

一氧化氮供体型新药研究

张奕华*, 彭司勋

(中国药科大学新药研究中心, 江苏 南京 210009)

摘要: 一氧化氮 (NO) 作为信使物质或效应分子在体内发挥极其重要的生理作用, NO 生成不足或 NO 信号传导异常与多种疾病的形成和发展密切相关。因此, 设计和研究 NO 供体型药物已成为新药发现的重要策略之一。本文作者结合自己的科研实践, 综述近年来 NO 供体型新药的研究进展。

关键词: 一氧化氮; 信使物质; 效应分子; NO 供体型药物

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 11-1200-11

Advances in the study of nitric oxide-donating drugs

ZHANG Yi-hua*, PENG Si-xun

(Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Nitric oxide (NO) as a messenger and/or effector plays important roles *in vivo*. The decreased availability of NO or dysfunction in NO signaling has often been implicated in the development and progression of diseases, and design and research of NO-donating drugs has become one of the important strategies in drug discovery. In connection with authors' scientific practice, this article reviews the recent advances in the research of NO-donating drugs.

Key words: nitric oxide (NO); messenger; effector; NO-donating drugs

20 世纪 80 年代哺乳动物体内一氧化氮 (NO) 的发现是生命科学史上的重大进展。大量研究表明, NO 作为信使物质或效应分子在心血管、神经、免疫等系统发挥极其重要的生理功能; 体内 NO 生成不足或 NO 信号传导异常与多种疾病的形成和发展密切相关。因此, 有关 NO 的研究成为生命科学的热点和前沿之一。

21 世纪以来, NO 的研究方兴未艾, 其发展趋势已从单纯的基础研究逐渐向应用方面转化。美国国家卫生研究院 (NIH) 和美国国立癌症研究所 (NCI) 联合支持直接或间接调控 NO 释放的药物研究。2002

年 6 月, NCI 还专门发文协调这方面的研发工作, 一些 NO 科研项目已被列入快速研发计划 (RAID)。设计和研究 NO 供体型药物是在上述背景下应运而生的新药研究策略^[1, 2]。

迄今为止, NO 供体型药物中已有 1 个抗心力衰竭药 (Bidil) 于 2005 年在美国上市, 1 个抗炎药 (Naproxcinod) 已结束 III 期临床研究, 预计 2009 年下半年获 FDA 批准, 其他 10 多个药物在 II 期和 I 期临床研究中。此外, NO 供体型药物研究中的一些关键问题, 如 NO 靶向释放、NO 体内测定等也已取得了重要进展。

本文作者结合自己的科研实践, 综述近年来 NO 供体型新药研究。

1 NO 供体型创新药物的研究

1.1 NO 供体型抗肿瘤药物

NO 在肿瘤的发生、发展和死亡中的作用已成为肿瘤研究与治疗的热点之一。尽管有关 NO 在肿瘤进

收稿日期: 2009-03-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770869, 30271491, 30472085, 30873073, 30973608); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20070316007); 长三角科技攻关项目 (2005E60011); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2002119); 十一五“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09103-090, 2009ZX09103-095).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271186, Fax: 86-25-86635503,

E-mail: zyhtgd@sohu.com

展中的作用机制目前尚未十分清楚,但一般认为,体内持续低浓度的 NO 可以促进细胞的生长,抑制细胞凋亡;而高浓度的 NO 则产生细胞毒性,诱导肿瘤细胞凋亡,阻止肿瘤细胞的扩散和转移。因此,调控外源性 NO 供体,使其靶向肿瘤细胞并释放高浓度的 NO,已成为 NO 供体型抗肿瘤药物研究的关键^[3]。

具有抗肿瘤作用的 NO 供体 NCI 和犹他大学合作研究发现,NO 供体 O^2 -芳基修饰的偶氮鎓二醇盐 JS-K 在 GSH/GST 作用下,可选择性地在急性髓白血病 HL-60 细胞内释放 NO,杀灭癌细胞,而不伤害正常细胞;对免疫缺陷型小鼠体内植入的 HL-60 细胞及前列腺癌细胞 PC-3, JS-K 均能抑制其生长,且不导致小鼠血压下降等副作用。作用机制研究表明,JS-K 通过浓度和半胱氨酸蛋白水解酶 (caspase) 依赖方式诱导肿瘤细胞凋亡;此外,JS-K 还激活了 MAPK 家族中的成员如 ERK、JNK 和 p38 及其下游效应子 C-Jun 和 AP-1。研究发现,JS-K 不仅抑制肿瘤的生长,而且还降低了肿瘤细胞对其他抗癌药如砷剂和顺铂类药物的耐药性^[4]。

JS-K 的临床前研究得到 NCI 高度重视,被列入其快速研发计划 (RAID)。此后,人们合成了一系列 JS-K 衍生物和类似物^[5-7],其中 PABA/NO 体内抗人卵巢癌的活性与顺铂相当。分子模拟研究结果显示,PABA/NO 可选择性地抑制在多种肿瘤细胞内过度表达并与多药耐药性密切相关的 GST- π ^[5]。

研究还发现, O^2 经半乳糖、葡萄糖等修饰的偶氮鎓二醇盐稳定性大幅度提高,并可能在肿瘤细胞表面过度表达的糖转运蛋白的作用下,特异性地转运至肿瘤细胞内,经糖苷酶活化释放 NO,因此具有较强的肿瘤细胞毒性^[8]。

此外,将前列腺特异性抗原底物的类似物小分子肽通过烷酰氧甲基分别与偶氮鎓二醇盐的 O^2 连结,生成物被前列腺特异抗原活化后,可以靶向释放 NO,杀灭前列腺癌细胞^[9]。

NO 供体增强放疗、化疗或免疫疗法的效果 实体瘤组织中低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的聚集会导致癌症化疗、放疗或免疫疗法的耐受以及预后不良。研究表明^[10],NO 供体与化疗药物联用,通过形成过氧化亚硝酸盐损伤肿瘤 DNA 并激活 p53,减少 HIF-1 α 在低氧癌细胞中的聚集,可克服对常规治疗剂的耐药性。例如,NO 供体硝酸甘油和长春瑞滨/顺铂在 II 期临床试验中联合治疗 III 期或 IV 期非小细胞肺癌病人,与单用长春瑞滨或顺铂相比,治疗效果提高 72%^[11]。

NO 供体可增强放疗和免疫疗法的疗效^[10]。据报道,免疫抑制剂 (S, R)-3-苯基-4, 5-二氢-5-异恶唑乙酸 (VGX-1027) 的 NO 供体型衍生物 (GIT-27NO) 对啮齿类动物肿瘤细胞 (L929、B16 和 C6) 和人肿瘤细胞 (U251、BT20、HeLa 和 LS174) 均具有很强的抑制作用,其机制可能与 GIT-27NO 细胞选择性地激活促分裂原活化蛋白有关,而 VGX-1027 无此作用。GIT-27NO 体内显著抑制 B16 黑素瘤生长,且毒性很小,有望进入临床研究^[12]。

NO 供体与具有抗肿瘤作用的药物偶联、协同作用 NO 供体通过连接基团与现有的抗肿瘤药物 (或活性基团) 结合而成的前体药物,在体内可以通过酶解作用,释放 NO 和原药,因此这类药物的抗肿瘤作用一般优于原药。例如,5-氟尿嘧啶 (5-FU) 与偶氮鎓二醇盐的偶联物对人宫颈上皮癌和前列腺癌细胞比 5-FU 具有更强的细胞毒性^[13]。

