

• 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。

本刊于2019年第3期刊登了治疗青光眼的多佐胺滴眼剂的研制过程,多佐胺的作用靶标是眼部的碳酸酐酶。本期发表另一个青光眼治疗药奈托舒迪,靶标是抑制小梁网的ROCK激酶,作用机制不同。本滴眼剂是外用药,但须透过角膜进入小梁网组织,调控房水外流,从而降低巩膜静脉压。研制治疗青光眼的难度在于高活性、选择性、作用持续性、无刺激性等诸多要求,在结构优化过程中这些内容都需要在动物模型上同时进行试验。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0334

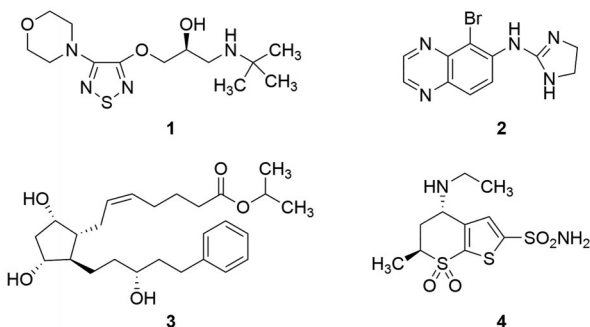
作用于ROCK激酶的滴眼剂奈托舒迪

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 背景

青光眼是一种常见眼病,由于眼内压(IOP)持续升高,给眼球各部分组织带来损害,视力下降导致视野可以全部丧失而失明。既有的若干种类型的降低眼压的药物有 β 肾上腺能阻滞剂如噻马洛尔(**1**, timolol)、 α 肾上腺能激动剂如溴莫尼定(**2**, brimonidine)、前列腺素 $F_{2\alpha}$ 类似物拉坦前列素(**3**, latanoprost) (Stjemschantz J, Resul B. Phenyl substituted prostaglandin analogs for glaucoma treatment. *Drugs Future*, 1992, 17: 691–704)和碳酸酐酶抑制剂多佐胺(**4**, dorzolamide) (Baldwin JJ, Ponticello GS, Anderson PS, et al. Thienothiopyran-2-sulfonamides: novel topically active carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of glaucoma. *J Med Chem*, 1989, 32: 2510–2513)等。本品是一种兼具抑制Rho相关蛋白激酶(ROCK)和抑制去甲肾上腺素转运蛋白作用的药物,能够改善小梁网的渗透能力,减少房水的产生,从而降低眼内压。



2 靶标

人体内存在一类称作Rho的激酶,表达于多种组织中,功能是促进肌动蛋白应力纤维的聚集和黏着斑的形成,调节细胞的收缩和运动。其相关的ROCK激酶也在小梁网表达,抑制小梁网ROCK激酶可提高小梁网渗出房水的能力,降低眼内压,因而ROCK激酶是研制治疗青光眼和高血压症的药物靶标。Rho激酶有两种亚型ROCK1和ROCK2,属于丝/苏氨酸蛋白激酶家族。

3 活性评价

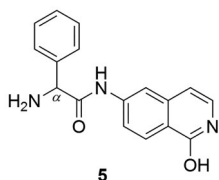
用三种体外模型评价受试物的抑制活性。一是对ROCK酶的抑制活性。以不同浓度的化合物与ROCK激酶温育,测定酶活性降低值,计算化合物与酶结合的离解常数 K_i 值。另两个是用SV40转化的人小梁网细胞(HTM)和猪小梁网细胞(PTM)与不同浓度的化合物温育,计算50%细胞生长受到抑制的化合物浓度 IC_{50} 。

动物试验是用荷兰兔测定化合物降低眼内压的活性。角膜由三层构成:外层是亲脂性上皮细胞;中间层较厚,为亲水性间质细胞;内层是内皮细胞。因而局部应用的滴眼剂需要穿越角膜的屏障。受试物必需穿越角膜,吸收到小梁网细胞中。两只眼睛一只为对照,一只滴0.2或0.3%受试物溶液1滴,在第4、8h和次日测定两只眼睛的眼内压差 ΔIOP (mmHg)。比较降压的强度和持续时间,并观察对结膜的刺激作用,打分评定,分值越低安全性越好。

