

## • 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。

肌萎缩侧索硬化症(ALS)是难治的罕见病,没有有效的治疗药物。美国FDA根据日本临床研究的数据直接批准上市,是20多年来批准的首款ALS新药。三菱制药研制依达拉奉最初为治疗和缓解脑卒中后遗症,是从消除脑内活性氧自由基入手的,以化学视角淬灭自由基设计化合物。从酚类抗氧化作用提出了烯醇-酮的互变异构的科学假设,设计出吡啶酮骨架,经过体内外构效关系的实验求证,优化出超小分子(MW=174)药物依达拉奉,具有强效捕获自由基的物化性质和适宜的亲脂性,因而易于穿越BBB和有利于清除脑内自由基。这个研发路径值得借鉴。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0928

# 起始于化学原理的依达拉奉研制

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

**1.1 肌萎缩侧索硬化症和治疗** 肌萎缩侧索硬化症(ALS)属于罕见病,为一种影响上运动神经元(大脑、脑干、脊髓)和下运动神经元(颅神经核、脊髓前角细胞)及其支配的躯干、四肢和头面部肌肉的一种慢性退行性疾病。临床上常表现为上下肢无力、消瘦并导致瘫痪,著名物理学家霍金就是ALS患者。

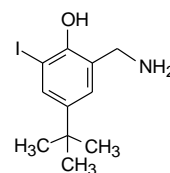
ALS的病因有多种学说:包括病毒感染侵入中枢,铅、铝、铜等重金属中毒,自身免疫,遗传因素和兴奋性氨基酸等学说,由于病因不清楚,缺少有效的防治措施。研究表明,氧化应激是ALS发作和进展的大概率因素,氧化应激与脂质过氧化密切相关。在几乎没有药物可以延缓ALS恶化的情况下,研发自由基捕获剂可能减轻氧化应激效应,延缓ALS患者的神经功能的退化。美国FDA 2017年批准依达拉奉治疗ALS,是FDA 22年来批准的首款ALS治疗药物。

**1.2 抗脂质过氧化的自由基捕获剂** 其实依达拉奉的研制始于治疗脑卒中患者。脑卒中导致局部脑缺血,血液再灌注会启动酶促或非酶性产生活性氧(ROS),活性氧多为羟基自由基、过氧化氢和其他过氧自由基。酶源性ROS的生成主要来自花生四烯酸发生的级联反应,多以自由基形式存在。自由基的链反应产生过量的ROS,引起能量衰竭和氧化应激,使神经细胞膜损伤,导致脑水肿和细胞死亡。缺血后的

ROS 炎性氧化应激还损伤血脑屏障(BBB),引起血管性水肿加剧,使水肿与细胞死亡进一步加剧(Banno M, Mizuno T, Kato H, et al. The radical scavenger edaravone prevents oxidative neurotoxicity induced by peroxynitrite and activated microglia. *Neuropharmacology*, 2005, 48: 283-290)。

酚类化合物是最早发现的自由基捕获剂,实验表明,酚类可以加速PGG<sub>2</sub>转变为PGH<sub>2</sub>,从而使花生四烯酸的级联反应上调游离的PGI<sub>2</sub>(Egan RW, Paxton J, Kuehl FA Jr. Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. *J Biol Chem*, 1976, 251: 7329-7935),例如化合物1可以阻止或减轻PGG<sub>1</sub>、PGE<sub>1</sub>等过氧化物对PGI<sub>2</sub>合成酶的抑制作用(Ham EA, Egan RW, Soderman DD, et al. Peroxidase-dependent deactivation of prostacyclin synthetase. *J Biol Chem*, 1979, 254: 2191-2194),因而抑制炎症的发生和发展。

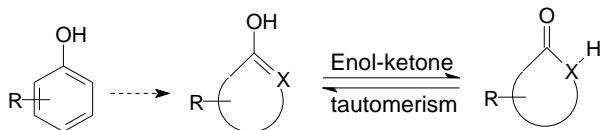
**1.3 烯醇与酮的互变异构** 在化学上酚类具有捕获自由基的性质,但作为药用,由于多有不良反应和成药



1

性的缺陷例如酚类对机体有腐蚀性和刺激性, 容易被代谢氧化和经 II 相代谢而失活, 因而难以直接应用。

日本三菱制药的渡边等从化学观点分析, 以如下的论点设计自由基新型捕获剂: 酚类可视作烯醇, 经质子转移可互变成为酮式异构体, 从而引申一些含有  $\alpha$  氢的环酮、内酰胺或环酰胺等可以烯醇形式捕获自由基的化合物, 起到酚类抗氧化的作用, 从而避免了酚类的毒性和易代谢性。图 1 示意了该设计的思路。