近年来最受人们关注的 NO 供体型抗肿瘤药物是 NO 供体型非甾体抗炎药 (NO-NSAIDs)。这类药物具有 NSAIDs 的抗炎、抗肿瘤作用,但无 NSAIDs 的胃肠道和心血管副作用,且体内外抗肿瘤活性显著优于 NSAIDs。据报道,NO-阿司匹林已进入临床研究,治疗结肠、直肠癌^[14]。NO-阿司匹林的抗癌机制包括阻断 Wnt 信号通路、抑制 NF- κ B 的激活、抑制 iNOS、调控 COX-2 等^[15]。新近报道^[16],NO-舒林酸经 Akt 信号通路抑制 HIF-1 α 表达从而抑制前列腺癌 PC-3 细胞生长并诱导其凋亡。

齐墩果酸 (OA) 为五环三萜类化合物,我国临床上将 OA 作为保肝药。研究发现,OA 给药后主要在肝脏分布和代谢^[17]。近年来,国内外不少文献报道,OA 及其衍生物还能抑制肿瘤新生血管生成,阻止肿瘤细胞的侵袭和转移,显示了抗肿瘤作用^[18-20]。

作者设计并合成了 NO 供体型 OA 衍生物 (NO-OA) (图 1),研究它们对肝的保护作用以及可能的抗肝肿瘤作用。试验结果表明,由于应用的 NO 供体及连接基团不同,NO-OA 在 NO 释放部位和释放量方面有所差异,从而表现出不同的生物活性。一些 NO-OA 如 ZCH2 在肝脏细胞内释放少量 NO,表现出抑制细胞凋亡、保护肝脏的作用^[21]。另一些 NO-OA 能选择性地诱导肿瘤细胞凋亡,不伤害正常肝细胞,显示了特异性的肝肿瘤细胞毒性^[22]。其中,ZCVI4 抑制肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 的 IC₅₀ 为 0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但 ZCVI4 并未诱导其他癌细胞如人前列腺癌细胞、人

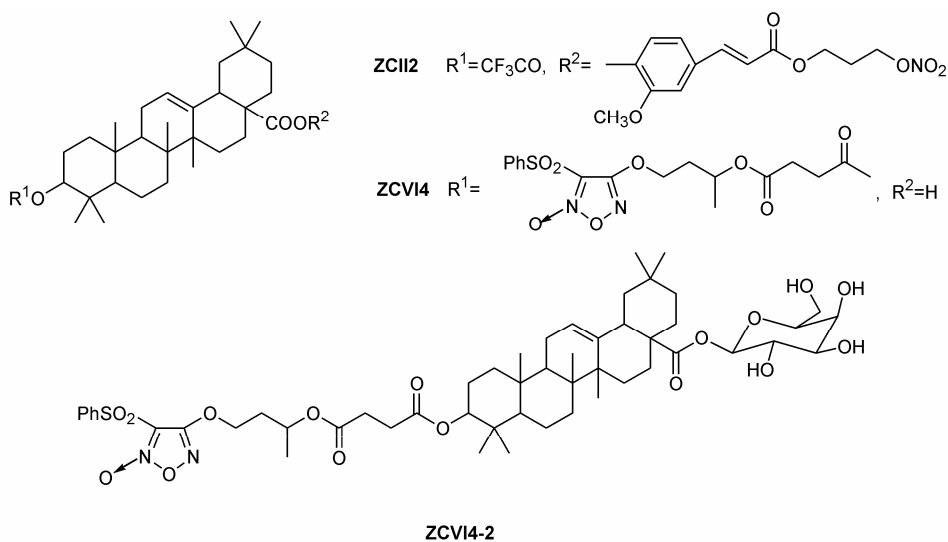


Figure 1 The structures of NO-OA

乳腺癌细胞、人宫颈上皮癌细胞的凋亡, 而且对正常人肝细胞、人肾上皮细胞及对小鼠淋巴细胞无毒性作用, 此结果提示, ZCVI4 对肝肿瘤细胞有特异性毒性作用。

ZCVI4 是一种在水和乙醇中都极难溶解的化合物。考虑到糖基修饰可能会增加水溶性, 而且半乳糖修饰后的产物有可能通过与肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体 (ASGP-R) 等作用, 从而定向地转运至肝脏; 还考虑到肿瘤细胞过度表达的糖跨膜转运蛋白 (GLUTs) 能促进单糖向细胞内转运; 此外, 一些糖基化修饰的 NO 供体能选择性地浓集于肿瘤细胞内, 由糖苷酶活化后释放 NO, 发挥抗肿瘤作用^[23]。因此将 ZCVI4 分子中的羧基与半乳糖、葡萄糖基、2-脱氧半乳糖等以酯键相连, 制备了一系列 28-位羧基糖基化的 ZCVI4 衍生物, 除增加 ZCVI4 的水溶性外, 还希望保留或进一步增强它的肝靶向性。通过药理初筛发现了活性最强的化合物 ZCVI4-2, 它的水溶性较 ZCVI4 显著增加。

研究发现, ZCVI4-2 体外对多种肝癌细胞具有显著的抑制作用, 抗肿瘤活性明显强于阳性对照药羟喜树碱。ZCVI4-2 在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下对 HepG2 细胞生长的抑制率为 100%, 而对正常肝细胞 LO2 的抑制率还不到 10%, 显示了较高的选择性。体内试验同样显示了良好的抗肝癌作用。ZCVI4-2 腹腔给药, 对小鼠 H22 肝癌的抑瘤率与等剂量的 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 相当; 对人肝癌 SMMC-7721 裸小鼠静脉给予 ZCVI4-2 ($25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 相对肿瘤增殖率 (T/C) 为 44.1%, 而相同剂量 5-FU 给药的 T/C 为 55.2%, 提示 ZCVI4-2 体内抗肝癌活性可能优于 5-氟尿嘧啶^[24]。

研究发现, ZCVI4-2 在肝肿瘤细胞 HepG2 中释放

NO 的量约是正常肝细胞 LO2 中的 3 倍, 推测 ZCVI4-2 的肝肿瘤选择性可能与 NO 释放有关; 加入 NO 清除剂或将 ZCVI4-2 结构中的 NO 供体片段去除后, 原有的抗肿瘤作用基本消失, 证明了 ZCVI4-2 的抗肿瘤作用及其选择性与 NO 释放相关^[24]。

抗癌机制研究表明, ZCVI4-2 通过作用于凋亡的关键因子从而激活凋亡通路, 产生促凋亡效应, 如浓度依赖性地增强 caspase 3 的活性, 下调 Bcl-2、上调 Bax 表达等^[24]。

在 NO-OA 研究的基础上, 作者还设计、合成了 NO 供体型的甘草次酸衍生物^[25]、烷氧基联苯羧酸类衍生物^[26]、沙利度胺衍生物^[27]和 *N*-4-羟基苯基维甲酰胺类化合物^[28], 发现了一些抗肿瘤活性强、毒副作用较小的苗头化合物, 将对它们进行深入研究。

1.2 NO 供体型心血管药物

NO 在维持血管张力、血压及血流动力学方面起着十分重要的作用。近年来, 人们将各种 NO 供体通过连接基团与已知的心血管药物偶联, 研发了一系列 NO 供体型心血管药物。不同的 NO 供体和连接基团可调节 NO 的释放部位、释放量和释放时间, 使 NO 以持续、可控的方式释放到特定组织和/或血液中, 这样不仅可改善原药的心血管活性, 还能减少其不良反应。

