

## • 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。

精准医学需要有准确的诊断,使用精确设计研发的药物。布加替尼的研制体现了精准的要求,不仅针对ALK阳性的非小细胞肺癌,而且是对克唑替尼治疗后耐药的患者。虽然在临床前的研究中没有直接针对克唑替尼耐药的酶和细胞,但从先导物的设计和评价开始,就重视酶和细胞水平的选择性作用。在化学上,含有机磷基团是布加替尼的结构特色,加之其他基团的精细优化,成就了临床研究的既定目标。由于显著疗效,FDA曾确定布加替尼为突破性资格药物、孤儿药资格,并在2017年4月28日,加速批准了布加替尼在美国上市。(编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2017-0425

# 精准研制的非小细胞肺癌治疗药布加替尼

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)

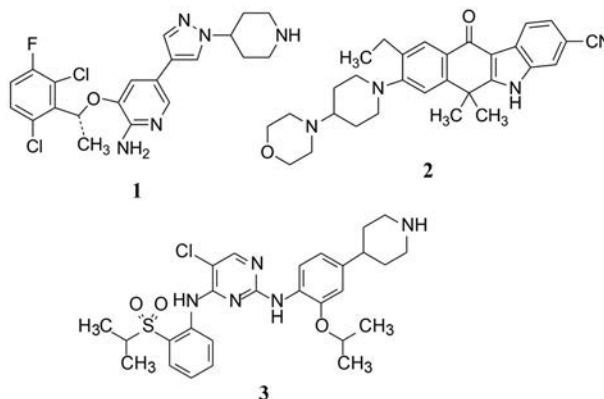
## 1 背景与靶标

间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)属于胰岛素受体家族的酪氨酸激酶,2007年发现在肺癌患者中由于染色体倒位,形成棘皮动物微管相关类蛋白4(EML4)基因和ALK基因的重排(EML4-ALK),促使肺癌发生和发展。EML4-ALK基因重排(又称ALK阳性,ALK+)的肺癌是新近发现的一种分子亚型,主要发生在非小细胞肺癌,约占肺癌3%~5%。第一个上市治疗ALK+的非小细胞肺癌靶向药物是克唑替尼(1, crizotinib),患者对克唑替尼的应答率约70%,无进展生存8~11个月。用药后由于ALK发生变异,而产生耐药性。第二代靶向药物是针对I1171N/T/S变异的埃雷替尼(2, alectinib)、针对F1174C/V和G1202R变异的色瑞替尼(3, ceritinib)。第三代药物的研究目标是对各种变异的ALK+非小细胞肺癌都有效的药物。

## 2 含氧化二甲磷片段的先导物

严格意义上讲,研发第三代药物不属于首创性,但也不会是跟随性的模仿,因为要对耐药的靶标有效,结构上一定有特色,何况作用于ALK激酶的已上市的、处于临床和正在临床前的抑制剂有多种结构骨架,不能侵犯知识产权。

ARIAD公司一开始探索了多种结构,其中一个是以多见的2-苯胺基嘧啶为母核,在苯环的2'位连接甲氧基,目的是使甲氧基结合于ALK酶的铰链附近的小



疏水腔,以避免对其他激酶的结合(减少分子的杂泛性)。最重要的是在4位引入氧化二甲磷片段(DMPO),DMPO是氢键接受体,结构新颖,ARIAD公司曾研究Src激酶抑制剂,有过引入DMPO基团提高活性70倍的经验(Dalgarno D, Stehle T, Narula S, et al. Structural basis of Src tyrosine kinase inhibition with a new class of potent and selective trisubstituted purine-based compounds. Chem Biol Drug Des, 2006, 67: 46-57)。嘧啶4位连接取代的苯胺片段,作为优化的位点,所以设计的先导物是含有DMPO的2,4-二苯胺基嘧啶结构骨架。

在评价化合物对ALK的抑制活性(IC<sub>50</sub>)的同时测定对胰岛素样生长因子受体(IGF1R)和胰岛素受体激酶(InsR)的抑制作用(IC<sub>50</sub>),因为IGF1R和InsR与ALK的蛋白序列同源性较高,为避免影响血糖的杂泛

性, 评价化合物的脱靶作用, 显示 ALK 的选择性。在细胞水平上评价化合物对 ALK+ 的 Karpas299 细胞和对 ALK- 的 U937 细胞的抑制作用 ( $IC_{50}$ ), 二者的活性差异显示化合物的选择性。首轮合成的化合物列于表 1。

