

药物化学进展

◎ 主编 彭司勋
◎ 副主编 赵守训 廖清江 黄文龙

Progress
in Medicinal
Chemistry

2



化学工业出版社

ISBN 7-5025-3925-5



9 787502 539252 >

ISBN 7-5025-3925-5/G · 1076 定价：35.00元

925

28
56
2

药物化学进展

Progress in Medicinal Chemistry

(2)

主 编 彭司勋
副主编 赵守训 廖清江 黄文龙

化 学 工 业 出 版 社

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

药物化学进展. (2) / 彭司勋主编. —北京: 化学工业出版社, 2002. 12
ISBN 7-5025-3925-5

I. 药… II. 彭… III. 药物化学-研究-进展-世界
IV. R914

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 068983 号

药物化学进展

Progress in Medicinal Chemistry
(2)

主 编 彭司勋
副主编 赵守训 廖清江 黄文龙
责任编辑: 何曙霓
责任校对: 蒋 宇
封面设计: 潘 峰

*

化学工业出版社出版发行
(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)
发行电话: (010) 64982530
<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销
北京管庄永胜印刷厂印刷
三河市延风装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 17 $\frac{1}{4}$ 字数 429 千字
2003 年 1 月第 1 版 2003 年 1 月北京第 1 次印刷
ISBN 7-5025-3925-5/G · 1076
定 价: 35.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

作者

(以姓氏笔画为序)

尤启冬	中国药科大学药学院副院长, 博士生导师, 南京童家巷 24 号	210009
王联红	中国药科大学, 南京童家巷 24 号	210009
田伟生	中国科学院上海有机化学研究所, 博士生导师, 上海市枫林路 354 号	200032
叶 阳	中国科学院上海生命科学院药物研究所, 博士生导师, 上海市太原路 294 号	200031
刘 澎	中国医学科学院药物研究所, 北京市宣武区先农坛街 1 号	100050
李仁利	北京大学医学部药化系, 教授, 北京北郊学院路	100083
李中军	北京大学药学院化学生物学系, 博士生导师, 北京北郊学院路	100083
李 玲	中国科学院昆明植物研究所, 昆明医学院云南省天然药物 药理重点实验室, 教授, 昆明市梁家河	650031
沈月毛	中国科学院昆明植物研究所, 研究员, 昆明市黑龙潭	650204
陈植和	昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 教授, 昆明市梁家河	650031
邵荣光	中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究所, 博士生导师, 北京市先农坛街 1 号	100050
张礼和	北京大学药学院, 博士生导师, 北京北郊学院路	100083
张亮仁	北京大学药学院, 教授, 北京北郊学院路	100083
张惠斌	中国药科大学新药研究中心, 副教授, 南京童家巷 24 号	210009
张奕华	中国药科大学新药研究中心, 博士生导师, 南京童家巷 24 号	210009
张 震	山东大学药学院, 博士生导师, 济南市文化西路 44 号	250012
苟少华	南京大学化学化工学院, 博士生导师, 南京市汉口路	210008
林 茂	中国医学科学院药物研究所, 博士生导师, 北京市先农坛街 1 号	100050
恽榴红	军事医学科学院 6 所, 博士生导师, 北京市太平路 27 号	100850
郝小江	中国科学院昆明植物研究所所长, 博士生导师, 昆明市黑龙潭	650204
徐文方	山东大学药学院, 博士生导师, 济南市文化西路 44 号	250012
徐任生	中国科学院上海生命科学院药物研究所, 博士生导师,	

	上海市太原路 294 号	200031
贾兰齐	中国科学院上海有机化学研究所, 研究员, 上海市枫林路 354 号	200032
黄文龙	中国药科大学, 博士生导师, 南京童家巷 24 号	210009
曹春霞	中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究 所, 研究员, 北京市先农坛街 1 号	100050
彭司勋	中国药科大学, 博士生导师, 南京童家巷 24 号	210009
谢晶曦	中国医学科学院药物研究所, 研究员, 北京市先农坛街 1 号	100050
蔡孟深	北京大学药学院化学生物学系, 博士生导师, 北京北郊学院路	100083

目 录

1. 先导物选择与优化的系统策略和方法 (Systematic Strategies and Methods for the Selection and Optimization of Lead Compounds)	恽榴红	1
2. 比较分子场分析 (CoMFA) 方法及其应用与限度 (Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) Method, Its Application and Limitation)	李仁利	13
3. 反义核酸药物研究 (Advances in Antisense Drugs)	张亮仁 张礼和	37
4. 用于缺血性脑损伤的脑保护剂的研究进展 (Advances in the Protective Agents for the Ischemic Brain Damage)	李 玲 沈月毛 陈植和 郝小江	54
5. 植物来源抗癌药物研究进展 (Recent Advances in Anticancer Drugs from Plants)	徐任生 叶 阳	66
6. 二苯并环辛二烯木酚素合成化学研究进展 (Progress on the Synthetic Chemistry of Dibenzocyclooctadiene Lignans)	谢晶曦 刘 澎	83
7. 糖类化合物在药学中的应用 (Advances in Carbohydrate Compounds Applied to the Drug Research)	李中军 蔡孟深	104
8. 天然芪类化合物的化学进展 (Progress in the chemistry of natural stilbenoids)	林 茂	134
9. 抗肿瘤铂类配合物的研究进展 (Progress in Antitumor Platinum Complexes)	王联红 尤启冬 苟少华	161
10. 吡嗪双甾体的研究进展 (Progress of the Studies on Pyrazino Bissteroids)	田伟生 贾兰齐	188
11. 细胞信号转导调控剂——新型肿瘤治疗药物 (Intracellular Signaling Transduction Regulators: Novel Drugs for Cancer Therapy)	邵荣光 曹春霞	210
12. 基质金属蛋白酶抑制剂 (MMPs) 的研究进展 (Progress in the Research of Matrix Metalloproteinase Inhibitors)	徐文方 张 震	224
13. 过氧化酶增殖体激活受体 (PPARs) 及其药物研究进展 (Advances in Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Drugs)	黄文龙 张惠斌	233
14. 一氧化氮供体与新药研究 (Nitric Oxide Donors and Studies of New Drugs)	张奕华 彭司勋	250
索引		264