4 先导物及其优化

研制者已有的活性化合物AR-12286(**5**)抑制ROCK2

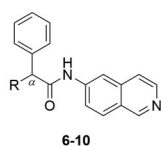
激酶的活性 IC_{50} 值为 $2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 动物模型和人体试验表明能够降低眼内压, 但作用不持久, 优化的目标是增加降低眼内压的时间。



4.1 变换氨基与芳环之间的距离 首先考察变换碱性氨基与芳环的距离对活性的影响, 合成的化合物列于表 1, 结果提示, 氨基处于 β 位的化合物 **7** 抑制酶活性强于 α 位的 **5**, 氨基在 γ 位的化合物 **10** 的活性也比 **5** 强。 **7** 拆分为光活体, *S* 构型显著强于 *R* 异构体, **8** 为优映体, 提示与酶结合具有立体专属性。对细胞的活性与酶的抑制作用趋势相同。

评价化合物 **6**、**7** 和 **10** 降低荷兰兔眼压的作用, 分别是滴 0.3%、0.2% 和 0.3% 溶液 1 滴, 在规定的测定与对照眼的眼压差, 结果表明化合物 **7** 活性高于 **6** 和 **10**, 而且降低眼压的幅度大、持续时间长 (省略数据), 然而 **7** 有结膜充血和轻度的结膜水肿的不良反应。基于这些结果, 将 **7** 作为先导物, 结构骨架是 α -芳基- β -氨基丙酰氨基异喹啉, 下一步是在苯基和异喹啉环上进行取代基的优化。

Table 1 Structure and activity of compounds with varied amino position



Compd.	R	ROCK2	HTM	PTM
		K_i /nmol·L ⁻¹	IC_{50} /nmol·L ⁻¹	IC_{50} /nmol·L ⁻¹
6	NH ₂	1.5	5 609	2 196
7	(<i>SR</i>)-CH ₂ NH ₂	0.8	123	137
8	(<i>S</i>)-CH ₂ NH ₂	0.4	47	179
9	(<i>R</i>)-CH ₂ NH ₂	16	1 216	1 816
10	CH ₂ CH ₂ NH ₂	1.5	47	97

4.2 芳基上取代基的变换 以化合物 **7** 为起始物, 在苯环的不同位置作单或二取代, 同时也考察异喹啉环 1-位羟基的必要性, 合成的化合物和体外活性列于表 2。分析表中的构效关系如下: ① 变换苯环的取代基引起抑制 ROCK2 激酶的变化与对 HTM 和 PTM 细胞的活性变化仍呈正相关。② 抑制酶活性强的化合物有 4-Cl (**19**, $K_i = 0.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、4-CH₃ (**23**, $K_i = 0.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、4-OH

(**25**, $K_i = 0.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、4-CH₂OH (**33**, $K_i = 0.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 2-萘基 (**37**, $K_i = 0.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。③ 异喹啉环上 1-OH 取代的活性低于无取代的 1 倍, 如化合物 **11** 低于 **12**, **15** 低于 **14**, 因而异喹啉环上 1-位不宜有取代基。

表 2 中的高活性化合物用荷兰兔做降低眼压活性实验, 其中 4-Cl (**19**)、4-CH₃ (**23**) 和 2-萘基 (**37**) 的降低眼压作用最强, 滴入 0.1% 溶液 1 滴, 8 h 后分别降低眼压 8.1、9.6 和 7.2 mmHg, 持续时间 1~2 天。这三个化合物的取代基都是亲脂性基团, 例如疏水性常数 $\pi_{Cl} = 0.71$ 、 $\pi_{CH_3} = 0.56$ 、 $\pi_{萘基} = 1.32$, 有利于穿越角膜。然而这三个化合物仍有引起轻度结膜充血和水肿的不良反应。

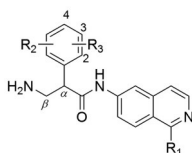
化合物 **25** (4-OH) 和 **33** (4-CH₂OH) 的降眼压作用明显弱于上述三个化合物, 分别只有 1.5 和 2.1 mmHg, 推测是极性基团不利于穿越角膜的缘故。下一步是提高角膜吸收的作用并消除刺激结膜的不良反应, 选择的化合物是含有酚羟基 **25** 和羟甲基的 **33**, 选定的依据是 **25** 和 **33** 的酶活性比较高, 而且羟基在结构上有可修饰性, 即通过制备亲脂性前药提高化合物的过膜性, 有望降低刺激结膜作用, 并且由于水解缓释出原药可延长降压的效果。

