha$ -氨基的化合物能够与 PEPTs 中保守的组氨酸残基形成氢键相互作用，是该类转运体的常见底物[21, 22]；

③PEPTs 可以转运二肽以及三肽，多肽氨基端和羧基端的距离为 500~635 pm，但 PEPTs 无法转运游离氨基酸以及四肽[23, 24]。研究表明，多种类型的上市药物均是 PEPTs 的底物（图 2），例如  $\beta$ -内酰胺类抗生素头孢氨苄（cefalexin 1），该类药物存在脂溶性低、透膜性差的问题，但它是 PEPT1

的转运底物，可在肠道中被转运吸收，具有较高的口服生物利用度[25]。因此，利用 PEPT1 的底物特点，可以拓宽药物设计思路，使某些透膜性较差药物以口服方式给药成为可能。

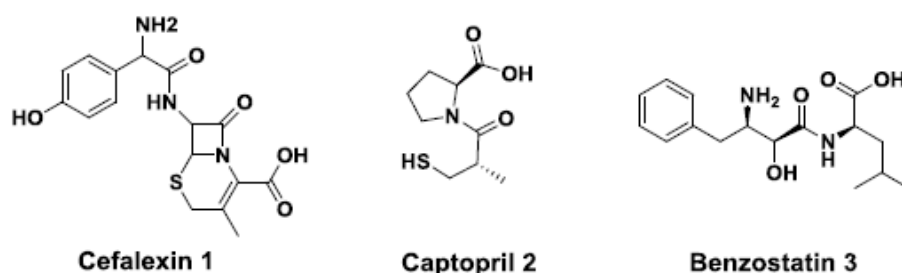


Figure 2 Representative marketed drugs as the substrates of PEPT

许多药物并不具有 PEPT 底物的结构特征，但可以通过设计成前药形式使其被 PEPT 识别和转运，增强口服生物利用度（图 3）[26, 27]。氨基酸酯化是靶向 PEPT1 前药设计的首选方法，因为药物的  $\alpha$ -氨基酸酯在结构上类似于多肽，容易被 PEPT1 所识别，并且在肠道 pH 值范围中展现出良好的化学稳定性；其次，引入氨基酸后，分子中会多出一个游离的氨基，可以增加化合物的水溶性；此外，L-型氨基酸类前药在被吸收进入人体后，可在酯酶的催化下水解，释放出原型药物，所以一般选用 L-型氨基酸制备前药[27, 28]。

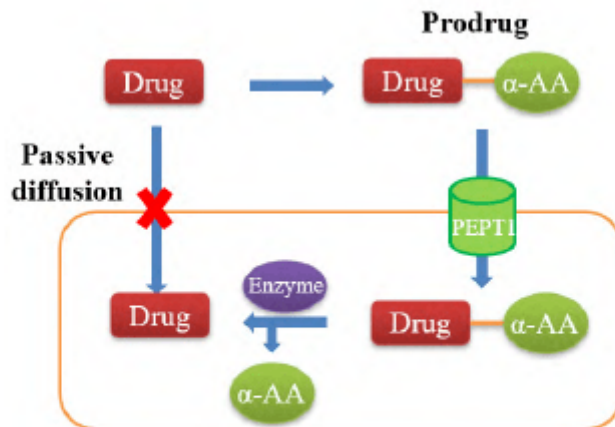


Figure 3 Strategy targeting PEPT for prodrug design

抗病毒药阿昔洛韦（acyclovir 5）的口服生物利用度仅为 10%~20%，研究人员将其结构中的末端羟基与缬氨酸通过酯键连接，得到前药伐昔洛韦（valaciclovir 4）。体外实验表明伐昔洛韦主要经 PEPT1 转运吸收，人体内的口服生物利用度是阿昔洛韦的 3~5 倍，且其被吸收进入人体后，可以在伐昔洛韦水解酶的催化下，水解生成阿昔洛韦，发挥药效（图 4a）[29]。此外，也有部分药物以自身氨基通过酰胺键与氨基酸相连设计获得前药，例如抗精神疾病类药物 LY354740 通过分子上的游离的氨基与丙氨酸形成酰胺键，得到前药 LY544344，该前药分子对 PEPT 展现出了高亲和力[30]，在大鼠体内的口

服生物利用度达到了 85%，且给药 30 min 后前药全部水解转化为 LY354740（图 4b）[31]。

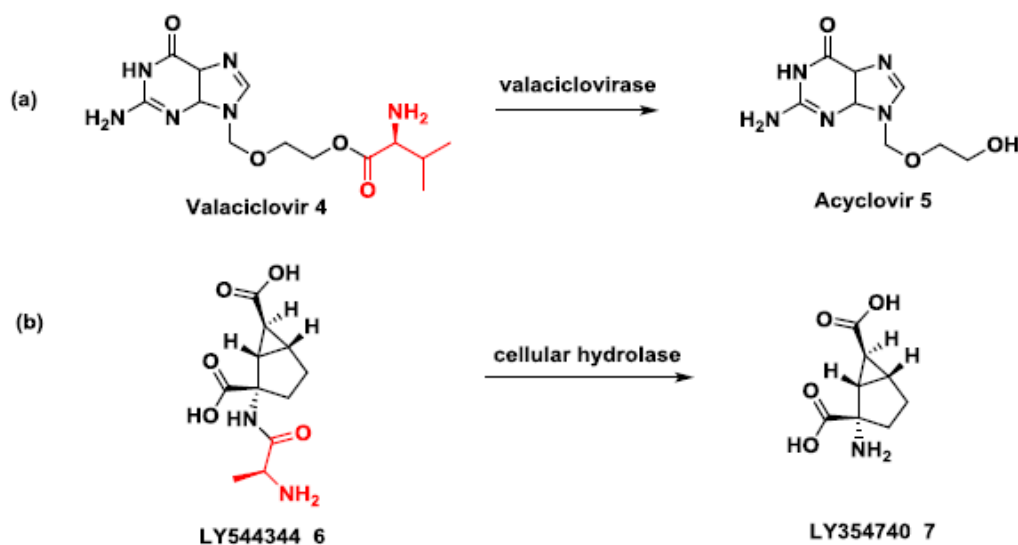
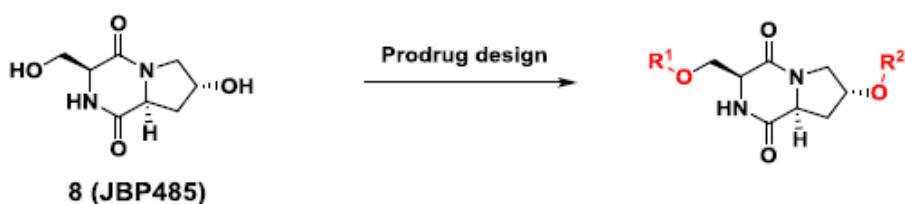


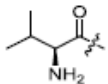
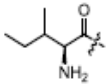
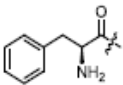
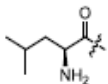
Figure 4 Examples of prodrug design targeting PEPT

最近，He 课题组[32]同样利用该种前药策略对抗肝炎药物 JBP485 进行结构改造，JBP485 是一种环状二肽分子，它可以被 PEPT 所识别，但亲和力较低，在大鼠体内的生物利用度仅有 21%。研究人员尝试在分子中的游离的羟基上引入多种类型的 L-氨基酸，将分子设计成前药，从而增强化合物对 PEPT1 的亲和力。结果表明在 R1 位置引入氨基酸酯可以有效提升化合物的口服生物利用度，并且 L-缬氨酸酯（J3V）的提升效果最强（表 2）。

Table 2 Prodrug design of JBP485 by introducing L-amino acids



Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	F/%
8 (JBP485)	H	H	21.0
9 (J3V)		H	50.1

10	H		36.0
11			H
12			H
13			H

进一步实验结果表明，优选前药 J3V 在大鼠体内可以迅速水解成原型药物 JBP485，其暴露量相比原型药物提升了近 10 倍（图 5）。

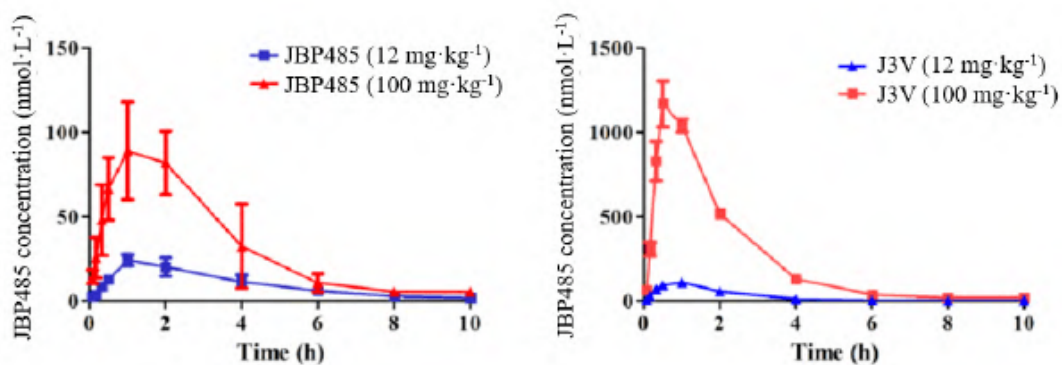


Figure 5 PK profiles of oral administration of JBP485 and J3V in rats

## 1.2 有机阴离子转运体(organic anion transporters, OATs)

OATs 主要负责转运人体中带负电荷的内源性代谢物，目前已经发现了 20 多种 OAT 亚型，其中 OAT1、OAT2 和 OAT3 负责将底物从血液中转运进入肾小管上皮细胞，在药物分子的清除排泄过程中发挥重要作用[33, 34]。OAT1、OAT2 和 OAT3 的底物范围均十分广泛，转运底物主要是相对分子质量小于 500 的亲水性阴离子化合物（图 6）[33]，例如非甾体抗炎药以及  $\beta$ -内酰胺类抗生素等。此外，当多种药物竞争同一种 OAT 或者 OAT 转运活性被药物抑制时会导致 DDI 的发生，例如苯扎贝特（bezafibrate, 14）和咪唑立滨

（mizoribine, 15）都是 OAT1/3 的底物，当二者同时服用时会导致苯扎贝特的清除率降低，药物暴露量增加，极有可能导致横纹肌溶解等不良反应的发生 [35, 36]。因此，在药物研发过程中需要明确化合物是否是 OATs 的底物，避免 DDI 所介导的不良反应。

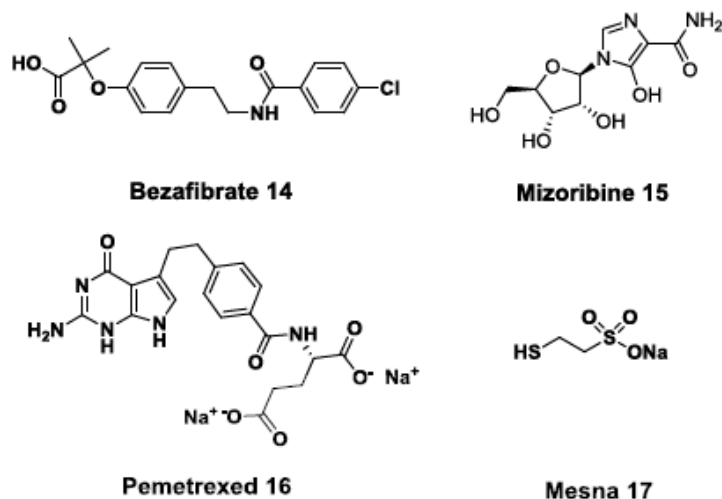
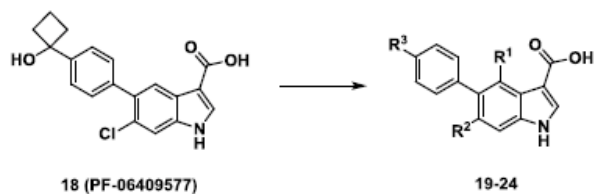


Figure 6 Representative marketed drugs as the substrates of OATs

OATs 可以促进其底物进入肾脏，介导其从尿排出，从而导致底物的肾脏清除率增加。OATs 的底物一般极性较大，因此可以通过对底物中的极性基团进行封闭和替换的策略来改善其清除率。PF-06409577 是强效 AMPK 激动剂，其 AMPK 激动活性为  $7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (表 2)，但该分子是 OAT3 的底物并且在肾脏的清除率较高 (大鼠体内  $\text{CL}_{\text{renal}} = 7.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ )，限制了其进一步开发[37]。OATs 的底物通常是极性较大的离子型化合物，因此，辉瑞公司研究人员[38]设想通过替换分子中的极性基团来降低化合物对 OAT3 的亲合力。前期研究结果表明，分子中游离的羟基对于维持激动活性并不是必须的，而羧基和吡啶则会和靶点中的赖氨酸残基形成关键的氢键相互作用，所以研究人员选择对环丁醇片段进行封闭和替换，尝试在保持化合物激动活性的基础上，改善其肾脏清除率。研究人员首先将环丁醇替换为乙二醇，以便进行后续改造，所得化合物 19 极性增大且对 OAT3 的亲合力提升，进一步将末端羟基封闭得到化合物 20，其 hOAT3 的摄取比例显著降低，而在末端引入极性较大的吗啉环则会提升化合物对 OAT3 的亲合力 (表 3)。研究人员将 R3 基团替换为极性较小且脂溶性强的四氢吡喃环，得到兼有较好 AMPK 激动活性和较低 hOAT3 亲和力的化合物 22，在此基础上，他们又通过替换 R1 和 R2 基团进一步提升化合物的渗透性，最终得到化合物 24(PF-06679142)，其在大鼠体内肾脏清除率仅为  $0.03 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，改善了该类化合物的成药性。

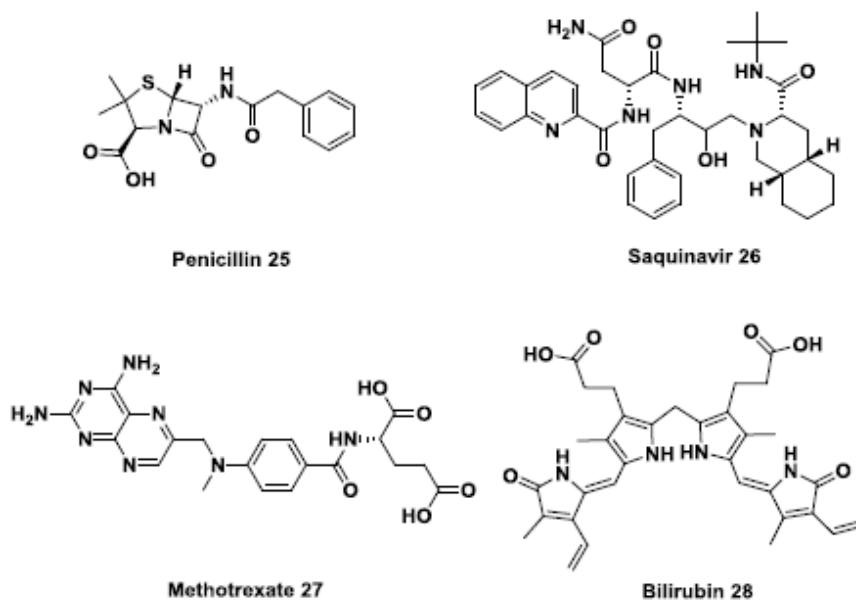
affinity to hOAT3. <sup>a</sup> Passive permeability ( $P_{app}$ ) from the apical to basolateral (AB) direction was measured in Ralph Russ canine kidney (RRCK) cells. <sup>b</sup> Ratio of uptake in hOAT3 transfected HEK293 cells to uptake in vector-treated cells



Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	EC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>	$P_{app}^a$ / 10 <sup>-6</sup> cm·s <sup>-1</sup>	hOAT3 uptake <sup>b</sup>
18	H	Cl		5.6	5.8	4.7
19	H	Cl		47	2.9	7.1
20	H	Cl		57	12	1.6
21	H	Cl		43	6.6	6.3
22	H	Cl		24	9.8	1.1
23	F	F		62	ND	ND
24 (PF-06679142)	F	F		22	14	2.3

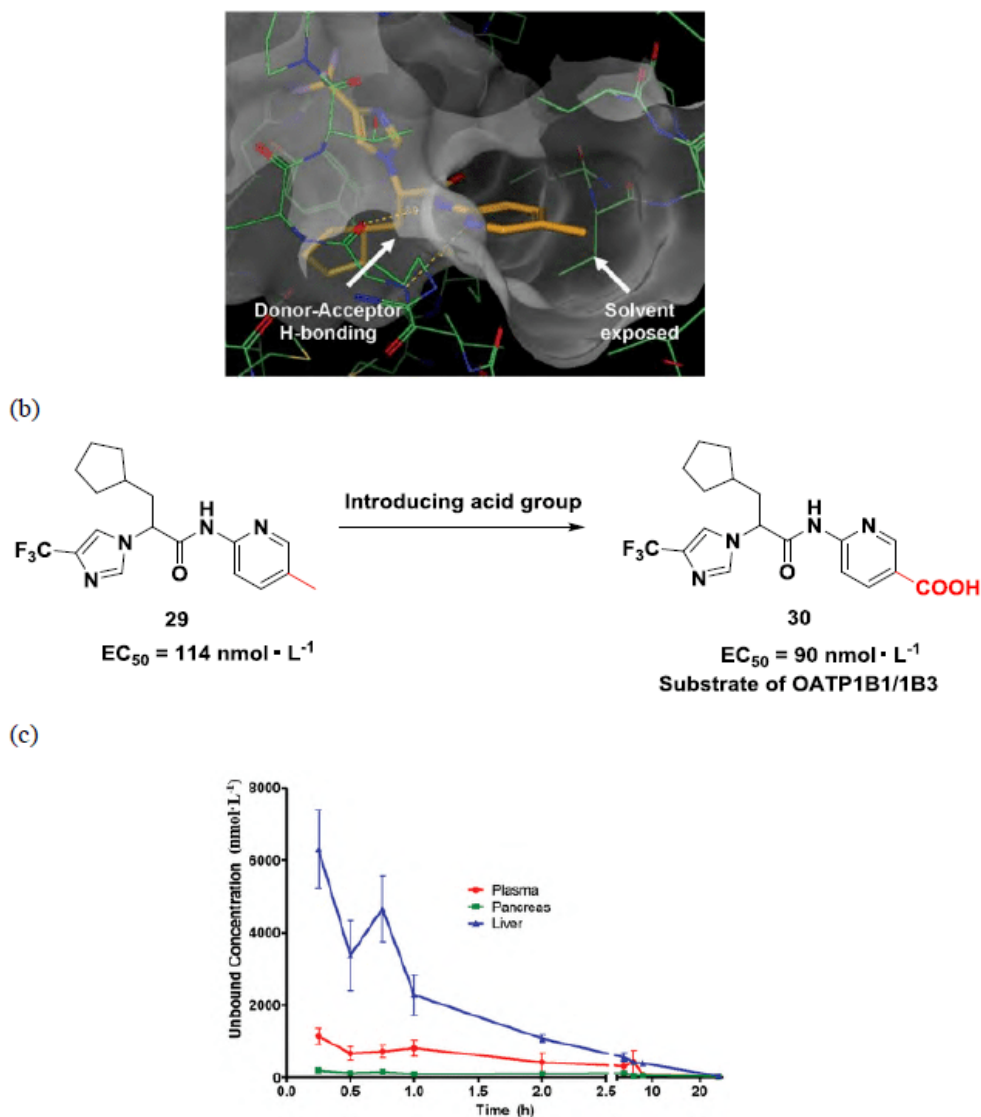
### 1.3 有机阴离子多肽转运体 (organic anion transporting polypeptides, OATPs)

OATPs 在结构上与 OATs 相似但转运底物略有不同, OATPs 的底物主要是分子量较大的疏水阴离子而 OAT 则转运分子量较小的亲水阴离子 (图 7) [33]。OATPs 有多种亚型, 其中 OATP1B1 和 OATP1B3 主要分布于肝细胞基侧膜, 是肝脏中含量最丰富的转运体, 在许多药物肝摄取过程中发挥重要作用, 因此 OATP1B1/1B3 被竞争性或非竞争性抑制时, 可能会导致 DDI 的发生。另一方面, 某些药物的靶标存在于肝内, 设计肝脏选择性的药物可以降低不良反应以及提高疗效, 所以利用 OATP1B1/1B3 转运药物进入肝细胞也就成为了一种新型的药物设计策略。



**Figure 7** Representative marketed drugs as the substrates of OATPs

葡萄糖激酶（glucokinase, GK）激动剂可以增强葡萄糖激酶的催化活性，促进葡萄糖转化为 6-磷酸葡萄糖，从而降低血糖，是一种新型的抗 II 型糖尿病药物。但研究表明该类药物会在较低血糖水平下激活胰腺中的 GK，从而引起胰岛素释放，造成低血糖，因此，开发肝脏选择性的 GK 激动剂则有望避免低血糖风险[39]。化合物 29 是一种葡萄糖激酶激动剂，辉瑞公司研究人员[40]设想通过结构改造将其变为 OATP1B1/1B3 的底物，使其能够被 OATP1B1/1B3 转运进入肝细胞，从而选择性的在肝中富集，以避免不良反应的产生。OATPs 的底物大部分是疏水性阴离子，而且很多是含有羧基结构的化合物，因此研究人员设想在化合物 29 的结构中引入羧基，同时羧基也可以降低分子的渗透性，避免化合物的被动扩散。通过对晶体复合物结构进行分析（图 8a），研究人员发现化合物 29 中的咪唑环和环戊烷伸向口袋内部，而吡啶环上的甲基暴露在溶剂区中，是一个合适的改造位点。由此所得到的化合物 30 既保持了 GK 的激动活性，同时也成为了 OATP1B1 和 OATP1B3 的底物（图 8b）。大鼠体内实验结果表明，化合物 30 经口服进入大鼠体内后主要富集于肝内，且在胰腺内的含量极低，对肝脏展现出了良好的选择性（图 8c）。此外，研究人员进行了后续的结构改造，结果表明将羧基替换为磺酸、草胺酸以及四氮唑均可维持其对转运体的亲和力，但是所得化合物的 GK 激动活性不高[40]。



