

• 新药发现与研究实例简析 •

新药创制是复杂的智力活动, 涉及科学研究、技术创造、产品开发和医疗效果等多维科技活动。每个药物都有自身的研发轨迹, 而构建化学结构是最重要的环节, 因为它涵盖了药效、药代、安全性和生物药剂学等多维性质。本栏目以药物化学视角, 对有代表性的药物的成功构建, 加以剖析和解读。

癫痫病是难治的中枢神经性疾病, 发病机制虽未完全清楚, 但已知谷氨酸 AMPA 受体亚型过分活跃是癫痫发作的重要原因。武田制药公司的抗癫痫药吡仑帕奈就是针对 AMPA 靶标研制的, 研制过程体现了以靶标为核心的理念和实施途径, 从发现先导物、结构优化、确定候选化合物, 到临床研究和上市, 紧密围绕着对靶标的活性和选择性以及化合物的成药性等内容, 成功地概念验证了结构优化的合理性。 (编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2016-1112

作用于 AMPA 受体的抗癫痫药吡仑帕奈的研制

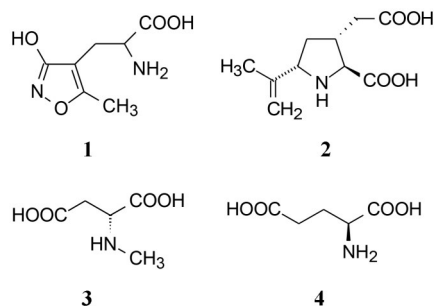
郭宗儒

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

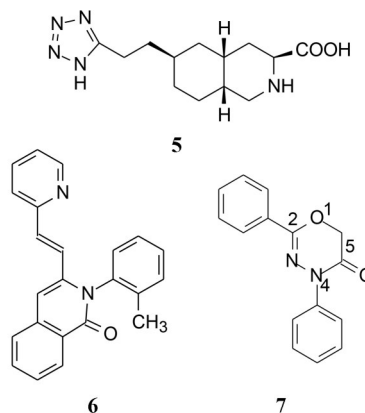
1 研发背景

谷氨酸是神经系统重要的兴奋性递质, 其生理效应是作用于两类受体蛋白: 一是所谓代谢型谷氨酸受体亚型 (mGluRs), 调节细胞的兴奋性和经过第二信使通路调节突触传导; 另一是离子移变型谷氨酸受体亚型 (iGluRs), 为门控四聚型离子通道, 快速调节谷氨酸对突触的效应。iGluRs 又基于对配体 AMPA (1)、海人草酸 (2) 和 NMDA (3) 的选择性不同, 分成 3 种受体亚型, 这 3 个亚型的配体虽然都不是机体原有的天然配体, 但化学结构都是谷氨酸 (4) 模拟物。谷氨酸能神经传导的失调引起多种疾病, 例如癫痫、帕金森病、神经痛、卒中和记忆障碍等。选择性抑制 AMPAs 受体是治疗癫痫发作的重要途径, 但由于选择性作用不强或药代动力学性质不佳, 少有获得临床应用的药物 (Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol, Toxicol*, 2010, 50: 295-322)。

既往研究 AMPA 受体拮抗剂还没有上市的药物,



有代表性的化合物如竞争性拮抗剂替占帕奈 (5, tezampanel) 和非竞争性拮抗剂苄啉唑酮 (6, piriqualone) 等。5 的结构中含有两个酸性基团和一个脂肪胺基团, 模拟谷氨酸竞争其结合位点; 6 的结合位点不是谷氨酸结合部位, 所以化学结构中不含谷氨酸药效团特征 (Welch WM, Ewing FE, Huang J, et al. Atropisomeric quinazolin-4-one derivatives are potent noncompetitive α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 177-181)。



2 活性评价和先导化合物

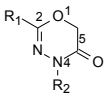
用高通量筛选 (HTS) 方法在公司化合物库中搜寻先导化合物, 目标和标准是: ① AMPA 受体非竞争性拮抗剂; ② 剔除竞争性拮抗剂; ③ 剔除假阳性; ④ 化合物活性在 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或以下水平。为此, 首先用 AMPA

