

• 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。

阿瑞吡坦是全球第一个上市的神经激肽受体小分子拮抗剂,是肿瘤化疗的止吐药。研发商默克的起始依据是辉瑞发现的苗头化合物,在没有受体结构数据的情况下,研发者基于经典的药物化学理念和方法,在结构简化、新结构构建做了多方面的探索,用多种体内外模型评价化合物的活性、选择性和药代性质,实现了由活性化合物向药物的成功转化。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0279

首创的神经激肽受体拮抗剂阿瑞吡坦

郭宗儒

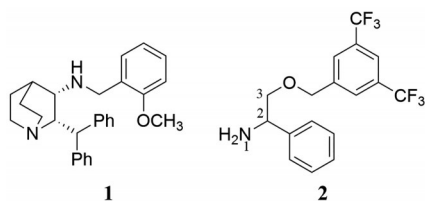
(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所,北京 100050)

1 靶标与背景

1.1 神经激肽受体 哺乳动物的速激肽家族 (tachykinins) 包括多种内源性活性肽,例如神经激肽 A、B、K (neurokinins, NKs) 和 P 物质 (SP) 等。P 物质在中枢和外周广泛地合成和分泌,通过与靶标神经激肽受体结合,参与许多病理生理过程,例如疼痛、神经源性炎症、呕吐、哮喘和偏头痛等。因而研究 P 物质拮抗剂成为干预上述疾病的治疗药物。

1.2 既有的研发状态 最初研究 P 物质拮抗剂是肽类化合物,多作为工具药。为了药用价值,人们致力于研制有机小分子拮抗剂,最早的苗头化合物是辉瑞公司发现的 cp-96345 (**1**),是二苯甲基喹核碱化合物,虽然对 NK1 受体呈现结合作用,但同时对其他亚型和离子通道也有活性,由于泛结合作用,需经结构改造提高选择性。

默沙东公司以 **1** 作为苗头,通过剖列和简化结构操作,发现去除喹核碱环和简化二苯甲基得到的化合物 (**2**) 仍保持一定的活性,**2** 的分子尺寸显著减小,有利于结构修饰和优化。在药物设计中,由简单结构修饰成药物比由复杂结构简化而成的药物来得容易。



2 活性评价

2.1 体外实验模型 对人体神经激肽 1 (hNK1) 受体的抑制活性,是用稳定高表达 hNK1 的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 作模型,评价化合物置换 hNK1 受体结合碘 125 标记的 P 物质 ($[^{125}\text{I}]\text{SP}$) 的 50% 所需的受试物摩尔浓度 (IC_{50}),数值越小活性越高。用 CHO 表达的 hNK2 受体模型,评价化合物置换掉 hNK2 受体结合碘 125 标记的神经激肽 A ($[^{125}\text{I}]\text{NK}_A$) 的 IC_{50} ,数值越大表明脱靶作用越弱。用 CHO 表达的 hNK3 受体模型,评价化合物置换掉 hNK3 受体结合碘 125 和生物素双标记的章鱼唾腺精 ($[^{125}\text{I}]\text{-biotin-eledoisin}$) 的 IC_{50} ,数值越大表明脱靶作用越弱。用家兔骨骼肌细胞 L-型钙通道模型,评价化合物置换掉与钙通道结合的氚标记地儿硫草 ($[^3\text{H}]\text{diltiazem}$) 的 IC_{50} ,数值越大表明脱靶作用越弱。

2.2 体内实验模型 抑制血管渗漏作用: 树脂酯毒素可引起豚鼠食道、气管和膀胱的血管渗漏,而且是剂量依赖性的。树脂酯毒素与 P 物质合用,可刺激对辣椒素敏感的神纤维释放神经激肽而导致血管渗漏。豚鼠造模后灌胃不同剂量的受试物,在 1 或 12 h 测定抑制血管渗漏度,分别计算 50% (ID_{50}) 和 90% (ID_{90}) 的剂量 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

抗焦虑作用: 受试物抗焦虑动物模型是评价对沙鼠顿足反应的抑制作用。不同剂量的受试物静脉注射沙鼠后,脑内注射 GR73632 (一种 P 物质),以空白为对照,用非线性回归分析计算不同时间点抑制 50% 顿足

的剂量 (ID_{50} , $mg \cdot kg^{-1}$)