NO-阿司匹林类 阿司匹林是最常用的一种药物, 因其不可逆地阻断环氧合酶-1 (COX-1), 故能同时减少血小板中血栓素 (TXA₂) 和血管内皮细胞中抗凝剂前列环素 (PGI₂) 的水平。由于内皮细胞能合成新的 COX-1, 而血小板却没有这种上调酶的能力,

因此, 最终平衡转为对血小板聚集的抑制。但阿司匹林仅阻断血小板激活的一条通路, 不影响其他途径, 这就限制了其抗血栓作用。将 NO 供体硝酸酯通过不同的连接基团连接到乙酰水杨酸 (ASA) 的羧基上, 得到一系列前药 NO-阿司匹林, 其中 NCX4016 既保持了阿司匹林的抗炎活性, 又因 NO 供体的作用, 增加了新的胃肠道 (GI) 和心血管保护作用。

体外研究表明, NCX4016 可抑制由阿司匹林敏感性或非敏感性的血小板聚集作用, 还能减少血液中血小板与胶原的黏附, 防止剪切力诱导血小板激活^[29]。这一点很重要, 因为黏附是血小板激活、血栓形成的第一步, 时至今日只有少数抗血小板聚集药有此作用。

动脉血管成形术 (PTCA) 现已广泛应用于治疗动脉粥样硬化患者冠脉狭窄, 但内膜增生引起血管再狭窄是常见的并发症。阿司匹林和 NCX4016 均可防止血管再狭窄, 然而后者能以较低的剂量即可达到治疗效果, 还可控制再狭窄过程的其他病理反应。NCX4016 在隐静脉冠状动脉旁路移植 (CABG) 失败后导致的血栓形成以及平滑肌细胞 (VSMC) 的增生和迁移等方面, 疗效也优于阿司匹林^[30]。

新近, Lazzarato 等^[31]用含硝酸酯的酰基取代阿司匹林的乙酰基合成了一系列阿司匹林类化合物, 它们的抗炎活性与阿司匹林类似, 但无胃肠道副作用。所有化合物均能剂量依赖性地舒张预先用去氧肾上腺素收缩的大鼠动脉条, 一些化合物具有抑制血小板聚集的作用。

作者选择具有抗氧化作用的对羟基桂皮酸和阿魏酸等作为连接基团, 将不同类型的 NO 供体分别与阿司匹林酯化结合, 制备了一系列 NO 供体型阿司匹林衍生物^[32, 33] (图 2)。发现化合物 ZJY28 和 ZJY29 抗血栓活性总体高于阿司匹林, 同时显示良好的抗

氧化作用。其中, ZJY29 比维生素 E (V_E) 更能有效抑制 H_2O_2 所致红细胞氧化性溶血 ($P < 0.01$), 两者抑制率分别为 85.8%和 75.2%; 此外, ZJY29 还可抑制 H_2O_2 造成的大鼠肝匀浆和 ECV304 细胞上清液中超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性降低和丙二醛 (MDA) 含量升高, 效果与 V_E 作用相当。进一步研究表明, ZJY29 可以有效地减轻大鼠脑血栓和下腔静脉血栓的形成, 降低 TXB_2 的生成量。试验还发现, ZJY29 可缓慢地持续释放 NO, 不但有利于抑制血小板聚集、减轻阿司匹林的 GI 副作用, 同时还有助于避免快速释放 NO 而引发低血压等不良反应。

进一步将阿司匹林与 3-芳基-1, 2, 3, 4-噁三唑-5-亚胺偶联, 合成了一系列新型 NO-阿司匹林衍生物, 其中 ZZL30 (图 2) 对由胶原蛋白和肾上腺素引发的肺血栓形成具有较好的抑制作用, 可以提高小鼠肺栓塞的存活率^[34]。

丁苯酞 (NBP) 是我国第一个拥有自主知识产权的脑血管新药, 对脑缺血的预防以及轻、中度脑缺血卒中治疗具有良好作用。基于增强疗效的目的, 临床上常将 NBP 与其他抗血小板药物联合用药。NBP 结构中含有一个内酯环, 开环后生成邻-(α -羟戊基) 苯甲酸 (简称开环物), 结构上可视为阿司匹林的类似物。文献报道^[35], 开环物具有与 NBP 相当的抗血小板聚集和抗血栓活性。为了改善 NBP 的抗脑缺血活性, 作者以开环物为先导物, 抗氧剂阿魏酸为连接基团, 将硝酸酯类 NO 供体与开环物以酯键结合, 合成了邻-(α -羟戊基) 苯甲酸酯类衍生物, 其中 ZJM289 (图 2) 活性最佳。体外试验表明, ZJM289 能显著抑制大鼠全血血小板聚集, 并能抑制大鼠动静脉血栓旁路试验中血栓的形成, 活性大于 NBP ($P < 0.05$)。ZJM289 体内抗血小板聚集作用也优于 NBP ($P < 0.05$)。此外, ZJM289 还能剂量依赖性地降低缺血再灌注后脑梗死

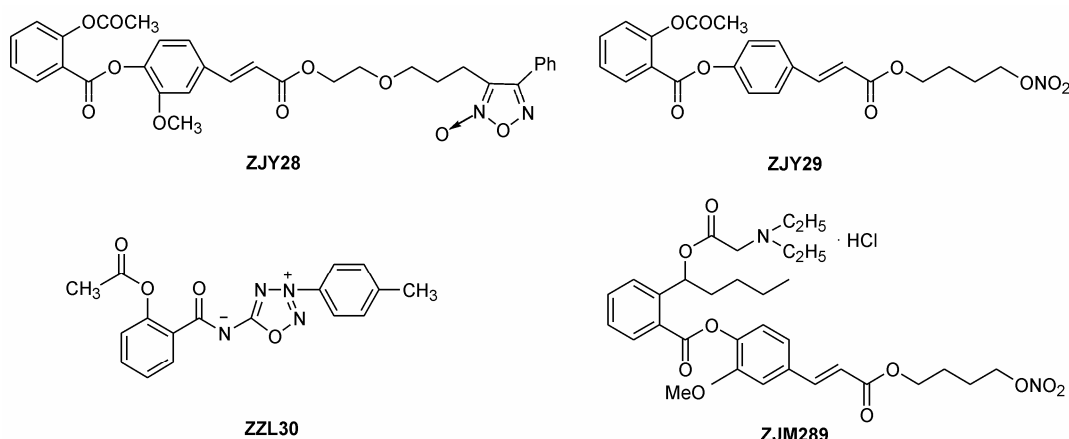


Figure 2 The structures of NO-Aspirin

的面积,改善动物的神经行为功能,降低缺血再灌注后脑含水量,其疗效强于等摩尔剂量的 NBP^[36]。研究表明, ZJM289 在体内可代谢成阿魏酸和开环物,并释放出 NO,部分开环物可进一步环合成 NBP,推测它们可能协同作用,发挥抗血小板聚集和抗血栓的活性。

NO- α_1/β_1 受体拮抗剂类 Fruttero 等^[37]用 NO 供体呋喃氮氧化物取代 α_1 受体拮抗剂哌唑嗪结构中的呋喃环,合成了一系列 NO- α_1 受体拮抗剂,获得了 α_1 受体拮抗和 NO 舒张血管二者作用均衡的杂合物。