诱导建立大鼠脑神经元细胞死亡模型, 评价化合物的阻断活性作为初筛, 评价对 AMPA 受体的拮抗活性。然后用 ^3H -AMPA 结合实验排除那些竞争性拮抗剂。再用 AMPA 诱导 Ca^{2+} 流入, 测定抑制 Ca^{2+} 离子 50% 进入细胞的化合物浓度 (IC_{50}), 确定拮抗性功能, 也据此排除假阳性化合物。通过 HTS 得到了噁二嗪酮为母核的化合物 **7** (IC_{50} 9.17 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 并作为先导化合物。

3 结构优化

3.1 对杂环 2 和 4 位苯基的变换 用烷基或芳烷基对 2 和 4 位变换以探索构效关系, 合成的化合物及活性列于表 1。结果表明, 2 位或 4 位任何一处变换为烷基或芳烷基都使活性降低, 提示这两个位置为苯环的必要性, 推测与噁二嗪酮环的共轭性是必要的。

Table 1 Structure alteration at 2- and 4-position of the lead compound



Compd.	R ₁	R ₂	AMPA $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
7	Phenyl	Phenyl	9.17
8	Phenyl	Benzyl	33.7
9	Phenyl	cyc-Hexyl	>150
10	cyc-Hexyl	Phenyl	>150
11	c-Propyl	Phenyl	>150
12	Benzyl	Phenyl	>150

3.2 噁二嗪环的变换 由于化合物 **7** 容易被代谢清除, 可能与噁二嗪酮环有关, 故用其他含氮六元杂环酮替换噁二嗪酮并保持 2,4-二苯基不变, 以优化活性和代谢稳定性, 合成的有代表性化合物的体外活性和清除率列于表 2。

化合物 **13** 是二嗪酮为母核, 环上失去氧原子使活性降低; **14** 和 **15** 是吡啶酮化合物, 活性也低于先导物 **13**, 化合物 **15** 的氮原子上有活泼氢, 代谢稳定性差。 **16** 是用苯环替换了氢, 活性和稳定性不仅优于 **14** 和 **15**, 而且优于先导物 **7**, 从而优化出三苯基吡啶酮的结构。

4 三苯基的变换

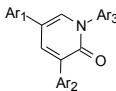
4.1 确定母核位置的优化基团 以 1,3,5-三苯基吡啶酮为新的起点, 用吡啶环分别替换不同位置的苯环以优化活性, 表 3 列出了有代表性的化合物。化合物 **17** 和 **18** 抑制 AMPA 受体阻止 Ca^{2+} 流入的活性强于 **16**, 提示母核吡啶酮的 5 位 (Ar_1) 连接 2'-吡啶基有利于活性, 为此, 固定 C5 位 2'-吡啶基作深入优化。

4.2 以化合物 17 为起点考察 C3-芳环的电性和位阻效应 C3 连接的芳环邻近于吡啶酮的羰基, 环上的取

Table 2 Activity and metabolic stability of compounds with varied oxadiazinone moieties. a. H, M, and R stand for the *in vitro* clearance in men, mice and rats, respectively. The value smaller, the stability stronger

Compd.	A	AMPA $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CL $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{a}$
7		9.17	H: 0.305 M: 1.158 R: 0.476
13		28.10	H: 0.172 M: >1.535 R: 0.497
14		69.54	H: 0.114 M: >1.535 R: 0.486
15		57.72	H: 0.371 M: 1.230 R: 0.822
16		1.08	H: 0.045 M: 0.148 R: 0.051

Table 3 Activity of the compounds with pyridine instead of phenyl ring

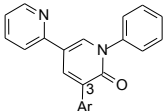


Compd.	Ar ₁	Ar ₂	Ar ₃	AMPA $\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
16	Phenyl	Phenyl	Phenyl	1.08
17	Pyridyl	Phenyl	Phenyl	0.32
18	Pyridyl	Phenyl	Pyridyl	0.44