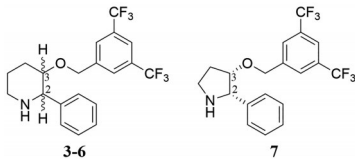
抗呕吐作用: 评价受试物抑制呕吐的实验动物是雪貂, 用顺铂/环磷酰胺或吗啡造模, 一定时间后, 灌胃或静注一定量的受试物, 记录干呕和呕吐的次数, 并与空白对照。

3 苗头化合物的优化

3.1 环合成哌啶母核 化合物 **2** 是链状结构, 分子增加了柔性, 这对于贡献活性构象、固定药效团的空间位置是不利的。为了提高活性, 从 C2 引出亚烷基链并与氮原子相连成哌啶或四氢吡咯环, 表 1 列出了合成的化合物和对 *hNK1* 受体的抑制活性。

环合后存在两个手性碳原子。构效关系表明消旋的顺式体 (**3**) 活性显著强于消旋的反式体 (**4**), 进而拆分后 *2S,3S* (**5**) 强于 *2R,3R* (**6**), 提示 *2S,3S* 为优映体, 化合物 **7** 是四氢吡咯为母核的 *2S,3S* 化合物, 环的缩小导致活性略减, 但手性碳的 *2S,3S* 构型仍占主导地位。既然哌啶和四氢吡咯环系都是以 *2S,3S* 取代的活性最强, 因而以后的结构优化保持 *2S,3S* 的绝对构型 (Harrison T, Williams BJ, Swain CJ, et al. Piperidine-ether based *hNK1* antagonists 1: determination of the relative and absolute stereochemical requirements. *Bioorg Med Chem Lett*, 1994, 4: 2545-2550)。

Table 1 Displacement of [^{125}I] substance P from *hNK1* receptor in CHO cells



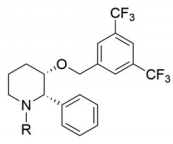
Compd.	Structure	$IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$
3	(±) <i>cis</i>	1.4
4	(±) <i>trans</i>	300
5	<i>2S,3S</i>	0.87
6	<i>2R,3R</i>	350
7	-	7.0
1	-	0.7

化合物 **5** 对 *hNK1* 受体呈现高抑制活性, IC_{50} 为 $0.87 nmol \cdot L^{-1}$, 进一步评价对 *hNK2* 和 *hNK3* 受体的抑制活性, 表明 IC_{50} 都大于 $1\ 000 nmol \cdot L^{-1}$, 提示对 *hNK* 亚型有较高选择性。对于 L-型 Ca^{2+} 通道有抑制活性, 可引起心血管不良反应。其他类型的 *hNK1* 受体拮抗剂具有碱性氮原子时, 往往对 L-型 Ca^{2+} 通道产生抑制作用。因而以化合物 **5** 为新的先导物, 降低对 L-型 Ca^{2+} 通道的脱靶作用。

3.2 哌啶环 N-取代基的变换 化合物 **5** 的 pK_a 为 8.3, 碱性较强, 推测是抑制钙通道 (脱靶作用) 的原因。因

而对哌啶的氮原子进行取代基变换, 以保持对 *hNK1* 受体的活性, 消除抑制钙通道作用。表 2 列出了代表性的化合物及其活性 (Harrison T, Owens AP, Williams BJ, et al. Piperidine-ether based *hNK1* antagonists 2: investigation of the effect of N-substitution. *Bioorg Med Chem Lett*, 1995, 5: 209-212), 构效关系分析如下: ① 对哌啶环的氮原子作简单取代, 如甲基 (**10**)、苄基 (**11**) 和乙酰基 (**12**) 对 *hNK1* 受体的活性显著减弱, 虽然对钙通道抑制作用也显著减弱。② *N*-乙酰胺 (**15**) 和 *N*-乙酸甲酯 (**13**) 的活性与 **5** 相近, 并显著降低了钙通道拮抗作用。可能是 **15** 的碱性较弱的缘故 (pK_a 5.4), 将酰胺或酯水解成游离酸 (**14**) 活性显著降低。③ 酮酰胺 (**8**) 和酮酸酯 (**9**) 分别是 **15** 和 **13** 的 *N*-侧链 CH_2 氧化为 CO, 两种活性都显著减弱, 可能是酮酸链与 C3 取代基有脂环的 1,3 效应, 改变了分子构象的缘故。④ 化合物 **16** 和 **17** 为 **15** 的同系物 (增加了 1 个或 2 个 CH_2), 抑制 *hNK1* 受体变化不大, 但显著提高了抑制钙通道作用。这可能是加入的 CH_2 增加了环上氮原子的碱性, 例如化合物 **16** 的 pK_a 6.5, 碱性强于 **15** (pK_a 5.4)。⑤ 化合物 **18** 和 **19** 是 **15** 的酰胺甲基化产物, 对 *hNK1* 受体没有明显变化, 提示氮上氢原子对结合作用 (氢键给体) 没有贡献。