为了提高 β 受体阻断剂的活性,将不同的 NO 供体部分连接到普萘洛尔类似物的结构上,合成了 NO- β 受体拮抗剂,其中一些分子能够在相同的浓度范围内均衡地阻断 β 受体并释放 NO,降低了对 β 受体的亲和力,尤其是对 β_2 受体的亲和力,提高了对 β_1/β_2 受体的选择性^[38]。

Nigris 等^[39]研究发现,对饲以富含胆固醇食物的动物给予 NO 供体型 β 受体阻断剂奈必洛尔 (nebivolol),能增强其内皮反应性,增加主动脉 eNOS 表达,抑制动脉粥样硬化的发展。

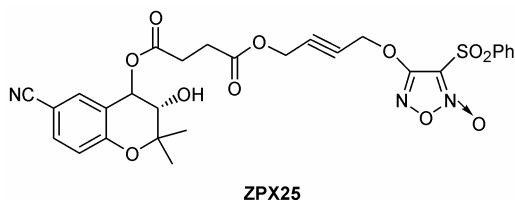
NO- Ca^{2+} 通道阻滞剂类 1,4-二氢吡啶类 (DHP) Ca^{2+} -拮抗剂如尼非地平、尼群地平、氨氯地平,广泛用于治疗高血压和缺血性心肌疾病,其主要作用机制为阻断血管平滑肌上电压依赖性 L-型钙通道 (VDCCs) 的 Ca^{2+} 内流。

为了提高 DHP Ca^{2+} -拮抗剂的舒张血管活性,在其母核苯环的邻位或间位连接呋喃氮氧化物,合成系列化合物,获得了 Ca^{2+} -拮抗作用和 NO 供体作用二者均衡的杂合分子^[40]。

NO- K^+_{ATP} 启开剂类 尼可地尔是一类具有 ATP 敏感性钾通道 (K^+_{ATP}) 启开剂和 NO 供体双重作用的抗心绞痛药^[41]。由于 K^+_{ATP} 启开剂能扩张外周和冠状小动脉,减少阻力,而硝酸酯能扩张全身血管及心外膜冠状动脉,因此,尼可地尔可以增加冠脉血流量,抗心绞痛作用类似于硝酸甘油。然而,硝酸甘油可能引起耐药性,增加血管对收缩血管物质的敏感性及损伤内皮,而尼可地尔因其双重机制,可通过启开 K^+_{ATP} ,扩张甚至有硝酸酯耐药性的血管。抗心绞痛临床试验显示,尼可地尔通过减少急性冠状动脉综合症的发病频率,改善了稳定性心绞痛病人的预后。

苯吡喃为多种心血管药物的基本结构,对心脏有直接保护作用的 K^+_{ATP} 启开剂—Cromakalim 也是苯吡喃的衍生物。作者以 3,4 位反式苯吡喃为基

本骨架,分别在 3 位和 4 位羟基上连接硝酸酯或呋喃氮氧化物,合成了系列 NO 供体型苯吡喃类衍生物,其中化合物 ZPX25 对原发性高血压大鼠 (SHR) 尾动脉收缩压 (SAP) 和舒张压 (DAP) 的抑制率分别为 22.1% 和 23.8%,降压持续时间 8 h,与吡那地尔相当^[42]。



NO-ACE 抑制剂类 血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂作用于肾素-血管紧张素系统 (RAS),阻止血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II,是高血压和充血性心衰治疗的一线用药。为了提高 ACE 抑制剂的活性,合成了 S-亚硝基卡托普利 (SNOcap)。研究表明, SNOcap 通过断裂 S-NO 键产生 NO 供体作用和 ACE 抑制作用,对高血压、血小板聚集、充血性心衰和肺高压的治疗作用优于卡托普利^[43]。新近合成的 NO-依那普利 (NCX 899) 和依那普利相比,增强了舒张血管的效应,提高了左心室的收缩性,并可防止不利的心肌重构,其作用与长时间释放 NO、增强内皮功能和减少血管阻力有关^[44]。

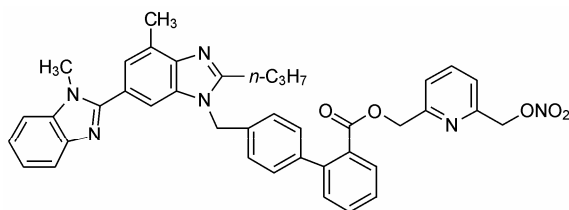
NO-他汀类 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂 (他汀类) 除具有降脂活性外,还有抑制动脉粥样硬化作用,是一类广泛用于高胆固醇血症的治疗药物。

NO-普伐他汀 (NCX 6550) 及 NO-氟伐他汀 (NCX 6553) 能明显增强他汀类的非降脂作用,如恢复内皮功能、减轻 VSMC 的增生和炎症。此外,NO 供体部分还为他汀类药物引入了新的活性,如 NCX6550 的抑制血小板聚集、降低模型鼠栓塞的致死率^[45]。NO-阿托伐他汀 (NCX 6560) 在细胞水平上和高胆固醇血症鼠模型中具有持续的 HMG-CoA 还原酶抑制作用,能明显减少鼠肺动脉血栓模型的致死率,而等剂量的阿托伐他汀无效。在用高脂食物喂养的低密度脂蛋白受体 (LDLR) 基因敲除的鼠模型中,NCX 6560 能明显抑制体外血小板在高剪应力下黏附到胶原蛋白上,而阿托伐他汀无此作用。

NO-沙坦类 血管紧张素 II (AII) 受体拮抗剂沙坦类,主要拮抗 AII 受体的亚型 AT1,虽然也作用于

RAS 系统, 但不阻止 ACE 水解缓激肽, 故无干咳等副作用, 且比 ACE 抑制剂阻断 AII 的作用更全面, 这是其优点所在; 然而, 沙坦类在避免缓激肽诱发干咳症状的同时缺少了 NO 的调节作用, 这是其美中不足之处。为了增强这类药物的抗高血压活性并获得 NO 介导的心血管活性, 将硝酸酯类 NO 供体引入到洛沙坦及其活性代谢物 (EXP3174) 分子中, 合成了系列 NO-洛沙坦。结果表明, NO-洛沙坦具有不同程度的双重活性, 即 AT1 拮抗活性和 NO 介导的不依赖缓激肽的心血管活性; 对高血压大鼠长期经口或皮下给药, 显示了良好的降压效果, 与等摩尔剂量的卡托普利或洛沙坦相当或稍优; 此外, 对缺血再灌注的大鼠具有心脏保护作用, 且抗血小板活性强于洛沙坦^[46]。

作者设计、合成了一系列 NO 供体型替米沙坦衍生物, 发现一些化合物体外对 AII 所引起的血管收缩具有明显的抑制作用, 其中 WB1106 的活性最强。WB1106 可剂量依赖性地增加 cGMP 的生成, 而在相同条件下, 替米沙坦对 cGMP 的生成无显著性影响。WB1106 对大鼠具有较好的降血压作用 (降压幅度达 40%, $P < 0.001$)。另外与替米沙坦不同的是, WB1106 可显著减少饲以高脂高糖的大鼠体重增加, 并改善糖耐量, 提示 WB1106 不仅可用作降压药, 而且可能有益于胰岛素抵抗或者代谢综合征的治疗^[47]。



WB1106

1.3 NO 供体型非甾体类抗炎药

NO 供体型非甾体类抗炎药既能抑制 COX, 产生抗炎、镇痛作用, 又具有 NO 介导的胃肠道和心血管保护作用。硝酸酯类 NO-布洛芬 (Naproxenol) 的 III 期临床研究已经完成, 2009 年下半年可能获 FDA 批准上市。