代基电性和立体性可能对羰基与受体的结合有重要影响, 为此, 固定 N1-苯基和 C5 为 2'-吡啶基, 变换 C3 的连接基, 化合物的结构与活性列于表 4。

表 4 中有代表性的化合物并非批量一次合成的, 而是首先选取了氰基取代苯, 氰基是拉电子基团, 也有较大的体积, 连接在不同位置对母核吡啶酮的电性分布以及 C3-苯环同母核环的扭转程度是不同的, 从而可能影响活性。结果表明 2'-氰苯基化合物 (**19**) 的活性强于无取代的 **17**, 氰基移至间位 (**20**) 或对位 (**21**), 活性依次下降, 提示 2'-取代的位阻效应使 C3 环-吡啶环形成有利于结合的两面角。这样, 考察其他原子或基团的效应都连接在 2'-位。化合物 **22~25** 的 2'-不同取代的化合物有较高的活性, 但都低于 **19**。用 3-(2'-取代) 吡啶基替换苯基, 化合物 **26~28** 活性弱于相应的苯基化合物。至此, **19** 是活性优化最强的化合物。

4.3 以化合物 18 为起点考察 C3 的芳环效应 化合物 **18** 为 N1, C5 二吡啶取代物, 也是活性较高的化合物, 因而以 **18** 为出发点考察 C3 的基团变换对基团的影响。

Table 4 Activity of compounds with alteration in C3 linkers


Compd.	Ar	AMPA IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
17	Ph	0.32
19	2'-CN-Ph	0.06
20	3'-CN-Ph	7.26
21	4'-CN-Ph	28.73
22	2'-F-Ph	0.20
23	2'-Cl-Ph	0.10
24	2'-CH ₃ -Ph	0.40
25	2'-CH ₃ O-Ph	1.42
26	3-(2'-F)-Py	0.37
27	3-(2'-Cl)-Py	0.68
28	3-(2'-CN)-Py	0.20

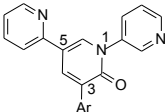
表5列出了化合物的活性。

表5中的化合物**29**和**32**虽然活性低于**19**,但仍证明2'-氰基取代是优选的取代基。不过也说明N1为苯环优于吡啶环取代。

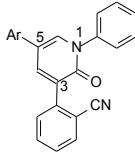
4.4 固定C3为2'-氰苯基、N1为苯基,优化C5取代基 药物化学中优化多位置的化合物时,往往变换一个位置而固定其余结构,这样优化局部结构所得到的结果并非固定不变的,当变换另一位置的结构时,原先的优化结论未必适用,这就是反复优化的原因。下面就是C3和N1分别固定为氰苯基和苯基,探索C5的最佳取代。表6列出了化合物的结构和活性。

表6的数据表明C5变换成取代苯基或噻吩基的活性都低于2'-吡啶基,变换吡啶基的连接位置也使活性降低,因而**19**仍是体外活性最强的化合物。

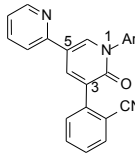
4.5 固定C3为2'-氰苯基、C5为2'-吡啶基,优化N1取代基 至此,将C3固定为2'-氰苯基、C5为2'-吡啶基,再优化N1取代基。表7列出了化合物活性。结果表明,变换吡啶基或环上引入不同取代基,活性都弱于**19**。

Table 5 Activity of compounds with varied C3-aromatic moieties


Compd.	Ar	AMPA IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
18	Ph	0.44
29	2'-CN-Ph	0.21
30	3'-Thienyl	0.78
31	2'-Cl-Ph	0.40
32	3-(2'-CN-thienyl)	0.18
33	3-(2'-CF ₃ -Ph)	2.10
34	3-(2'-F-pyridinyl)	1.45