Table 2 Activities of *N*-substituted compounds with piperidine-ether skeleton



Compd.	R	<i>hNK1</i> receptor/ $IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$	Ca^{2+} binding
5	H	0.87	IC_{50} 760 $nmol \cdot L^{-1}$
8	$H_2N-C(=O)-$	25	0% @ 5 $\mu mol \cdot L^{-1}$
9	$H_3COC(=O)-$	68	0% @ 5 $\mu mol \cdot L^{-1}$
10	CH_3	14	IC_{50} 720 $nmol \cdot L^{-1}$
11	$PhCH_2$	110	IC_{50} 4.1 $\mu mol \cdot L^{-1}$
12	CH_3CO	35	0% @ 5 $\mu mol \cdot L^{-1}$
13	$H_3COC(=O)CH_2$	2.8	IC_{50} 26 $\mu mol \cdot L^{-1}$
14	$HOOCCH_2$	85	7% @ 5 $\mu mol \cdot L^{-1}$
15	H_2NCOCH_2	1.3	16% @ 30 $\mu mol \cdot L^{-1}$
16	$H_2NCOCH_2CH_2$	1.8	98% @ 5 $\mu mol \cdot L^{-1}$
17	$H_2NCOCH_2CH_2CH_2$	2.7	98% @ 5 $\mu mol \cdot L^{-1}$
18	$H_3CNHCOCH_2$	0.63	0% @ 5 $\mu mol \cdot L^{-1}$
19	$(CH_3)_2NCOCH_2$	0.3	0% @ 5 $\mu mol \cdot L^{-1}$

3.3 含有杂环的 N-取代基 化合物 **15** 作为新一轮的先导化合物, 是因为 *N*-取代基的拉电子作用有利于提高对 *hNK1* 受体的抑制活性, 降低对钙通道的作用。进而用五元杂环替换 **15** 中的酰胺基团, 合成的化合物

列于表3中。总结构效关系如下:① 化合物15的乙酰胺基用咪唑环置换,活性显著下降,推测亲脂性不利于结合。② 噁唑(21)和噁二唑(24)的极性强于咪唑(20),21和24抑制hNK1受体活性与15相近。③ 两个咪唑化合物22和23的抑制hNK1受体作用也很强,但对钙通道的作用显著提高,再次证明较强的碱性与钙通道脱靶作用的相关性。④ 三唑化合物25抑制hNK1受体的活性显著强于咪唑,是因为极性增强有利于结合,尤其是三唑酮26的活性达到 $0.05 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。然而硫代三唑酮27的活性略弱,是亲脂性增加的缘故。⑤ 四唑化合物28的活性几乎丧失,是因为作为酸性基团离解成负电荷,不利于结合。

Table 3 Structure and activity of compounds with *N*-hetero-methyl moieties

Compd.	R	hNK1 receptor/ IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	Ca ²⁺ binding /μmol·L ⁻¹
15		1.3	16% @ 30 μmol·L ⁻¹
20		36	Not test
21		1.0	23
22		0.53	2.06
23		0.90	2.3
24		0.97	10
25		0.22	>100
26		0.05	12.6
27		0.8	10
28		43	>5

3.4 高活性化合物的体内活性 化合物15、25和26体外对hNK1受体呈现高活性和选择性,下一步是用3种体内模型评价它们对炎症、中枢炎症和呕吐的治疗作用。不同剂量的受试化合物灌胃预先静脉注射了P物质和Evans蓝染料的豚鼠,测定血管外渗到皮肤(SPIDER)的Evans蓝含量,评价化合物的抗炎活性(ID₅₀)。另一模型是刺激大鼠三叉神经,促使神经激肽的分泌释放,引起脑硬膜炎(rat trigeminal model),静注受试物,测定血浆中的[¹²⁵I]标记的血清白蛋白标示物,以评价对中枢炎症的抑制作用(ID₅₀)。用前述的雪

貂模型评价受试物抑制顺铂引起的抗呕吐作用(ID₉₀)。结果列于表3(Ladduwahetty T, Baker R, Cascieri RA, et al. *N*-Heteroaryl-2-phenyl-3-(benzyloxy)piperidines: a novel class of potent orally active human NK1 antagonists. *J Med Chem*, 1996, 39: 2907-2914)。