新近将偶氮鎓二醇盐类 NO 供体与阿司匹林、布洛芬、吲哚美辛等偶联, 其偶联物抗炎活性优于原药, 致溃疡指数 (UI) 显著低于原药^[48]。

选择性 COX-2 抑制剂可有效抑制炎症, 避免 GI 副作用, 但也减少了血管舒张和抗血小板聚集作用的 PGI₂ 的合成, 故长期给药可能导致高血压和心肌梗死的发生。将 COX-2 抑制剂与偶氮鎓二醇盐类

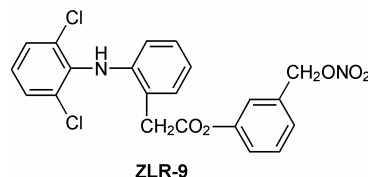
NO 供体连接, 生成物显示了良好的抗炎活性和安全性^[49, 50]。

诱导型 NO 合酶 (iNOS) 在体内催化产生大量 NO, 引起炎症和组织损伤。iNOS 抑制剂可产生抗炎作用, 但也能引起高血压等不良反应。将 iNOS 抑制剂与硝酸酯类 NO 供体偶联后, 偶联物可抑制炎症因子 IL- β 和 PGE₂ 生成, 且对内皮有保护作用, 体内也能有效抑制模型动物的结肠炎^[51]。

作者将 NO 供体苯磺酰基咪唑氮氧化物和苯基咪唑氮氧化物以酯或酰胺键与双氯芬酸 (DC) 偶联, 设计合成了两类 NO-DC 衍生物 ZLW13 和 ZLW14 (图 3)。研究表明, NO-DC 的抗炎活性与偶合键类型、连接基团以及 NO 释放量有关。其中, 酰胺类化合物无抗炎活性; 酯类化合物中, 连接基团的极性较大且碳链含 3~4 个碳者抗炎活性较强; 含芳环的连接基团中因苯基取代基不同, 活性显示较大的差异。抗炎活性强的化合物一般释放 NO 的能力较强。活性化合物 ZLW13a、ZLW13b 的 GI 副作用显著小于 DC^[52]。

ZLW14a 抗炎镇痛活性强于 DC, 且 GI 副作用小于 DC。其对 GI 的保护作用与它在体内释放 NO、增加胃黏膜血流量有关^[53]。将 ZLW14a 的咪唑氮基团中的氧去除后, 所得化合物 ZLW14b 虽有一定的抗炎活性, 但明显低于 ZLW14a, 表明化合物的抗炎活性与 NO 相关^[54]。

将 NO 供体 3-硝氧甲基苯酚与 DC 偶联得到 ZLR-9, 其抗炎活性明显强于 DC ($P < 0.01$), 镇痛活性与 DC 相当。安全性试验表明, DC-Na 给药组大鼠死亡率高达 45.4%, 而等摩尔剂量的 ZLR-9 组未见大鼠死亡; 粪便隐血及血液学指标测定表明, ZLR-9 组与阴性对照组 (CMC-Na) 相比无显著性差异^[55]。



ZLR-9

1.4 NO 供体型抗 AD 药物

阿尔茨海默氏病 (AD) 的形成可能与年龄增长脑部微循环逐渐萎缩、供血不足有关。研究表明, 脑微循环障碍造成了内源性 NO 水平下降, 而 NO 的生成不足又进一步导致脑部血流量下降, 形成恶性循环。另一方面, 随着 NO 生成不足以及脑部供血量的下降, 活泼自由基水平显著上升, 同时一些炎症开始出现, 逐步导致神经细胞凋亡及痴呆症特别是血管

性痴呆症的形成。鉴于 AD 病因复杂, 传统单靶点药

物很难取得理想的治疗效果, 因而联合用药或设计

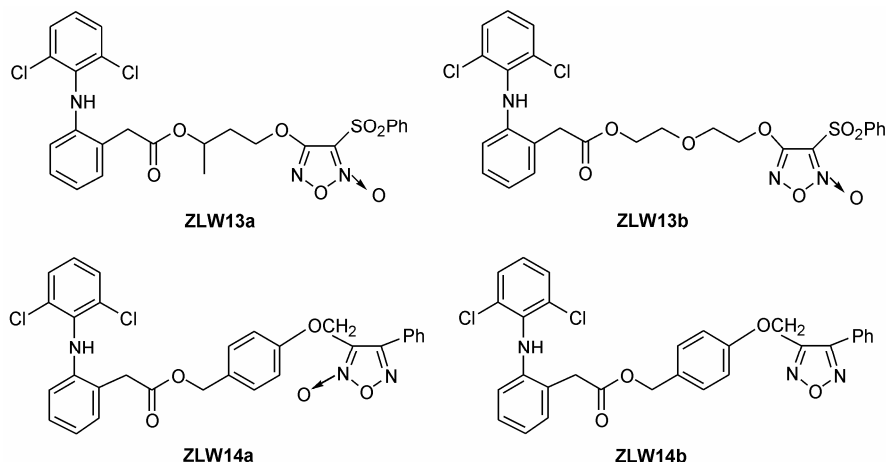


Figure 3 The structures of NO-DC

具有多靶点作用的药物已成为当前研发抗 AD 新药的一个热点。

硝酸酯类 NO 供体化合物 GT1061 [4-甲基-5-(2-硝氧乙基) 噻唑盐酸盐] 口服可迅速吸收并透过血脑屏障, 选择性地激活海马部位的 sGC, 促进海马中、长期记忆功能相关的 ERK1/2 磷酸化, 具有保护脑神经和增强认知的功能, 现已进入 I 期临床研究。将 GT 1061 与胆碱酯酶抑制剂多奈派齐 (donepezil) 联用, 可进一步增加认知功能^[56, 57]。

将 NO 供体异山梨醇二硝酸酯与 GT1061 及其他抗 AD 药物联合用药, 可有效改善东莨菪碱诱导的智力损伤, 且活性优于 GT1061 单独用药^[58]。

一些 NO-NSAIDs 如 NO-氟吡洛芬等在体外可有效抑制 A β 前体 (APP) 转化为神经毒性 A β_{1-42} , 而对可溶性 A β_{1-40} 无影响, 提示该类化合物具有保护神经细胞、阻止 AD 进程的潜在疗效^[59]。

他克林是首个获 FDA 批准用于治疗 AD 的胆碱酯酶抑制剂, 能强效地缓解 AD 患者智力丧失、行动能力下降等症状。然而, 他克林仅能作用于胆碱酯酶单一靶点, 无法阻止及逆转 AD 发展进程。同时, 肝毒性和周边神经胆碱样副作用也在一定程度上限制了他克林的应用。为了克服他克林的严重副作用并开发出多靶向作用的抗 AD 药物, 作者在他克林母核 9 位引入一个烷基二胺侧链, 将 NO 供体与之连接, 设计、合成了一系列 NO 供体型他克林衍生物^[60, 61] (图 4)。与他克林 ($IC_{50} = 45.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比, 所有目标物 (ZLF3a 除外) 显示了相当或更高的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制活性, 其中 ZLF1a 的活性 (IC_{50} 为 $5.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 提升了约 8 倍。受试物的丁酰胆碱酯酶 (BChE) 抑制活性总体与他克林相当。