**Figure 1** Design of carbonyl compounds based on the phenol tautomerism ( $X=CH, N, etc$ )

## 2 活性测定

用离体的硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定受试化合物对大鼠脑匀浆自氧化的抑制实验, 评价化合物活性。不同浓度的受试化合物与大鼠脑匀浆温孵 30 min, 离心后的上清液加入十二烷基硫酸钠 (SDS, 应称作硫酸十二醇酯钠), 酸化, 加入 TBA, 加热, 萃取, 荧光测定 TBA 的强度, 计算抑制 50% 自氧化反应的受试物浓度 ( $IC_{50}$ )。

体内评价抗脑缺血活性用大鼠造模。实验组腹腔注射  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  化合物, 对照组注射生理盐水, 30 min 后将左颈总动脉、左锁骨下动脉和胸腔的头臂动脉同时钳夹, 致使脑电波 (EEG) 立即变平, 钳夹 10 min, 使恢复循环, 记录 EEG 恢复时间和动物存活时间。

## 3 化合物结构及优化

**3.1 吡啶烷酮的 N1-取代基变换** 目标化合物需要穿越 BBB 进入中枢, 淬灭脑缺血引起的脂质过氧化所产生的自由基, 分子尺寸宜小和适宜的亲脂性, 以有利于穿越 BBB 向脑中分布。研发者设计了吡啶烷酮为骨架的分子, 4 位至少含有一个氢原子, 以便形成烯醇型

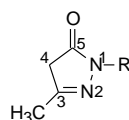
分子。首先合成了容易制备的化合物 **2** (乙酰乙酸酯与苯胂缩合而得), 缺血大鼠模型实验表明, **2** 可恢复消失 (变平) 的脑电波, 提示具有脑保护作用 (Watanabe T, Morita I, Nishi H, et al. Preventive effect of MCI-186 on 15-HPETE induced vascular endothelial cell injury *in vitro*. Prostaglandins Leukot Essent. Fatty Acids, 1988, 33: 81-87)。从而以化合物 **2** 为先导物, 首先变换 N1 取代基, 合成的化合物及其活性列于表 1。

表 1 的构效关系表明, N1 的苯基用氢或甲基 (**3** 和 **4**) 等小位阻基团置换, 丧失了活性, 羟乙基 (**5**) 也无活性, 可能是亲脂性低的缘故, 推论抗脂质过氧化需有一定的亲脂性。环己基 (**6**)、苄基 (**7**)、1-萘基 (**8**) 或杂环 (**9~13**, **10** 除外) 都保持或提高了活性, 1-萘基和 2-苯并噻吩基化合物的体外活性高于 **2**, 可能是亲脂性较强所致。由于 **2** 仍是活性较好的化合物, 下一步是在苯环上进行取代。

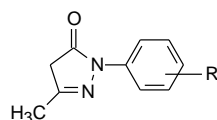
**3.2 N1-苯环上的取代基变换** 在苯环的不同位置作各种基团取代, 化合物及活性列于表 2。分析构效关系表明: ① 苯环的 2 位取代大都使活性显著减弱, 如化合物 **14**、**21** 和 **30**, 2-OH 取代 (**25**) 活性尚可, 可能是酚羟基贡献于抗氧化作用, 也可能是与 N2 形成分子内氢键, 消除了邻位取代的位阻效应。② 苯环的 3 位与 4 位取代基对活性没有显著差异。③ 增加基团的亲脂性如烷基和卤素可提高活性, 长链的烷基或烷氧基也使活性增高。④ 二氯化物 (**24**) 活性强于单取代物, 而二甲氧基的活性并未提高。⑤ 极性基团如羟甲基 (**29**) 和羧基 (**35**) 活性降低或丧失。综上, 在 N1 的苯环 3 或 (和) 4 位含有亲脂性基团有利于增强抗脂质过氧化活性。

**3.3 吡啶环的 3 位和 4 位的取代** 吡啶环的 N2 和 5-酮基是不可变换的。下一步是变换吡啶环的 3 位和 4 位基团, 合成的化合物活性列于表 3。构效关系显示: ① 增加 3 位基团的亲脂性, 化合物 **44** 和 **45** 的抗脂质过氧化活性增高, 含有吡啶环的化合物 **47** 和 **49** 具有中