Table 3 *In vivo* properties of compounds 15, 25 and 26

Compd.	Spider	Rat model	Ferret emesis
	ID ₅₀ /mg·kg ⁻¹ , <i>p.o.</i>	ID ₅₀ /mg·kg ⁻¹ , <i>iv</i>	ID ₉₀ /mg·kg ⁻¹ , <i>iv</i>
15	0.8	NT	NT
25	0.4	0.008	NT
26	0.037	0.028	1.0

结果表明,化合物25和26体内抗hNK1受体的活性非常强,提示化合物穿过血脑屏障到达中枢部位,杂环取代优于酰胺基化合物15,尤其是三唑酮化合物26的体内3种模型都有良好的作用,是个里程碑化合物。

4 优化代谢稳定性

为了研究有代表性的杂环化合物的代谢稳定性,将其与大鼠肝微粒体温孵,在不同的时间节点上测定原型物的存量,结果列于表4中。数据表明含噁唑基的化合物21在温孵15 min后95%被代谢转化,提示容易代谢。咪唑化合物23在温孵24 h后仍存留18%的原型物,三唑酮26在24 h后只有16%被代谢转化,说明26是代谢稳定的化合物。

Table 4 Microsomal incubation analysis. *Degradation of compound in incubations at 25 μmol·L⁻¹ with normal rat liver microsomes. Substrate concentrations are shown relative to an initial concentration of 1.0

Compd.	R	Time			
		15 min	1 h	4 h	24 h
21		0.05*	-	-	-
23		-	0.72	0.55	0.18
25		-	0.87	0.61	0.33
26		-	1.04	0.90	0.84

先导物代谢产物的结构证明是3,5-二三氟甲基苯甲酸,提示在苯醚的α碳原子发生氧化代谢所致。皆知苯基的α碳电荷比较丰富,是容易发生氧化代谢的位点。为了提高代谢稳定性,在α碳上连接1个甲基,会因位阻效应降低氧化代谢反应速率。然而甲基的引入势必会影响对hNK1受体的抑制活性,因而首先应

考察甲基的存在对其他结构因素的活性影响。此外, 连接了1个甲基使 α 碳变成手性原子, 从而形成差向异构体, 还需考察构型对活性的影响。合成的化合物列于表5。总结构效关系如下: ① 化合物**5**加入 α 甲基对活性有显著影响, 而且取决于 α 碳的构型, **27**是(*R*)- α 甲基, 活性比**5**强5倍, 而(*S*)- α 甲基化合物**28**, 活性比**5**弱100倍, 提示(*R*)- α 甲基有利于抑制活性。同样在苄基苯环上为二氯代物的**29**和**30**, 也有同样的甲基化效应, 构型的不同活性相差近百倍。② **5**和**25**都没有 α 甲基, 结构差别只是**25**有*N*-三唑取代, **25**活性强于无取代的**5**。然而**31**是**25**的(*R*)- α 甲基化物, 活性变化不大, 提示*N*-取代后(*R*)- α 甲基对活性影响较小。③ 化合物**32**和**33**是*N*-三唑酮为侧链的 α 甲基取代物, 苄基环上 CF_3 或 Cl 双取代活性都很高, **34**是**33**的差向异构体(*S*)- α 甲基化物, 活性显著减弱。

体内实验评价了化合物**25**、**31**和**32**抑制血管渗透作用, 表明没有 α 甲基取代的**25**在给药后8h的活性只有55%, 24h时活性已经消失。而**31**和**32**在8h的活性分别为78%和97%, 24h的活性为12%和66%。提示(*R*)- α 甲基取代提高了体内的代谢稳定性, 延长了作用时间(Swain J, Williams BJ, Baker R, et al. 3-Benzylloxy-2-phenylpiperidine NK1 antagonists: the influence of alpha methyl substitution. Bioorg Med Chem Lett, 1997, 7: 2959-2962)。

Table 5 The effect of α -methyl and its configuration on inhibiting activity

Compd.	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
5	H	H	CF ₃	0.8
27	H	CH ₃ , (<i>R</i>)	CF ₃	0.15
28	H	CH ₃ , (<i>S</i>)	CF ₃	87
29	H	CH ₃ , (<i>R</i>)	Cl	0.91
30	H	CH ₃ , (<i>S</i>)	Cl	85
25		H	CF ₃	0.18
31		CH ₃ , (<i>R</i>)	CF ₃	0.16
32		CH ₃ , (<i>R</i>)	CF ₃	0.16
33		CH ₃ , (<i>R</i>)	Cl	0.09
34		CH ₃ , (<i>S</i>)	Cl	25
35		CH ₃ , (<i>R</i>)	H	5.9