1. 先导物选择与优化的系统策略和方法

(Systematic Strategies and Methods for the Selection and Optimization of Lead Compounds)

恽 榴 红

1.1	前言	1
1.2	药物生物利用度相关理化性质的早期预测	2
1.2.1	溶解度	2
1.2.1.1	溶解度的快速测量	2
1.2.1.2	水溶解度的计算法	2
1.2.2	油水分配系数和细胞通透性	3
1.2.3	口服生物利用度	4
1.2.3.1	利宾斯基定性规则 (Lipinski's Rule of Five)	4
1.2.3.2	口服生物利用度的计算方法	4
1.2.3.3	口服生物利用度的实验模型	5
1.3	药代动力学性质的早期预测	5
1.3.1	药物开发中关键的药动学参数	5
1.3.2	药物代谢特征的快速预测	6
1.3.2.1	代谢稳定性体外筛选	6
1.3.2.2	药物代谢途径的快速筛选	7
1.3.3	药物相互作用潜力的预测方法	7
1.4	药物毒理学性质的早期预测	8
1.5	应用实例	8
1.6	结束语	11
	参考文献	11

1.1 前言

在新药研究过程中, 先导化合物的早期发现和优化是关键一步。20 世纪 90 年代前, 药物化学家的传统工作模式一直是将目光集中于设计合成新化合物, 提高其体外或体内的药理活性强度和选择性, 并以此为标准从中挑选出候选药进入临床前研究。虽然药物化学家明白

药物理化性质的重要性，但通常仅作为影响药理活性的因素考虑。结果这样产生的候选药进一步开发上市的成功率常常很低。据一项统计分析，候选药的毒性、临床疗效不好和生物药剂学性质差是开发失败或进展迟缓的主要原因^[1, 2]（表 1-1）。

表 1-1 候选药开发失败或进展迟缓原因

失败原因及比例	进展迟缓原因
药动学性质不良，39%	合成工艺复杂
临床疗效差，29%	发现可疑毒性
毒性反应，21%	生物药剂学性质差
市场原因，6%	活性低
化学等其他因素，5%	靶标先天不足

20 世纪 90 年代以来，基因组学、计算机辅助药物设计、组合化学等新技术源源不断地产生出许多新靶标和大量活性新化合物。据介绍，国外一个制药公司用高通量筛选程序获得的初筛数据，在 20 世纪 90 年代初期每年仅 20 万个，90 年代中期达到每年 500 万~600 万个，而 90 年代末期剧增到每年 5000 万个以上。遗憾的是，

在整个 90 年代，每年批准上市的新化学体药物数量并没有增加，而只是批准进入临床研究的品种数量有较大增加。造成这种“低产”的原因可能是多方面的。除了新靶标的可靠性以外，由先导物选择和优化产生候选药的内在质量也是一个重要原因。显然，为了提高新药开发成功率，选择先导化合物和候选药时，除体外或体内药效学指标外，需要增加早期评价指标，包括生物药剂学参数，药代动力学参数，毒理学参数，并综合多种学科的试验结果。

1.2 药物生物利用度相关理化性质的早期预测

药物必须先溶解进入水相，穿过几重生物膜到达作用位点，才能产生药效反应。影响药物进入体内和生物相的因素很多，包括给药途径和剂型，药物的崩解速率、溶解度、对生物膜的通透性、在体液和组织中的分布，生物转化的类型、数量和速率，重吸收和清除等。另外，药物遗传学因素和某些病理条件也会影响上述过程。

口服是最常用的给药途径。口服药物的生物利用度是生物药剂学和药代动力学共同相关的性质。在影响药物生物利用度的因素中，药物化学家考虑较多的是药物溶解度、油水分配常数、膜通透性等与分子结构相关的理化性质。

1.2.1 溶解度

1.2.1.1 溶解度的快速测量

在药物发现阶段，为了选择和优化先导物，常用浊度法测量溶解度。该法的优点是快速和便于自动化操作，虽然结果不如经典的平衡测量法精确。

浊度测量法的具体操作^[3]：将待测样品溶于二甲基亚砜（DMSO），配制成 10 μg/μL 的样品溶液。取 2.5 mL 无氯离子的磷酸盐缓冲液（pH7）置 UV 吸收池内。室温下向吸收池加入 1 μL 样品 DMSO 溶液，间隔 1 min 再第 2 次加入，加样总次数为 17，相当于每次溶解度增量 < 5 μg/mL，最后一次加入终浓度 > 65 μg/mL。如果在加入早期明显出现沉淀，马上停止加入，以便有 2 个连续性读数。用二极管阵列 UV 检测器测定沉淀物的光散射强度（如 HP8452A 型二极管阵列检测）。为了避开大多数药物的 UV 吸收区，一般采用的检测波长范围为 600~820 nm。沉淀点用双线性拟合吸收值（y 轴）对 DMSO μL 数（x 轴），2 条 S 形曲线的交叉点坐标 x 为沉淀析出时的 DMSO μL 数，y 为沉淀光吸收值，已知样品 DMSO 溶液的浓度和吸收池内缓冲液体积，即可计算出沉淀点每 mL 缓冲液中药物样品的量（μg），计算出溶解度。

1.2.1.2 水溶解度的计算法

理论上，固体化合物的溶解度是晶体堆积能、空化能和溶解能的函数。迄今为止，尚无

准确可靠的计算化学方法预测溶解度。文献中结合训练系列化合物的具体性质提出了几种回归方程^[4, 5]。本文介绍一种改良的溶解能测定法, 可从实验数据或分子结构预测化合物的水溶解度 ($\log S_w$)。