**Table 1** The effect of alteration of N1-substituents on the lipid peroxydation. \* Inhibitory percentage at  $500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , and the same below



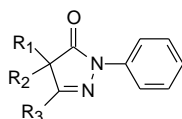
Compd.	R	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Compd.	R	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>2</b>	Phenyl	18.2	<b>8</b>	1-Naphthyl	4.9
<b>3</b>	H	34%@500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ *	<b>9</b>	2-Pyridyl	23.5
<b>4</b>	$\text{CH}_3$ -	46%@500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>10</b>	4-Pyridyl	77.7
<b>5</b>	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2$ -	39%@500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>11</b>	2-Pyrimidyl	29.4
<b>6</b>	Cyclohexyl	24.8	<b>12</b>	2-Pyrazinyl	29.3
<b>7</b>	Benzyl	32.9	<b>13</b>	2-Benzothienyl	16.0

**Table 2** The structure and the anti-lipid peroxidation activity of the compounds with varied substituent on the phenyl ring

Compd.	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	Compd.	R	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
2	H	18.2	25	2-OH	35.5
14	2-CH <sub>3</sub>	392.2	26	3-OH	21.2
15	3-CH <sub>3</sub>	8.0	27	4-OH	23.9
16	4-CH <sub>3</sub>	6.3	28	3,4-(OH) <sub>2</sub>	1.3
17	3,4-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	6.0	29	4-CH <sub>2</sub> OH	51.8
18	4-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	4.2	30	2-OCH <sub>3</sub>	2 129.0
19	4-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	2.2	31	3-OCH <sub>3</sub>	7.1
20	4-F	12.1	32	4-OCH <sub>3</sub>	20.7
21	2-Cl	97.8	33	3,4-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	23.0
22	3-Cl	3.4	34	4-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10.3
23	4-Cl	4.0	35	4-COOH	34%@500 μmol·L <sup>-1</sup>
24	3,4-Cl <sub>2</sub>	1.6	36	4-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	5.2

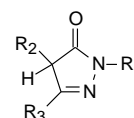
等活性, 而苯基取代的 **46** 活性异常高, 强于有极性的呋喃化合物 **48** 大约 50 倍, 提示 3 位需有亲脂性基团。② 4 位的亲脂性也有利于抗氧化活性。5-异丁基 **38** 提高了活性, 而 5-羟乙基 **39** 几乎没有活性。苯氧基 (**40**) 和苯硫基 (**41**) 虽然亲脂性较强, 但活性未能提高 (或许是位阻大的原因)。化合物 **42** 是 4,4-二甲基化合物, 丧失了活性, 是由于没有  $\alpha$  氢, 不能形成烯醇的缘故, 证实了酮-烯醇互变异构是这类化合物捕获自由基的关键因素。

**3.4 化合物对脑缺血动物的活性评价** 表 1~3 中多数化合物体外实验具有抑制脂质过氧化活性, 但体内大鼠脑缺血模型表明只有 9 个化合物呈现活性, 表 4

**Table 3** 3- and 4-Substituted pyrazolidones and the anti-lipid peroxidation activity

Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
2	H	H	CH <sub>3</sub>	18.2
37	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	20.6
38	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	5.7
39	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	63%@500 μmol·L <sup>-1</sup>
40	PhO	H	CH <sub>3</sub>	16.2
41	PhS	H	CH <sub>3</sub>	146.4
42	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4%@100 μmol·L <sup>-1</sup>
43	H	H	H	20.1
44	H	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	15.1
45	H	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	5.9
46	H	H	Phenyl	0.08
47	H	H	3-Pyridyl	23.6
48	H	H	4-Furanyl	4.3
49	H	H	3-Pyridylmethyl	16.4
50	H	H	1-Imidazolylmethyl	60.1

列出了这些化合物的体内活性, 包括脑电图恢复的时间 (时间越短活性越强) 和大鼠存活的时间 (时间越长活性越强)。结果表明, 空白对照组动物未能恢复脑电图, 大鼠存活的时间最短, 受试化合物的存活时间是不同的。其中化合物 **2**、**32** 和 **34** 表现为优良的化合物。

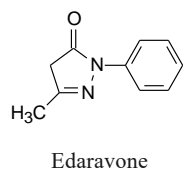
**Table 4** *In vivo* activity of the active compounds