5 骨架母核的变换

5.1 体外活性的构效关系 变换哌啶环上取代基的同时, 还用吗啉环作电子等排置换, 并连接前述的优化基团, 合成的代表性化合物列于表6。

Table 6 Structure and activity of compounds with morpholine core

Compd.	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
32		-		0.16 ± 0.10
36	CF ₃	H	H	0.09 ± 0.03
37	CF ₃	CH ₃ , (<i>S</i>)	H	0.88 ± 0.03
38	CF ₃	CH ₃ , (<i>R</i>)	H	0.09 ± 0.03
39	F	CH ₃ , (<i>R</i>)	H	0.10 ± 0.02
40	H	CH ₃ , (<i>R</i>)	H	0.27 ± 0.03
41	CF ₃	H	F	0.07 ± 0.03
42	CF ₃	CH ₃ , (<i>R</i>)	F	0.09 ± 0.03

表6的构效关系提示: ① 以高活性的**32**为参比物, **36**只是用吗啉替换哌啶环, 活性有所提高。② 化合物**36**引入(*R*)- α 甲基(**38**)活性不变, 而(*S*)- α 甲基(**37**)活性显著减弱。③ 将**38**的一个三氟甲基换成氟原子(**39**), 活性基本不变, 但换成氢原子(**40**)则活性降低3倍, 说明苯环的低电荷密度有利于结合。④ 化合物**41**是**36**的C3-苯环对位引入氟原子, 活性很强, 再引入(*R*)- α 甲基, **42**仍保持活性。

进而评价了高活性的化合物**32**、**36**、**38**、**41**和**42**对前述受体亚型和钙通道的脱靶作用, 表明对hNK2受体的IC₅₀ > 1 μmol·L⁻¹, hNK3受体的IC₅₀ > 100 nmol·L⁻¹, Ca²⁺通道IC₅₀ > 1 μmol·L⁻¹, 提示选择性较高。

5.2 高活性化合物的体内活性 用两种动物模型比较**36**、**38**、**41**和**42**的体内活性, 表7列出了评价结果。

一是化合物对外周的抗炎作用, 通过豚鼠静脉注射致炎物质树脂毒素(resiniferatoxin), 引起剂量依赖性的血管渗出作用, 1或24h后灌胃不同剂量的受试物, 分别测定并计算ID₅₀和ID₉₀。结果表明, 这4个体外高活性化合物中**42**的活性最强。另一模型是评价化合物进入中枢的抗焦虑作用, 是用沙鼠颅内灌注NK-1激动剂GR73632引起顿足反应, 在3个时间点上静脉注射不同剂量的受试物, 测定半数抑制的有效浓度。结果表明, 化合物**42**在4和24h进入中枢和持续作用的活性最强, 说明(*R*)- α -甲基和苯环4-F取代对于体内活性和代谢稳定性的作用显著(24h的ID₅₀化合物**42**比**36**强8倍)。所以, 两种评价模型表明化合物**42**的胃肠道吸收

Table 7 Inhibition of systemic vascular leakage in Guinea pig and foot tapping in gerbil

Compd.	Vascular leakage in Guinea pig		Inhibition of foot tapping in gerbil		
	ID ₅₀ (1 h, mg·kg ⁻¹)	ID ₉₀ (24 h, mg·kg ⁻¹)	<i>t</i> = 0 h	ID ₅₀ /iv, mg·kg ⁻¹ <i>t</i> = 4 h	<i>t</i> = 24 h
36	0.006	5.4	0.85	Not test	2.88
38	0.010	2.3	0.16	0.04	1.11
41	0.008	2.3	0.30	0.07	1.24
42	0.008	1.8	0.36	0.04	0.33

和进入中枢的能力都优于其他化合物 (Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, et al. Structural optimization affording 2- (*R*)- (1- (*R*)-3, 5-bis(trifluoromethyl)phenylethoxy) -3- (*S*)-(4-fluoro)phenyl-4- (3-oxo-1,2,4-triazol-5-yl)methyl-morpholine, a potent, orally active, long-acting morpholine acetal human NK-1 receptor antagonist. *J Med Chem*, 1998, 41: 4607-4614)。