为考察化合物 ZLF1a 的末端硝酸酯基团对胆碱酯酶抑制活性的影响, 将其替换为氢原子得到类似物 ZLF1c。发现它的活性特别是 AChE 抑制活性较 ZLF1a 明显下降, IC_{50} 值从 $5.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升至 $23.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果提示, NO 供体硝酸酯基团对目标物的活性具有较大贡献。

选择 ZLF1a、ZLF2 和 ZLF3a 测定体外血管舒张活性。发现与异山梨醇硝酸酯 ($EC_{50} = 0.42 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和他克林 ($EC_{50} = 97.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比, 它们均显示出中等舒张血管活性, EC_{50} 值在 $3.68 \sim 22.54 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 提示该类化合物具有改善供血从而延缓 AD 病症发展的潜在活性, 但不会过度扩张血管, 导至低血压。

体内胆碱酯酶抑制活性研究采用东莨菪碱诱导智力损伤的大鼠为动物模型, 用射线形八臂迷宫研究动物行为能力。结果表明, ZLF1a、ZLF2、ZLF1b 保持了他克林相当的智力改善活性。

为进一步考察目标物分子中硝酸酯基团的体内作用, 测试了 ZLF1c 及其与 1-丙基硝酸酯联合用药的体内活性。结果显示, ZLF1c 的活性较 ZLF1a 明显下降, 与 1-丙基硝酸酯联合用药后活性也无明显变化, 单独应用 1-丙基硝酸酯同样无明显智力改善活性。结果再次证明, 目标物分子中硝酸酯基团对胆碱酯酶抑制活性有着重要影响, 结果也提示目标物的体内活性优于他克林和 NO 供体单独给药或联合用药。

考察了 NO 供体的引入是否能够降低原药的肝毒性。结果表明, 与空白对照组相比, 他克林给药组大鼠的各种数据均表现出显著性差异, 如天冬氨酸转氨酶和乳酸脱氢酶水平上升, 白蛋白浓度和肝组织蛋白质含量下降, 表明他克林诱发了严重肝毒性; 而

ZLF1a 给药组大鼠的各种数值均无显著变化, 提示

NO 供体的引入明显降低了原药的肝毒性。

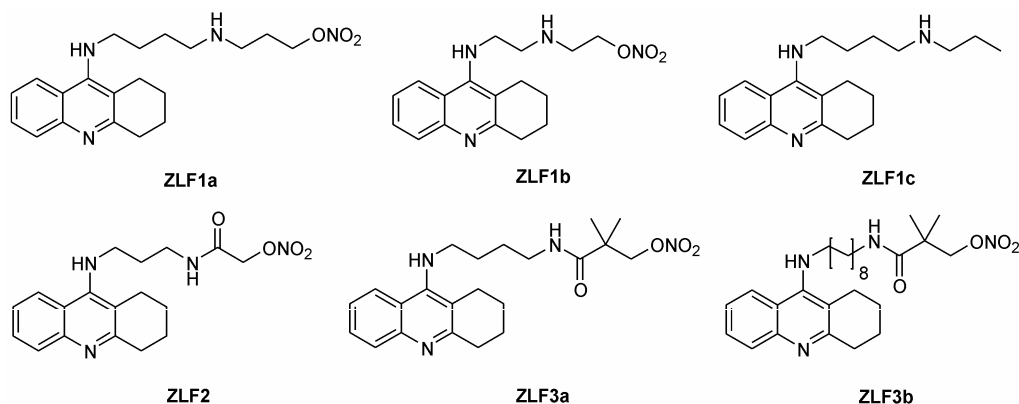


Figure 4 The structures of NO-donor-tacrine hybrids

除药理研究外, 还应用计算机软件模拟了部分目标物与靶点模型的对接。选用双联他克林为标准配体, 应用 MOE 软件“Site Find”功能首先确定 AChE 晶体模型的催化位点和“外周阴离子”位点(PAS), 然后将 ZLF1a、ZLF1b、ZLF3a、ZLF3b 和他克林分别对接, 发现除 ZLF3a 外, 其他化合物均能很好地进入 AChE 的口袋, 各项参数包括构象能量、对接能量、最终评分与标准配体相比, 均比较接近。此外, ZLF3a 与其他化合物活性上的差异也能基于对接结果给予较好的解释。

2 NO 供体型创新药物研究的思考

近年来 NO 的研究取得了长足的进步, 但也给人们留下了许多思考。NO 是一把“双刃剑”。已为人们形成共识的是, 低浓度、生理量的 NO 对人体多种系统具有重要作用, 体内 NO 生成不足或生成过量会引发多种疾病的产生和发展。能否扬“长”避“短”, 通过外源性地提供适量的 NO 来治疗某些疾病呢? 这一点已由 NO 供体型心血管药 Bidil 和非甾体抗炎药 Naproxenod 的成功开发得到肯定的答案。接下来思考的问题是, 既然正常组织、细胞内 NO 生成过量会导致肌体损伤, 能否将这种破坏作用选择性地发生在癌细胞或病变组织呢? 近年来人们正在进行这方面的尝试。将具有 NO 供体识别或活化功能的特定酶转染入靶细胞中, 从而使设计的 NO 供体化合物能特异性地在靶细胞释放 NO, 或者向肿瘤细胞导入诱生型 NO 合酶 (iNOS) 的编码基因^[62, 63]或能表达人 iNOS 的细胞^[64], 使人 iNOS 在肿瘤细胞内高度表达, 从而产生高浓度的 NO, 诱导肿瘤细胞凋亡。

靶向作用的 NO 供体型药物与上述策略有异曲同工之妙。作者正在试图利用肿瘤组织低氧、略偏酸性的特点以及利用肿瘤细胞高度或过度表达的酶、转

运蛋白等作为靶标设计能特导性地在肿瘤细胞释放高浓度 NO、诱导肿瘤细胞凋亡的药物。类似地, 对于一些缺血、缺氧性的心脑血管病变组织, 作者正在设计、合成一些 NO 供体, 它们可在缺氧条件下还原成 NO, 发挥治疗作用, 但在有氧的正常组织中它们可被氧化成无毒的硝酸盐, 从而达到靶向治疗的目的^[65, 66]。

除了 NO 供体型药物 (包括 NO 供体化合物) 能增加体内 NO 生成外, 人们也发现一些中药及复方制剂在体内能增加 NO 合酶 (NOS) 表达或增强 NOS 活性, 促进 NO 释放。因此, 设计一些在体内能激活内皮型 NOS (eNOS) 或增加其表达, 从而促进 NO 生成的药物也是很有意义的。作者应用这一策略设计、合成了一系列取代的硫脲类化合物, 发现其中的 ZX-5 能显著增加兔脉络膜血流, 对其虹膜和睫状体血流没有影响, 脉络膜血流的增加是 NO 在脉络膜释放的结果^[67]。研究表明, ZX-5 通过增加内皮型 NOS (eNOS) mRNA 的转录和 eNOS 蛋白的表达, 促进了细胞内 NO 的释放; 同时发现 ZX-5 还作用于信号转导途径, 抑制蛋白激酶 ERK1/2 的表达^[68]。上述结果对进一步研发防治年龄相关性黄斑变性眼病 (AMD) 的新药具有重要意义。

NO 供体型药物具有原药和 NO 介导的双重作用, 应该注意二者之间的平衡, 即 NO 的释放必须与另一作用机制精确地匹配, 才能发挥它们最大的药理学和药效学优势。例如, 对于 NO 供体型降压药物来说, NO 介导的血管舒张活性应是温和和适度的, 否则可能导致低血压的副作用。由于不同的供体具有不同的 NO 释放机制, 彼此之间存在着效能高低、作用时间长短、有无耐受性、代谢物有无毒性等多方面的差异, 因此, 考虑选择和应用哪一种类型的 NO 供体和连接