表 1 的构效关系如下: ① C2 连接的苯胺基的 4'-DMPO 对活性为正贡献, 因为化合物 **10** 与 **4** 的区别在于 **10** 没有 4'-DMPO 基团, 活性降低 7 倍。② C4 连接的苯胺基上的 2'-取代 (**4**~**9**) 保持了高活性, 这些基团都是氢键接受体。③ 化合物对 ALK+ 细胞的活性显著高于 ALK- 细胞, 提示对 ALK+ 有选择性作用。④ 化合物 **4** 的异丙磺酰基是借鉴色瑞替尼 (**3**) 的片段, 对 ALK- 细胞活性很高 ( $IC_{50} = 20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但对 IGF1R 的抑制活性接近于 ALK, 选择性差, 因而未作为优选的基团。⑤ 化合物 **9** 在 4-苯胺环上也有 DMPO, 虽然细胞水平的活性不高, 但对 ALK 的选择性显著强于其他化合物。为此固定 4-苯胺基的 2'-DMPO, 下一步变换 C2-苯胺基环上的基团。

### 3 C2-苯胺基环上的变换

C4 连接的苯胺环的邻位固定为氧化二甲磷基, 考察在 C2 连接的苯胺环的对位引出碱性基团, 一是提高对 ALK 的活性, 特别是 ALK+ 细胞活性, 另一考虑是该位置接近酶的边沿, 可以提高分子的溶解性。因而合成了含有不同碱性基团的集中库, 列于表 2 中。

表 2 化合物对酶和细胞活性的构效关系分析如下: ① 所有的化合物对 ALK 酶显示强抑制活性, 变换环的结构对抑酶活性没有显著差异, 但对细胞活性有区别, 推测是由于细胞内 ATP 浓度较高, 温孵 72 h 显示出差异, 也可能是由于细胞为全长的 ALK 激酶, 而测定酶活性的是部分结构。② 直接与苯环相连的哌啶或哌啶化合物如 **15** 和 **19** 有较高细胞活性, 环末端被氧

或碳原子置换或降低氮的碱性则活性降低, 例如 **14**、**16**、**17** 和 **18**。③ 含氮的七元或五元环细胞活性低于六元环。④ 化合物 **30** 是移植克唑替尼的助溶基团 (跟进性药物研究惯用方法), 但活性很差, 可能是芳环吡啶不利于细胞内的结合。⑤ 化合物 **15**、**23**、**24**、**27** 和 **31** 对 ALK+ 细胞有较高活性和选择性 (相对于野生型和胰岛素受体), **27** 的选择性尤为突出。

### 4 噻啶环 C5、C2 与 C4 苯环上取代基的变换

以化合物 **27** 为中心, 对 C5 和 C2 与 C4 的取代基作微调变换, 优化对细胞的活性和选择性, 以求精准化设计, 合成的化合物列于表 3。

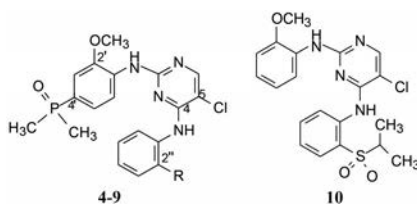
变换各个位置的基团与活性变化的关系如下: ① 噻啶环的 C5 连接的氯原子被其他基团或原子取代 (**32**~**35**) 都使细胞活性降低, 尤其是乙酰基置换 (**36**) 活性殆尽, 所以 C5 为氯原子是最佳基团。② C4 连接的苯胺环上的 2"-氧化二甲磷基换成二乙基, 化合物 **37** 对细胞的抑制降低 5 倍, 提示结合腔的体积不能容纳较大的二乙基氧磷。③ C2 连接的苯胺环上 2' 甲氧基换成乙氧基 (**40**) 或异丙氧基 (**41**) 虽然降低了对胰岛素受体的作用, 但对 ALK 和细胞的抑制降低了 50%, 置换得不偿失。④ 4' 位被 F 取代 (**38**) 显著降低细胞活性, 而甲基取代 (**39**) 的细胞活性略升, 但酶活性略降。

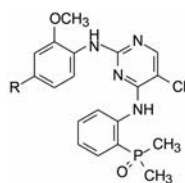
综上, 化合物 **27** 仍是优良的化合物。为了证明氧化二甲磷是该项目的特色结构, 进而换成其他氢键接受体以确定 DMPO 的必要性。表 4 列出了变换 C4 苯胺环上 2" 的基团的化合物及其活性。