具体方法^[6]: 收集多种结构类型的 664 个化合物, 删除其中偏差太大的 5 个化合物 (含 2 个二元羧酸)。对其中 594 个化合物建立回归方程:

$$\log S_w = 0.518 - 1.004R_2 + 0.771\pi_2^H + 2.168 \sum \alpha_2^H + 4.238 \sum \beta_2^H - 3.362 \sum \alpha_2^H \sum \beta_2^H - 3.987V_x$$
$$n=594, SD=0.557, r^2=0.920, F=1256$$

式中 R_2 —— 剩余摩尔折射率 ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}/10$);

π_2^H —— 偶极矩 / 极化度;

$\sum \alpha_2^H$ —— 氢键酸度总和;

$\sum \beta_2^H$ —— 氢键碱度总和;

$\sum \alpha_2^H \sum \beta_2^H$ —— 分子中酸性基团碱性基团之间的氢键相互作用;

V_x —— McGowan 特征体积 ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}/100$);

n —— 样本数;

SD —— 标准偏差;

r^2 —— 相关系数;

F —— 方差。

用上述方程计算剩余的 65 个化合物的水溶解度 ($\log S_w$), 对比实验测定值, $SD=0.56$ 。相关方程表明, 一个化合物的氢键能力有助于提高水溶性, 虽然溶质分子中酸碱基团的相互作用导致降低水溶性, 增加分子的偶极矩或极化度能提高水溶性, 而增加分子的剩余摩尔折射率或体积, 则降低水溶性。

1.2.2 油水分配系数和细胞通透性

油水分配系数对药物的被动转运有最直接的意义; 另外, 它与蛋白结合、清除等药动学参数也有密切关系。在 QSAR 研究过程中, 曾经对油水分配系数进行过多种研究。有两个方面的进展最值得注意: (1) 提出了从头计算油水分配系数的软件 $ClogP$, 它有较强的预测能力; (2) 提高实验测量油水分配系数方法的简便性、通量和预测能力^[7]。例如晚近开发的自动电位滴定技术, 可用于先导物的选择和药物开发^[8]。作者测定了 21 种结构不同且可离子化的常用药物在 pH6.8 脂质体系统中的分配, 这些药物的人体口服吸收范围从小于 5% 到几乎 100%。作者发现药物在人体的小肠被动吸收与根据脂质体分配系数和溶解度-剂量比例计算出的吸收力参数之间有 S 形曲线关系, 而与正辛醇作为分配相计算出来的吸收力或油水分配系数 $\log P$ 相关性差。有一种固定化人工膜 (immobilized artificial membranes, IAM) 系将纯化的细胞膜键合在硅胶载体上构成细胞膜脂质环境的色谱模型, 国外已有商品上市, 如美国 Regis 化学品公司的 IAM.PC.DD。这是一种快速简便的测量方法, 其特点是具有设计好的磷脂胆碱表面, 所反映的油水分配过程体现了亲脂性和静电力两种相互作用。因此有实验评价 IAM 容量因子 (K'_{IAM}) 比较适合于作为药物小肠吸收模型^[9]。但由于它采用 HPLC 分析测量, 使分析样品的通量受到限制。

按一般理解, 适合于大量筛选化合物的高通量方法至少每天能筛选 500~1000 个化合物。Kansy 等报道了一种人工膜平行测量细胞通透性的方法^[10]能够满足高通量要求。其实验装置为 96 孔微量滴定板, 孔内全部注满 pH7.4 或 pH6.5 的缓冲液, 盖上 96 孔滤板, 滤板为夹层结构, 内置孔径为 0.22~0.45 μm 的疏水性滤材。前一半 48 孔为样品管, 注满 1%~2%

卵磷脂有机溶剂溶液（癸烷、己烷或 1,9-癸二烯）；另一半 48 孔为对照，滤器表面用 4~5 μL 体积分数为 50% 的甲醇-缓冲液润湿。分别在样品孔和对照孔滤板顶上加 100~200 μL 250~500 $\mu\text{mol/L}$ 待测化合物贮存液。贮存液中 DMSO 最高浓度为 5%。缓冲液通常为 0.05 mol/L TRIS pH7.4 缓冲液或 0.05 mol/L 磷酸盐 pH6.5 缓冲液。用 96 孔微板紫外光度计同时用 6 个不同波长测量样品的通透性，以对照溶液为内标。测定样品通透性所得的移动值用已知的人体吸收数据校正。采用这一方法一天可以测定几百个化合物的通透性。另外用该法也很容易测出 pH 变化、磷脂组成、溶解度、表面活性剂对通通过程的影响。

对于组合化学产生的混合物库，可以采用“鸡尾酒筛选法”在 LC-MS-MS 检测技术帮助下提高初筛 NCE 细胞通透性的效率^[11]。Stevenson 等研究了由 375000 个三肽构成的组合肽库的透膜转运能力。他们将肽库分成 150 个亚库，每个亚库含 2500 个不同序列的三肽，采用“鸡尾酒法”加上 LC-MS 检测，很快就确定了这些三肽的细胞通透性次序^[12]。

1.2.3 口服生物利用度

1.2.3.1 利宾斯基定性规则 (Lipinski's Rule of Five)^[2]

辉瑞公司的新药研究工作者早就认识到药物理化性质对新药开发成功率的重要价值。他们研究了世界药物索引库 50 427 个化合物及 USAN 中收录的 7894 个药物的溶解度和细胞通透性，总结出一个简单的定性规则：小肠吸收差的药物分子一般具有下述 4 条特征中的任意 2 条：（1）相对分子质量大于 500；（2）氢键供体数目大于 5；（3）氢键受体数目大于 10；（4） $\log P$ 计算值 > 5。因为这几个数量界限都与 5 或 5 的倍数有关，所以将它命名为“Rule of Five”。虽然它仅仅是一个相当粗略的定性规则，但却有很实际的指导意义。