**Figure 8** (a) Complex structure of compound 29 with glucokinase. (b) Increasing the affinity of GK activator to OATP1B1/1B3. (c) Acute tissue distribution time course of 22 in rat after oral administration

硬脂酰-CoA 去饱和酶-1 (stearoyl-CoA desaturase-1, SCD1) 抑制剂是一种新型的糖尿病和血脂异常治疗药物, 但临床前实验表明抑制皮肤和眼组织中的 SCD 会导致严重的不良反应, 因此开发肝脏选择性的 SCD1 抑制剂十分必要。默克公司研究人员[41]设想在 SCD1 抑制剂 31 上引入酸性基团使其成为 OATPs 的底物 (图 9)。初步研究发现, 在 31 的苯环上进行结构改造导致化合物活性丧失 (化合物 32), 而在左侧的杂环上引入酸性基团则可以在保持活性的基础上使化合物成为 OATP1B1/1B3 的底物 (化合物 33)。随后, 研究人员进一步结构改造, 得到活性较强的化合物 34。动物实验结果表明, 化合物 34 在恒河猴体内的肝脏/血浆浓度比达到 39:1, 皮肤组织中的药物浓度极低而眼组织中未能检测到药物, 为后续研发奠定基础。

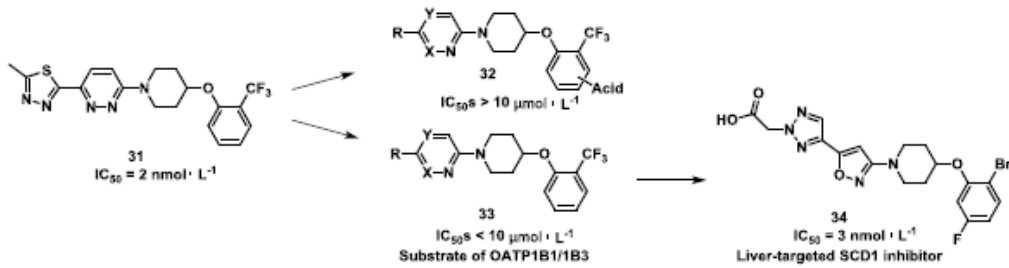


Figure 9 Increasing the affinity of SCD1 inhibitors to OATP1B1/1B3

OATPs 对于其底物也可能产生负面的影响，许多药物的靶标并不仅存在于肝内，在肝内富集即会导致治疗效果下降，也会加速药物的代谢和排泄。化合物 35 是一种肝脏选择性的 AMPK 激动剂，对肝中脂代谢具有较好的改善作用，默克公司研究人员[42]试图对其进行结构改造，降低其肝脏选择性，增强其对骨骼肌中 AMPK 的激动活性，以达到治疗糖尿病的目的。化合物 35 具有肝脏选择性的原因是它可以被 OATP1B1/1B2 所转运，并且其极性较大、透膜性差，进入肝脏后难以通过被动扩散离开肝脏。研究人员认为分子中的羧基是化合物维持其对 OATP1B1/1B2 亲和力的重要基团，用极性较小的电子等排体对其进行替换既可避免化合物被 OATP1B1/1B2 转运，又可以增加化合物的透膜性。替换后所得到的化合物 36 的渗透性提高，肝脏选择性显著降低，小鼠体内的肝脏骨骼肌浓度比例降为 3，并展示出了良好的降糖活性(图 10)[42]。

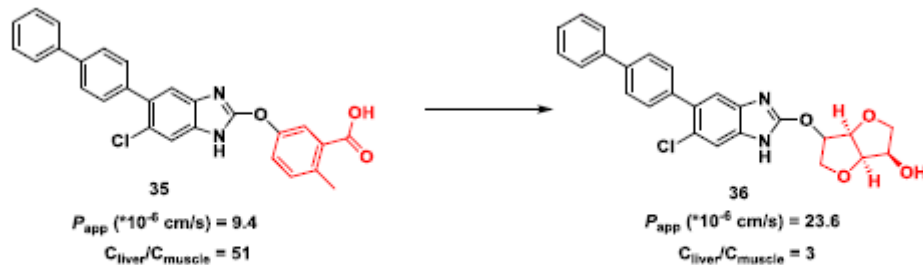


Figure 10 Decreasing the affinity of AMPK activator to OATP1B1/1B2 by

#### 1.4 有机阳离子转运体 (organic cation transporters, OCTs)

OCT 主要分为 OCT1、OCT2 和 OCT3 三个亚型。其中 OCT1 和 OCT2 分别分布于肝细胞和肾近曲小管细胞，可以介导药物进入肝脏和肾脏，促进药物的代谢和排泄；而 OCT3 分布广泛，在骨骼肌、小肠、脑、心脏和胎盘等多种组织中均有分布，主要负责单胺类神经递质、激素以及类固醇在人体内的转运 [43, 44]。许多药物例如顺铂、二甲双胍、拉米夫定等 (图 11) 是 OCT1/2 的转运底物；当 OCT1/2 被竞争性或非竞争性抑制时，可能导致 DDI 的发生。



Figure 11 Representative structures of marketed drugs that are the substrates of

OCT1 和 OCT2 具有较高的同源性，底物主要是阳离子化合物以及在生理环境下带有正电荷的弱碱以及部分不带电荷的化合物，而其抑制剂一般是在生理条件下带有正电荷的亲脂性化合物。此外，Gustavsson 等[45]分析了 354 个化合物对 OCT1/2 的亲和力，总结了 OCT1/2 底物的一般特征。首先，OCT1/2 倾向于转运分子量和体积较小的化合物，所有 OCT1/2 底物的分子体积均小于 500 Å<sup>3</sup>；其次，化合物的极性表面积（PSA）越小，LogD 越高，则越有可能被 OCT2 转运，但化合物对 OCT1 的亲和力和 PSA 以及 LogD 之间无相关性。

与 OATP1B1/1B3 相类似，OCT1 也可通过增加化合物在肝内的浓度从而加强化合物的治疗作用，例如二甲双胍（metformin 37）极性较大，透膜性差，但是可以通过 OCT1 在肝细胞内富集，激活 AMPK，抑制葡萄糖的产生[46]；某些抗病毒药物如拉米夫定（lamivudine 38）被证明是 OCTs 的底物，可以经 OCTs 转运进入肝细胞，抑制乙肝病毒[47]。OCTs 也会导致部分药物在肾脏中富集，例如顺铂（cis-platinum 39）会被 OCT2 转运进入肾脏，但肾脏上外排转运体却难以将顺铂转运至尿液，因此顺铂会在肾脏中蓄积，导致肾毒性的发生。而新一代的化疗药物卡铂则不是 OCT2 的底物，所以肾毒性较轻，安全性比顺铂更高[48]。

内容由凡默谷小编查阅文献选取，排版与编辑为原创。如转载，请尊重劳动成果，注明来源于凡默谷公众号。

2

## ATP 结合盒转运体（ATP-binding cassette, ABC）超家族

### 2.1 P 糖蛋白（P-glycoprotein, P-gp）

P-gp 由 MDR1 基因所编码，广泛分布于小肠上皮细胞、血-组织屏障、肝内胆管上皮细胞以及肾脏近曲小管的上皮细胞。P-gp 在限制药物透过血脑屏障、小肠药物吸收以及促进药物的尿排泄和胆汁排泄方面发挥重要作用。P-gp 的转运底物一般具有以下特点：

①P-gp 结合底物的空腔较大且特异性不高，因此相对分子质量较小（MW <250）的化合物通常情况下不会成为 P-gp 的底物，而相对分子质量大于 400 的化合物则很有可能被 P-gp 转运[49]；

②对 P-gp 的晶体结构分析，其底物结合区域中有一部分谷氨酰胺和丝氨酸等极性氨基酸残基，它们可以和药物分子中的氢键受体形成氢键相互作用，因此分子中含有氢键供体越多，则越易成为 P-gp 的底物[49, 50]；

③药物分子所带的电荷类型也会影响其与 P-gp 结合的效率，多项研究表明带有阳离子的碱性基团（ $pK_a > 4$  的酸）会增加化合物成为 P-gp 底物的概率，而带有阴离子的酸性基团（ $pK_a < 8$  的碱）则会降低这种概率[49]；

④化合物的拓扑极性表面积（TPSA）越大，则越有可能成为 P-gp 底物[50]。

P-gp 可以将毒性物质或者代谢产物转运出细胞，对于维持细胞的正常生理功能具有重要作用，但是如果药物分子本身是 P-gp 底物则可能导致一系列的不利影响。首先，在药物-药物相互作用方面，某些药物比如地高辛是 P-gp 的底物，当与其他 P-gp 底物或抑制剂同时服用时，则会引起地高辛的暴露量的升高[51]。其次，许多耐药反应与 P-gp 相关，在 NCI-60 细胞系中，有超过 50% 的肿瘤细胞系表达了 P-gp，特别是在肾癌和结肠癌中出现了 P-gp 高表达的情况[52]。此外，小肠上皮细胞上表达的 P-gp 可能会阻碍药物分子的吸收，而肝胆汁上皮细胞以及肾近曲小管的上皮细胞上的 P-gp 会加速药物分子从人体中排出。最后，血脑屏障中的 P-gp 可能会阻碍药物入脑[13]。

鉴于以上特点，研究人员发展了一系列策略来避免 P-gp 介导的耐药性以及其对药物药代动力学特性的影响。其中，最直接的策略就是研发 P-gp 小分子抑制剂[53]，但是目前尚未开发出 P-gp 小分子进入临床研究，因此通过对药物分子进行结构改造来避免被 P-gp 转运可能是更加实用的研究策略。通常可以通过减少分子内氢键供体（ $HBD < 2$ ）以及引入亲脂基团减小 TPSA（ $TPSA < 90 \text{ \AA}^2$ ）的方法来避免小分子化合物被 P-gp 转运。化合物 40 是一种受体相互作用蛋白 1（RIP1）抑制剂，用于治疗神经退行性疾病，但它是 P-gp 的底物，难以穿过血脑屏障发挥药效。

武田制药公司的研究人员[15]设想通过降低化合物的 TPSA 和减少 HBD 的方式避免 P-gp 对其的外排作用（图 12）。前期研究表明化合物结构中的红色部分不与靶点中的残基形成氢键作用，引入亲脂性基团封闭 HBD 以及替换极性较大的三氮唑对化合物的活性影响较小。由此得到的化合物 41 的 TPSA 降低为  $79 \text{ \AA}^2$  且仅有一个 HBD，P-gp 介导的外排比（efflux ratio, ER）降低到 1.9。在此基础上，研究人员将化合物 41 中的咪唑环替换为吡啶环来与苯基连接，将分子中的 HBD 降为 0 个，同时考察不同取代基对活性的影响，最终得到了兼有较好活性与低外排比的化合物 42。

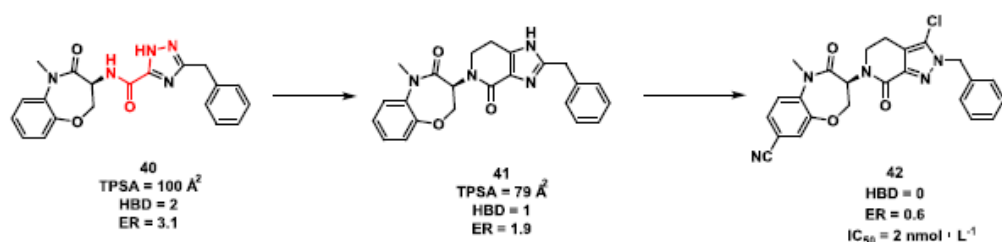


Figure 12 Decreasing tPSA and HBD to avoid the efflux mediated by P-gp

此外，还可以通过降低分子 pKa 的方式来降低分子对 P-gp 的亲合力。化合物 43 是一种  $\beta$ -分泌酶 1 (BACE1) 抑制剂，可以用来治疗阿尔茨海默病，但它受 P-gp 的外排影响难以入脑。盐野义制药公司的研究人员[14]分析后认为分子中游离的氨基是化合物发挥活性的关键，不能对其进行修饰和替换，但 P-gp 对在生理条件下 (pH 7.4) 带电荷的化合物有较高的亲和力，因此将化合物的 pKa 降低到 7.4 以下则有可能降低 P-gp 的外排比 (图 13)。

基于以上策略，他们考虑在氨基相连的环上引入双键，使氨基上的孤对电子离域，达到降低分子 pKa 的目的，同时在双键上引入取代基，考察构效关系。由此设计改造得到化合物 44 保持了对 BACE1 的抑制活性 (IC<sub>50</sub> = 59 nmol · L<sup>-1</sup>)，并且其 pKa 降低到 6.9，P-gp 介导的外排比例显著改善 (ER 值降低到 12)，动物实验结果表明化合物在小鼠体内的 B/P 增加，达到 1.2，并且将阿尔茨海默病小鼠脑内的 A $\beta$  降低了 69%，具有良好的治疗效果。

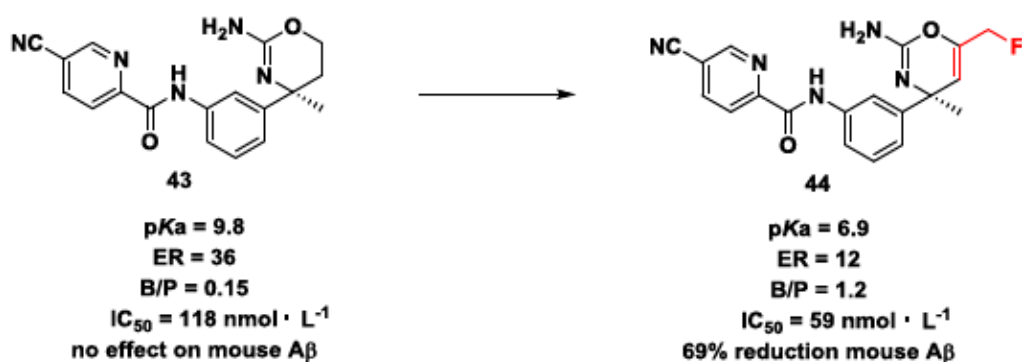
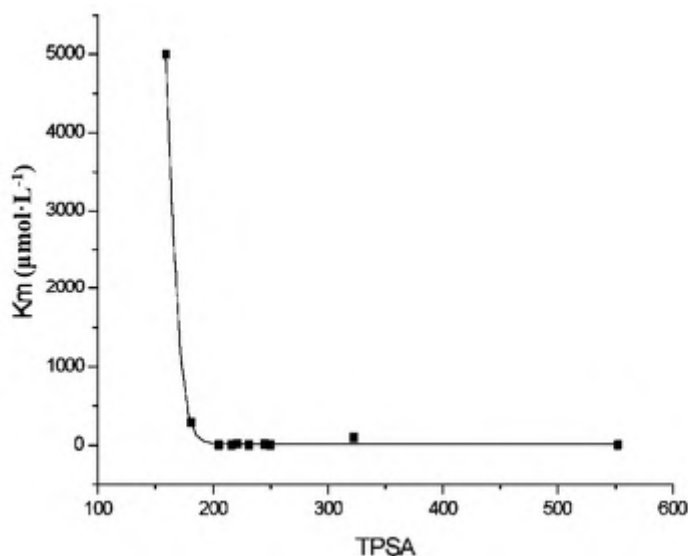


Figure 13 Decreasing pK<sub>a</sub> to reduce the efflux mediated by P-gp

## 2.2 多药耐药相关蛋白-1 (multidrug resistance protein 1, MRP1)

MRP1 由 ABCC1 基因所编码，广泛分布于人体的各个组织，可以将有机阴离子以及药物或药物的 II 相代谢产物泵出细胞，从而保护组织细胞免受外源性毒素的损伤。Gattass 课题组[54]发现化合物的 TPSA 与对 MRP1 的亲合力之间有着显著的相关性，并建立了底物米氏常数 (K<sub>m</sub>) 和 TPSA 的相关性曲线 (图 14)。



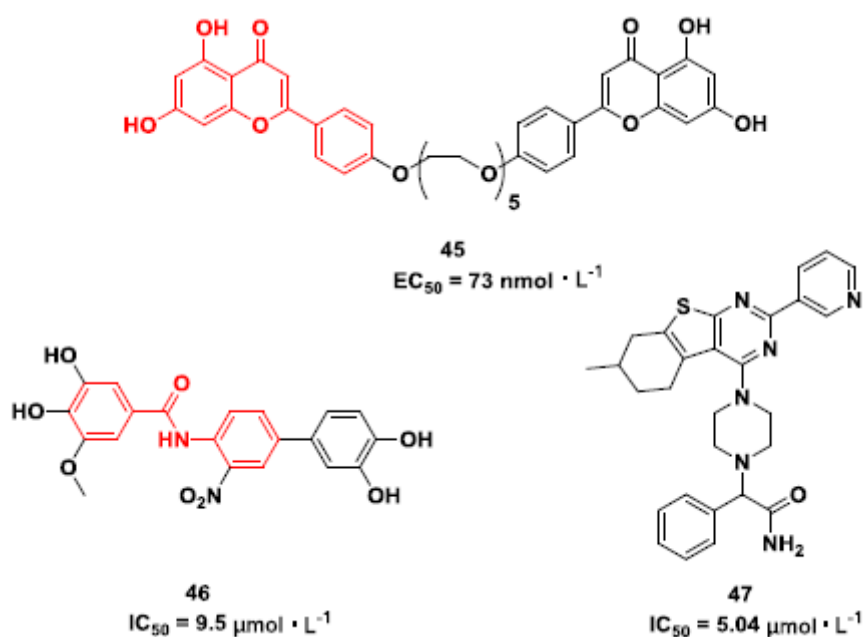
当化合物的 TPSA 大于 150 Å<sup>2</sup> 时，其极有可能成为 MRP1 的底物；TPSA 较小的化合物不易被 MRP1 所转运，但是化合物被葡萄糖醛酸化、硫酸化或者与谷胱甘肽结合后，产物的 TPSA 会极大增加，从而成为 MRP1 的底物。因此，降低化合物极性、减少 II 相代谢可能会有助于避免化合物被 MRP1 转运。

目前，已发现有多种化疗药物例如长春新碱、阿霉素、依托泊苷等均是 MRP1 的底物。研究表明，在非小细胞性肺癌、胃肠癌和黑色素瘤等多种肿瘤细胞中均出现 MRP1 表达升高的情况，进而导致细胞内化疗药物浓度降低，引起肿瘤多药耐药（MDR）的产生，而 MRP1 抑制剂则可以逆转 MDR，增强化疗药物的疗效[55, 56]。

传统的 MRP1 抑制剂主要包括非甾体抗炎药（吲哚美辛）[57]、白三烯受体拮抗剂（MK571）[58]、P-gp 抑制剂（维拉帕米）[59]、天然黄酮类化合物[60] 等，但它们的选择性低而且抑制活性不高，因此难以进行实际应用。许多研究人员试图通过对现有的 MRP1 抑制剂进行结构改造，以期得到选择性较好且具有较高 MRP1 抑制活性的抑制剂（图 15）。MRP1 具有假二聚体结构，Chan 课题组[60]设想将两分子的黄酮类抑制剂连接在一起后使其同时结合在一个 MRP1 蛋白上，从而增强抑制剂分子的结合活性和选择性，所得到的化合物 45 对 MRP1 展现了高的抑制活性 ( $EC_{50} = 73 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，并且在体外试验中化合物能够逆转肿瘤耐药株对阿霉素的耐药性。

Colabufo 课题组[61]则是分析了传统的 MRP1 抑制剂结构，发现大多数分子中均含有苯甲酰苯胺的核心结构，他们将这一结构提取出来，对苯环上的取代基进行逐步替换和考察，得到了具有微摩尔级抑制活性的化合物 46 ( $IC_{50} = 9.5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。最近，Wiese 课题组[62]利用虚拟筛选研发 MRP1 抑制剂，他们首先对现有的 MRP1 抑制剂进行分析，建立了药效团模型，然后对 ZINC 数据库中的 16 403 865 个化合物进行相似度搜索和药效团建模，筛选得到了 1510 个化合物；在此基础上，研究人员继续进行了类药性筛选和人工挑选，

得到了 17 个潜在的抑制剂进行实验测定，结果表明，噻吩并嘧啶类化合物 47 具有较好的抑制活性，对 MRP1 的  $IC_{50}$  达到了  $5.04 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，适合作为苗头化合物进行后续开发。



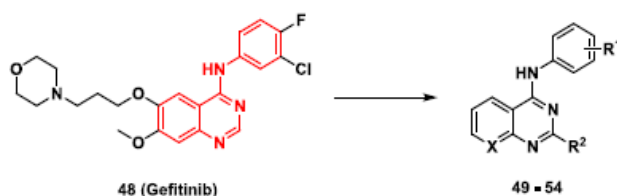
### 2.3 乳腺癌耐药蛋白 (Breast cancer resistance protein, BCRP)