基团以及了解它们在体内可能的代谢方式是非常重要的。

随着研究的深入, 将 NO 供体型药物定义为酯类前药的概念已不能适应形势的发展和需要。一些能释放 NO 的药物包括前述的 NO 供体型抗 AD 药物, 在设计时是将原药的药效基团或活性片段通过连接基团以非酯键形式 (如 C-C, C-N 键等) 与 NO 供体杂合而成, 这种药物有可能是通过分子整体结构与靶酶活性中心的氨基酸残基结合产生效应, 虽然释放 NO 的机制还不是很清楚, 但可以肯定的是 NO 对药物活性作出了贡献。进一步拓宽 NO 供体型药物定义和类型对今后此类新药发展的作用是毋庸置疑的。

“鸡尾酒疗法”治疗艾滋病的实践以及研究具有多靶点作用药物的成功经验给人们以鼓舞和启迪, 合理药物设计思想也从“一药一靶”发展到“一药多靶”^[69, 70]。有理由相信, 随着生命科学和信息科学等学科的发展, 药物化学家对双重或多重作用的 NO 供体型药物的研究, 必将取得更大的进展。

References

- [1] Scatena R, Bottoni P, Martorana GE, et al. Nitric oxide donor drugs: an update on pathophysiology and therapeutic potential [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005, 14: 835–846.
- [2] Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 151: 305–321.
- [3] Zhang YH, Tian JD, Peng SX. Targeting of nitric oxide-donor and related drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 481–486.
- [4] Liu J, Li C, Qu W, et al. Nitric oxide prodrugs and metal-chemotherapeutics: JS-K and CB-3-100 enhance arsenic and cisplatin cytotoxicity by increasing cellular accumulation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3: 709–714.
- [5] Saavedra JE, Srinivasan A, Buzard GS, et al. PABA/NO as an anticancer lead: analogue synthesis, structure revision, solution chemistry, reactivity toward glutathione, and *in vitro* activity [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 1157–1164.
- [6] Chakrapani H, Kalathur RC, Maciag AE, et al. Synthesis, mechanistic studies, and anti-proliferative activity of glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide prodrugs [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 9764–9771.
- [7] Chakrapani H, Wilde TC, Citro ML, et al. Synthesis, nitric oxide release, and anti-leukemic activity of glutathione-activated nitric oxide prodrugs: structural analogues of PABA/NO, an anti-cancer lead compound [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 2657–2664.
- [8] Chen C, Shi YQ, Song J, et al. A glycosylated nitric oxide donor, β -Gal-NONOate, and its site-specific antitumor activity [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2006, 339: 366–371.
- [9] Tang XP, Xian M, Trikha M, et al. Synthesis of peptide-diazeniumdiolate conjugates: towards enzyme activated antitumor agents [J]. *Tetrahedron Lett*, 2001, 42: 2625–2629.
- [10] Yasuda H. Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radio-resistance: novel strategy for cancer therapy: nitric oxide donor as a therapeutic enhancer [J]. *Nitric Oxide*, 2008, 19: 205–216.
- [11] Yasuda H, Yamaya M, Nakayama K. Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 688–694.
- [12] Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Harhaji L, et al. Anticancer properties of the novel nitric oxide-donating compound (*S*, *R*)-3-phenyl-4, 5-dihydro-5-isoxazole acetic acid-nitric oxide *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7: 510–520.
- [13] Cai TB, Tang XP, Nagorski J, et al. Synthesis and cytotoxicity of 5-fluorouracil/diazeniumdiolate conjugates [J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11: 4971–4975.
- [14] Rigas B, Kashfi K. Nitric oxide-donating NSAIDs as agents for cancer prevention [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10: 324–330.
- [15] Rigas B. Novel agents for cancer prevention based on nitric oxide [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35: 136–138.
- [16] Stewart GD, Nanda J, Brown DJ, et al. NO-sulindac inhibits the hypoxia response of PC-3 prostate cancer cells via the Akt signaling pathway [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124: 223–232.
- [17] Jeong DW, Kim YH, Kim HH, et al. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2007, 28: 51–57.
- [18] Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K, et al. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds [J]. *Neoplasma*, 2004, 51: 327–333.
- [19] Cipak L, Grausova L, Miadokova E, et al. Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects [J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80: 429–435.
- [20] Huang D, Ding Y, Li Y, et al. Anti-tumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid [J]. *Cancer Lett*, 2006, 233: 289–296.
- [21] Wu LM, Wu XX, Sun Y, et al. A novel synthetic oleanolic acid derivative (CPU-II(2)) attenuates liver fibrosis in mice through regulating the function of hepatic stellate cells [J]. *J*