1.2.3.2 口服生物利用度的计算方法

Johnson 等认为，细胞通透性和药物在胃肠道的溶解度是决定小肠吸收率的两个主要因素。他们提出用方程式 (1-1) 计算药物在人体小肠内的吸收剂量 (EDA)^[13]。

$$\text{EDA (mg)} = K_a \cdot V \cdot C_s \cdot t_{\text{res}} \quad (1-1)$$

式中， $K_a = 2 \text{ Peff} \cdot h / r$ ，为吸收速率常数； C_s 为溶解度； V 为胃肠道体积； t_{res} 为药物停留时间； $\text{Peff} \cdot h$ 为实际人体细胞通透性； r 为人体小肠半径。通常 $V = 250 \text{ mL}$ ， $t_{\text{res}} = 4 \text{ h}$ ， $r = 2 \text{ cm}$ 。对于高度水溶性的化合物，用剂量 / 体积比代替 C_s 即可算出 EDA。对于水溶性中等或较差的化合物，则用实际溶解度数值 C_s 代入式 (1-1) 计算 EDA。在新药早期发现阶段，EDA 可以提供一种实用的启迪，用于排列各种化合物或结构类别的吸收顺序。如果待开发的候选药设计剂量大于 EDA，等于告诉研究者应当思考：（1）通过分子修饰提高药物在胃肠道溶解度的可能性；（2）通过改变处方增加药物溶解度或溶出度的可能性。

近来，Andrews 等提出了一种结构-生物利用度定量关系 (QSBR) 模型，用以预测药物的人体口服生物利用度^[14]。基本思路与方法类似于 QSAR。已经开发出几种分析软件。该作者从文献中选取了 591 种药物，都有相应的口服生物利用度实验数据，并进行结构分类，列出 608 种亚结构“指纹”，标以特定的计算机描述符。用 SAS 统计分析软件进行处理，建立 QSBR 回归方程，包含了 85 种亚结构描述符。该方程可以根据化合物结构预测其人体生物利用度。方程的传统回归系数 R^2 为 0.71，预测误差为 18%，已知实验平均误差为 12%，表明回归方程的误差尚算合理。模型交叉验证 R^2 为 0.63，显示模型有较好的预测能力。如果参考 Topliss 工作树，设置二级结构参数，可以减少结构描述符的相互作用，提高预测精度。作者将 QSBR 模型与利宾斯基定性规则作了比较，表明 QSBR 模型预测准确性较高，可以减少假阳性结果。作者通过系统分析提出了一些影响生物利用度的结构启示：较小分子

比大分子生物利用度高；每增加 1 个比氢原子重的原子，大约降低生物利用度 1%；H 键供体描述符为负系数，降低生物利用度，降低作用较大的结构片断如四氮唑、4-氨基吡啶、苯醌、二氢吡喃、环己酮等；H 键受体描述符为正系数，增加生物利用度，增强作用较大的结构片断如叠氮化物、1-甲基环戊醇、水杨酸、氰胍等；*N*-末端氨基酸为正效应，内部氨基酸残基为负效应，芳香烃基酮比芳酸烃基酯的生物利用度差。

尚有一些代表分子三维结构信息的指标参数，尤其是描述分子表面极性区域特征的指标参数，被用于预测药物包括吸收情况很差的肽类药物的人体口服吸收情况^[15,16,17]。

1.2.3.3 口服生物利用度的实验模型

虽然已有多种实验模型可供选用，如细胞匀浆、单层细胞、离体肠管、小肠灌流、转基因细胞系等，但以单层细胞和大鼠小肠灌流技术最为常用。曾衍霖先生已对 Caco-2 单层细胞系作为创新药研究早期阶段的口服特性筛选模型进行了评述^[18]，介绍了 Caco-2 细胞的培养，单细胞层的形成和活性，筛选实验方法，体外体内试验结果的相关性，模型的生物转化特性，并且介绍了筛选口服药物的吸收特征和研究口服药物的吸收机制等方面的应用情况。

对化合物生物利用度高低排序来说，制剂中化合物对时间和 pH 的溶出曲线比溶解度绝对数值更为重要。为了预测人体溶出-吸收关系，已经提出了溶出/Caco-2 系统，用以评价各种处方制剂的溶出和吸收率，预测其临床研究结果^[19]。

1.3 药代动力学性质的早期预测

1.3.1 药物开发中关键的药动力学参数

过去 10 年中，药动力学数据在药物开发中的重要性日益增加。药动力学是药物开发中决定药物治疗价值和用法的有力依据。今天已清楚地认识到成功的药物开发程序应当包括以下 10 项关键性药动力学参数：清除率，治疗窗浓度，以原型排出的药物百分数 (fu)，血液 / 血浆浓度比，半衰期，毒性浓度，分布容积，蛋白结合率 (*p*)，吸收率^[20]。这些参数的关系分别如下：

$$\begin{aligned} FD/\tau &= C_{ss}CL \\ CL &= 0.693V_d/t_{1/2} \\ V_d &= V_p + (V_t \text{fup}/\text{fut}) \end{aligned}$$

式中，*F* 为生物利用度；*D* 为剂量； τ 为用药时间间隔； C_{ss} 为血浆中稳态药物浓度；CL 为总清除率； V_d 为分布容积； $t_{1/2}$ 为清除半衰期； V_p 为血浆体积； V_t 为组织体积；fup 和 fut 分别为血浆和组织中未结合药物的百分数。