BCRP 是一种外排转运体，主要分布在胃肠道、肝脏、肾脏以及大脑内皮，它的底物类型范围十分广泛，可转运有机阳离子、中性分子以及疏水性化合物 [63]。BCRP 对于底物药物在人体中的转运具有重要影响，它会限制药物口服生物利用度以及阻止药物透过大脑皮层，同时它可以促进药物的胆汁排泄和尿排泄，而 BCRP 被抑制则有可能导致 DDI 的发生 [64]。此外，BCRP 由 ABCG2 基因所编码，ABCG2 上有多个单核苷酸突变位点，其中最为常见的是 c.421C>A，这些基因突变会导致 BCRP 的表达量减少或者转运效能下降，从而引起用药的个体差异 [65]，例如瑞舒伐他汀是 BCRP 的底物，它在 BCRP c.421A/A 纯合子病人体内的暴露量是 c.421C/C 纯合子病人的 2.4 倍 [66]。

BCRP 是介导肿瘤细胞产生耐药性的重要机制之一，目前已发现 BCRP 在多种实体瘤和血液瘤细胞中高表达，许多重要的抗肿瘤药物例如米托蒽醌、甲氨蝶呤、拓扑替康等均是 BCRP 的底物，而 BCRP 则会外排抗肿瘤药物，导致肿瘤细胞内的药物浓度较低，药物治疗效果下降 [63]，因此，开发药物设计新策略，避免 BCRP 对药物治疗的不利影响十分重要。但是 BCRP 的底物范围十分广泛，目前尚无针对 BCRP 进行药物结构改造的具体策略，所以研究人员主要通过开发 BCRP 抑制剂来抑制其转运活性，达到加强药物治疗疗效的目的 [67]。

烟曲霉毒素 C 是最早被发现的 BCRP 特异性抑制剂，具有良好的抑制活性，但是它的神经毒性较高。Allen 等人 [68] 提取得到 FTC 类似物 Ko143，Ko143

的抑制活性更强 ( $EC_{90} = 26 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 且对其他的 ABC 转运体的抑制剂活性较低, 显示出较好的选择性, 作为工具分子广泛使用。其后, 研究人员发现许多含有喹唑啉结构的酪氨酸激酶抑制剂 (例如吉非替尼和埃罗替尼) 均有 BCRP 抑制活性, Wiese 课题组[69]将这一片段提取出来, 对芳环上的取代基进行构效关系考察 (表 4), 结果表明 X 为氮原子时化合物活性较强, 将 R2 基团从苯环变成缺电子或者富电子芳环会导致活性丧失或下降, 在 R1 上引入吸电子基会导致活性下降, 而引入给电子基则可以维持活性。化合物 54 对 BCRP 展现出了最强的抑制活性( $IC_{50} = 149 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 适合作为先导化合物进行后续研究。



Compound	X	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>
49	C	H	Ph	882
50	N	H	Ph	149
51	N	3-NO <sub>2</sub>	Ph	519
52	N	3-NO <sub>2</sub>	3-Pyr	Not active
53	N	3-NO <sub>2</sub>	3-OMe-Ph	747
54	N	3-OMe	Ph	150

此外, 有研究表明 P-gp 抑制剂 tariquidar 也具有 BCRP 抑制剂活性。Wiese 课题组[70]对其进行初步的结构改造, 研究结果表明, 去除 tariquidar 结构中的四氢异喹啉环可以使化合物失去对 P-gp 的抑制作用, 而对 BCRP 抑制活性的影响较小, 这可能是因为四氢异喹啉环中的氮质子化后与 P-gp 形成较强的相互作用。

但是所得到的化合物 56 的 BCRP 抑制活性仅有微摩尔水平 ( $IC_{50} = 1.96 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 因此研究人员对其进一步进行结构改造, 以期提升化合物的 BCRP 抑制活性, 他们参考了新一代 P-gp 抑制剂 HM30181 的结构, 将其中的四氮唑片段引入到分子中, 同时对化合物中的苯环和喹啉环进行替代和考察, 最终得到了具有纳摩尔级抑制活性的化合物 58 ( $IC_{50} = 64 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (图 16) [71]。

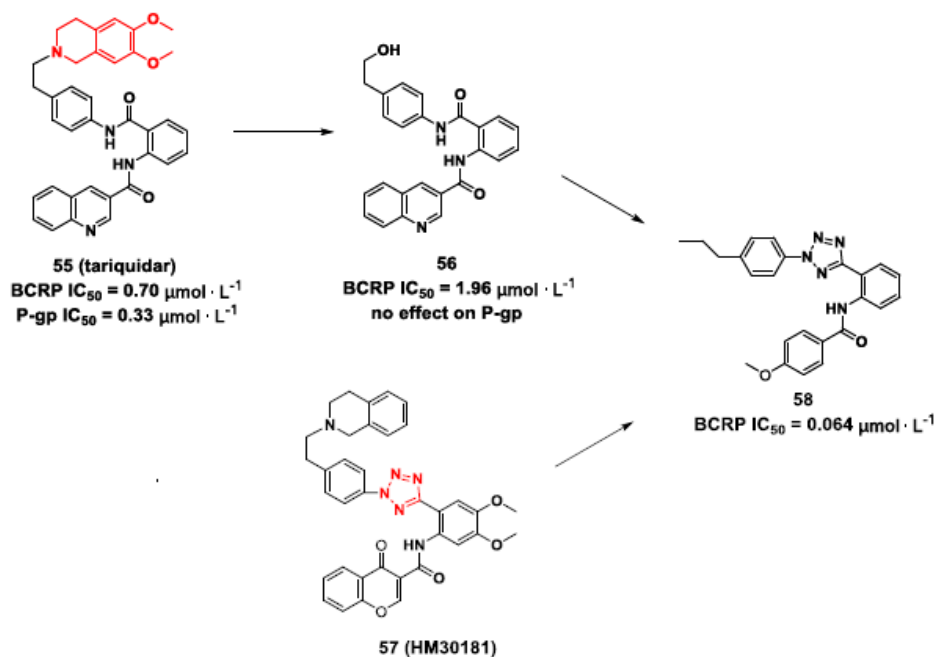


Figure 16 Structures modification of MRP1 selective inhibitors

3

## 总结与展望

转运体对于药物在人体中的转运和分布具有重要影响，是一把双刃剑[72]。一方面它可以促进人体对药物的吸收，改善药物的组织分布；另一方面，转运体也会介导肿瘤细胞的多药耐药，导致 DDI 的产生，促进药物的代谢与排泄。因此，如何合理利用和针对转运体进行药物设计已经引起药物研发人员的高度重视，并且已经有许多实用性的策略开发出来，拓宽了药物设计的新思路和新方法。

但是，目前针对转运体设计报道的研发实例仍然较少，应用范围也比较局限，还需要研究人员开展更多的工作来对探索和拓展针对转运体研究的药物化学结构优化策略。目前，利用转运体进行药物设计已经显现出巨大的潜力，随着未来药物设计策略的不断完善，它也将成为药物研发的重要方法之一。

## 先导化合物结构优化策略(九)—改善药物清除率

### 摘要

清除率反映药物分子在体循环中被提取和消除的快慢程度。通过化学结构修饰方法降低化合物的清除率有助于改善化合物在体内的药代动力学和药效学性质。本文介绍了清除率的概念和研究意义，体内清除率的常见预测方法，重点

综述了改善清除率的先导化合物结构优化策略，主要包括：通过降低亲脂性、封闭代谢位点、骨架修饰、增加位阻等方法降低肝脏代谢转化清除率；通过提高亲脂性、降低极性表面积、生物电子等排等方法降低胆汁排泄清除率或肾脏排泄清除率；最后总结了药物分子立体构型对清除率的影响。

## 关键词

清除率；肝脏代谢；排泄；亲脂性；立体构型

- 正文 -

几十年前，药物研究者在新药研发的早期阶段将重点放在化合物的生物活性上，而对药物代谢动力学性质的优化与投入有限，导致很多体外高活性的候选药物因药物代谢动力学性质较差而终止研发。药代动力学主要问题包括首过效应、口服生物利用度较低、易代谢失活以及产生毒性代谢产物等。

20 世纪 80 年代后期，药物研究人员逐渐认识到化合物的理化性质会对其药代动力学性质产生重要影响，因此相继建立了多种体外代谢实验模型，如肝微粒体和肝细胞稳定性实验等，大大降低了因药代动力学性质不佳引起的药物研发损耗[1]。一个理想的候选药物，不仅应具有高效低毒的特点，还应具有良好的生物利用度和理想的半衰期，使其能够在靶器官达到足够的浓度发挥疗效，而不产生蓄积毒性。

本课题组前期分别从提高药物代谢稳定性与血浆稳定性、改善水溶性、提高血脑屏障通透性、降低潜在毒性等方面，对先导化合物结构优化策略进行了系列综述[2-6]。除此之外，清除率也是一个十分重要的药代参数——首过代谢清除直接影响到口服药物的生物利用度；清除率与分布容积共同影响药物的体内半衰期，进一步影响给药间隔[7]。

本文介绍了清除率的概念和研究意义，以及体内清除率的常见预测方法。重点综述了改善清除率的先导化合物结构优化策略，主要包括：通过降低亲脂性、封闭代谢位点、骨架修饰、增加位阻等方法降低肝脏代谢转化清除率；通过提高亲脂性、降低极性表面积、生物电子等排等方法降低胆汁排泄清除率或肾脏排泄清除率；最后总结了药物分子的立体构型对清除率的影响。通过这些先导化合物的结构优化策略，能够显著改善先导化合物的清除率，为新药设计与研发提供理论指导和实践经验。

## 1.1 清除率的概念

清除率(clearance, CL)定义为：单位时间内，由消除器官完全有效地清除含药液体的体积，其单位通常为  $\text{mL}\cdot(\text{min}\cdot\text{kg})^{-1}$  或  $\text{L}\cdot(\text{h}\cdot\text{kg})^{-1}$  [7]。

清除率主要用于反映药物分子在体循环中被提取和消除的快慢程度，其在药物的研发和临床应用中是一项重要的考察指标。清除率的计算方法如公式(1)所示(dose: 给药剂量;  $\text{AUC}_{0-\infty}$  : 血药浓度-时间曲线下面积)。

清除率的大小与给药途径密切相关，通常考察经静脉注射(i.v.)给药后药物分子的清除率，由于这种情况下所有药物分子均达到体循环，因此计算所得的清除率又称为系统清除率(CLs)。而若采用口服(p.o.)给药，则计算所得清除率称为口服清除率(CL<sub>po</sub>)，有时也称为表观清除率(CL<sub>app</sub>)，其与系统清除率之间的关系如公式(2)所示(F: 口服生物利用度)。此外，在考察药物代谢动力学性质的过程中，以血液为分析对象，测得的清除率称为血液清除率(CL<sub>b</sub>)；以血浆为分析对象测得的清除率称为血浆清除率(CL<sub>p</sub>)。

## 1.2 清除率的研究意义

清除率是药物化学工作者进行结构改造过程中需要考虑的最重要的药代参数之一，因为它决定了药物分子的半衰期、口服生物利用度等其他药代参数[7]。

同时，在确定合适的给药剂量时，也需要考虑药物分子的清除率[8]。清除率与分布容积( $V_d$ )共同决定了药物的消除速率( $k_{el}$ )，并最终影响到药物的半衰期( $t_{1/2}$ )。公式 3 和 4 展示了在一房室模型中，通过分布容积与清除率估算半衰期的方法：

$$CL \approx V_d \times k_{el} \quad (3)$$

$$t_{1/2} \approx \ln 2 \times V_d / CL \quad (4)$$

大多数药物分子通过口服给药，药物在胃肠道吸收不完全或首过代谢会降低药物的生物利用度。对于主要经肝脏清除的药物，肝脏提取是影响口服生物利用度和清除率的重要因素。三者之间的关系如公式 5 和 6 所示( $F_a$ : 吸收分数;  $F_g$ : 药物逃逸肠壁代谢的比例;  $E_h$ : 肝脏提取率;  $Q$ : 肝脏血流)。

另一方面，清除率是联系稳态平均血药浓度( $C_{ss,av}$ )和给药剂量的重要纽带(公式 7, dose: 给药剂量;  $\tau$ : 给药间隔)。另外，生物利用度也受到清除率的影响，因此在公式 7 中，清除率同时影响分子与分母，即清除率的调节会对系列化合物的给药剂量产生直接影响。

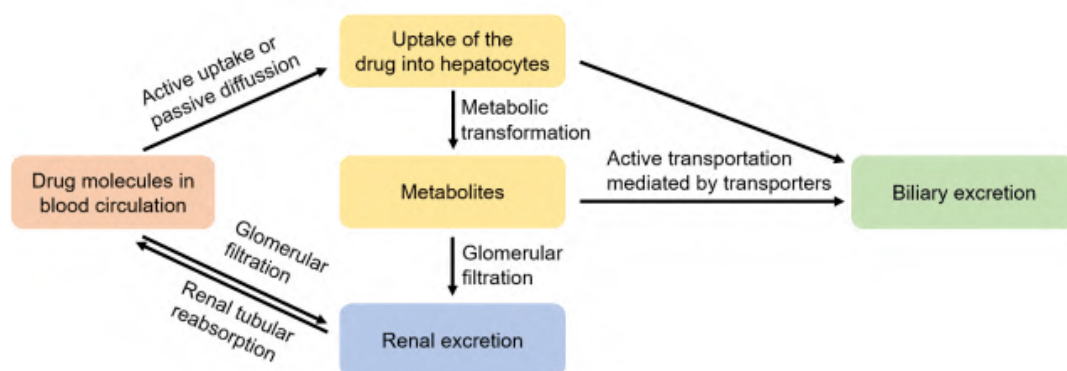
通过以上描述可知，清除率过高的药物，体内半衰期短，口服生物利用度差，血药浓度难以维持在起效浓度以上，导致药物体内药效不佳；而清除率过低的药物，易在体内蓄积产生毒性，对于安全窗较小的药物尤其需要关注其血药浓度的变化。通常以肝全血流量作为参考评价清除率。清除率大于 70%肝全血流量的药物为高清除率药物，清除率小于 30%肝全血流量的药物为低清除率药物。部分动物及人的体重、肝全血流量及清除率范围如表 1 所示[9]。

**Table 1** Body weight, hepatic blood flow and clearance range of some animals and human

Species	Mouse	Rat	Monkey	Dog	Human
Average body weight/kg	0.02	0.25	5	10	70
Hepatic blood flow /mL·(min·kg) <sup>-1</sup>	120	68	44	31	21
Clearance range	36 ~ 84	20 ~ 48	13 ~ 31	9 ~ 22	6 ~ 15

### 1.3 药物清除机制与影响因素

肝脏和肾脏是药物清除的两大器官。药物清除的机制主要分为三大类：代谢转化、胆汁排泄和肾脏排泄(图 1)。



**Figure 1** Major mechanisms of drug clearance

此外，在肠道、皮肤等器官中也可能发生药物清除。肝脏是药物的主要代谢器官，肝细胞中含有大量的摄取/外排转运体以及丰富的药物代谢酶，如：I 相代

谢酶 CYP450 酶、环氧化物水解酶、醛脱氢酶等；II 相代谢酶葡萄糖醛酸转移酶、谷胱甘肽巯基转移酶等[2, 10]；有机阴离子多肽转运体(OATP)、有机阳离子转运体(OCT)、乳腺癌耐药蛋白(BCRP)、多药耐药相关蛋白(MRP)等转运体[11, 12]。药物分子通过被动扩散或主动摄取进入肝细胞后，一方面，在不同代谢酶的催化下发生 I 相代谢和(或)II 相代谢被清除；也有一些药物不经代谢转化，直接以原型药物的形式通过胆汁排泄清除。药物及其代谢物的胆汁排泄通常为转运体介导的主动运输过程，且存在较大的种属差异。

肾脏是药物及其代谢物的主要排泄器官。肾脏排泄主要包括三个过程，即肾小球滤过、肾小管主动分泌和肾小管重吸收。未与血浆蛋白结合的游离小分子药物都会经肾小球滤过作用进入近端肾小管(公式 8, CL<sub>r</sub>: 药物的肾脏清除率; f<sub>u,b</sub>: 血液中游离药物分数; GFR: 肾小球滤过率)。脂溶性较高的分子，容易在肾小管重吸收回到血液循环，这类分子通常经 I 相和(或) II 相代谢转化后形成极性代谢物而被排泄。

在改善药物清除率的过程中，应首先明确药物分子的主要清除途径。药物的清除途径主要受分子的理化性质与透膜性的影响(表 2)[8, 11]。

**Table 2 Influence of physicochemical properties and permeability on drug clearance path**

Physicochemical properties	Log D > 0	Log D > 0	Log D < 0
	(PSA < 75 Å <sup>2</sup> )	(PSA > 75 Å <sup>2</sup> )	
Permeability	High	Medium	Low
Clearance path	Metabolic transformation	Metabolic transformation or excretion mediated by transporters	Renal or biliary excretion (possible transporter involvement)

亲脂性高的药物分子，往往透膜性好，易在肾小管重吸收，因此不易经肾脏排泄，主要经肝脏代谢转化清除。极性大、透膜性差的药物，主要经胆汁或肾脏排泄清除，其跨膜运输受转运体影响较大，清除途径较复杂[13]。

内容由凡默谷小编查阅文献选取，排版与编辑为原创。如转载，请尊重劳动成果，注明来源于凡默谷公众号。

## 体内清除率的预测

已知的体内清除率的预测方法有近 30 种，主要分为两大类：体外体内外推法 (in vitro-in vivo extrapolation, IVIVE) 和异速放大法 (allometric scaling, AS)。

### 2.1 体外体内外推法(IVIVE)

体外体内外推法是最常用的一种肝脏清除率预测方法。采用 IVIVE 法预测药物的肝脏清除率主要经历以下三个步骤：

- ①测量药物分子在体外肝代谢模型中的内在清除率( $CL_{int, in vitro}$ )；
  - ②通过基于生理学的放大参数(PBSF)换算得到药物分子的肝脏内在清除率( $CL_{int, in vivo}$ )；
  - ③选择合适的肝脏处置模型预测药物分子在体内的肝脏清除率( $CL_h$ )[14]。
- 肝微粒体和肝细胞是最实用的两种体外肝代谢模型，对于主要经 CYP450 酶代谢清除的分子，通过将化合物与已知浓度的肝微粒体或肝细胞共孵育，测得化合物的消除速率( $k_{el}$ )，即可根据表 3 中的公式计算出该化合物的体外内在清除率( $CL_{int, in vitro}$ )。随后，将  $CL_{int, in vitro}$  换算为  $CL_{int, in vivo}$ ，这一步骤本质上是将实验中使用的蛋白或细胞浓度换算为肝脏内蛋白或细胞的总含量。以小鼠肝微粒体为例，若将某一小分子与小鼠肝微粒体共孵育，测得该小分子的消除速率  $k_{el}$ ，则根据实验中肝微粒体浓度可计算得到该小分子在小鼠肝微粒体中的内在清除率  $CL_{int, in vitro}$ 。 $CL_{int, in vitro}$  乘以每克肝脏中肝微粒体的含量(即表 4 中的换算系数 47)，再乘以肝脏质量在小鼠总体重中的占比 (54.7)，即可得到小鼠肝脏对该化合物的内在清除率( $CL_{int, in vivo}$ )的预测值。

**Table 3** Prediction of drug clearance through *in vitro-in vivo* extrapolation. <sup>a</sup>  $C_{\text{protein}}$ : Concentration of liver microsomes;  $C_{\text{cell}}$ : Concentration of hepatocytes; PBSF: Physiological based scaling factors, see Table 4

Method	Formular <sup>a</sup>	Defect
<i>In vitro</i> incubation with liver microsomes	$CL_{\text{int},\text{in vitro}} = \frac{k_{\text{el}}}{C_{\text{protein}}}$ $CL_{\text{int},\text{in vivo}} = CL_{\text{int},\text{in vitro}} \times \text{PBSF}$	The experimental results need to be confirmed by <i>in vivo</i> study.
<i>In vitro</i> incubation with hepatocytes	$CL_{\text{int},\text{in vitro}} = \frac{k_{\text{el}}}{C_{\text{cell}}}$ $CL_{\text{int},\text{in vivo}} = CL_{\text{int},\text{in vitro}} \times \text{PBSF}$	The preparation of hepatocytes is complex. Hepatocytes can only survive for 4 hours <i>in vitro</i> .