分析表中的构效关系如下: ① 氰基 (**44**) 和羟乙基 (**50**) 化合物对胰岛素受体的作用虽然较弱, 但抑制 ALK 的活性也降低了 3~5 倍。② 乙酰基、磺酰胺基和磺酰基等氢键接受体, 对 ALK 和胰岛素受体选择性

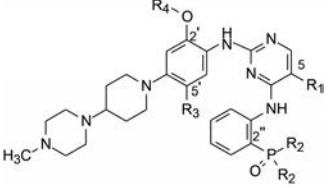
Table 1 Activity of compounds synthesised in the first round

Compd.	R	Inhibit enzyme activity ( $IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )			Inhibit cell viability ( $IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
		ALK	IGF1R	InsR	Karpas299 (ALK+)	U937 (ALK-)
<b>4</b>	$\text{SO}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	0.31	1.9	9.9	20	4 838
<b>5</b>	$\text{OCH}_3$	0.96	22.1	55.2	278	2 908
<b>6</b>	$\text{COCH}_3$	0.79	0.47	0.88	251	1 423
<b>7</b>	$\text{CONH}_2$	0.68	0.11	14.1	613	2 368
<b>8</b>	$\text{SO}_2\text{CH}_3$	0.33	0.40	4.7	405	4 813
<b>9</b>	$\text{PO}(\text{CH}_3)_2$	1.06	139	726	738	13 193
<b>10</b>	-	2.1	-	-	349	20 824
<b>1</b>	Crizotinib	0.64	143	201	365	2 286

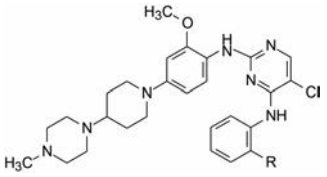


**Table 2** Activity of compounds that change the substituents on the benzene ring attached to C2

Compd.	R	Inhibit enzyme activity (IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup> )			Inhibit cell viability (IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup> )	
		ALK	IGF1R	InsR	Karpas299 (ALK+)	U937 (ALK-)
11		0.22	17.4	284	113	2 307
12		0.33	100	397	65.1	6 334
13		0.54	86.5	343	55.5	4 523
14		0.24	51.4	399	77.4	5 994
15		0.18	20.3	90.6	28.3	1 590
16		0.59	32.5	103	79.9	5 453
17		0.36	26.9	171	70.4	7 232
18		3.1	125	459	270	7 004
19		0.18	12.8	28.1	37.6	1 798
20		0.72	77.5	339	53.9	2 968
21		0.33	42.7	489	66.9	1 174
22		0.07	3.2	100	41.5	1 718
23		0.88	31.6	130	29.9	2 725
24		0.53	20.3	85.3	21.1	1 678
25		0.28	43.3	285	101	4 920
26		0.49	47.3	270	61	5 682
27		0.37	24.9	196	29	3 194
28		0.49	38.8	162	109	3 389
29		0.88	81.5	270	66.7	2 390
30		0.76	98.1	70.2	322	6 226
31		0.38	8.2	57.2	19.2	3 557
1	Crizotinib	0.64	143	201	365	2 286

**Table 3** Activity of the compounds of different substituents on pyrimidine ring C5, and benzene ring C2 and C4


Compd.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Inhibit enzyme activity (IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup> )			Inhibit cell viability (IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup> )	
					ALK	IGF1R	InsR	Karpas299 (ALK+)	U937 (ALK-)
27	Cl	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	0.37	24.9	196	29	3 194
32	Cyclopropyl	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	3.23	434	367	278	10 630
33	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	1.19	117	1 684	429	13 863
34	F	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	0.39	143	1 683	147	24 166
35	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	0.42	128	483	46.9	5 307
36	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	291	-	-	-	-
37	Cl	Et	H	CH <sub>3</sub>	0.12	45.1	314	169	3 465
38	Cl	CH <sub>3</sub>	F	CH <sub>3</sub>	1.03	59.5	1 179	162	1 231
39	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	0.86	27	171	16	1 282
40	Cl	CH <sub>3</sub>	H	Et	0.75	103	253	58.9	22 398
41	Cl	CH <sub>3</sub>	H	i-Pr	0.68	203	700	54.6	21 457
1		Crizotinib			0.64	143	201	365	2 286

**Table 4** Activity of the compounds (change the dimethylphosphine oxide to other substituent) (IC<sub>50</sub>/nmol·L<sup>-1</sup>)