一个药物能否以口服剂型上市，fu 和 C_{ss} 是主要的判断依据。fu 接近 0 的药物不适于口服，在分子修饰时引入极性基团或去掉药效团以外的非极性基团，可降低这类分子的亲脂性，使其较适于口服。半衰期是确定服药时间间隔的重要参数，通常倾向于选择半衰期长的候选药。亲脂性是表征分布性质的一个很好的指标。如 V_d 可通过式 (1-2) 来估算。

$$V_d = (0.0955P + 1.2232)(1-p)BW(\text{mL}) \quad (1-2)$$

式中，*P* 为分配系数；*p* 为蛋白结合率；BW 为体重 (以 g 计)。

通常药物的亲脂性越高， V_d 值就越高。碱性药物在生理 pH 下易离子化，其荷正电的碱性中心与生物膜上荷负电的磷酸头相互作用，使 V_d 值升高。药物在脑内分布也大致如此，但亲脂性特别高的药物反而不易通过血脑屏障，可能与脑毛细血管上皮细胞顶端的 *p*-糖蛋白的阻碍有关。作用于细胞内的药物如反义药物 V_d 值应很高，否则服用的大部分药物停留在

循环系统，而在作用位点反而没有足够的药物。对于安全性较低的药物或那些只作用于循环系统的药物，如抗心律失常药或其他心血管药物， V_d 值低较好，因为这样可避免药物过多进入组织。

1.3.2 药物代谢特征的快速预测^[21]

1.3.2.1 代谢稳定性体外筛选

肝微粒体比肝切片、肝细胞培养基、肝灌注都简便易得。它可以来源于任何动物，也包括人；可以提供简单的或较复杂的代谢参数，甚至可能推测人体代谢特征，容易采用自动化测量系统，因此它是最适合于新药早期发现阶段高通量筛选代谢稳定性的一线工具。如果化合物属第 I 相代谢清除，那么用肝微粒体培养的实验结果类似于活性肝代谢。但应当注意，在体外培养实验条件的的影响，如药物浓度。在初筛过程中肝微粒体系统中有许多代谢酶容易处于药物高度饱和状态，结果根据单个底物浓度计算出的代谢速率也许大大低于体内实验结果。当注意选择合适浓度时，肝微粒体系统完全适用于高通量筛选。

肝微粒体不含第 II 相代谢酶。涉及第 I 相第 II 相代谢酶的药物筛选应采用肝细胞模型。Bertrand 等提出了一种根据计算机拟合药物体外消除曲线用 Michaelis-Menten 整合方程测定药物全程代谢表观 K_m 和 V_m 的简单方法^[21]。该法以两种浓度药物（如 10^{-7} mol/L, 10^{-5} mol/L）与两种浓度肝微粒体混合培养，在 6 个时间点（0, 5, 10, 30, 60, 90 min）取样作 LC-MS-MS 分析，内标法测定药物浓度，经方程式（1-3）作非线性回归拟合计算 V_m 值和 K_m 值。

$$dc/dt = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S} \quad (1-3)$$

式中， S 为底物药物浓度； dc/dt 为各时间点的药物浓度测定值。 K_m 为米氏常数； V_m 为最大的酶促反应速率。

当增加某些生物参数（如肝血流量、肝重量、肝微粒体重量等）即可由体外扩展为体内条件，计算出代谢性口服生物利用度。如果在大鼠、狗、人体测定不同口服剂量药物的代谢性生物利用度数据，即可模拟出生物体内首过效应和非线性药动学效应的饱和性。本法已经被发展为在首次临床试用前初步预测人体代谢性清除情况的手段，只需伴随自动化操作和 LC-MS-MS 盒式分析，本法可用于选择性药物筛选。如果采用肝微粒体模型和较低的药物浓度，本法可以高通量测定药物内在清除率 CL_{int} 。

Schneider 等采用神经网络和多变量统计学方法综合体外和体内药动学参数预测人体对药物的肝清除率^[22]。该作者发现，根据人体肝细胞代谢数据作出的预测可靠性最好，根据大鼠肝细胞代谢数据作出的预测可靠性其次，狗肝细胞代谢数据似乎与人体清除数据不大相关，根据狗肝细胞代谢数据构建的预测模型可靠性不理想。该作者的研究结果是，结合人和大鼠肝细胞清除参数，可以最佳的价格 / 效果比预测人体对药物的清除率。

Kathleen 等提出了一种药动学快速筛选方法，可以快速测定大量化合物的 AUC 近似值及排列顺序，从而为最后选择先导化合物提供一个比较可靠的口服药动学量化指标^[23]。其方法是，给与两只大鼠平行口服一个化合物后，在 6 h 内，每 1 h 采集 1 次血浆样品，将各时间点采集的同一只大鼠的血浆样品合并，参照相应血浆样品的微量标准曲线对已合并血浆样品进行分析，混合血浆样品以 HPLC-API-MS-MS 法测定，得各样品合并血浆浓度实测值。将该实测值乘以 6/7，得合并血浆浓度的修正值。将该修正值乘以 6，得 AUC（0~6 h）近似值。取两只大鼠 AUC 近似值的平均值，即为该化合物的最后结果。此作者曾将该方法应用于某一治疗领域研究的 200 多种合成化合物的 AUC 排序，确定 AUC 近似值在

900 ng · h · mL⁻¹ 以上的前 4 位化合物具有作为首选先导物的资格。该方法大大减少了实验工作量, 节省样品分析时间, 在相同情况下比常规药动学研究方法提高工作效率 4 倍。

1.3.2.2 药物代谢途径的快速筛选

尽管有人开发了一种测定药物代谢途径的高通量方法, 即用肝微粒体加药物体外培养, 用 MS 技术测定药物代谢物结构^[24]。但在药物开发早期, 即高通量筛选 (HTS) 和选择性药物筛选 (selective drug screening) 阶段测定各化合物的代谢途径实际意义不大。从发现和优化先导物结构的要求出发, 当化学家希望应用结构修饰改变药物代谢稳定性不良因素时, 需要通过体外实验较快证明形成了哪种类型代谢反应中间体。从理论上看阻塞了一条代谢途径可能有利于产生另一条代谢途径。这时候如果能完成几个选择化合物的代谢途径测试, 无疑对化学家作出正确判断是有实际指导意义的。