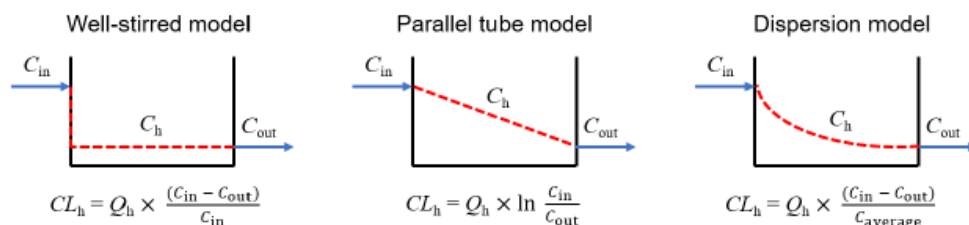
**Table 4** Physiological based scaling factors[9]

PBSF factor	Mouse	Rat	Dog	Monkey	Human
g liver/ kg BW	54.9	36.6	32.9	24.8	25.7
mg prot/g liver	47	47	58	32	32
mg prot/kg BW	2580.3	1720.2	1908.2	793.6	822.4
10 <sup>6</sup> cells/g liver	128	128	187.5	99	99
10 <sup>6</sup> cells/kg BW	7027.20	4684.80	6168.75	2455.20	2544.3
$Q_{\text{liver}}/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	2.4	16.9	309	218	1450

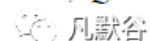
最后，需要选择合适的肝脏处置模型预测化合物在体内的肝脏清除率(CL<sub>h</sub>)。图2中列出了3种最常用的肝脏处置模型以及在相应的模型中，肝脏清除率(CL<sub>h</sub>)的计算方法[14]。其中，充分搅拌模型是最简单的一种数学模型。在该模型中，肝脏对药物的清除率由肝脏血流量(Q)、肝脏对药物的内在非结合清除率

(CL<sub>int,in vivo</sub>)以及药物分子的游离分数(f<sub>u</sub>)共同决定，即将上述计算所得 CL<sub>int,in vivo</sub> 代入公式 9，即可得到化合物在体内的肝脏清除率的预测值。

$$CL_h = (Q \times f_u \times CL_{int,in vivo}) / (Q + f_u \times CL_{int,in vivo}) \quad (9)$$



**Figure 2** Hepatic disposition models<sup>[14]</sup>. C<sub>in</sub>: Influx drug concentration; C<sub>h</sub>: Hepatic drug concentration; C<sub>out</sub>: Efflux drug concentration; CL<sub>h</sub>: Hepatic clearance; Q<sub>h</sub>: Hepatic blood flow



采取体外肝代谢模型对体内清除率进行预测会存在一些误差，例如：化合物渗透性较差时，预测值偏高；化合物经非 CYP 酶代谢时，预测值偏低；若化合物为摄取转运体底物，则预测值偏低，因为体外测试中使用的肝细胞与体内肝细胞相比，细胞膜上转运体活性较低。

## 2.2 异速放大法(AS)

异速放大法是一种经验性方法，假设药物在不同动物间的药代特征是类似的，差异仅在体重<sup>[15]</sup>。具体来说，测量同一药物分子在不同种属动物体内的清除率(CL)，其与动物体重(BW)之间存在幂函数关系(公式 10)<sup>[8]</sup>。若将公式 10 等号左右同时取对数，即可得到线性函数，即公式 11。公式 11 中的 Log<sub>a</sub> 即为图 3 中的截距，b 为斜率。将人的体重带入公式 11，即可推测出该药物分子在人体内的清除率。

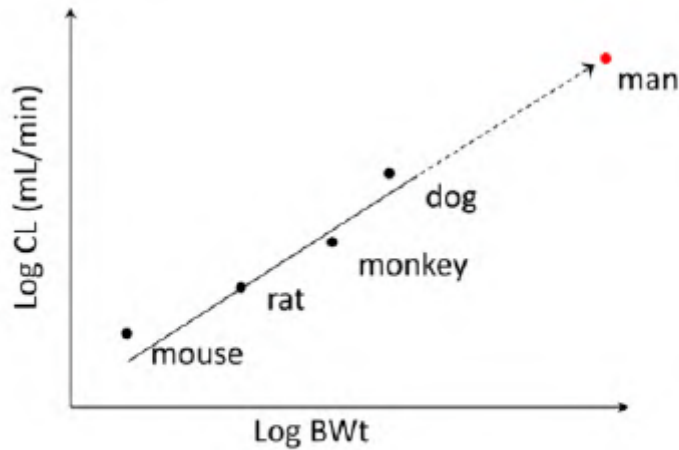


Figure 3 Basics of an allometric scaling experiment<sup>[8]</sup>

在异速放大法的实际应用中，并不需要测量出药物分子在所有实验动物体内的清除率，有时只需要测量化合物在某一种或两种动物体内的清除率，即可根据相应的公式推测出其在人体内的清除率。基于异速放大理论的清除率预测方法有很多种，表 5 中列出了准确性较高的 3 种<sup>[15-17]</sup>，通过将清除率预测值与测量值对比，约 60% 的化合物，其清除率测量值与预测值之间的误差在 2 倍之内；约 80% 的化合物，其清除率测量值与预测值之间的误差在 3 倍之内；而 100% 的化合物清除率测量值与预测值之间的误差在 10 倍之内。采用异速放大法预测人体内清除率的误差主要来源于：

- ① 药物主要经肝脏代谢，且在肝微粒体中的稳定性存在较大的种属差异；
- ② 药物分布过程涉及转运体；
- ③ 个别种属存在代谢饱和现象等。

Table 5 Three allometric scaling-based prediction methods of human clearance with relatively high accuracy

Method	Description	Formular	Remark
$f_u$ Intercept correction method (FCIM)	Universal equation based on the intercept obtained from the simple allometry log-log plot and ratio of unbound fraction in plasma between rats and human	$CL_{human} = 33.35 \text{ mL/min} \times \left(\frac{\alpha}{Rf_{up}}\right)^{0.77}$	$\alpha$ : Allometric scaling factor $Rf_{up}$ : Ratio of unbound fraction in plasma between rats and human
$TS_{rat-dog}$	Rat-dog-human proportionality for bound drug	$CL_{human} = \alpha_{rat-dog} \times (BW_{human})^{0.628}$	$\alpha$ : Allometric scaling factor BW: Body weight
$QSAR_{rat-dog}$	Rat and dog i.v. CL combined with	$\text{Log } CL_{human} = (0.433 \times \text{Log } CL_{rat}) + (1 \times \text{Log } CL_{dog}) - (0.00627 \times MW)$	MW: Molecular weight
	compound descriptors as predictors of i.v. CL in human	$+ (0.189 \times \text{NHBA}) - (0.00111 \times \text{Log } CL_{dog} \times MW) + (0.0000144 \times MW^2) - (0.0004 \times MW \times \text{NHBA}) - 0.707$	weight NHBA: The number of hydrogen bond acceptor

3

### 化学修饰在改善药物清除率中的应用

通过先导化合物结构优化改善清除率的策略主要包括：采用降低亲脂性、封闭代谢位点、骨架修饰、增加位阻等方法降低肝脏代谢转化清除率；采用提高亲脂性、降低极性表面积、生物电子等排等方法降低胆汁排泄清除率或肾脏排泄清除率。此外，药物的立体构型也会对其清除率产生影响。

### 3.1 降低药物肝脏代谢转化清除率

亲脂性高的药物分子，主要经肝脏代谢转化而清除。通过化学结构修饰提升化合物的代谢稳定性，可有效降低肝脏代谢转化清除率，优化药物分子的药代动力学特征。降低肝脏代谢转化清除率的结构改造策略有：降低亲脂性、封闭代谢位点、骨架修饰、增加空间位阻降低谷胱甘肽反应性等。

#### 3.1.1 降低亲脂性

通常亲脂性高、透膜性好的化合物，容易进入肝脏发生代谢转化而被清除。体内的大多数代谢酶都具有与亲脂性基团相结合的活性口袋，对于具有相同骨架或相似结构的化合物，其清除率往往与亲脂性正相关。因此，降低亲脂性是改善化合物清除率的重要策略之一。

非洛地平(felodipine, 1)是第二代钙离子通道阻滞剂(图 4,  $IC_{50} = 0.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )[18]，由于其具有较高的亲脂性( $c\text{LogP} = 5.30$ )，非洛地平在犬体内的系统清除率较高[ $CL = 38 \text{ mL}\cdot(\text{min}\cdot\text{kg})^{-1}$ ]，血浆半衰期仅为 1 h。通过去除苯环 3 位氯原子，并在二氢吡啶环的侧链引入极性的氨基侧链，得到第三代长效型钙离子通道阻滞剂氨氯地平(图 4, amlodipine, 2,  $IC_{50} = 7.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )[19]。氨氯地平的亲脂性相比非洛地平降低约 2 个 Log 单位，犬体内系统清除率降低至  $11 \text{ mL}\cdot(\text{min}\cdot\text{kg})^{-1}$ ，仅为非洛地平的 1/4，血浆半衰期延长至 30 h。氨氯地平的氨基侧链具有碱性，在生理条件下携带正电荷，可与携带负电荷的细胞膜进行结合，这一分子结构特征也决定了其对血管平滑肌细胞钙离子通道具有持久的阻滞作用。

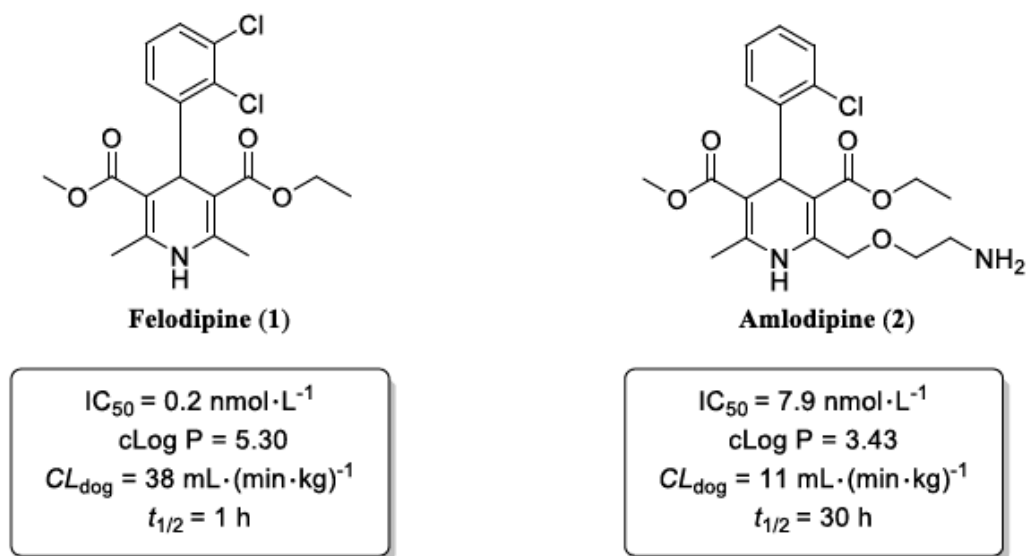
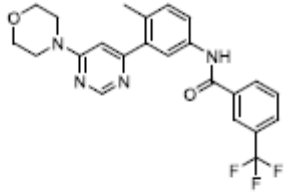
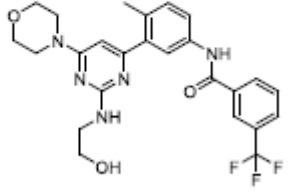
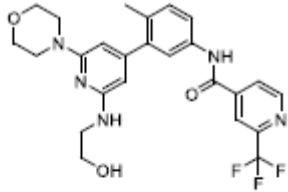
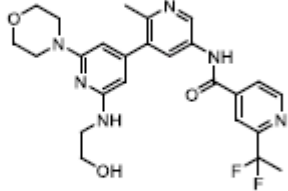
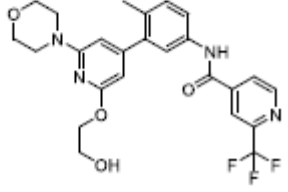


Figure 4 Reducing hepatic metabolic clearance of calcium channel blockers by reducing lipophilicity

化合物 3 对 C-Raf 原癌基因丝苏氨酸蛋白激酶(CRAF)具有较强的抑制活性 (表 6, CRAF IC<sub>50</sub> = 0.000 1 μmol·L<sup>-1</sup>), 但其对 RAS 突变的人退行性肺癌细胞 Calu-6 的增殖(cell proliferation, CP)抑制活性较低 (CP Calu-6 EC<sub>50</sub> = 5.28 μmol·L<sup>-1</sup>), 且人肝微粒体内的清除率较高[CL<sub>int,HLM</sub> = 43.3 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>][20]。

**Table 6** Reducing hepatic metabolic clearance of CRAF inhibitors by reducing lipophilicity

Compd.	Structure	CRAF IC <sub>50</sub> / μmol·L <sup>-1</sup>	CP Calu-6 EC <sub>50</sub> / μmol·L <sup>-1</sup>	cLog P	CL <sub>int,HLM</sub> / μL·(min·mg) <sup>-1</sup>
3		0.000 1	5.28	4.0	43.3
4		0.000 2	0.16	4.1	48.0
5		0.000 6	0.51	3.2	20.5
6		0.000 7	6.22	2.1	10.4
7 (LXH254)		0.000 2	0.47	3.5	13.5

凡默谷

凡默谷

通过在其嘧啶环的 2 位引入氨基乙醇侧链得到化合物 4，其侧链氧原子与靶标蛋白 RAF 激酶的 595 位苯丙氨酸残基形成较强的氢键相互作用，其细胞增殖抑制活性增强(CPCalu-6 EC 50 = 0.16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，相比 3 提高了近 33 倍，但由于化合物 4 具有较高的亲脂性(cLogP = 4.1)，人肝微粒体清除率升高(CL int,HLM = 48.0  $\mu\text{L}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ )。

将化合物 4 的嘧啶环与苯环均由吡啶环替换，得到化合物 5，其亲脂性相比化合物 4 降低了 0.9 个 Log 单位，Chemdraw 软件预测结果表明，右侧苯环采用吡啶环替换对其亲脂性的降低具有较大贡献。化合物 5 在人肝微粒体中的清除率下降至 20.5  $\mu\text{L}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ ，约为化合物 4 的 1/2。

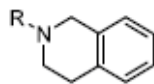
进一步将化合物 5 的三氟甲基中的一个氟原子用甲基替代，得到化合物 6，亲脂性相比 3 降低 1.1 个 Log 单位，人肝微粒体中的清除率进一步下降为化合物 5 的 1/2[CL int,HLM = 10.4  $\mu\text{L}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ ]，随着化合物亲脂性减弱，清除率降低(表 6)。

进一步改造过程中，将氨基乙醇侧链替换为乙二醇侧链，得到细胞增殖抑制活性较高(CP Calu-6 EC 50 = 0.47  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，且清除率较低[CL int,HLM = 13.5  $\mu\text{L}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ ]的化合物 7(LXH254)。

化合物 8 是美国 Epizyme 公司通过高通量筛选发现的蛋白精氨酸甲基转移酶 (PRMT5)抑制剂，该化合物对 PRMT5 具有一定抑制活性(表 7, PRMT5 IC 50 =

326  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )[21]。

Table 7 Reducing hepatic metabolic clearance of PRMT5 inhibitors by reducing lipophilicity. a HLM scaled CL: In vivo intrinsic clearance determined from in vitro intrinsic clearance of human liver microsomes. b MLM scaled CL: In vivo intrinsic clearance determined from in vitro intrinsic clearance of mouse liver microsomes



Compd.	R	PRMT5			HLM	MLM
		IC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>	cLog P	cLog D	scaled CL <sup>a</sup>	scaled CL <sup>b</sup>
					mL·(min·kg) <sup>-1</sup>	
8		326	3.88	0.65	13	50
9		13	3.02	2.25	17	80
10		18	1.63	0.86	10	61
11 (EPZ015666)		22	0.57	-0.14	<5	20

通过结构优化得到化合物 9，虽然其对 PRMT5 的抑制活性明显提升(PRMT5 IC<sub>50</sub> = 13 nmol·L<sup>-1</sup>)，但体外清除率较高，经 IVIVE 法预测所得体内清除率接近人或小鼠肝脏血流[HLM scaled CL = 17 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>；MLM scaled CL = 80 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>]。

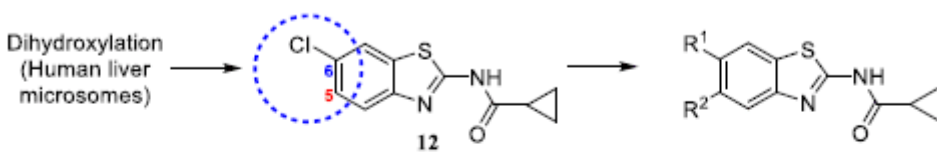
通过将吡啶环替换为四氢吡喃环得到化合物 10，其亲脂性降低 1.39 个 Log 单位，清除率也随之降低[HLM scaled CL = 10 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>；MLM scaled CL = 61 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>]，进一步将四氢吡喃环替换为氧杂环丁烷，得到化合物 11(EPZ015666)，其亲脂性相比化合物 10 降低约 1 个 Log 单位，清除率进一步降低 [HLM scaled CL < 5 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>；MLM scaled CL = 20 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>]。EPZ015666 现作为体内工具药用于 PRMT5 相关药理机制研究[22]，其小鼠、大鼠和比格犬体内的系统清除率分别为 30.0、36.8 和 46.5 mL·(min·kg)<sup>-1</sup> [23]。

### 3.1.2 封闭代谢位点

对于代谢途径较明确的化合物，可以通过封闭代谢位点的结构修饰策略降低化合物的代谢转化清除率，改善药代动力学特性。

化合物 12 具有一定的抗锥虫病活性(表 8, *T. cruzi* IC<sub>50</sub> = 0.63 μmol·L<sup>-1</sup>), 其在人肝微粒体中的清除率为 9.57 mL·(min·kg)<sup>-1</sup> [24]。分析表明, 在人肝微粒体中, 化合物 12 主要发生 5,6 位双羟基化代谢。

**Table 8 Reducing hepatic metabolic clearance of anti-*T. cruzi* agents by blocking the hydroxylation metabolic sites**



Compd.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	<i>T. cruzi</i> IC <sub>50</sub> / μmol·L <sup>-1</sup>	CL <sub>int,HLM</sub> / μL·(min·mg) <sup>-1</sup>
12	Cl	H	0.63	9.57
13	Et	H	0.14	10.4
14	NO <sub>2</sub>	H	0.04	1.57
15	CF <sub>3</sub>	H	0.1	0.94
16	CF <sub>3</sub>	F	0.079	0.41

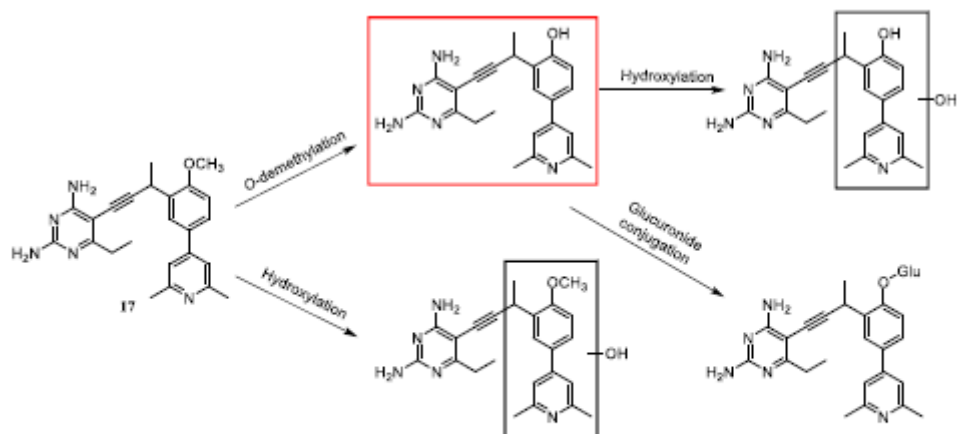
将 6 位氯原子替换为给电子的乙基, 得到化合物 13, 其抗锥虫活性提高(*T. cruzi* IC<sub>50</sub> = 0.14 μmol·L<sup>-1</sup>), 但在人肝微粒体中的清除率略微上升[CL<sub>int,HLM</sub> = 10.4 μL·(min·mg)<sup>-1</sup> ]。

在化合物苯环 6 位引入硝基或三氟甲基等吸电子取代基, 化合物的抗锥虫活性和人肝微粒体清除率均得到改善[14, *T. cruzi* IC<sub>50</sub> = 0.04 μmol·L<sup>-1</sup>, CL<sub>int,HLM</sub> = 1.57 μL·(min·mg)<sup>-1</sup>; 15, *T. cruzi* IC<sub>50</sub> = 0.1 μmol·L<sup>-1</sup>, CL<sub>int,HLM</sub> = 0.94 μL·(min·mg)<sup>-1</sup> ]。考虑到硝基可能在还原的过程中产生自由基引发毒性, 所以选择化合物 15 进行进一步改造。

通过在化合物 15 的苯环 5 位引入氟原子封闭羟基化代谢位点, 得到化合物 16, 其抗锥虫活性进一步提高(*T. cruzi* IC<sub>50</sub> = 0.079 μmol·L<sup>-1</sup>), 化合物 16 在人肝微粒体中的清除率显著下降[CL<sub>int,HLM</sub> = 0.41 μL·(min·mg)<sup>-1</sup> ], 仅为化合物 12 人肝微粒体中清除率的 1/23。

化合物 17 是一种二氢叶酸还原酶(DHFR)抑制剂, 其对金葡菌的最小抑菌浓

度(MIC)为  $0.156 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，但它在小鼠肝微粒体中的清除率高达  $173 \text{mL}\cdot(\text{min}\cdot\text{kg})^{-1}$  [25]。体外分析表明，化合物 17 的主要代谢途径为苯环上甲氧基的 O-去甲基代谢(图 5)。



**Figure 5** The proposed metabolic scheme for compound 17 following incubation with mouse liver microsomes

采用氘代甲氧基(18)或三氟甲氧基(19)替换甲氧基(表 9)，可有效减少 O-去烷基化代谢，降低化合物的清除率[18,  $\text{CL}_{\text{int,MLM}} = 154 \mu\text{L}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ ; 19,  $\text{CL}_{\text{int,MLM}} = 22 \mu\text{L}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$  ]。

**Table 9** Reducing hepatic metabolic clearance of DHFR inhibitors by blocking the O-demethylation metabolic site

Compd.	Configuration	R	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{CL}_{\text{int,MLM}}/\mu\text{L}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$
17	Rac	OCH <sub>3</sub>	0.156	173

18	<i>Rac</i>	OCD <sub>3</sub>	0.312	154
19	<i>Rac</i>	OCF <sub>3</sub>	0.625	22
20	<i>Rac</i>	Cl	0.312	25
21	<i>S</i>	Cl	0.156	18

18 凡默谷

采用氯原子替代甲氧基，封闭 O-去甲基代谢位点，得到化合物 20，其抗菌活性和小鼠肝微粒体中清除率得到较好的平衡[MIC =0.312 μg·mL<sup>-1</sup>；CL int,MLM = 25 μL·(min·mg)<sup>-1</sup> ]。

化合物 20 为消旋体，其活性单体 21(*S* 构型)在小鼠肝微粒体中的清除率仅为化合物 17 小鼠肝微粒体清除率的 1/10。经腹腔注射给药后，化合物 21 在小鼠体内的清除率为 5.96 mL·(min·kg)<sup>-1</sup> 。