- Biomed Sci, 2008, 15: 251–259.
- [22] Chen L, Zhang YH, Kong X, et al. Design, synthesis, and antihepatocellular carcinoma activity of nitric oxide releasing derivatives of oleanolic acid [J]. J Med Chem, 2008, 51: 4834–4838.
- [23] Wu XJ, Tang XP, Xian M, et al. Synthesis and cytotoxicities of mannose conjugated *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) [J]. Bioorg Med Chem, 2002, 10: 2303–2307.
- [24] Huang Z. Studies on design, synthesis of site-targeting and NO-donating oleanolic acid derivatives as anti-hepatocellular carcinoma agents [D]. Nanjing: China Pharmaceutical University, 2009.
- [25] Shen LH, Lai YS, Zhang YH, et al. Synthesis and anti-tumor activities of nitrate derivatives of glycyrrhetic acid [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2008, 39: 103–107.
- [26] Kong XW, Zhang YH, Wang T, et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of novel dimethyl [1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarboxylates bearing 1,3,4-thiadiazole moieties [J]. Chem Biodivers, 2008, 5: 1743–1752.
- [27] Wang T, Zhang YH, Kong XW, et al. Synthesis and biological evaluation of nitric oxide-donating thalidomide analogues as anticancer agents [J]. Chem Biodivers, 2009, 6: 466–474.
- [28] He BC, Zhang YH, Lai YS, et al. Studies on synthesis and anti-tumor activity of conjugates of furoxans to *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2007, 27: 629–635.
- [29] Wallace JL, Ignarro LJ, Fiorucci S. Potential cardioprotective actions of no-releasing aspirin [J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1: 375–382.
- [30] Shukla N, Angelini GD, Ascione R. Nitric oxide donating aspirins: novel drugs for the treatment of saphenous vein graft failure [J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75: 1437–1442.
- [31] Lazzarato L, Donnola M, Rolando B, et al. Searching for new NO-donor aspirin-like molecules: a new class of nitrooxy-acyl derivatives of salicylic acid [J]. J Med Chem, 2008, 51: 1894–1903.
- [32] Zhou Z, Jiang LY, Zhang YH, et al. Synthesis and antithrombotic activity of acetylsalicyl *p*-coumaric acid coupled with furoxans and nitrates [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2006, 26: 1403–1408.
- [33] Zhou Z, Jiang LY, Zhang YH, et al. Synthesis and antithrombotic activity of acetylsalicyl ferulic acid-coupling furoxans and nitrates [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 1050–1056.
- [34] Zhou Z, Lai YS, Zhang YH, et al. Synthesis and antithrombotic activity of 3-aryl-1,2,3,4-oxatriazole-5-imine-aoupled aspirin [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2008, 28: 819–824.
- [35] Zhang Y, Wang L, Zhang L, et al. Effects of 2-(1-hydroxypentyl)-benzoate on platelet aggregation and thrombus formation in rats [J]. Drug Dev Res, 2004, 63: 174–180.
- [36] Min ZL, Zhang YH, Zhuang P, et al. Synthesis and anti-platelet activities of nitric oxide-releasing derivatives of 3-butylphthalide [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2008, 39: 392–397.
- [37] Fruttero R, Boschi D, Di Stilo A, et al. The furoxan system as a useful tool for balancing “hybrids” with mixed alpha 1-antagonist and NO-like vasodilator activities [J]. J Med Chem, 1995, 38: 4944–4949.
- [38] Decker M, König A, Glusa E, et al. Synthesis and vasorelaxant properties of hybrid molecules out of NO-donors and the beta-receptor blocking drug propranolol [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14: 4995–4997.
- [39] de Nigris F, Mancini FP, Balestrieri ML, et al. Therapeutic dose of nebivolol, a nitric oxide-releasing b-blocker, reduces atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits [J]. Nitric Oxide, 2008, 19: 57–63.
- [40] Di Stilo A, Visentin S, Cena C, et al. New 1,4-dihydropyridines conjugated to furoxanyl moieties, endowed with both nitric oxide-like and calcium channel antagonist vasodilator activities [J]. J Med Chem, 1998, 41: 5393–5401.
- [41] Harada N, Miura T, Dairaku Y, et al. NO donor-activated PKC-delta plays a pivotal role in ischemic myocardial protection through accelerated opening of mitochondrial K-ATP channels [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2004, 44: 35–41.
- [42] Xu X, Zhang YH, Peng SX, et al. Study on NO-donating antihypertensive agents I. Synthesis and antihypertensive activity of C-3 nitrate or furoxan substituted benzopyrans [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2005, 36: 488–495.
- [43] Tsui DY, Gambino A, Wanstall JC. *S*-nitrosocaptopril: *in vitro* characterization of pulmonary vascular effects in rats [J]. Br J Pharmacol, 2003, 138: 855–864.
- [44] Iwanaga Y, Gu Y, Dieterle T, et al. A nitric oxide-releasing derivative of enalapril, NCX 899, prevents progressive cardiac dysfunction and remodeling in hamsters with heart failure [J]. FASEB J, 2004, 18: 587–588.
- [45] Breschi MC, Calderone V, Digiacomo M, et al. NO sartans: a new class of pharmacodynamic hybrids as cardiovascular drugs [J]. J Med Chem, 2004, 47: 5597–5600.
- [46] Breschi MC, Calderone V, Digiacomo M, et al. New NO-releasing pharmacodynamic hybrids of losartan and its active metabolite: design, synthesis, and biopharmacological properties [J]. J Med Chem, 2006, 49: 2628–2639.
- [47] Li YQ, Ji H, Zhang YH, et al. WB1106, a novel nitric oxide-

- releasing derivative of telmisartan, inhibits hypertension and improves glucose metabolism in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 577: 100–108.
- [48] Velázquez CA, Praveen Rao PN, Citro ML, et al. *O*²-acetoxymethyl-protected diazeniumdiolate-based NSAIDs (NONO-NSAIDs): synthesis, nitric oxide release, and biological evaluation studies [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 4767–4774.
- [49] Abdellatif KR, Chowdhury MA, Dong Y, et al. Diazen-1-ium-1,2-diolated and nitrooxyethyl nitric oxide donor ester prodrugs of anti-inflammatory (*E*)-2-(aryl)-3-(4-methanesulfonylphenyl) acrylic acids: synthesis, cyclooxygenase inhibition, and nitric oxide release studies [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 3302–3308.
- [50] Abdellatif KR, Chowdhury MA, Dong Y, et al. Dinitroglyceryl and diazen-1-ium-1,2-diolated nitric oxide donor ester prodrugs of aspirin, indomethacin and ibuprofen: synthesis, biological evaluation and nitric oxide release studies [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 3014–3018.
- [51] Botta M, Distrutti E, Mencarelli A, et al. Anti-inflammatory activity of a new class of nitric oxide synthase inhibitors that release nitric oxide [J]. *ChemMedChem*, 2008, 3: 1580–1588.
- [52] Li RW, Zhang YH, Ji H, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of benzenesulfonylfuroxan-coupled diclofenac [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2001, 36: 821–826.
- [53] Li R, Zhang YH, Ji H, et al. Synthesis and anti-inflammatory analgesic activities of phenylfuroxan-coupled diclofenac [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2002, 37: 27–32.
- [54] Feng XC, Ji H, Zhang YH, et al. Effect of ZLR-8 on the healing of gastric ulcer and NO releasing *in vitro* [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2004, 35: 357–360.
- [55] Wang WD, Zhang YH, Zhang ZG, et al. Synthesis and anti-inflammatory analgesic activities of 2-(2,6-dichlorophenyl-amino)-benzeneacetic acid (3-nitroxymethyl) phenyl ester [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2003, 34: 13–16.
- [56] Thatcher GRJ, Bennett BM, Reynolds JN. Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2005, 2: 171–182.
- [57] Bennet BM, Reynolds JN, Prusky GT, et al. Cognitive deficits in rats after forebrain cholinergic depletion are reversed by a novel NO mimetic nitrate ester [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2007, 32: 505–513.
- [58] Green A, Bender R. Therapies for cognition and learning enhancement: CA 2649760 [P]. 2009-7-14.
- [59] Munoz B, Prasit P, Reger TS. Nitric oxide releasing drugs for Alzheimer's disease: US 20050054714 [P]. 2005-3-10.
- [60] Fang L, Appenroth D, Decker M, et al. Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-alzheimer drug candidates [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 713–716.
- [61] Fang L, Appenroth D, Decker M, et al. NO-donating tacrine hybrid compounds improve scopolamine-induced cognition impairment and show less hepatotoxicity [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 7666–7669.
- [62] Harada K, Supriatno, Kawaguchi S, et al. Overexpression of iNOS gene suppresses the tumorigenicity and metastasis of oral cancer cells [J]. *In Vivo*, 2004, 18: 449–455.
- [63] Wang Z, Cook T, Alber S, et al. Adenoviral gene transfer of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances the radiation response of human colorectal cancer associated with alterations in tumor vascularity [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 1386–1395.
- [64] Xu W, Liu L, Charles IG. Microencapsulated iNOS-expressing cells cause tumor suppression in mice [J]. *FASEB J*, 2002, 16: 213–215.
- [65] Mazzone M, Carmeliet P. A lifeline for suffocating tissues [J]. *Nature*, 2008, 453: 1194–1195.
- [66] Kumar D, Branch BG, Pattillo CB, et al. Chronic sodium nitrite therapy augments ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 7540–7545.
- [67] Xuan B, Xu XR, Chiou GC, et al. Relationship between nitric oxide production and choroidal blood flow [J]. *J Ocular Pharmacol Ther*, 2003, 19: 247–253.
- [68] Ji XB, Zhang YH, Lai YS, et al. Synthesis and biological evaluation of enantiomers of ZX-5 as novel anti-AMD agents [C]. Berlin: 50th Anniversary Meeting. Eighth Tetrahedron Symposium: Delegate Manual. 2007: 92–93.
- [69] Guo Z. Strategy of molecular drug design: dual-target drug design [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 209–218.
- [70] Xu Y, Li X. Multi-target therapeutics and new drug discovery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 226–230..