4.3 酚酯的前药 目标化合物的活性评价包括抑制 ROCK 激酶和抑制小梁网细胞的生长, 以及降低荷兰兔眼压的强度、持续性和对结膜刺激的不良反应 (选择性)。研制者以体外有较高活性的化合物 **25** 酚羟基为连接位点合成了酯性前药, 以调整过膜性、作用的持续性和选择性。

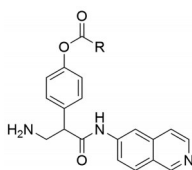
合成的酚酯类化合物列于表 3。结果表明, 羟基酯化后的酶和细胞活性都比相应的原药减弱。用荷兰兔评价降低眼压作用是第一天滴 1 滴 (30 μL) 0.1% 的溶液, 第二天滴 1 滴 0.3% 的溶液, 在每天给药后 1、2、4、8、24 h 的时间点测定眼压和对结膜刺激作用的打分 (越低越安全)。

结果提示, 化合物 **24** 的酚羟基酯化后, 除了苯乙酸酯 (**40**) 和甘氨酸酯 (**45**) 稍降低外, 其余化合物抑制 ROCK 激酶活性都显著降低, 说明前药本身的抑酶活性很差, 但对细胞的抑制作用, 化合物 **38** 和 **41** 的活性强于原药 **24**, 提示过膜和释出原药的总效果强于 **24**, 其他的化合物变化不大或活性更低。然而多数化合物降低眼压作用显著强于 **22**, 提示增加了化合物的亲脂性有利于过膜和释放原药。其中化合物 **38**、**40**、**42** 和 **43** 的 4 h/8 h 的降眼压作用较强, 不过只有 **42** 和 **43** 的刺激结膜的不良反应较弱 (表 3)。

4.4 羟甲基酯的前药 设计合成化合物 **33** 的羧酸酯前药, 结构与活性列于表 4。为了与 **25** 的前药化合

Table 2 Structure and activity of α -substituted phenyl- β -aminopropionamide of isoquinolines

Compd.	R ₁	R ₂ , R ₃	ROCK2 K _i /nmol·L ⁻¹	HTM IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	PTM IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
11	OH	H	2.2	266	456
12	H	2-F	1.0	139	260
13	H	3-F	1.0	201	298
14	H	4-F	1.0	102	175
15	OH	4-F	2.0	219	247
16	H	3,4-F ₂	1.2	70	200
17	H	2-Cl	1.3	192	245
18	H	3-Cl	0.9	383	455
19	H	4-Cl	0.4	64	129
20	H	2,4-Cl ₂	0.8	208	414
21	H	2-CH ₃	1.0	90	200
22	H	3-CH ₃	3.3	324	511
23	H	4-CH ₃	0.4	39	84
24	H	3-OH	1.3	1 721	459
25	H	4-OH	0.6	193	1 015
26	H	3,4-(OH) ₂	5.5	11 002	5 147
27	H	3-CH ₃ , 4-OH	1.0	672	794
28	H	3-OCH ₃ , 4-OH	10.3	4 239	2 954
29	H	3-OCH ₃	2.0	214	448
30	H	4-OCH ₃	1.3	111	670
31	H	4-OCH ₂ Ph	2.0	214	448
32	H	3-CH ₂ OH	3.0	248	1 376
33	H	4-CH ₂ OH	0.2	48	485
34	H	3-CF ₃	2.7	298	201
35	H	4-CF ₃	1.8	493	152
36	H	1-Naphthyl	1.0	4 239	2 954
37	H	2-Naphthyl	0.7	193	1 015

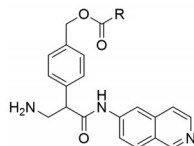
Table 3 SAR of esters of the α -4-hydroxy phenyl β -amino isoquinoline amide. a: 0.1% compound dosed on day 1 and 0.3% dosed on day 2; IOP numbers from day 2; $p = 0.1-0.001$. b: Average irritation score on day 2, based on Draize method, c = chemosis