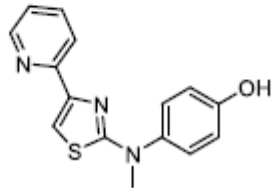
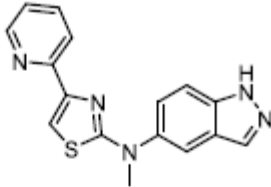
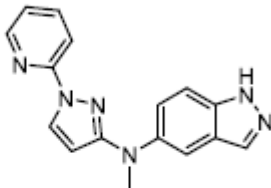
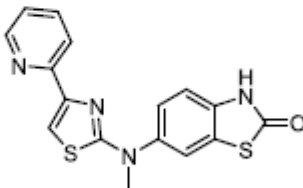
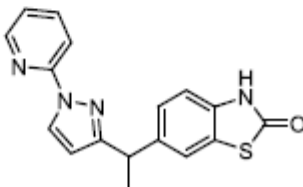
化合物 22 是经高通量筛选得到的具有亚型选择性的 α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸(AMPA)受体拮抗剂，其在表达跨膜 AMPA 受体调控蛋白 γ-8 (TARP γ-8)的细胞中表现出一定的 AMPA 受体拮抗活性(IC<sub>50</sub> = 2.97 μmol·L<sup>-1</sup>)[26]。但化合

物 22 在人及大鼠肝微粒体中的消除率较高，分别为 81.0%和 84.0%，并且在

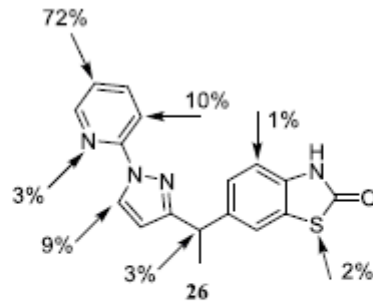
大鼠体内的清除率(CL rat = 234 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>)超过肝脏血流，提示除肝脏代谢清除外，还存在其他清除途径。考虑化合物 22 结构中的酚羟基可能是关键的 II 相代谢位点。

将苯酚基团替换为吡啶(23, 24)或苯并噁唑酮(25, 26)，可有效封闭 II 相代谢位点，降低化合物在大鼠体内的清除率(表 10)，但化合物的肝微粒体消除率依然较高。

**Table 10** Reducing hepatic metabolic clearance of AMPAR antagonists by blocking the phase II metabolic site

Compd.	Structure	GluA1/TAR P $\gamma$ -8 IC <sub>50</sub> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Fraction		CL <sub>rat</sub> / mL·(min·kg) <sup>-1</sup>
			metabolized by		
			Human	Rat	
22		2.97	81.0	84.0	234
23		0.147	52.7	65.6	71.5
24		0.353	36.2	32.5	61.3
25		0.070	54.5	82.2	96.6
26		0.122	41.9	84	115

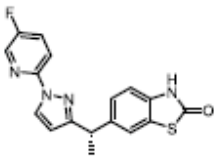
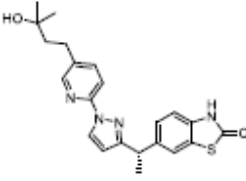
体外研究表明，化合物 26 经肝细胞孵育后的主要代谢途径为吡啶环上的氧化代谢(图 6)[26]。



**Figure 6** Predicted sites of CYP2D6-mediated oxidative metabolism of compound **20** using the StarDrop model. Sites are labeled with a predicted percentage of products formed due to metabolism at that position

凡默谷

**Table 11** Reducing hepatic metabolic clearance of AMPAR antagonists by blocking the oxidative metabolic site

Compd.	Structure	GluA1/TARP $\gamma$ -8 IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	Fraction metabolized by microsomes/%		CL <sub>rat</sub> / mL·(min·kg) <sup>-1</sup>
			Huma n	Rat	
<b>27</b>		0.054	19.6	67.4	42.2
<b>28</b>		0.160	23.6	43.7	6.0

凡默谷

29		0.062	15.2	47.4	16.3
30 (LY313048 1)		0.065	16.4	32.3	11.4

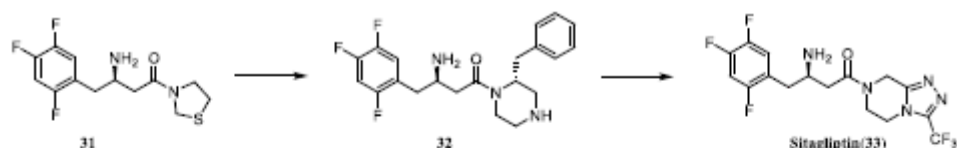
凡默谷

### 3.1.3 骨架修饰

骨架修饰也是降低化合物代谢转化清除率的重要结构改造策略之一。通过骨架修饰可以改变化合物的母核，调节化合物的理化性质。采用代谢稳定的环系结构替代不稳定的结构片段，可有效降低化合物的代谢转化清除率。

化合物 31 是默克公司研发的 DPP-IV 抑制剂 (DPP-IV IC<sub>50</sub> = 119 nmol·L<sup>-1</sup>)，其体内药代动力学性质较差，在大鼠体内的清除率高达 120 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>，生物利用度仅为 3%(表 12)[27]。

Table 12 Reducing hepatic metabolic clearance of DPP-IV inhibitors by scaffold modification



Compd.	Species	CL/mL·(min·kg) <sup>-1</sup>	t <sub>1/2</sub> /h	F/%
31	Rat	120	1.1	3
Sitagliptin (33)	Rat	60	1.7	76
	Dog	6.0	4.9	100

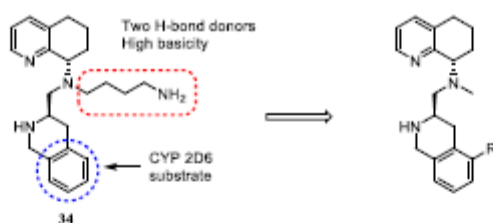
凡默谷

将噻唑烷替换为哌嗪环，并在哌嗪环上引入苄基，得到化合物 32，其 DPP-IV 抑制活性提高 5 倍(DPP-IV IC<sub>50</sub> = 19 nmol·L<sup>-1</sup>)，但体内清除率仍较高[28]。对其进行代谢产物分析，发现该化合物的主要代谢途径为哌嗪环上的氧化代谢。

在后续的改造中，研究人员采用代谢稳定的三唑并哌嗪环替换哌嗪环，并在三唑环上引入三氟甲基，最终得到 DPP-IV 抑制活性高(DPP-IV IC<sub>50</sub> = 18 nmol·L<sup>-1</sup>), 且药代性质良好的化合物西格列汀(Sitagliptin)[29]。西格列汀在大鼠及犬体内的生物利用度分别为 76%和 100%，显著优于化合物 31。其在大鼠体内的清除率为化合物 31 的 1/2 (CL rat = 60 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>), 并且在犬体内的清除率较低(CL dog = 6.0 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>), 半衰期达 4.9 h。2006 年，西格列汀作为首个口服 DPP-IV 抑制剂上市用于 2 型糖尿病的治疗。

趋化因子受体 4(CXCR4)拮抗剂 34 具有较高的 CXCR4 拮抗活性(CXCR4IC<sub>50</sub>= 6.5 nmol·L<sup>-1</sup>), 但其碱性较强(pKa = 10.7), 透膜性差, 在人及小鼠肝微粒体中保留百分比分别为 77.0%和 17.0%[30, 31]。并且 34 对 CYP2D6 具有一定的抑制活性(CYP2D6 IC<sub>50</sub> = 0.3 μmol·L<sup>-1</sup>), 提示其可能会在联合治疗中产生药物-药物相互作用。

Table 13 Reducing hepatic metabolic clearance of CXCR4 antagonists by scaffold modification

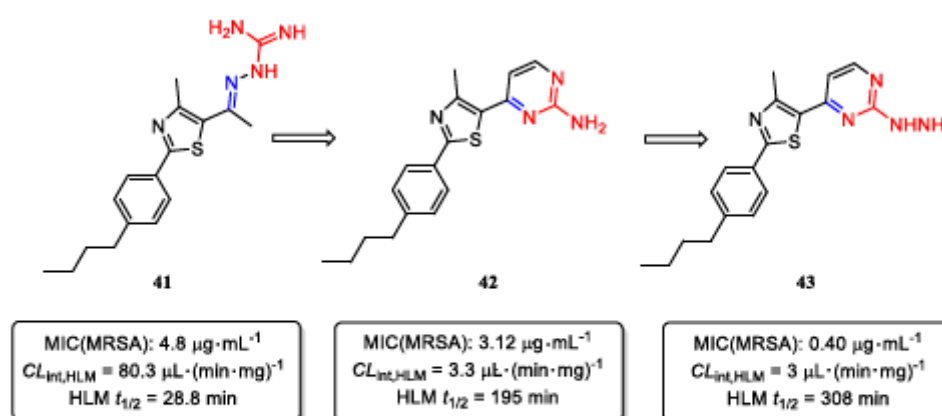


Compd.	R	CXCR4 Ca <sup>2+</sup> flux, IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	Microsomal stability (% remaining)		Permeability P <sub>o</sub> /nm·s <sup>-1</sup>
			Human	Mouse	
35		6.08	99.7	19.9	0
36		29.6	75.8	17.0	996
37		61.0	100	85.6	39.0
38		14.1	24.6	39.6	142
39		2.92	36.6	40.1	167
40		3.59	52.2	36.7	740

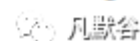
但 35 的透膜性仍较差，通过在哌嗪环上不同位置引入甲基(36~38)，虽然可在一定程度上改善化合物的透膜性，但始终无法在活性、透膜性和清除率之间达

到平衡。最终在四氢异噻啉的苯环上引入哌嗪并四氢吡咯的双环结构，得到化合物 39 和 40，其中(R)-构型单体 40 的 CXCR4 拮抗活性及透膜性均较好 (CXCR4 IC<sub>50</sub> = 3.59 μmol·L<sup>-1</sup>, Pc = 740 nm·s<sup>-1</sup>), 并且在人及小鼠肝微粒体中的保留百分比比较适中, 分别为 52.2%和 36.7%。

化合物 41 是第一代苯基噻唑类抗菌药, 对耐甲氧西林金葡菌(MRSA)的最小抑菌浓度为 4.8 μg·mL<sup>-1</sup> (图 7)[32]。但由于该化合物含有 Schiff 氏碱的结构, 易水解代谢失活, 在人肝微粒体中的清除率高达 80.3 μL·(min·mg)<sup>-1</sup>。

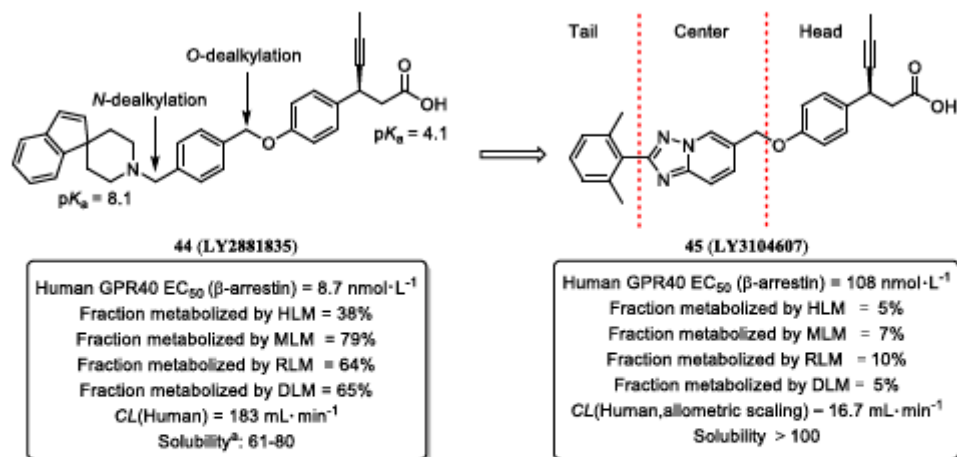


**Figure 7** Reducing hepatic metabolic clearance of phenylthiazole antibiotics using scaffold hopping strategy



通过将亚胺并入噻啉环, 得到化合物 42, 其在人肝微粒体中的清除率降低为化合物 41 的 1/24 (CL<sub>int,HLM</sub> = 3.3 μL·(min·mg)<sup>-1</sup>), 对 MRSA 的抑菌活性提高, 其 MIC 为 3.12 μg·mL<sup>-1</sup>。

将化合物 42 的噻啉环上的氨基替换为胍基, 得到化合物 43, 其对 MRSA 的抑菌活性相比化合物 41 提高 12 倍 (MIC = 0.40 μg·mL<sup>-1</sup>), 清除率降低至 3.0 μL·(min·mg)<sup>-1</sup>。且与 41 相比, 化合物 43 的人肝微粒体半衰期由 28.8 min 延长至 308 min, 提高约 10 倍。单剂量 (50 mg·kg<sup>-1</sup>) 口服给药后, 43 在大鼠体内的半衰期长达 8.24 h, 暴露量为 100 010.96 μg·h·L<sup>-1</sup>。



**Figure 8** Reducing hepatic metabolic clearance of GPR40 agonists by scaffold modification. HLM: Human liver microsomes; MLM: Mouse liver microsomes; RLM: Rat liver microsomes; DLM: Dog liver microsomes. <sup>a</sup> Solubility refers to the grams of compounds could dissolve in every 100 g water

### 3.1.4 增加位阻降低谷胱甘肽反应性

一些药物分子通过与靶标蛋白发生共价结合产生药理活性，这类分子往往含有迈克尔受体的结构特征，因此可在谷胱甘肽巯基转移酶(GST)的催化下与谷胱甘肽(GSH)结合而被清除。通过增加位阻降低化合物与 GST 的亲水性，可以有效降低化合物的清除率。

化合物 46 对 KRASG12C 的 IC<sub>50</sub> 为 0.211 μmol·L<sup>-1</sup>(表 14)，它的主要清除机制为丙烯酰胺基团发生谷胱甘肽结合[35]。在其哌嗪环上引入甲基得到化合物 47，由于哌嗪环上的乙醚基和甲基均采取直立键的取向，空间位阻限制了 GSH 从两侧接近丙烯酰胺，GSH 反应半衰期延长(GSH t 1/2 = 416 min)。但甲基的引入也使得化合物的亲脂性增加(Log D = 3.8)，人肝微粒体清除率提高 [CL int,HLM = 32μL·(min·mg)<sup>-1</sup>]。

Table 14 Reducing glutathione reactivity of KRAS inhibitors by increasing steric hindrance

Compd.	Structure	KRAS <sup>G12C</sup>		CL <sub>int,HLM</sub> / μL·(min·mg) <sup>-1</sup>	GSH t <sub>1/2</sub> /min
		IC <sub>50</sub> / μmol·L <sup>-1</sup>	Log D		
46		0.211	3.6	25	334
47		0.052	3.8	32	416
48		0.018	2.9	21	585
49		< 0.005	3.4	21	929

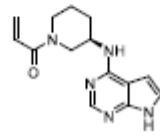
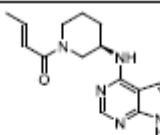
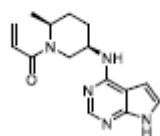
将吗啉环替换成内酰胺，得到化合物 48，其亲脂性相比化合物 47 降低 0.9 个 Log 单位，人肝微粒体清除率降低为 21 μL·(min·mg)<sup>-1</sup>，同时 GSH 反应半衰期延长至 585 min。

最后在化合物 48 的哌嗪环上引入甲基得到 49，其人肝微粒体清除率保持在较低水平[CL<sub>int,HLM</sub> = 21 μL·(min·mg)<sup>-1</sup>]，GSH 反应半衰期达到 929 min，相比化合物 46 延长近 2 倍。

化合物 50 是一个选择性的 JAK3 共价抑制剂(IC<sub>50</sub> = 56 nmol·L<sup>-1</sup>)[36]。体外研究表明，化合物 50 在大鼠肝微粒体内的清除率小于 15 μL·(min·mg)<sup>-1</sup>，但其在血液中的半衰期仅为 98 min，这是因为其在大鼠体内的清除主要由谷胱甘肽巯基转移酶(GST)而不是 CYP450 所介导。

在丙烯酰胺的烯基末端引入甲基，增加位阻，得到化合物 51(表 15)，其与 JAK3 的亲合性显著降低，JAK3 抑制活性丧失(JAK3 IC<sub>50</sub> > 10 000 nmol·L<sup>-1</sup>)。

**Table 15 Reducing glutathione reactivity of JAK3 inhibitors by increasing remote steric hindrance**

Compd.	Structure	JAK3		Human blood t <sub>1/2</sub>	Rat blood t <sub>1/2</sub>
		IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	CL <sub>int,HLM</sub> /CL <sub>int,DLM</sub> μL·(min·mg) <sup>-1</sup>		
50		56	8 < 15	~332	98
51		> 10 000	-	-	-
52 (PF-06651600)		33	8 < 15	> 360	161

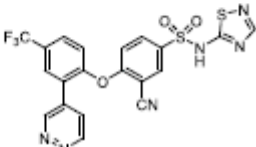
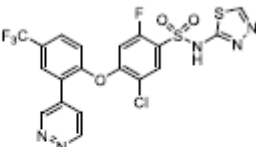
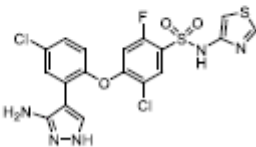
### 3.2 降低药物胆汁排泄清除率

一些极性大的药物分子，通常是不能在肠内被重吸收的有机阴离子或阳离子，可以经转运体(P-gp、BCRP、MRP2 等)介导从肝细胞内分泌进入胆汁。对于这类药物分子，可以通过提高亲脂性，生物电子等排等结构优化策略降低胆汁排泄清除率。

#### 3.2.1 提高亲脂性

LogD 是与胆汁排泄相关的最重要的理化性质参数之一。对于一些主要经胆汁排泄的药物分子，可以通过提高亲脂性，降低极性表面积(PSA)的方法改善清除率。选择性电压门控钠离子通道 NaV1.7 抑制剂 53(hNaV1.7 IC<sub>50</sub> = 13 nmol·L<sup>-1</sup>)在人、大鼠及犬肝微粒体中的清除率均较低[表 16, CL<sub>int,HLM</sub> = 14 μL·(min·mg)<sup>-1</sup>; CL<sub>int,RLM</sub> = 23 μL·(min·mg)<sup>-1</sup>; CL<sub>int,DLM</sub> < 5 μL·(min·mg)<sup>-1</sup>], 但在大鼠和犬体内的清除率却远高于 IVIVE 预测值[CL<sub>rat</sub> = 58.0 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>, CL<sub>dog</sub> = 10.0mL·(min·kg)<sup>-1</sup>], 表明该化合物存在非代谢清除，即胆汁排泄[38]。

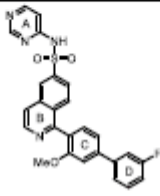
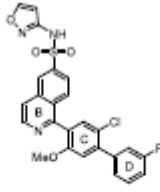
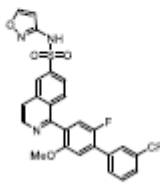
Table 16 Reducing biliary excretion clearance of Nav1.7 inhibitors by increasing lipophilicity

Compd.	Structure	hNav1.7		TPSA/Å <sup>2</sup>	CL <sub>rat</sub>	CL <sub>dog</sub>
		IC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>	Log D		mL·(min·kg) <sup>-1</sup>	
53		13	0.7	131	58.0	10.0
54		21	0.8	107	40.3	2.0
55 (PF-05089771)		11	2.3	123	6.0	2.7

采用亲脂性的氯原子替代极性基团氰基，得到化合物 54，其亲脂性略有提高 (LogD = 0.8)，极性表面积降低 (TPSA = 107 Å<sup>2</sup>)，体内清除率有所降低 [CL<sub>rat</sub> = 40.3 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>, CL<sub>dog</sub> 2.0 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>]。

化合物 56 也是一个选择性 NaV1.7 抑制剂 (NaV1.7 IC<sub>50</sub> = 0.15 μmol·L<sup>-1</sup>)，其在人及大鼠肝微粒体中的清除率较低，但在大鼠体内的清除率较高 [表 17, CL<sub>rat</sub> = 28.3 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>]，可能与转运体介导的胆汁排泄清除相关 [39]。化合物 56 在犬体内清除率较低，这也侧面说明了转运体介导的清除存在较大的种属差异。

Table 17 Reducing biliary excretion clearance of Nav1.7 inhibitors by increasing lipophilicity

Compd	Structure	Nav1.7		CL <sub>rat,bl.</sub>	CL <sub>rat,bl.</sub>	CL <sub>rat</sub>	CL <sub>dog</sub>
		IC <sub>50</sub> / μmol·L <sup>-1</sup>	cLog D	M	M		
				μL·(min·mg) <sup>-1</sup>	μL·(min·mg) <sup>-1</sup>	mL·(min·kg) <sup>-1</sup>	
56		0.15	2.1	<14	<14	28.3	0.82
57		0.051	2.6	<14	18	0.78	0.05
58		0.036	2.9	<14	<14	3.83	0.38

在化合物 56 的 C 环上引入亲脂性的氯原子，并将 A 环替换为异噁唑，得到化合物 57，其亲脂性增加(cLogD = 2.6)，清除率降低[CL rat = 0.78 mL·(min·kg)<sup>-1</sup> ; CL dog = 0.05 mL·(min·kg)<sup>-1</sup> ]。

由于化合物 57 具有一定的 CYP3A4 诱导活性，经后续改造得到安全性更高的化合物 58，其亲脂性相比化合物 56 提高 0.8 个 Log 单位，在大鼠及犬体内的清除率较为适中[CL rat = 3.83 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>; CL dog = 0.38 mL·(min·kg)<sup>-1</sup> ]，活性也得到了进一步提高(NaV1.7 IC<sub>50</sub> = 0.036 μmol·L<sup>-1</sup>)。经口服给药后，化合物 58 在 C57Bl/6 小鼠体内展现出良好的抗组胺效果。