Table 6 Structure and activity of compounds with varied C5-moieties


Compd.	Ar	AMPA IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
19	2'-Pyridyl	0.06
35	3'-Pyridyl	4.02
36	4'-Pyridyl	5.53
37	Phenyl	0.33
38	2'-F-phenyl	0.20
39	2'-Thienyl	0.10
40	2'-CN-phenyl	8.43
41	2'-CH ₃ O-phenyl	0.74
42	3'-Thienyl	0.14

Table 7 Structures and activity of compounds with varied N1-moieties


Compd.	Ar	AMPA IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
19	Phenyl	0.06
29	3'-Pyridyl	0.21
43	2'-CH ₃ O-phenyl	0.15
44	3'-CH ₃ O-phenyl	0.25
45	4'-CH ₃ O-phenyl	0.44
46	3-(2'-F-pyridyl)	0.50
47	2'-CN-phenyl	>15
48	4'-CN-phenyl	0.52
49	3-(2'-CH ₃ -pyridyl)	0.62

5 候选化合物的确定和吡仑帕奈的上市

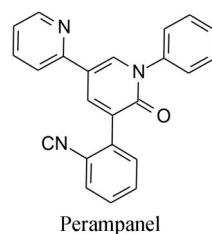
5.1 体外高活性化合物的代谢稳定性和体内活性的比较 在以吡啶酮为母核的N1,C3,C5-三芳基取代的优化中出现的一些高活性化合物,测定了对微粒体的代谢稳定性和灌胃小鼠抑制AMPA引起惊厥的最低有效剂量,表8列出了评价结果。表明化合物**19**、**26**、**28**和**34**对小鼠有较强的抗惊厥活性(体内),对人、小鼠和大鼠肝微粒体有良好的代谢稳定性(体外),其中化合物**19**尤其突出。

5.2 吡仑帕奈的批准上市 化合物**19**灌胃大鼠(1 mg·kg⁻¹)表明有良好的药代动力学性质,口服生物利用度64.3%,C_{max} 0.17 μg·mL⁻¹,半衰期t_{1/2} 2.37 h。还评价了化合物**19**在小鼠和大鼠脑与血浆中的浓度比值,分别为1.06和1.14。小鼠脑脊髓液中**19**的浓度与

Table 8 *In vitro* and *in vivo* metabolic stability of compounds with high activity. ^a H, M, and R stand for the *in vitro* clearance in men, mice and rats, respectively. ^b Minimum effect dose

Compd.	Ar ₁	Ar ₂	Ar ₃	AMPA IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	Cl/μmol·L ⁻¹ ^a	MED ^b /mg·kg ⁻¹
19				0.06	H: 0.009 M: 0.020 R: 0.108	2
26				0.37	H: 0.010 M: 0.012 R: 0.031	5
28				0.20	H: 0.007 M: 0.015 R: 0.068	5
29				0.21	H: 0.014 M: 0.016 R: 0.035	10
31				0.40	H: 0.003 M: 0.006 R: 0.082	25
32				0.18	H: 0.029 M: 0.075 R: 0.069	25
34				1.45	H: 0.005 M: 0.018 R: 0.002	10
37				0.33	H: 0.022 M: 0.059 R: 0.226	25

血浆中游离浓度的比值为1.14。这些数值表明化合物**19**作为中枢神经系统药物适宜穿越血脑屏障。此外,还评价了对63种酶、受体和离子通道的作用,提示没有脱靶作用,有较高的选择性作用,遂确定为候选化合物进入临床前研究,命名为吡仑帕奈(perampanel) (Shigeki Hibi S, Ueno K, Nagato S, et al. Discovery of 2-(2-oxo-1-phenyl-5-pyridin-2-yl-1,2-dihydropyridin-3-yl)benzonitrile (perampanel): a novel, noncompetitive α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropanoic acid (AMPA) receptor antagonist. J Med Chem, 2012, 55:



10584-10600), 经三期临床研究表明是作用于AMPA受体非竞争性的拮抗剂,用于口服治疗部分发作型的癫痫病,美国FDA于2012年批准上市。