Compd.	R	ALK	IGF1R	InsR	Karpas299 (ALK+)
27	PO(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.37	24.9	196	29
42	H	9.9	51.6	81.7	Not test
43	I	1.36	6.2	13.7	705
44	CN	1.86	51.6	128	Not test
45	CH <sub>3</sub>	1.88	8.7	26	851
46	CONH <sub>2</sub>	0.8	1.4	3.4	Not test
47	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.77	6.17	6.05	Not test
48	SO <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.75	1.93	8.4	Not test
49	COCH <sub>3</sub>	1.59	1.33	2.16	Not test
50	CH <sub>3</sub> CHOH	0.99	36.1	43.2	Not test
51	SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.59	0.76	5.1	Not test
52	SO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.15	0.35	1.9	Not test
1	Crizotinib	0.64	143	201	365

较低,与基团的尺寸大小无关,说明二甲基膦氧基团对于活性和选择性是不可替换的。化合物52再一次借鉴色瑞替尼的成功基团,依然没有成功。

## 5 确定候选化合物和布加替尼上市

在上述诸轮优化的过程中,对活性和选择性较强的化合物,进行了大鼠和小鼠的药代动力学评价,在第3节优化C2连接的苯环4'位的碱性基团出现了不少高活性化合物,但选择27作为里程碑式化合物作精准性

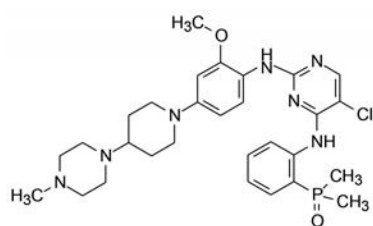
优化,是因为N-甲基哌嗪基哌啶片段的药代性质优于其他环系,例如四氢吡咯哌啶、羟乙基哌啶等化合物的清除率很高(数据从略),较低的生物利用度预示着难以成药的风险。

用Karpas-299小鼠模型评价高活性化合物的药代(PK)和药效(PD)性质,小鼠灌胃25 mg·kg<sup>-1</sup>,在10、16和24 h测定细胞中ALK被磷酸化的百分率(与空白对照比,越低越好)。表5列出的数据表明,化合物15和27呈现稳定的抑制磷酸化性质,尤其是27在灌胃16和24 h只有7%和39%被磷酸化,提示持续性抑制作用,这个PK/PD实验预示体内有较好的抗肿瘤效果。

**Table 5** Percentage of ALK phosphorylation at different time of compounds (25 mg·kg<sup>-1</sup>, intragastric administration)

Compd.	Percentage of ALK phosphorylation/%		
	10 h	16 h	24 h
13	23	125	160
15	2	14	94
17	41	25	168
23	13	60	104
24	2	39	51
26	15	52	50
27	1	7	39
31	1	69	118

进而评价化合物15、17、24和27对Karpas-299小鼠的抗肿瘤活性,同等剂量下27显著优于其他化合物(数据从略),从而作为候选化合物,定名为布加替尼(brigatinib),经临床前和临床研究,表明对克唑替尼治



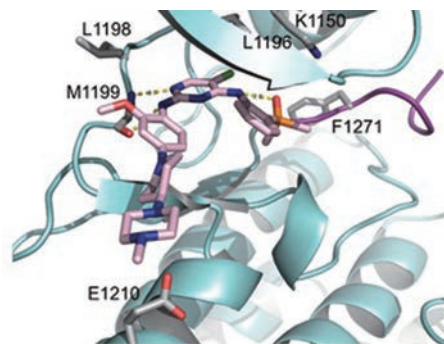
Brigatinib

疗后病情进展的, 或对克唑替尼不能耐受的 ALK 阳性的局部晚期或转移性非小细胞肺癌是有效的药物。由于疗效显著, 美国 FDA 加速批准, 于 2017 年 4 月 28 日批准上市 (Huang WS, Liu SY, Zou D, et al. Discovery of brigatinib (AP26113), a phosphine oxide-containing, potent, orally active inhibitor of anaplastic lymphoma kinase. *J Med Chem*, 2016, 59: 4948-4964)。

## 6 布加替尼与 ALK 的结合模式

X 射线分析布加替尼与 ALK 复合物晶体结构表

明 (PDB 5J7H), 布加替尼分子呈 U 形构象定位于 ATP 结合位点, 嘧啶环位于腺苷结合处, 甲氧基邻近于铰链, 与 L1198 相互作用, 氯原子与门户残基 L1196 结合, 带有二甲磷氧的苯胺环处于 DFG 部位, P=O 与苯胺的 NH 发生分子内氢键结合, 稳定了 U 形药效构象。甲基哌嗪处于无结合的自由状态, 发挥助溶作用 (图 1)。



**Figure 1** The crystal structure of the complex of brigatinib and ALK, the dotted line represents the hydrogen bond