### 3.2.2 生物电子等排

生物电子等排是先导化合物结构优化过程中常用的策略，采用生物电子等排策略不仅可以提高化合物的药理活性和安全性[40]，也可改善化合物的药代动力学性质。

化合物 59 对 P2Y<sub>12</sub> 受体具有较高的亲和力(表 18, IC<sub>50</sub> = 6.3 nmol·L<sup>-1</sup>)，采用透光率比浊法(LTA)测定其对二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板聚积具有一定的抑制作用(LTA IC<sub>50</sub> = 21 nmol·L<sup>-1</sup>) [41]。其在大鼠体内表现出中等的清除

率[CL rat = 24 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>], 推测这一现象可能是因为羧基的存在, 导致部分原型药物经胆汁排泄造成的。

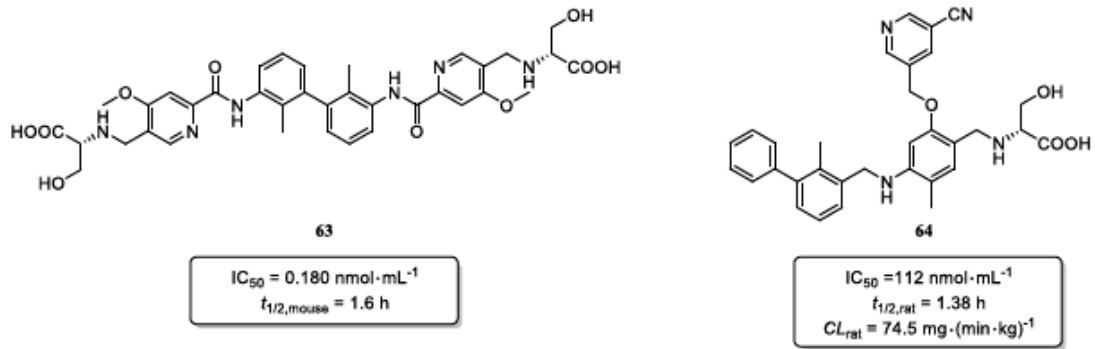
**Table 18 Reducing biliary excretion clearance of P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists using bioisosterism strategy**

Compd.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Binding IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	LTA IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	CL <sub>rat</sub> / mL·(min·kg) <sup>-1</sup>
59	Bu		6.3	21	24
60	Et		12	11	3.7
61	Bu		1.0	8.0	2.1

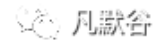
采用生物电子等排策略, 以磷酸基团替换羧基, 得到若干低清除率的化合物[表 18, 60, CL rat = 3.7 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>; 61, CLrat = 2.1 mL·(min·kg)<sup>-1</sup>; 62, CL rat = 5.4 mL·(min·kg)<sup>-1</sup> ]。其中, 化合物 61 在大鼠体内的清除率最低, 且其 P2Y<sub>12</sub> 受体亲和力与抗凝血能力均较优(Binding IC<sub>50</sub> = 1.0nmol·L<sup>-1</sup>, LTA IC<sub>50</sub> = 8.0 nmol·L<sup>-1</sup>), 因此, 对其进行体内研究, 经静脉注射给药后, 化合物 61 在大鼠三氯化铁血栓模型中表现出良好的治疗效果。

PD-1/PD-L1 信号通路与肿瘤免疫逃逸机制密切相关, 目前, 有较多抑制 PD-1/PD-L1 相互作用的小分子被报道用于抗肿瘤免疫治疗。

多数小分子内含有羧基的结构, 例如图 9 中的化合物 63(IC<sub>50</sub> = 0.180 nmol·L<sup>-1</sup>)和 64(IC<sub>50</sub> = 112 nmol·L<sup>-1</sup>)[42, 43]。这些小分子在体内清除较快, 化合物 63 经口服给药(10 mg·kg<sup>-1</sup>)后, 在小鼠体内的半衰期仅 1.6 h。



**Figure 9** Inhibitors of PD-1/PD-L1

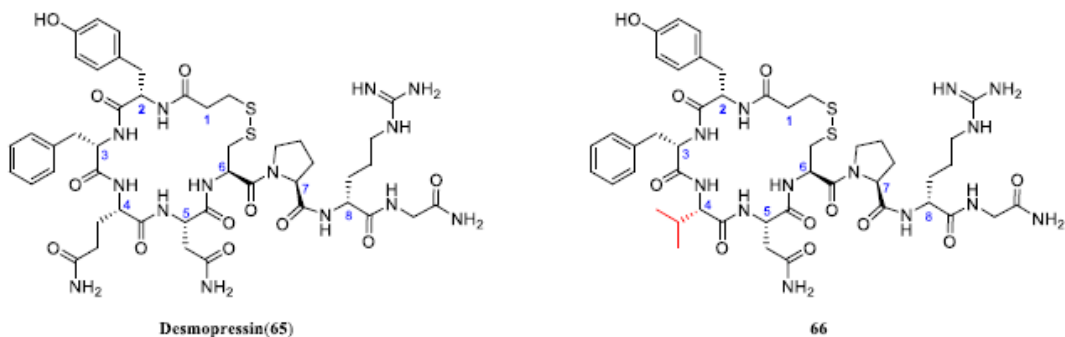


化合物 64 经静脉注射给药( $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )后, 在大鼠体内的半衰期约  $1.38 \text{ h}$ , 清除率高达  $74.5 \text{ mL}\cdot(\text{min}\cdot\text{kg})^{-1}$ , 超过大鼠肝脏血流。虽然对这些小分子抑制剂药代性质的研究还不是很深入, 但可以推测这些携带羧基的小分子可能作为转运体底物被富集于肝脏, 进而被代谢或经胆汁排泄清除[12]。若采用生物电子等排策略将羧基替换为其他基团, 或许可降低其体内清除率。

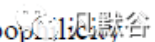
### 3.3 提高亲脂性,降低药物肾脏排泄清除率

一些大极性、水溶性较好的分子易经肾脏排泄。但对于肾功能损伤的病人来说, 这类药物的清除率相比健康人会有所降低, 从而引起体内蓄积毒性, 并进一步增加病人肾脏的负担。对于这一类药物分子, 应通过增加化合物的亲脂性, 减少肾脏排泄, 增加非肾清除率。

去氨加压素(Desmopressin)是抗利尿激素的类似物(图 10), 对抗利尿激素受体(V2R)具有很强的激动活性( $hV2R \text{ EC}_{50} = 0.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 在多个国家批准上市用于治疗糖尿病尿崩症[44]。



**Figure 10** Reducing renal excretion clearance by increasing lipophilicity

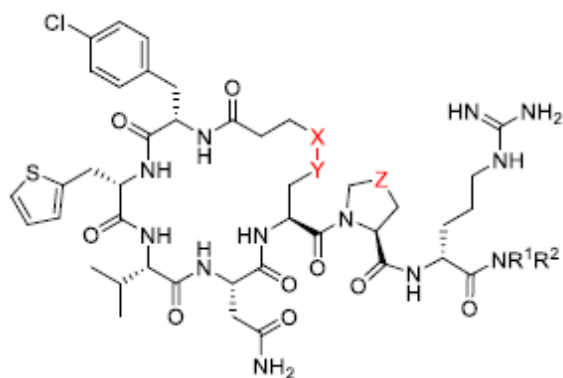


去氨加压素在人体内的药代动力学研究表明，其在健康人体内的系统清除率约  $1.7 \text{ mL}\cdot(\text{min}\cdot\text{kg})^{-1}$ ，半衰期为 2.8 h；而在肾功能损伤者体内的系统清除率降低至  $0.69 \text{ mL}\cdot(\text{min}\cdot\text{kg})^{-1}$ ，相应半衰期延长至 10 h。去氨加压素在大鼠体内的清除率( $7.5 \text{ mL}\cdot(\text{min}\cdot\text{kg})^{-1}$ )接近肾小球滤过率(GFR)，非肾清除率仅占 11%。

将其 4 位的谷氨酰胺残基替换为亲脂性更高的缬氨酸残基，得到活性和选择性更高的化合物 66 (图 10,  $\text{hV2R EC}_{50} = 0.05 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，其亲脂性增加，在 HPLC 中的容量因子  $k'$  由 3.72 增加到 4.56，在大鼠体内的清除率也有所提高 [ $\text{CL}_{\text{rat}} = 9.6 \text{ mL}\cdot(\text{min}\cdot\text{kg})^{-1}$ ]。

对化合物 66 的 2、3、4 位氨基酸残基进行修饰得到活性与选择性较高的化合物，并以此为基础，对二硫键及 7 位脯氨酸残基进行修饰，得到化合物 67~71，随着化合物亲脂性的增加(即 HPLC 中的容量因子  $k'$  增加)，化合物在大鼠体内非肾清除率占比增加(表 19)。其中，化合物 70 在大鼠体内的系统清除率最高，为  $42 \text{ mL}\cdot(\text{min}\cdot\text{kg})^{-1}$ ，相比去氨加压素提高 5 倍，且非肾清除率占比提高至 60%。

Table 19 Reducing renal excretion clearance of hV2R agonists by increasing lipophilicity



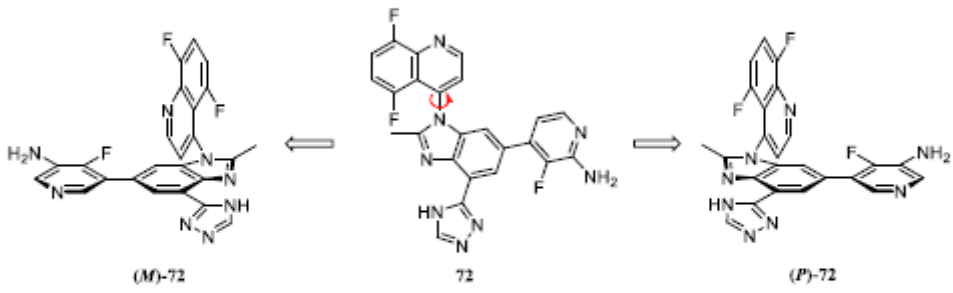
Compd.	X	Y	Z	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	hV <sub>2</sub> R	HPLC	CL <sub>rat</sub> / mL·(min·kg) <sup>-1</sup>	Nonrenal CL/%
						EC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>			
67	CH <sub>2</sub>	S	CH <sub>2</sub>	Me	H	0.27	6.80	9.1	Not tested
68	CH <sub>2</sub>	S	CH <sub>2</sub>	Et	H	0.29	7.23	10	49
69	CH <sub>2</sub>	S	CH <sub>2</sub>	<i>i</i> -Pr	H	0.45	7.31	15	58
70	CH <sub>2</sub>	S	CH <sub>2</sub>	Et	Et	0.25	8.47	42	60
71	CH <sub>2</sub>	S	S	Pr	H	0.21	8.48	31	90

### 3.4 化合物的立体构型对清除率的影响

药物分子中含有手性中心时，应分别对消旋体及不同构型单体的代谢性质进行考察。一方面，不同构型的单体与代谢酶之间的亲和力可能不同，导致两者清除率差异较大。另一方面，若两种构型单体被同一个代谢酶代谢转化，则以消旋体形式给药时，对映异构体之间竞争同一代谢酶的结合位点，导致两者的清除率与以单体形式给药时不同。因此，当化合物具有手性中心时，应结合消旋体与单体的活性与药代性质，选择合适的给药形式。

阻转异构体是一种特殊的手性异构体：由于围绕单键旋转受阻导致构象异构体之间无法相互转换，则这些构象异构体互为阻转异构体。

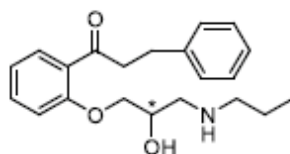
**Table 20** Influence of axial chirality on activity and hepatic metabolic clearance of PI3K $\beta$  inhibitors. <sup>a</sup>HLM CL<sub>int</sub>: *In vivo* intrinsic clearance determined from human liver microsomes fortified with NADPH and UDPGA. <sup>b</sup>hHep CL<sub>int</sub>: *In vivo* intrinsic clearance determined from cryopreserved human hepatocytes



Compd.	PI3K $\beta$ IC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>	HLM CL <sub>int</sub> <sup>a</sup> / mL·(min·kg) <sup>-1</sup>	hHep CL <sub>int</sub> <sup>b</sup> / mL·(min·kg) <sup>-1</sup>	Fraction metabolized by AO/%
( <i>M</i> )-72	1423	2.5	32.8	69
( <i>P</i> )-72	2	<2.0	1.33	BLQ

普罗帕酮是 Ic 类抗心律失常药物，其(S)-型异构体的  $\beta$  受体拮抗作用是(R)-型异构体的 100 倍(表 21)[46]。

**Table 21 Influence of spatial configuration on the activity and pharmacokinetic properties of propafenone**



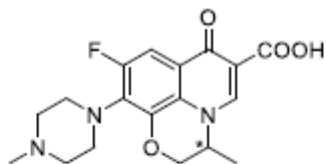
Compd.	$\beta_2R$ IC <sub>50</sub> / nmol·L <sup>-1</sup>	Human apparent oral clearance CL <sub>po</sub> /mL·min <sup>-1</sup>	
		Administration of racemate	Administration of enantiomers
( <i>S</i> )-Propafenone (73)	18.7	2521	920
( <i>R</i> )-Propafenone (74)	1538	1279	1460

两种构型单体的代谢均主要由 CYP2D6 介导。若以单一构型给药，(*S*)-型异构体的清除率( $CL_{po} = 2521 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )大于(*R*)-型异构体( $CL_{po} = 1279 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )，且因达不到有效浓度，无法产生  $\beta$  受体阻断作用[47]。但若长期以消旋体给药，由于(*R*)-型异构体对 CYP2D6 的亲合性强于(*S*)-型异构体，自身代谢清除率提高( $CL_{po} = 1460 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )，(*S*)-型异构体清除率下降( $CL_{po} = 920 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )，(*S*)-型异构体血药浓度反而高于(*R*)-型异构体。因此，综合考虑活性与清除率，普罗帕酮以消旋体形式给药可以达到最理想的治疗效果。

药物的手性构型也会对肾脏排泄产生影响。肾小管上皮细胞的转运体对手性药物的不同构型可能具有不同的选择性，且由于转运体具有饱和性，不同异构体之间可能会竞争转运蛋白的结合位点。

例如，在消旋的氧氟沙星中，(*R*)-型异构体会抑制肾小管对(*S*)-型异构体的分泌(表 22)[48]。因此，若以消旋体给药，可观察到(*S*)-氧氟沙星的肾脏清除率( $CL_{renal} = 7.14 \text{ L}\cdot(\text{h}\cdot 1.73 \text{ m}^2)^{-1}$ )低于(*R*)-氧氟沙星[ $CL_{renal} = 7.53 \text{ L}\cdot(\text{h}\cdot 1.73 \text{ m}^2)^{-1}$ ]。由于氧氟沙星和左氧氟沙星的抗菌谱和适应症略有不同，两者在临床上都有使用。

**Table 22 Pharmacokinetic parameters of (*S*)-(-)-ofloxacin and (*R*)-(+)-ofloxacin after oral administration of ( $\pm$ )-ofloxacin (200 mg) to healthy volunteers. a 1.73 m<sup>2</sup>: Human standard body surface area**



Comps.	$t_{1/2}/h$	$AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	$CL_{total}$	$CL_{renal}$
			$L \cdot (h \cdot 1.73 m^2)^{-1} a$	
(S)-(-)-Ofloxacin (75)	6.93	11660	8.51	7.14
(R)-(+)-Ofloxacin (76)	6.26	10620	9.34	7.53

凡默谷

4

## 小结

在先导化合物结构优化的早期阶段，重视对化合物药代性质的考察可以显著降低研发失败率，减少损耗。清除率作为联系口服生物利用度、半衰期、稳态血药浓度等多个药代参数的纽带，是药物化学工作者需要着重考察的指标。

降低药物清除率可提高药物的口服生物利用度、延长药物分子的体内半衰期；对于清除率过低的药物，也应采取合适的策略提高其体内清除率，以防产生蓄积毒性。随着对药物清除机制及其影响因素的深入了解，越来越多的体外代谢评价模型和体内清除率预测方法得到开发。

在对化合物进行结构修饰时，应采用适当的清除率评价体系预测药物分子的体内清除率与主要清除机制，通过合理的结构优化改善清除率，使药物达到安全性、活性和药代动力学性质的最佳平衡，这样才能有效提高药物研发的成功率。

作者贡献：张蕊负责调研文献，整理撰写文章；王江负责审阅、修改文章；朱浩然负责调研文献，核对数据；柳红负责审阅、修改文章。

## 先导化合物的优化（上）

殷赋科技团队正在陆续推出基础学习、经典阅读、计算方案、案例讨论、科研时事等主题学习专栏。让我们一起夯实基础，开拓思路，在殷赋云计算平台上做出更好的科研成果。

本期是【跟我学药物设计】专栏第十三篇文章，下面就**先导化合物的优化原则与策略，和定量构**

**效 (QSAR) 方法**展开介绍。

---

药物发现及开发的起点是**苗头化合物**，它们是通过**随机筛选、偶然发现、高通量筛选或者合理药物**

**设计**等途径发现的**具有初步活性的化合物**。通过多重筛选和评估之后，少量的苗头化合物可以成为

具备开发前景的先导化合物。

**从苗头到先导 (From Hit To Lead, H2L)** 是改善化合物生物活性、完善构效关系并增加新颖性的

过程。先导化合物需要在**活性上具备明确的构效关系和量效关系**，在**性质上具备可优化成为药物候**

**选物的基本属性。**

成为先导化合物之后，药物化学家需要考虑其本身存在的问题，包

括：**生物学或药理活性较差、靶**

**点选择性不理想、体内无活性、可能存在毒性或不良反应、易被代谢**

**失活、口服吸收差**，对其进行

结构的修饰和优化，以便成为符合要求的药物候选药。

## 01

### 先导化合物优化的原则与策略

从苗头到先导的药物发现阶段，我们除了需要考察化合物的构效关

系、生物活性与结构新颖性，还

需通过**配体效率**和**配体亲脂性效率**关注化合物的品质。

#### 先导化合物的优化原则与策略

##### 1) 配体效率

**配体效率 (Ligand Efficiency, LE)** 指化合物分子中每个原子对结合

的贡献 (**配体效率**

**= 结合自由能/配体分子中重原子数**)。配体效率是评估片段苗头、高

通量筛选苗头、虚拟

筛选苗头以及结构优化效果的重要工具。配体效率越高，化合物品质就越好。

<https://doi.org/10.1038/nrd4163>

## **2) 配体亲脂性效率**

**配体亲脂性效率 (Ligand Lipophilicity Efficiency, LLE)** 是将化合物的活性强弱与亲

脂性同时作为考察度量的方法，从亲脂性考察化合物的品质，可以防止分子“过于肥

臆”。LLE 定义为：

$$LLE = pIC_{50} - ClgP$$

式中，**pIC50** 是 **IC50** 的负对数，数值越大表示活性越强；**clgP** 则为化合物的计算脂水分配

系数。在生物活性相同的情况下，亲脂性越高，则 LLE 值就越低，化合物的品质就越差。反

之，在同等生物活性的情况下，亲脂性越低，则 LLE 值就越高，化合物的品质就越好。在化

化合物的优化过程中，我们需要在 H2L 阶段对分子量和亲脂性这两个参数进行有效控制，以利

于后继对先导化合物的优化改造。

<https://doi.org/10.1038/nrd4163>

### **3) 类先导性与三倍律**

除了对化合物的生物活性高低和结构新颖性有要求之外，通过 H2L 阶段获得的先导化合物还

**需要满足类先导性的三倍律标准（片段分子量 < 300，脂水分配系数 < 3，氢键供体受体数**

**量 < 3）。其中，分子量和脂水分配系数是需要优先考虑的参数。**

#### 4) 先导化合物优化原则

当化合物完成 H2L，进入先导化合物的优化阶段后，生物活性已不再是化合物研究的核心内

容，考察重点将转移到**与体内活性、生物利用度、代谢稳定性和毒性有关的其他性质方**

**面**。在这一阶段，我们需要遵守以下四点优化原则：**1) 适度修饰原则**。在先导化合物优化

阶段，随着合成类似物数量的增多，应尽可能避免对骨架进行大幅度改造所产生的难以预

期的化合物性质。在实际操作过程中，药物化学家可以通过对现有结构进行小幅度修饰

(甲基、乙基、异丙基同系物取代) 去解决化合物活性不理想、选择性差的问题。**2) 替补**

**原则**。药物化学家在先导化合物优化时应考虑具有结构多样性的“备选”先导化合物，这

样可以维持化合物较大程度的结构差异性，从而避免药物研发后期出现由于无法预期的问

题所导致的整个系列化合物“全军覆没”的尴尬境地。**3) 均衡原则。**

成功的药物研发取决

于对生物活性、化合物能否到达靶点、是否具有代谢稳定性、是否具有安全性等多方面因素。药物化学家需要综合考量以上因素，获得在各种性质方面最为均衡的化合物。**4) 及早**