1.3.3 药物相互作用潜力的预测方法

药物相互作用可能影响药物的安全性和有效性。在新药研究开发中, 药物相互作用潜力越来越受到重视。细胞色素 P-450 酶系 (CYP) 是一个超家族。许多药物的体内代谢途径有 CYP 酶参与。另外, 许多药物同时也是 CYP 酶的抑制剂或诱导剂。分析参与代谢的 P-450 酶的种类、P-450 酶的抑制和诱导等三种因素, 就可预测药物之间相互作用的危险性。

药物代谢酶的抑制。对于大量化合物的测定, 可以采用与代谢稳定性类似的肝微粒体方法。将待试候选药与肝微粒体混合培养, 加上特定的 CYP 底物^[25], 可鉴别被抑制的 CYP 酶的品种和性质, 并估算候选药的抑酶能力。这是新药早期筛选阶段预测药物相互作用的一种有价值的参数, 最大危险性来自不可逆抑制。对代谢稳定性非常好的化合物也给予了特别关注。应当进一步了解其是否有抑酶能力。如果存在抑酶现象, 需测定 K_i 值, 以便衡量药物血浆水平上的抑酶效应, 并与预计的或实际的人体血药浓度作比较。比较简单的方法是测定 IC_{50} 值, 适用于选择性药物筛选。也有人提出 96 孔板, 加入细胞微粒体、人体 CYP、被测化合物混合培养, 再用简单的酶活性测定法测定, 构成高通量筛选方法^[26]。

药物代谢酶的诱导。评价候选药物这种能力的可靠方法一直是根据毒性研究获得的活体动物肝脏分析结果。由于肝酶诱导的种族差异, 由动物结果推导到人并不可靠, 且方法学的限制也不适合于筛选研究。作为可靠的小规模体外研究工具, 值得提到肝细胞长期培养法, 它允许完成酶诱导过程, 用 DNA 杂交分析测量特定 CYP 活性可以直接用人肝细胞检测酶诱导力, 加入一种参比诱导剂, 即可估算被测化合物的诱导能力。但因为材料来源和个体差异等原因, 试验结果仍不完全令人满意。Ogg 研究了全部或部分表达 CYP 调控机制基因, 并偶联了可定量报告基因蛋白的基因工程细胞, 将可能被接受为高通量筛选工具^[27]。

根据以上三类体外测定数据, 可以按下述情况划分候选药物可能的药物相互作用潜力和判断是否需要安排专门的临床研究: (1) 与被测药物有关的 CYP 酶的数量和性质, 如果存在一种主要的 CYP 代谢酶, 则可能与能抑制该酶的药物产生相互作用, 如果代谢性清除 / 总清除比值很低或不存在 P-450 代谢方式, 或存在多种 P-450 代谢方式, 则不存在药物相互作用, 也不必在临床研究药物相互作用; (2) 根据抑制 CYP 酶能力及估算的体内 K_i 值, 如果 K_i 值接近于估算的在体肝血流药物浓度, 则存在与伍用抑制 CYP 酶药物相互作用的危险, 如果被测药物对 P-450 氧化酶没有抑酶能力, 或 K_i 值远高于肝血流药物浓度, 则不必安排药物相互作用研究或相关的临床研究; (3) 比较诱酶所需剂量和体内药物剂量, 如果在低剂量就产生诱酶作用, 则被测药物具有与伍用的其他有诱酶能力药物相互作用的危险, 需要安排相关的临床研究, 如果没有诱酶作用, 则不需要安排药物相互作用研究或相关的临床研究。

以上观点已被 FDA 和欧洲药政机构指南所采纳^[21]。当然，目前对新药筛选阶段是否有必要测定上述数据尚有疑虑。

1.4 药物毒理学性质的早期预测^[28]

据统计，国外开发成功一个新药，花费在临床前毒理试验方面，平均在 4000 万美元以上。过去药物毒理学家仅仅到新药研发的中后期才进行药物临床前毒性评价，从而导致许多候选药物由于毒性或其他安全性原因而中途夭折，结果增大了开发风险，拉长了开发周期。近年来，国外大制药公司调整了新药研发总体策略，将毒理学工作适当提前，早期参与新药研发。其标志是 1993 年产生了一门新的药物毒理学分支——发现毒理学（discovery toxicology）。该学科认为在化学家设计合成一系列类似化合物后，运用高通量体外活性筛选系统和高通量体外毒性筛选系统，同步筛选其药理活性和毒性，确定该类化合物的毒性机制和定量结构毒性关系（QSTR），指导化学家设计合成毒性较低的新化合物。最后毒理学家根据该类化合物的毒性机制选择合适的动物试验模型，对先导化合物或候选药物作体内毒性评价。这种研究模式将尽可能早地获得药物安全性资料，有助于缩短研发周期，改善临床前和临床安全性试验的相关性。

基因技术将促进药物毒性机制的研究和分类。基因组毒理学根据混沌理论发现，虽然人类基因达 3 万种左右，但在毒物作用下基因表达模式仅有 50 种左右。通过对已知作用机制（如过氧化酶体增殖剂、多环芳烃、氧化应激物和内分泌紊乱剂等）的毒物进行基因阵列芯片分析，确定其基因表达模式，即能评价和分析新化合物的毒性作用机制^[29]。

目前，替代实验动物的毒理学试验方法学研究比较活跃，如用酵母生长抑制实验替代动物急性毒性试验；用全胚胎、胚胎器官体外培养替代致畸性过筛；用构效关系和细胞毒性标志物检测非遗传性致癌性^[30]；用 Hep G₂ 细胞与受试化合物混合体外长期培养检测细胞毒性预测化合物的长期人体毒性^[31]。这些方法研究尚处于起步阶段，真正成熟的体外毒理试验方法并不多。毒理学整体动物试验包含人体对药物反应的诸多信息，一种体外筛选方法的建立、评估、技术认证、药政管理认可还需有一个较长的过程。