Compd.	R	ROCK2 K _i /nmol·L ⁻¹	HTM IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	DIOPc ^a / mmHg/time point	Ave irritat. Score ^b
24	-	0.6	193	-1.5 (maximum)	-
38	-CH(CH ₃) ₂	42	14	-6.5/4 h; -4.8/8 h	0.8
39	-C(CH ₃) ₃	359	330	-5.9/4 h; -7.1/8 h	1.8
40	-C ₂ H ₅	6.8	167	-7.8/4 h; -3.7/8 h	0.9
41	-CH ₂ Ph	1.8	74	-6.0/4 h; -6.0/8 h	0.4
42	2,4-(CH ₃) ₂ Ph	821	2 459	-6.8/4 h; -6.5/8 h	0.5
43	3,5-(CH ₃) ₂ Ph	275	1 250	-7.3/4 h; -5.5/8 h	0.5
44	3-Pyridyl	4.8	832	-2.2/4 h; -0.3/8 h	0.2
45	-CH ₂ NH ₂	1	156	-1.1/4 h; -0.1/8 h	0

物作比较, 制备的羧酸酯基本相同。结果表明, 该系列的抑制 ROCK 激酶活性显著高于相应的酚酯型化合物, 而抑制人小梁网细胞的活性与酚酯相差不大, 但荷

兰兔滴眼实验表明化合物 **46**、**48**、**51** 和 **52** 的降低眼压和持续作用较强, 强于相应的酚酯。其中 3,5-二甲基苯甲酸酯 (**51**) 降眼压持续时间最长, 在 8 h 的降

Table 4 SAR of esters of the α -4-hydroxymethyl phenyl β -amino isoquinoline amide. a: 0.1% compound dosed on day 1 and 0.3% dosed on day 2; IOP numbers from day 2; $p = 0.1$ – 0.001 . b: Average irritation score on day 2, based on Draize method, c = chemosis



Compd.	R	ROCK2	HTM	DIOP ^c /	Ave irritat. Score ^b
		$K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	mmHg/time point	
33	–	0.2	48	–2.1 (maximum)	1.0
46	– $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	3.2	83	–7.3/4 h; –7.1/8 h	2.0
47	– $\text{C}(\text{CH}_3)_3$	21.8	424	–3.5/4 h; –8.1/8 h	1.0
48	– C_2H_5	1.7	72	–6.8/4 h; –9.7/8 h	0.7
49	– CH_2Ph	0.8	118	–6.0/4 h; –6.0/8 h	0.4
50	2,4- $(\text{CH}_3)_2\text{Ph}$	4.2	250	–6.3/4 h; –5.5/8 h	1.1
51	3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{Ph}$	0.9	65	–7.7/4 h; –9.3/8 h	0.4
52	– $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	1.6	44	–8.9/4 h; –5.4/8 h	0.5
53	3-Pyridyl	0.7	65	–4.3/4 h; –5.8/8 h	0
54	– CH_2NCH_3	Not test	38	–2.1/4 h; –1.3/8 h	0

压效果可达到9.1 mmHg, 而且对结膜呈现最小的刺激作用。

5 候选物的确定和奈托舒迪的上市

综合评价抑制 ROCK 激酶和细胞活性、降低眼压的幅度和持续时间, 以及较低结膜刺激作用, 确定 **51** 为候选化合物作进一步研发。此外, 还发现 **51** 具有抑制去甲肾上腺素转运蛋白 (NET) 和 5-羟色胺转运蛋白 (SERT) 的活性 (数据省略), 因而与抑制 ROCK 激酶的降低眼压有协同作用。选择性试验表明, 以 $500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度评价了对人体 442 个蛋白激酶的活性, 只有 11 个显示有活性, 其中 ROCK1 和 ROCK2 的抑制率超过 92%, 提示化合物 **51** 选择性较好。进而将 **51** 拆分为光学异构体, 确定了 S 构型为优映体, 定名为奈托舒迪 (netarsudil) 进入临床试验, 以 0.02% 的甲磺

酸盐溶液作滴眼剂, 每日一次表明能够调控小梁网的房水外流, 从而降低巩膜静脉压, 对结膜的刺激性很小, 于 2017 年 FDA 批准上市, 治疗青光眼和高眼压症 (Sturdivant JM, Royalty SM, Lin CW, et al. Discovery of the ROCK inhibitor netarsudil for the treatment of open-angle glaucoma. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26: 2475–2480)。