**淘汰原则。**从市场信誉度和价值的方面考虑，在选定药物候选物进入临床研究之前，有必

要安排更多的研究以最大程度确保候选物的安全性和有效性，及早淘汰不合适的药物，降

低对药物本身的信誉和市场价值的负面影响。

### **5) 先导化合物优化策略**

在“从苗头到先导”和“先导化合物优化”的过程中，药物化学家通常会采用生物电子等

排、同系物、拟似物、拼合、开环/闭环、骨架跃迁、前药原理、软药与硬药设计等方法去

调整化合物的分子结构，从而实现优化化合物性质的目标。除此之外，药物化学家会应用

基于结构的药物设计思想，依据对生物靶点三维结构的认识，通过“合理药物设计”方法

增强配体设计的目的性，避免药物设计过程中的偶然性、盲目性及低效率等问题。

随着计算机技术的发展，计算机辅助药物设计（CADD）的思想也已经融入到先导化合物发

现和优化的各个方面。从早期的 **Hansch 定量构效关系（QSAR）** 到 **以比较分子场分析法**

**（CoMFA）和比较分子相似性指数分析法（CoMSIA）** 为代表的 **三维定量构效关系（3D-**

**QSAR）方法、药效团及基于靶点结构的药物设计**，这些方法的发展和改进在提高药物设计

者的工作效率、减少化合物合成数量等方面发挥了积极的作用。除此之外，CADD 融合了蛋

白质结晶学、结构生物学、分子图形学和高性能计算等相关学科的发展成果，在药物的研

发过程中发挥了重要的作用。

## 定量构效 (QSAR) 方法介绍

**定量构效方法 (Quantitative Structure-Activity Relationship,**

**QSAR)** 是应用最为广泛的药

物设计方法。它通过一些数理统计方法建立一系列化合物的生理活性或某种性质与其物理化学性质

之间的定量关系。通过这些定量关系, 药物化学家可以预测化合物的生理活性或某些性质, 设计出

具有更高活性的化合物。

早在 1867 年, Crum-Brow 和 Fraser 就提出了构效关系的概念,

1900 年前后, Overton 和 Meyer 提

出了麻醉作用的类脂学说, 即化学结构各异的麻醉剂其活性随着**脂-水分配系数**的增加而增加的现

象, 这可能是最早提出的**化合物生理活性和物理化学性质之间的定量分配关系模型**。直到近几十

年, 尤其是 **Hansch 法**提出后, 结合计算机技术的发展和多变量解析技术的引入, 定量构效关系方

法才逐渐发展和应用起来，现在它已经成为药物研发过程中不可缺少的工具。

## 常用 QSAR 方法介绍

### 1. *Hansch* 方法 (线性自由能相关方法)

*Hansch* 方法把药物在体内的运转和与受体的相互作用理解为**药物分子与生物大分子之间的**

**物理和化学作用**。药物由给药部位到达作用部位 (受体位点) , 需通过若干生物膜, 即一

定数量的**脂-水界面**, 因此药物的运转过程与药物的脂水分配系数有关, 药物到达受点表面

的浓度高低会影响生物活性的强度。

在受体位点，药物分子会以共价键、离子键、离子-偶极键、氢键、疏水键、电荷转移复合

物、螯合作用、范德华力等形式与受体相互作用而产生生物活性。这些作用又与药物分子

的化学结构、电性效应、空间效应有关，所以药物的生物活性与药物分子的理化参数（如

脂水分配系数、电子效应、空间效应等参数）相关。综合以上所提到的相关作用，Hansch

提出了同源物的生物活性与各种取代基的理化参数之间的依赖关系，并用 Hansch 方程表

示：

$$\lg \left( \frac{1}{C} \right) = -k_1 \pi^2 + k_2 \pi + k_3 \sigma + k_4 E_s + k_5$$

Hansch 方程可用于预测同源化合物的生物活性、指导药物设计与合成、帮助了解药物的受

体图像。

**Hansch 方程的不足之处**

Hansch 方法是 2D-QSAR 研究方法，只考虑了化合物与受体作用的结合，没有考虑化合

物与受体在结合时构象的变化，对研究药物与受体的三维空间作用有一定的局限性；

Hansch 方法不能研究药物构象与构型对活性的影响，故不能全面解释生物活性的本

质，不能描绘三维结构域生物活性间的关系，达到智能优化先导化合物的目标。

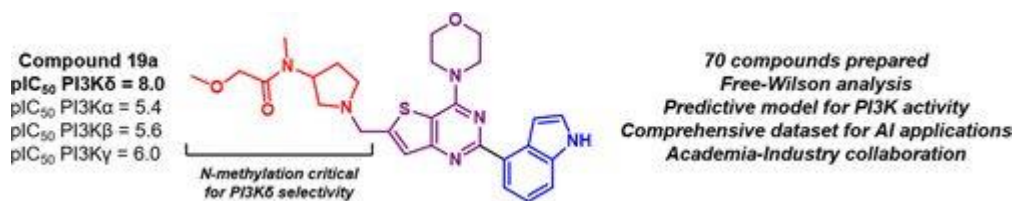
## ***2. Free-Wilson 模型***

Free-Wilson 模型假定分子的生物活性是母核和取代基的活性贡献之和，不论其他位置是否

变换取代基，每一取代基对生物活性的贡献是恒定且可叠加的，与分子其他部位的基团变

换无关。Free-Wilson 模型不需要 Hansch 方法的一系列理化参数，只需将药物的化学结构

进行组合，但该模型的结构参数缺乏物理意义，不适合指导新化合物的设计。



<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01499>

在使用 Free-Wilson 模型做计算时，为了使结果有统计学意义，需要参考以下标准：化合物

数目要多于取代基数目至少 5 倍；每个取代位置上某取代基出现的次数不应低于 2 次，且各

取代基在某位置上出现的次数宜大体相同；为了用最少数目化合物作统计，取代基的组合

要合理；统计结果不能引申到未研究的取代基。

在 Free-Wilson 模型的基础上，Fujita 和 Ban 通过假设氢的活性贡献为零对原有模型进行改

良，简化了计算，促进了改良模型对原有模型的替代。

综合 Hansch 方程和 Free-Wilson 模型，我们可以发现 Hansch 方程多用于取代基种类比较

多而取代基位置不多的场合，Free-Wilson 模型多运用于取代基数目较多且每一取代基变化不多的场合。在 Free-Wilson 模型的基础上，结合 Hansch 分析中的理化参数和知识变量，

通常可以得到相关性良好的构效关系。

### 3. 分子连接性

**分子连接性 (Molecular Connectivity)** 是在拓扑学上发展起来的一种方法。Randix 根

据图论把分子内各原子相互连接状态的拓扑学性质用简单的字符串表示，将化学结构变成

**隐氢图 (化合物略去氢原子后的分子骨架图)**，然后把结构信息用字符表达出来，其中反

映化合物分支程度的分支指数与化合物的某些性质呈线性关系。量子化学家 Kier 在此基础上

建立起了分子连接性方法，把分子连接性指数 $\chi$ 作为分子拓扑性质的描述符。化合物中各原

子的点价等于原子的价电子数减去该原子所连的氢原子数目。根据化合物的点价可以计算

出各个不同形式的子图项，再对所有子图项求和计算出分子连接性指数 $\chi$ 。分子连接性指数

$\chi$ 是以数值的形式反映了分子中原子的数目和状态，也反映了这些原子的排列，它与许多物

理化学性质如沸点、疏水性参数、立体参数等有显著的相关作用，也与分子的生物活性相

关，可用于定量构效关系研究。

## 分子连接性法的优势

分子连接性指数  $X$  只需靠计算就可以得到，不必做任何实验来获得理化参数，这对于文献中没有相应理化参数可查，或者把不同结构类型的化合物综合在一起进行构效研究的情况是很有用的。

## 分子连接性法的不足之处

分子连接性指数  $\chi$  和 Free-Wilson 法所采用的结构参数一样缺乏明确的物理意义，因此所得的构效相关式对指导新化合物设计存在一定的问题。

## 03

### 三维定量构效关系方法 (3D-QSAR)

近些年来，随着构效关系理论和统计方法的进一步发展，又出现了一些三维定量构效关系 (3D-QSAR) 方法。与 2D-QSAR 比较，3D-QSAR 方法把分子图形学与 QSAR 结合起来，间接地反映药

物分子与生物大分子相互作用的过程，以及两者之间的非键相互作用特征，从而获得比经典 QSAR

更加丰富的信息量和更加明确的物理意义。目前，应用最广泛的 3D-QSAR 方法是**比较分子场分析**

**法 (CoMFA) 和比较分子相似性指数分析法 (CoMSIA) 。**

<https://doi.org/10.1007/s10822-019-00231-x>

### **3D-QSAR 的理论基础**

1. **分子的形状**在一定程度上影响其生物活性，因此分子的活性构象是研究 3D-QSAR 的关键；

2. 药物分子与靶标之间的相互作用是通过可逆的、非共价结合的弱相互作用力而实现的，如静

电相互作用、疏水相互作用、氢键作用、范德华作用等。**3D-QSAR**能直接反映出药物分子与靶

标在三维空间上的互补性，更准确地表达药物与靶标之间的相互作用。

### 常用的 3D-QSAR 方法

#### 1. 比较分子场分析 (*Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA*) 方法简介

##### **基本原理**

如果一组相似化合物以同样的方式作用于同一靶点，那么它们的生物活性就取决于每个化

合物周围分子场的差别。分子场分析方法可以反映药物分子和靶点之间以非键合的形式发

生相互作用的特性。



## 计算步骤

(1) 确定药物分子的活性构象，再按一定的规则进行药物分子的叠合  
(一般为骨架叠加或

场叠加)；

(

2) 在叠合好的分子周围定义按一定步长来划分格点，在每个格点上用一个探针离子来评

价格点上的分子场特征（一般为静电场和立体场，有时也包括疏水场和氢键场）；

(

3) 通过偏最小二乘方法建立化合物活性和分子场特征之间的关系并给出各种分子场的等

势能面；

(

4) 计算新化合物分子周围的立场分布，输入到该模型中，用得出的3D-QSAR 方程预测

新化合物的活性。

近年来，研究人员对传统的 CoMFA 进行了大量的改进，其中涉及到活性构象的确定，分子

叠加规则、分子场势函数的定义以及分子场变量的选取等等，在很大程度上提高了 CoMFA

计算的成功率。其中最具有代表性的就是比较分子相似因子分析（**Comparative**

**Molecular Similarity Indices Analysis, CoMSIA**）方法。

## ***2. 比较分子相似因子分析 (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis,***

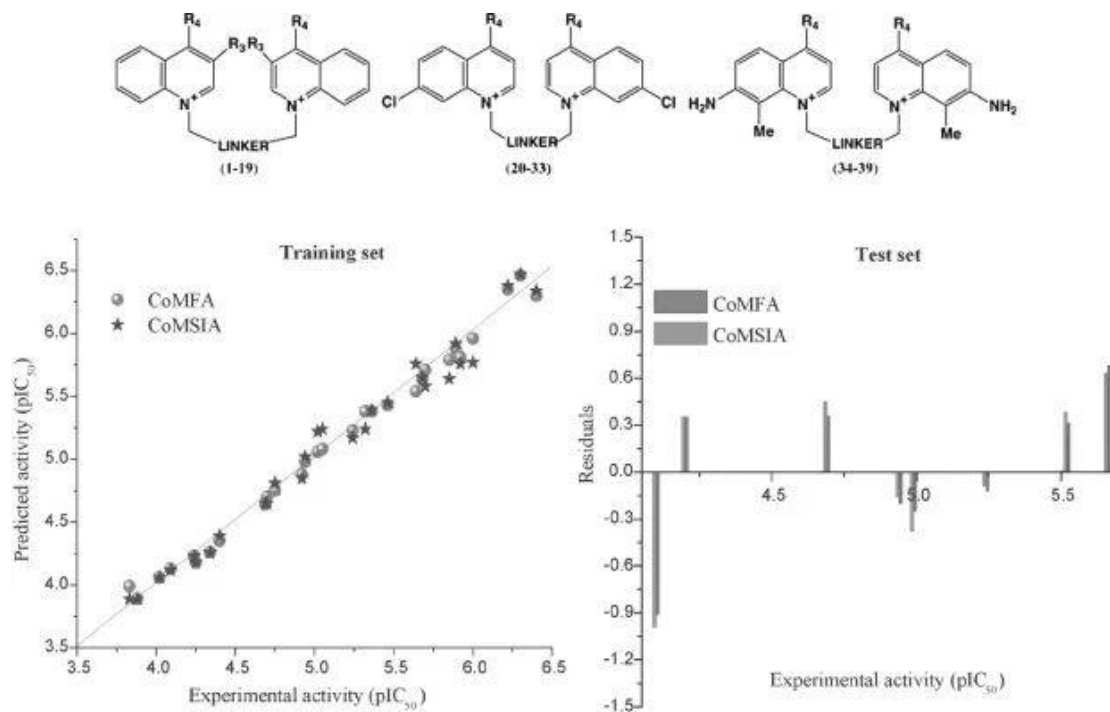
### ***CoMSIA) 方法简介***

与 CoMFA 方法相比，CoMSIA 方法最大的不同就是分子场的能量函数采用了与距离相关的

高斯函数的形式，而不是传统的 Coulomb 和 Lennard-Jones **6-12 势函数** 的形式。

**CoMSIA 方法中共定义五种分子场的特征，包括立体场、静电场、疏水场以及氢键场（包**

括氢键给体场和氢键受体场)。这五种分子场可以通过公式计算得到。



## CoMSIA 方法的优势

CoMSIA 采用与距离相关的高斯函数形式，因此可以有效地避免在传统 CoMFA 方法中由静电

场和立体场的函数形式所引起的缺陷。除此之外，由于分子场能量在格点上的迅速衰退，

CoMSIA 方法不需要定义能量的截断 (cutoff) 值。又由于引入了疏水场，三维结构模型更

优。

## 实际应用时，如何选择以上两种方法呢？

有研究者对一些实际体系进行 CoMFA 和 CoMSIA 方法的比较研究，尝试在计算中采用不同

的格点数，并对体系均采用全空间搜索策略。

结果发现 CoMFA 计算对格点大小和分子空间取向非常敏感。采用不同的空间取向时，回归

系数的差值最大可以达到 0.3 以上。而 CoMSIA 方法的结果则稳定得多。

因此，在一般情况下，CoMSIA 计算会得到更加满意的 3D-QSAR 模型。

## 参考文献

1.Hopkins, A., Keserü, G., Leeson, P. et al. The role of ligand efficiency metrics in drug

discovery. Nat Rev Drug Discov 13, 105–121 (2014).

2.Neves BJ, Braga RC, Melo-Filho CC, Moreira-Filho JT, Muratov EN and Andrade CH

(2018) QSAR-Based Virtual Screening: Advances and Applications in Drug

Discovery. Front. Pharmacol. 9:1275. doi:  
10.3389/fphar.2018.01275

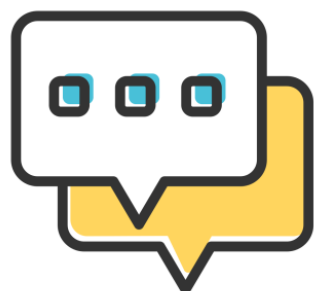
3.J. Chem. Educ. 2015, 92, 10, 1745–1750 Publication  
Date: August 7, 2015

4.J. Med. Chem. 2019, 62, 22, 10402–10422

以上就是本周的学习内容了。我们下周将进入**先导化合物的优化**  
**(下)**的学习。敬请留意!

工欲善其事必先利其器，殷赋云计算平台为广大科研工作者提供了专业的计算方案，帮助用户打破

学术壁垒，解决计算难题，提升研究效率，在科研竞争中取得领先优势。



**Contact Us**

打破学术壁垒 解决计算难题 提升科研效率



## 【跟我学药物设计】往期好文推荐

(点击下方文字即可阅读)

跟我学药物设计 | 药物研发的过程和药物设计的意义

跟我学药物设计 | 计算机辅助药物设计的起源及发展

跟我学药物设计 | 药物的分子结构

跟我学药物设计 | 靶标的主要类型和结构特征

跟我学药物设计 | 药物和靶标的相互作用

跟我学药物设计 | 分子模拟（上）

跟我学药物设计 | 分子模拟（下）

跟我学药物设计 | 信息学基础

跟我学药物设计 | 传统药物设计方法

跟我学药物设计 | 药物设计中的生物电子等排体

跟我学药物设计 | 药物靶标识别与预测

跟我学药物设计 | 计算机辅助先导化合物的发现

殷赋科技入驻 B 站视频啦！（欢迎大家关注、点赞）

**殷赋科技**在生物医药计算领域积累了丰富的经验，并且开发出了简单易用、智能友好的云计算平

台，让科研工作者轻松获得计算专家的倾力协助，突破药物设计过程中的计算关卡。

**欢迎大家在文章下方留言区提出关于研究课题或者使用平台的问题，我们每周精选一个问题展开**

**讨论，并将讨论内容整理发布到公众号上。要踊跃提问和留言哦！**

我们将继续围绕计算机辅助药物设计（CADD）的主题，展开一系列学习和讨论。欢迎大家持续关注、扫码加群，获取更多资讯。

# 先导化合物的优化（下）

01

## 化合物药效学性质的优化

### 常见的化合物药效学性质的优化策略

#### 1) 基于靶点结构的优化

在药物研发的早期阶段，靶点与配体分子结合模式的确认非常重要。

新合成化合物与靶点

复合物的晶体结构解析结果，提供了直观的分析基础，有助于采取基于靶点结构的优化策略，对提高化合物的生物活性、改善药效学性质有着重要意义。这部分工作通常需要多个

学科专家的紧密协作才能取得成功。

#### 多学科合作模式

**基因组学、蛋白质组学、生物化学：**发现靶蛋白并进行验证；

**结构生物学、生物物理学：**培养单晶并解析晶体结构；

**核磁共振分析**：确定已知活性化合物与复合物的相互作用方式；

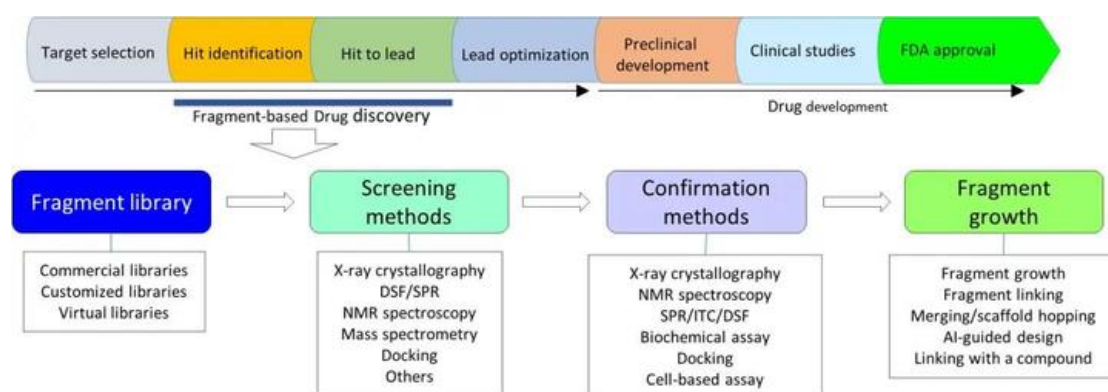
**合成药物化学**：提供化合物及后继的类似物；

**药理学**：初步的生物活性筛选；

**分子模拟 / 计算机辅助药物设计**：根据所获得的配体-靶点复合物的晶体结构，相关的生物学

活性数据，设计下一步的改造策略并进入下一轮的循环。

## 2) 基于片段结构的优化



基于片段结构的药物优化是一种以**小分子片段筛选和结构生物学为核心**，通过**筛选较少数**

**量的片段化合物去探索更大的化学空间**的方法。药物化学家使用基于片段的药物优化方法

可以更有效地发现苗头化合物，获得配体效率更高且成药性更好的化学结构。

## **基于片段的药物优化流程**

**1.苗头化合物片段化 (Hit Fragmentation) , 或称为骨架删减 (**

**Scaffold Pruning)**。药

物化学家需要将苗头化合物结构分解为具有片段特征的分子。分解后所获得的片段通常要求遵

**循三倍率规则 (片段分子量 < 300, 脂水分配系数 < 3, 氢键供体受体数量 < 3), 这样可以**

**更加有效地限制片段分子的结构复杂性。分解出来的片段应具有比较好的水溶性, 这样可以保**

**证较弱的相互作用在较高浓度下也可以被检测出。除此之外, 药物化学家需要控制好片段的大**

**小、氢键个数和柔性 (可旋转键数), 为后期的结构改造留出空间。**

**2. 分解获得的片段经制备后需要与靶点蛋白形成复合物。在这个过程中, 药物化学家会采集**

**复合物的单晶衍射数据, 对片段与靶点的结合方式进行分析。通常来说, 会选中 4-6 个苗头化**

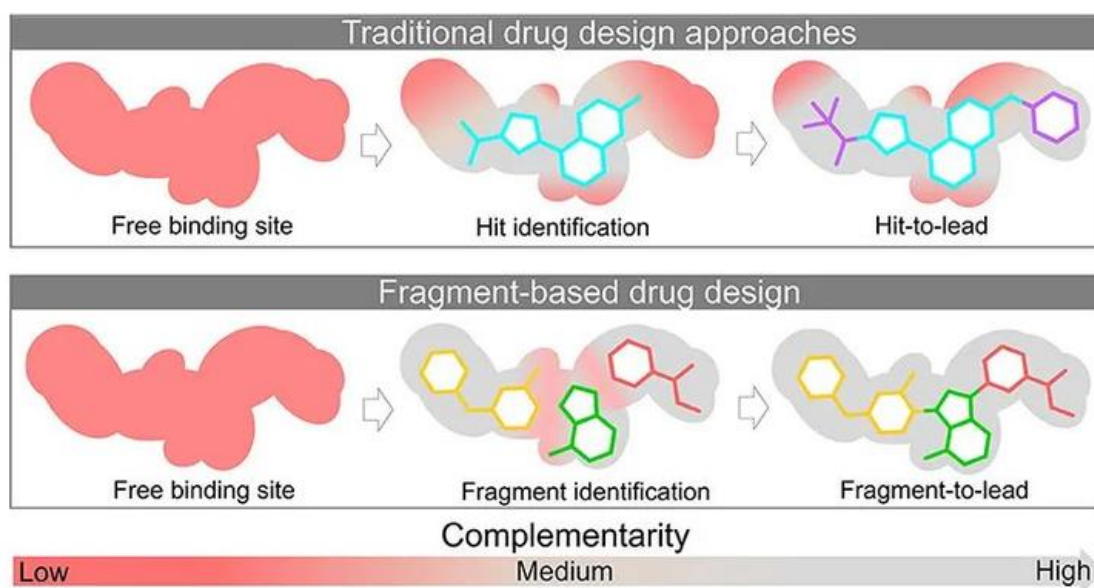
**合物进入进一步研究, 最终通过片段生长法、片段合并法和片段连接法合成新苗头、先导化合**