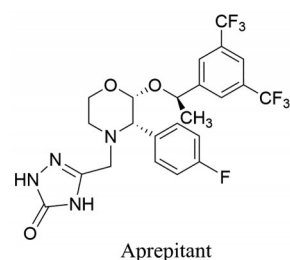
进而用诱发呕吐药物 (顺铂、阿普吗啡和吗啡) 引起雪雕呕吐的模型, 证明 **42** 有显著的治疗干呕和呕吐作用 (数据省略)。

6 候选物的确定和阿瑞吡坦上市

基于化合物 **42** 体外对 P 物质/神经激肽 1 受体有特异的抑制活性和选择性, 动物体内呈现有抗炎、抗焦虑和抗呕吐作用, 口服生物利用度 $F = 60\% \sim 65\%$, 半衰期 $t_{1/2} = 9 \sim 13$ h, 确定为候选化合物, 定名阿瑞吡坦 (aprepitant), 经 III 期临床研究, 美国 FDA 于 2003 年批准上市, 用于预防化疗引起的急性和延迟性干呕与呕吐。

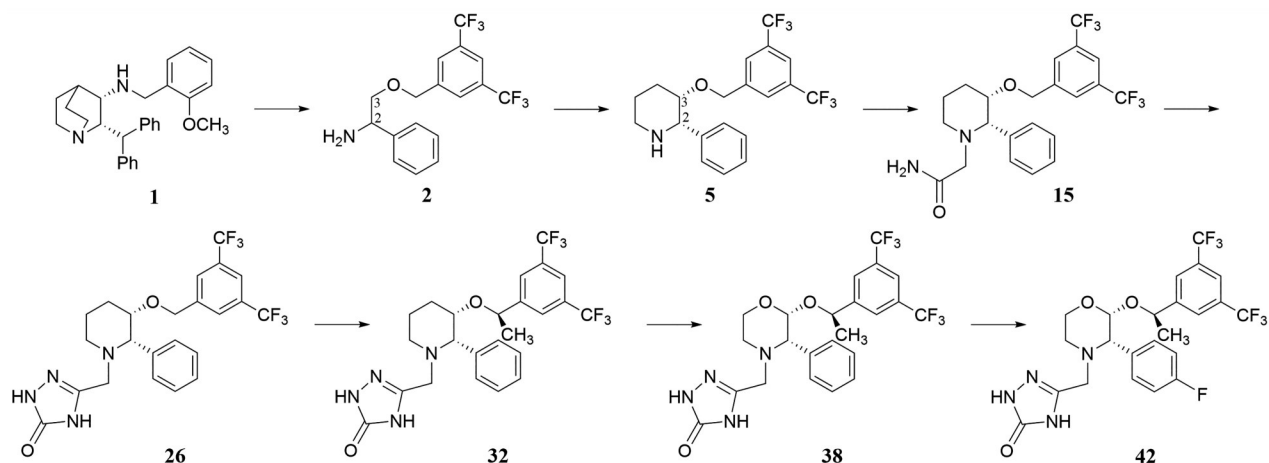
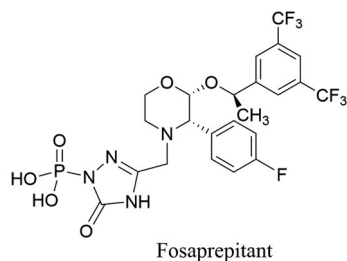
7 后记

从公开的资料可以看出, 默克和其他公司研发 NK1 受体的小分子拮抗剂都是从辉瑞发现的 cp-96345 (**1**) 为苗头物出发的, 阿瑞吡坦是首创上市的药物。在未知受体结构的情况下, 用经典药物化学策略和方法, 先简化结构, 再引入或修饰片段和基团, 再优化活性、选



择性和药代性质, 采用多种体外和体内模型, 以确保活性化合物向药物的成功转化, 得以在竞争中胜出。阿瑞吡坦是口服制剂, 基于其化学结构, 默克公司利用了三唑酮的 NH 可被酰化的特征, 经磷酸化研发了阿瑞吡坦的注射用前药福沙吡坦 (**43**, fosaprepitant), 与甲基葡萄糖胺成盐作静脉注射用, 于 2008 年上市, 也是肿瘤化疗的止吐药。

图 1 总结了阿瑞吡坦研发中的重要节点, 概括了结构的演化历程。

**Figure 1** The critical nodes of structural evolution in the discovery of aprepitant