1.5 应用实例

新药研发过程连接实验室新药发现与新药上市首尾阶段。由于新技术的出现和全球医药行业环境的新要求，这个过程正在迅速改变，新药研究程序正在打破传统的新药发现-开发界面，较早期考虑新药先导物的“可开发性”（developability），如口服生物利用度、药代动力学性质等，有助于提高开发候选药的内在质量^[32~35]。下面列出几个研究实例。

TNF- α 和 IL-1 是机体对感染或其他细胞应激反应产生的前炎症性细胞因子。已经证明，促分裂原活化蛋白激酶（p38MAP）在炎症反应整个生化过程中有作用，可以作为药物新靶标。p38MAP 激酶属于丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶家族。默克药厂科学家的研究目标是开发 p38AMP 激酶的选择性小分子抑制剂，用于治疗因细胞因子过量产生而引起的炎症反应，如风湿性关节炎^[36]。文献报道的 SB203580（1）（图 1-1）被选择为原型结构，重点研究提高药物作用的选择性，提高对人全血 TNF- α 抑制作用强度，改善药物的理化性质，提高这类抑制剂的水溶性，因为原型化合物（1）的水溶解度太低，在 pH7.4 是 0.0019 mg/mL，在 pH5 是 0.043 mg/mL。他们报道了对一系列咪唑类 p38MAP 激酶抑制剂的构效关系研究。采用的研究方法是对原型化合物（1）结构中咪唑环上 2，4，5 位取代基分别优化，然后再确定其