物。从改造结构的效果上看，**在片段基础上进行小幅改造和优化，往往比对分子进行大幅修改**

**更为有效。**与片段连接法相比较，**片段生长法能够更为有效地控制所生成的苗头、先导化合物**

**的理化性质。**在以上过程中，除了追踪化合物的生物活性及其与靶蛋白的结合方式外，还需要

及时监测化合物的配体效率、配体亲脂性效率和合成可行性等相关指标。



### 3) 基于配体结构的优化

在不明确靶点信息的情况下，药物化学家可以通过**基于配体三维结构的方法**对化合物进行

优化。比如 3D-QSAR 方法。

化合物优化的主要目标是**增强化合物与靶蛋白的结合能力**。根据吉布

**斯 (Gibbs) 自由能**

**计算公式** $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$ 可以推导出，降低**焓变 $\Delta H$** 或增加**熵变 $\Delta S$**

均可以得到高的**结合**

**自由能 $\Delta G$** 。

**影响焓变的因素**

影响焓变的因素主要是各种相互作用，包括**离子-离子相互作用、离子**

**-偶极相互作用、偶极-**

**偶极相互作用、氢键作用、阳离子- $\pi$ 相互作用、电荷转移作用、螯合**

**作用、卤键、范德华作**

**用和芳环-芳环相互作用**。从吉布斯自由能计算公式上看， $\Delta H$ 反映了

化合物和靶点与靶点和溶

剂这两组相互作用的结合强度差异。如果结构优化的过程以焓变为

主，则需要在化合物结构中

加入特异性、定向性的相互作用。依据药物化学家的研究经验，**内源**

**性配体与靶点的结合方式**

**主要以焓变为主**，通常来说以焓变为基础优化得到的化合物品质更好。

### **影响熵变的因素**

影响熵变的因素包括**蛋白及化合物在构象自由度上的损失（不利的作用）**和**将水分子释放到周**

**围水环境中的疏水作用（有利的作用）**。在现实情况中，增加熵值是改善活性最快的方法。比

如，增加亲脂性可以打乱配体与靶蛋白结合后疏水表面水分子的有序排列；提高结构刚性或增

加构象限制，可减少配体与靶点结合时自由度的损失。如果结构优化的过程以熵变为主，则会

遇到分子量增大、疏水性增加的问题，进而导致化合物的生物作用选择性降低、溶解性下降、

蛋白结合升高及潜在的药物蓄积问题。针对这些问题，药物化学家可以运

用焓效率（Enthalpic Efficiency, EE）和非依赖性焓效率（Size-Independent

Enthalpic Efficiency, SIHE) 指导优化过程。

在**从苗头到先导**的优化阶段，药物化学家一般在**配体效率 (LE)** 和**配体亲脂性效率 (LLE)**

的指导下进行优化。在**先导化合物**优化阶段，需采用更加复杂的度量指标进行指导，此处

就不赘述了。

#### **4) 骨架跃迁**

**骨架跃迁 (Scaffold Hopping)** 是指通过计算机辅助筛选手段或从药物化学角度进行骨

架替换，**找到与已知活性分子核心结构不同的活性化合物。**

骨架跃迁的概念最早是在 1999 年由 Schneider 等提出，用于**系统修**

**改先导化合物结构的核**

**心骨架，提高化合物的生物活性、改善药代动力学性质、降低毒性。**

骨架跃迁可以帮助药物化学家利用不同核心骨架来绕过已知活性结构的知识产权保护，从而获得自主知识产

权；或者将天然活性化合物的复杂结构替换成容易合成的简单结构。

计算方法在骨架跃迁中具有不可替代的优势，比如可以方便地**从已知**

**骨架分子外推到许多**

**具有不同骨架的分子，并用多种方法比较分子或骨架间的相似性或差异性；**还可以采用分

子对接等方法，来**预测骨架跃迁前后的分子与靶标的结合亲和力和相互作用细节的变化。**

目前，已有许多用于骨架跃迁的计算方法被开发出来，包括基于分子形状匹配的相似性搜

索方法、基于分子指纹的相似性搜索方法、药效团匹配方法、片段替换方法等。

## 基于结构的先导化合物优化

基于结构的先导化合物优化，就是借助**分子图形学技术 (Molecular Graphics)**，把先导化合物

对接到靶标的结合口袋，得到最佳的结合模式，然后根据**化学性质互补、几何形状互补两个原则**，

考察先导化合物与靶标口袋残基之间尚未满足两个互补原则的地方，通过**增删或者替换先导化合物**

**中相应的原子或基团**，从而完成优化的过程。

### 四种常用的优化策略

#### 1. 基团变换策略

针对 X 射线结晶学得到的药物-靶标复合物晶体结构，或者通过分子对接得到的药物-靶标相

互作用模式，可以通过分子模拟技术，仔细观察二者之间的相互作用细节，包括观察结合

口袋内各氨基酸残基的化学性质，比如是亲水性残基还是疏水性残基，是带正电荷残基还

是带负电荷残基，是氢键供体还是氢键受体；配体上现有原子或基团与邻近残基的相互作用

用是否匹配；进一步测量小分子原子与各残基之间的距离和角度。然后根据“几何形状互

**补、化学性质互补”**原则，增减或调整配体上的相关基团。

如果现有配体-受体相互作用不匹配，则可以通过在母环上的合适位置增加基团、删减基团

或者替换为一个更合适的基团，得到更好的相互作用模式。比如旁边有一个带正电荷的氨

基酸残基，则可以在骨架上相应的位置添加一个带负电荷的羧基或者磺酸基，以便二者形

成静电相互作用。替换基团则可以采用生物电子等排原理，更换为一个合适的基团。当

**然，改造后的结构要再进行分子对接，以确保其相互作用方式达到了改造的目的，而不是**

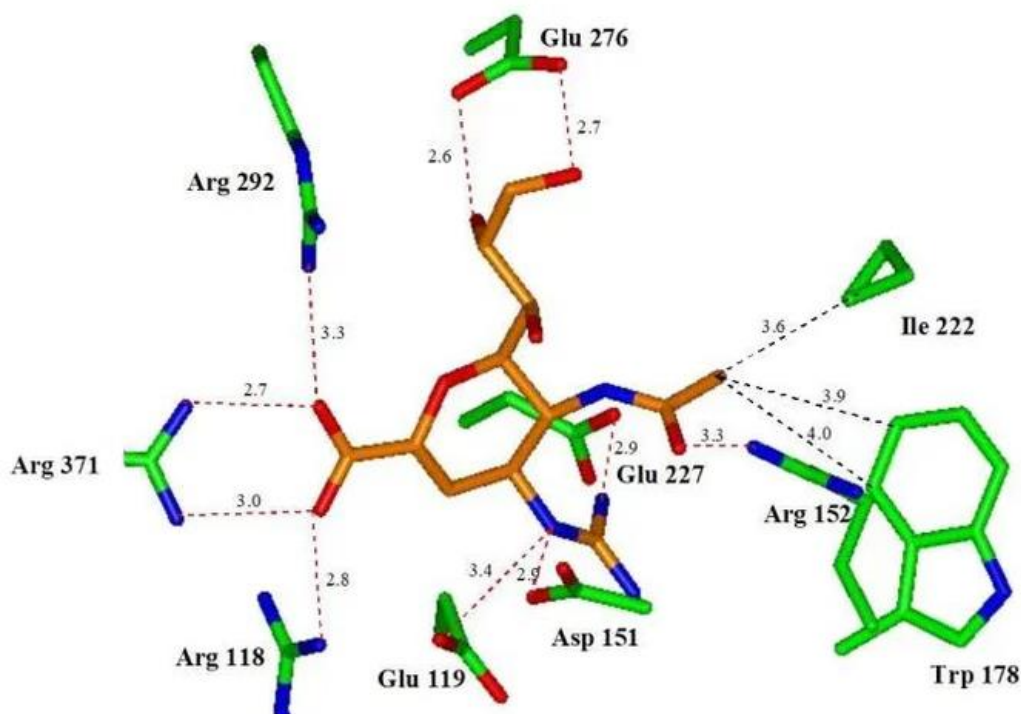
**变成新的不同的作用模式。**

## 基团变化策略实例

一个经典的例子就是抗流感药物扎那米韦的设计。其先导化合物 Neu5Ac2en 活性与选择性都

很低，但在 Neu5Ac2en 与神经氨酸酶的对接模式中，可以发现先导化合物的 4-羟基周围，有

Glu119、Asp151 和 Glu227 这三个带负电荷的残基，它们之间存在氢键作用。



研究人员把 4-羟基更换为 4-氨基，结合亲和力明显增强 ( $K_i = 50$  nmol/L)，并从 4-氨基-

Neu5Ac2en 与神经氨酸酶的复合物晶体结构中，发现 4-氨基与 Glu119 形成了盐桥。在这个

基础上，研究人员进一步使用体积更大、碱性更强的胍基替换氨基，所得到的 4-胍基-

Neu5Ac2en 结合力更强 ( $K_i = 0.2 \text{ nmol/L}$ )，并测定复合物晶体结构进行验证，发现 4-胍基

与 Glu119 和 Glu227 都形成了静电相互作用。4-胍基-Neu5Ac2en 即扎那米韦。

## 2. 合环开环策略

合环和开环是基于结构的先导化合物优化的有效策略。合环和开环策略通过**控制可自由旋**

**转键的数量来操纵分子的柔性**，比如分子中含有多个可旋转键时，分子柔性较大，如果对

接时发现这些可旋转键在空间上比较靠近，可以考虑成环来固定其构象，从而降低柔性。但有时，分子中环结构太多，使得分子刚性过大，难以很好地契合靶标的结合口袋，这时

就可以考虑打开其中某个环，以增大分子的柔性。由于合环和开环一般涉及分子核心骨架

的改变，因此有人将该策略归类到骨架跃迁中。

### **合环开环策略实例**

分子内氢键通常提供闭环的提示。英国葛兰素史克公司研究小组通过将 O-烷氧基和联芳基 NH

之间的潜在分子内氢键环化成为吡啶结构，合成了前列腺素 EP1 受体拮抗剂，成功地将分子锁

定成生物活性构象。

改造后的闭环对结合自由能有积极的影响，但是对溶解度和其他 ADME 性质也产生了潜在的负

面影响。为了克服分子中太多环的不利影响，药物化学家可以实践开环，以增强分子的类药性。

比如在一项关于血管生成抑制剂的研究中，研究者尝试将已知的选择性抑制剂

PTK787/ZK222584 中的二氮杂萘环打开，并使其通过分子内氢键形成一个伪六元环。分子模

拟表明二者构象几乎一样，测试结果也表明环打开前后的活性和选择性几乎没有改变，但获得了新的骨架类型，并改善了分子的类药性。

### **邻位修饰策略**

在优化小分子与蛋白质的相互作用时，常常会在苯环上进行修饰或取代。苯环上的取代有

邻位、间位和对位之分。**间位和对位的取代或修饰，常常影响的是小分子与蛋白质的直接**

**相互作用。而邻位的修饰或取代，不仅会影响小分子与蛋白质的直接相互作用，而且会影**

**响小分子本身的构象。**一般来说，小分子本身具有一定的柔性，未结合蛋白质之前，在溶

液中存在多种不同的构象，其中**可以与蛋白质结合的构象有利于提高活性，而不能与蛋白**

**质结合的构象则对活性不利。**依据 $\Delta G = -RT \ln K$ 可以知道，当小分子在溶液中的最低能

量构象与小分子在结合位点的活性构象的能量差别是 1.4 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.18

kJ/mol) 时，亲和力会有 10 倍的差别；而当相差 2 kcal/mol 时，亲和力会有 30 倍的差异。

所以，在先导化合物优化时，**把小分子在溶液中的最低能量构象调节到与结合位点的活性**

**构象相似**是一个非常不错的策略。

### **邻位修饰策略实例**

从一项关于 Cdc7 激酶抑制剂的研究结果可以看见：

1. **化合物 2** 仅比**化合物 9** 多了一个 CN 基团，但活性**提高了 60 倍**；
2. **化合物 5** 仅比**化合物 2** 在芳环上少了一个氮原子，但活性**下降了 120 倍**；
3. **化合物 18** 仅比**化合物 9** 在芳环上多了一个氮原子，但活性又**下降了 6 倍**。

为了解释这些化合物之间的构效关系，研究者采用量子力学计算对这些化合物进行了构象分

析，发现这些化合物两个芳香环之间夹角与能量的变化规律。

理论上来说，这些化合物的最优构象应该是平面状的，即夹角为  $0^\circ$  是最佳活性构象。但从二面

角能量分布图可以看出：

1. **化合物 2 和 9** 的二面角低能量构象（蓝色、红色）是  $0^{\circ}\sim 20^{\circ}$  间，与最优活性构象  $0^{\circ}$  非常接

近；2 **化合物 5** 的二面角低能量构象（紫色）是  $40^{\circ}$  和  $140^{\circ}$  左右 与最优活性构象能量差接近近；

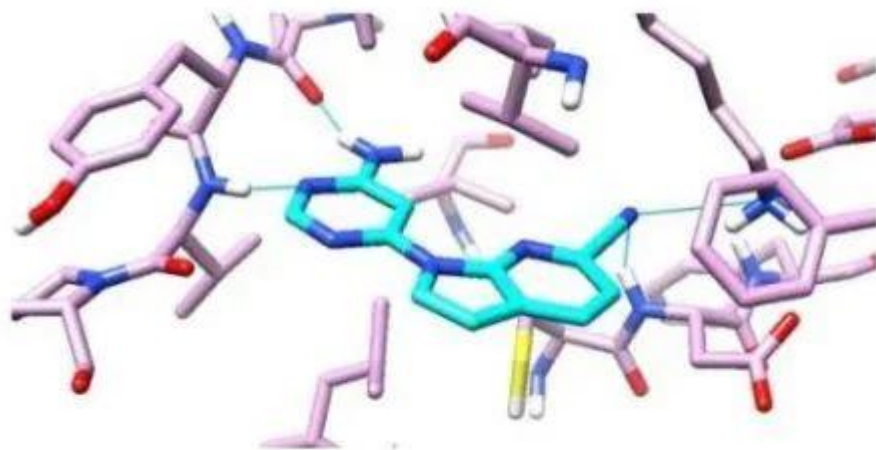
2. **化合物 5** 的二面角低能量构象（紫色）是 40 和 140 左右，与最优活性构象能量差接近

4 kcal/mol，因此造成了活性损失；

3. **化合物 18** 最低能量构象（绿色）处于  $180^{\circ}$ ，即两个环完全翻转了，与  $0^{\circ}$  的能量差接近 8

kcal/mol，基本上处于没有活性的状态，即使有-CN 基团，也会偏离结合模式中的位置，因

此不能与靶标正确结合。



**这项研究给我们的启示在于，结合模式并不是简单地把化合物对接到蛋白结合位点，挑出打分**

**最高的就能得到，而是需要综合考虑构效关系等各种因素，挑选出最合理的结合模式，才能更**

**加有效地指导后期的药物设计。**

### **肽键变换策略**

生物活性的内源性肽，如肽激素、生长因子和神经肽，在我们体内具有重要的生物学功

能。这些肽的不平衡可引起不同的人体疾病，包括糖尿病、癌症、骨质疏松症和子宫内膜

异位症等，因此需要开发相关药物，去模拟内源性肽的活性。但多肽直接开发为临床应用

的药物，具有代谢稳定性差和生物利用度低等缺点。使用活性肽构象作为模板，设计小分

子来模拟肽的结构特征，即拟肽物分子，在一些具有挑战性的靶标上已取得成功，成为上

市治疗药物。比如 HIV-1 蛋白酶抑制剂的研发，就经历了从肽类抑制剂到拟肽类抑制剂（如

沙奎那韦），再到非肽类抑制剂（如奈非那韦）的过程。

肽键变换策略也被应用到蛋白-蛋白相互作用（PPI）界面抑制剂的设计中，其中小分子被

设计为模拟蛋白质的相互作用部分。基于肽的药物发现的主要目标是减少肽的性质，以增

强对蛋白质水解的抵抗力，同时保持分子识别的关键化学特征。因此，将肽键转化为其它

键或者官能团，是典型的先导化合物优化方法。**肽键变换策略实例**

细胞凋亡或程序性细胞死亡，在维持体内平衡和去除损伤或恶性细胞中起主要作用。凋亡途径

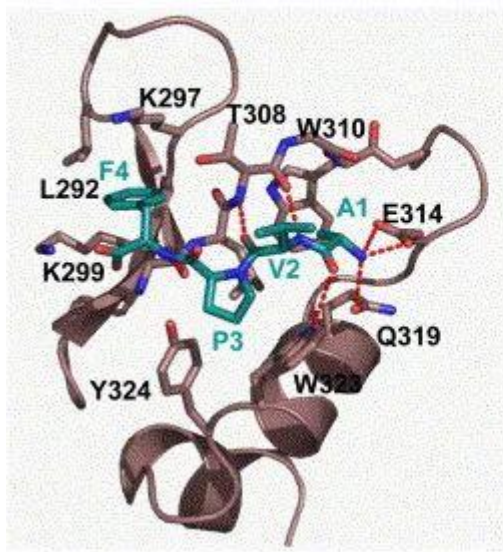
的不平衡与几个重要的疾病领域有关，包括肿瘤学、心血管疾病和神经变性疾病。Smac 通过

将其 N 末端序列 AVPI 插入 XIAP-caspase-9 相互作用口袋中与 XIAP 相互作用，从而释放载脂

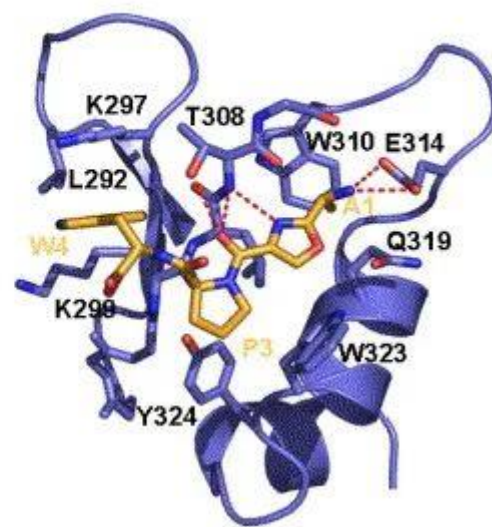
蛋白-9 并引起细胞死亡。研究人员用噁唑环代替一个肽键，旨在通过降低肽特性来增强药物活性，

以便与 AVPI/Smac 竞争，从而引起细胞凋亡。

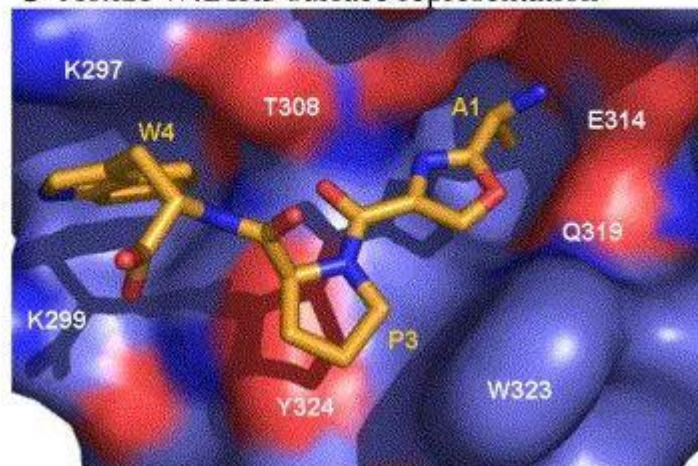
**a** AVPF:BIR3



**b** AoxSPW:BIR3



**c** AoxSPW:BIR3 surface representation



以上就是本周的学习内容了。下一期是本系列的最后一章——**药代动力学性质与毒性预测**。因最近身

体不适，拖更了，近期还要做个小手术，所以下一篇文章可能会延迟发布，请大家多多包涵，我们

下期再见。

工欲善其事必先利其器，殷赋云计算平台为广大科研工作者提供了专业的计算方案，帮助用户打破

学术壁垒，解决计算难题，提升研究效率，在科研竞争中取得领先优势。

## 参考文献

von Itzstein, M., Wu, WY., Kok, G. et al. Rational design of potent sialidase-based

inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 363, 418–423 (1993).

[doi.org/10.1038/363418a](https://doi.org/10.1038/363418a)

Pascal Furet, Guido Bold, Francesco Hofmann, Paul Manley, Thomas Meyer, Karl-Heinz

Altmann, Identification of a new chemical class of potent angiogenesis inhibitors based

on conformational considerations and database searching,

Bioorganic & Medicinal

Chemistry Letters, Volume 13, Issue 18, 2003, Pages 2967-2971,

ISSN 0960-

894X, [doi.org/10.1016/S0960-800626-7](https://doi.org/10.1016/S0960-800626-7).

Aislyn D. Wist, Lichuan Gu, Stefan J. Riedl, Yigong Shi, George L.

McLendon, Structure–

activity based study of the Smac-binding pocket within the BIR3

domain of XIAP,