Compd.	R1	R2	R3	EEG recov. time/min	Surviv. time/min
2	Phenyl	H	CH <sub>3</sub>	15	140
6	Cyclohexyl	H	CH <sub>3</sub>	6	64
16	4-CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	16	74
32	4-OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	17	150
34	4-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	15	151
23	4-Cl	H	CH <sub>3</sub>	15	86
45	Phenyl	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	13	54
37	Phenyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	35	87
38	Phenyl	<i>iso</i> -Butyl	CH <sub>3</sub>	48	109
	Control			No recovery	49

#### 4 依达拉奉的批准上市

对高活性化合物的进行成药性实验, 表明化合物 **2** 优胜于其他分子。静脉注射 **2**, 在血浆中 50% 以烯醇的阴离子形式存在, 这是捕获自由基的活性形式。60% 分布到中枢, 血浆半衰期 4.5~6 h, 代谢物为 II 相代谢硫酸氢酯和葡醛酸苷, 没有活性。2 定名为依达拉奉 (edaravone)。三菱制药将依达拉奉进入日本临床试验, 治疗因卒中引起的脑水肿, 于 2001 年批准在日本上市。自 2011 年开始对 ALS 的 III 期临床试验, 日本

于2015年批准为缓解ALS新的适应症。2017年5月美国FDA根据日本治疗ALS的效果,作为孤儿药直接批准在美国上市,治疗肌萎缩侧索硬化症(Watanabe K, Morinaka Y, Iseki K, et al. Structure-activity relationship of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (edaravone). Redox Reports, 2003, 8: 151-155; Watanabe T, Tahara M, Todo S. The novel antioxidant edaravone: from bench to bedside. Cardiovasc Ther, 2008, 26: 101-114)。

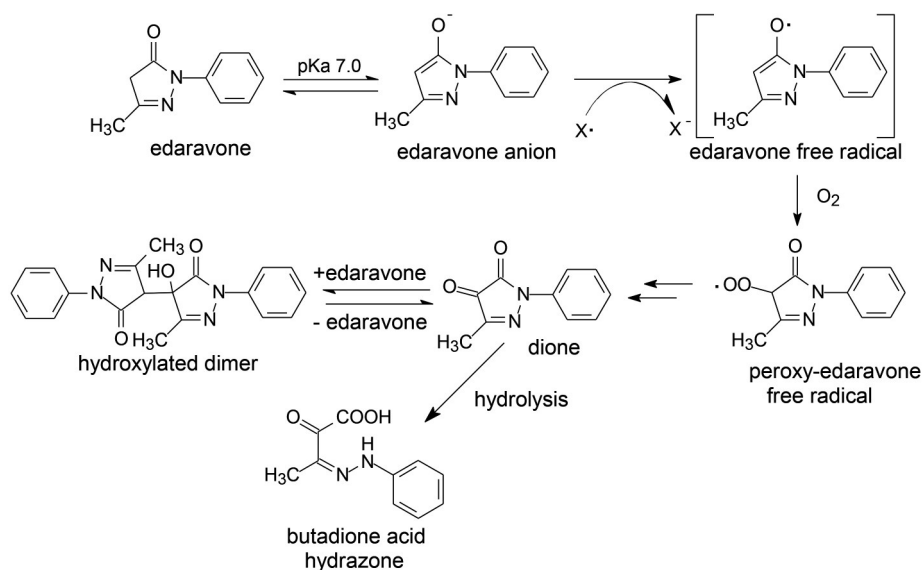


## 5 作用机制

依达拉奉的  $pK_a = 7.0$ , 在生理条件下, 经互变异构

50%可成为烯醇式阴离子, 与体内自由基(例如脂质过氧化生成的氧自由基)经单电子转移, 生成依达拉奉自由基, 后者与分子氧反应, 经依达拉奉过氧自由基生成二酮化合物, 水解得到终产物丁二酮酸苯腙。二酮还可逆地与另一分子依达拉奉缩合生成羟基二聚物。图2是依达拉奉清除自由基的反应机制(Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, et al. Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. Brain Res, 1997, 762: 240-242)。

依达拉奉抑制人嗜中性白细胞产生的活性氧(例如过氧化氢和羟基自由基等)是通过上述的反应机制实现的, 而不是抑制细胞的功能所致(Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, et al. Effects of edaravone on human neutrophil function. Acta Anaesthesiol Scand, 2005, 49: 385-389)。



**Figure 2** The mechanism of free-radical scavenging of edaravone