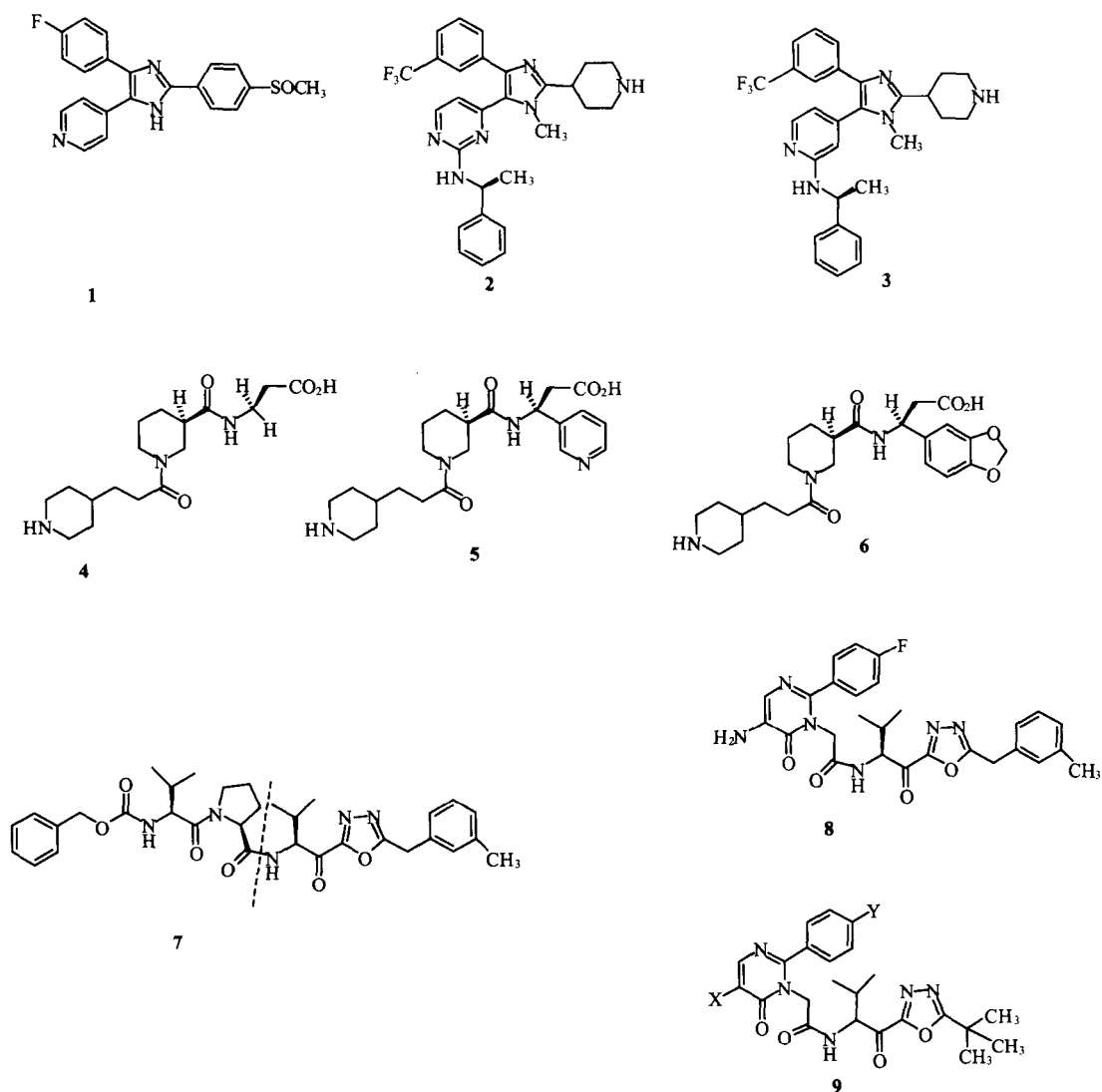


图 1-1 化合物 (1) ~ (9) 结构式

结构加和性, 以 p38, c-Raf, JNK221, TNF- α 的 IC_{50} 为生物活性效价和选择性的筛选指标, 部分化合物的大鼠静脉和口服药代动力学参数作为药学筛选指标。研究中发现, 有些较高活性化合物血浆半衰期短, 口服生物利用度很低, 清除特别快, 完全通过尿 (80%) 和胆汁 (20%) 排泄。分析其原因, 可能是因为 $\log P$ 太低, 如有的化合物 $\log P$ 为 0.39。但后来研究发现有的化合物 $\log P > 3.9$, 血浆半衰期同样短且口服不吸收。有趣的是, 将咪唑环上一个氮原子甲基化后, 获得中间量的亲脂性 $\log P$ 为 2.37, 半衰期大大延长, 清除率和分布容积都比较低, 口服生物利用度良好。进一步比较这样得到的两个化合物 (2) 和 (3), 它们对大鼠 P-450 酶都没有抑制作用, 但化合物 (2) 对人肝微粒体 CYP3A4 酶具有中等程度时间依赖性抑制作用, 而化合物 (3) 没有抑制作用。因此选择化合物 (3) 作为进一步评价的候选药。化合物 (3) 大鼠和雄性恒河猴的口服生物利用度分别为 85% 和 86%。又经过几种动物模型, 注射和口服不同途径, 预防或治疗给药证明, 化合物 (3) 是一种高选择性 p38MAP 激酶抑制

剂, 有可能作为治疗 TNF- α 介导的炎症的候选药物。

镶嵌在血小板双层脂质膜中的糖蛋白 (GP) 与血小板的粘附和聚集密切相关。其中 GP II b/IIIa 则为纤维蛋白原受体。阻滞该受体就抑制了血小板活化, 从而防止由之而导致的血栓疾病。这是心血管新药研究热点之一。R.W.Johnson 药厂科学家报道了口服有效的 GP II b/IIIa 拮抗剂候选药 RWJ-53308 (5) 的研究过程^[37]。通过对纤维蛋白原 γ -链 KQAGD 序列结构和功能的研究, 确认其关键结构域 (r406-410) 内存在转角构型, 从而设想用嘧啶羧酸作为分子构架 (scaffold), 连接适当的 Lys 和 Asp 基团, 组成一系列新结构化合物, 例如化合物 (4)。生物评价结果表明化合物 (4) 口服有效, 但对生物基化纤维蛋白原结合固定化 GP II b/IIIa 的抑制能力中等, 而且动物体内作用有效时间较短。对此制定了优化结构方案。合成方面采用固相法组合化学, 生物活性初步评价采用生物基化纤维蛋白原与 GP II b/IIIa 的结合试验和血栓性凝胶过滤血小板凝集试验, 选择初筛活性较好的化合物, 用 3 条狗口服给药 3 mg/kg, 间隔 30 min 采血, 测定血小板聚集作用。为了评价被试化合物的药理学, 狗也用 1/3 或 1/10 口服剂量静脉途径给药作为对照。全面比较不同取代基的化合物的药效强度、作用时间, 从中选择化合物 (5) 作为初步候选物, 它作用时间较长, 口服 3 mg/kg 作用可达 6 h, 1 mg/kg 剂量作用也可达 5 h, 静注 0.3 mg/kg 作用时间 5 h, AUC 法测定它口服生物利用度 16% $\pm$ 8%, 静注和口服血浆半衰期分别为 (85 $\pm$ 24) min 和 (114 $\pm$ 15) min; 耐受性较好, 试验中动物的血小板计数、心率、血压均属正常。进一步用 2 种动物 (狗和豚鼠) 3 种血栓模型观察了化合物 (5) 的抗血栓作用具有剂量依赖关系。同时比较的化合物 (6), 除个别药效试验 IC₅₀ 较低外, 其他指标均不如化合物 (5)。为了进一步优化结构, 设计合成了带取代基的吡啶环衍生物, 结合试验和功能试验均表明部分衍生物提高了活性强度, 但药代动力学性质不如化合物 (5) 优良。对化合物 (5) 分子结构中其他部分也进行了化学修饰, 但生物评价结果均不理想。化合物 (5) (RWJ-53308) 最终被推荐为口服和静注两用的抗血栓候选药进入临床试验。

人体中性粒细胞弹性蛋白酶 (HNE) 是与炎症反应相关的丝氨酸蛋白酶。已发现在风湿性关节炎、成人呼吸窘迫症、肺气肿等病人中过量产生该酶。日本 ONO 制药公司科学家报告了一种口服高效非肽类 HNE 抑制剂 (9) 的研究过程^[38]。他们制订了寻找口服有效的 HNE 抑制剂的筛选程序, 从中发现了一个肽类 α -酮基-1,3,4-噁二唑衍生物 (7), 抑酶作用很强, $K_i=0.025$ nmol/L, 遗憾的是口服剂量 30 mg/kg 仍不显示生物活性。为了改进口服活性, 对化合物 (7) 左半边肽结构进行化学修饰。从文献调研中选取 5-氨基-2-苯基嘧啶-6-酮作为修饰基团, 设计合成化合物 (8), 抑酶活性 $K_i=0.64$ nmol/L, 口服 ED₅₀ 13.3 mg/kg。进一步改变 (7) 右半边结构中 α -酮基-1,3,4-噁二唑环上的取代基, 证明亲脂性基团都比较适合, 口服 ED₅₀ 不受明显影响, 部分化合物的体外抑酶活性有所降低, 测定了这些化合物的 Caco-2 通透性和水溶解度, 结果说明化合物的理化性质得到改进。继续改变左半边结构中嘧啶环和苯环上的取代基, 得到化合物 (9), 该结构中含有 1 个手性碳, 很容易外消旋化, (9) 为 RS 异构体混合物。分别测定了三者的口服 ED₅₀ 值, 抑酶 K_i 值, 表明 S 异构体活性较强。外消旋体口服活性稍好, 用 0.5% CMC 混悬液口服测定化合物 (9) 的 ED₅₀ 1.4 mg/kg, 抑酶 $K_i=12.16$ nmol/L, 抑酶作用选择性高, 作用时间超过 8 h, 口服生物利用度优良 (大鼠 51%, 狗 31%, 猴 18%), 而且比较容易合成。因此化合物 (9) (ONO-68187) 已被推荐为口服有效的非肽类可逆性 HNE 酶抑制剂的代表作进一步评价。