

• 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。

本刊在 2016, 51 (4): 672-676 介绍了辉瑞研发的克唑替尼,是第一代治疗间质性淋巴瘤激酶 (ALK) 呈阳性的非小细胞肺癌的首创性药物,时隔 7 年后辉瑞上市劳拉替尼,是治疗 ALK 发生变异和脑转移的患者。作为第三代药物,其结构特征是大环分子,研制目标针对 ALK 发生变异的细胞,以及可进入中枢,治疗脑转移患者,为此,在药物化学上,注意调整分子尺寸、氢键数目和亲脂性效率;在药理学上,针对耐药的 ALK 细胞、穿越中枢和避免 P-糖蛋白的外排作用,实现了药物化学的设计合成和药理学的多维评价的密切配合。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0352

治疗间质性淋巴瘤激酶变异和脑转移的大环类药物劳拉替尼的研制

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 背景

1.1 靶标

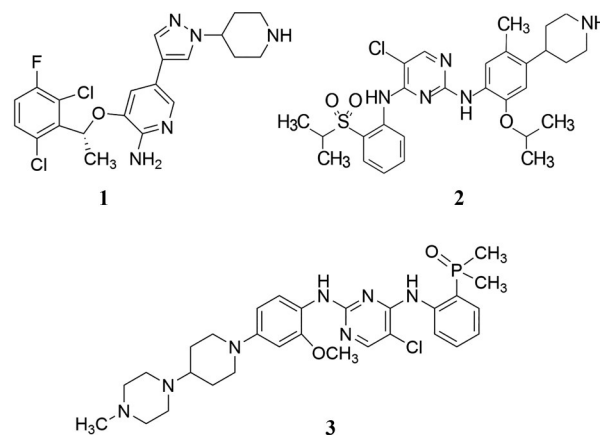
间质性淋巴瘤激酶 (ALK) 属于胰岛素受体家族酪氨酸激酶的一个成员,主要表达于成人的脑组织中,维持中枢神经的发育和功能。ALK 名称的来源是在间质性大细胞淋巴瘤 (ALCL, 一种非何杰金淋巴瘤) 的发生中 ALK 起重要作用。ALCL 基因发生 t(2;5)(p32;q35) 染色体易位,这种易位导致核磷蛋白 (NMP) 与截短的 ALK 发生融合,成为构成胞浆中有活性的酪氨酸激酶,具有促进癌变的功能。

迄今已证实染色体易位可生成 10 多种 ALK 融合蛋白,表达于多种肿瘤细胞中,神经母细胞瘤、炎性乳腺癌和卵巢癌发生 ALK 的扩增以及全长蛋白的活化点突变。ALK 是研发治疗这些肿瘤的药物靶标。

1.2 ALK 靶标的已有药物

第一个作用于 ALK 靶标的药物是 2011 年辉瑞上市的克唑替尼 (1, crizotinib), 治疗 NPM-ALK 瘤源性融合基因的非小细胞肺癌。诺华研发的色瑞替尼 (2, ceritinib) 和武田研发的布加替尼 (3, brigatinib) 分别在 2014 和 2017 年上市,认为是作用于 ALK 的第二代药物。

克唑替尼治疗非小细胞肺癌出现耐药性,本品旨在研发针对已耐药的患者。此外肺癌和乳腺癌患者常发生脑转移而克唑替尼难以穿越血脑屏障进入中枢,药物在脑脊液与血浆浓度比为 0.03,因而辉瑞公司



设定研制针对 ALK 第三代药物的目标是对耐药 ALK 的有效性和在脑中的有效分布。从药物分子的理化性质上要求化合物在高活性和选择性前提下,分子尺寸尽可能小,以有利于吸收和穿越血脑屏障;保持分子的适度亲脂性,以免亲脂性过强引起氧化代谢,不利于药效的持续性。为此,用亲脂性效率 (LipE) 量度化合物的质量。LipE 的定义是 $LipE = pIC_{50} - \log D$, pIC_{50} 是活性的负对数, $\log D$ 是化合物的分布系数, LipE 是联系化合物亲脂性和与受体结合效率的量度,数值越大越趋近成药性。

2 活性评价

2.1 受试物对 ALK 激酶活性的生化测定

用杆状病毒表达人体重组野生型和变异的 ALK 蛋白的激酶域 (氨基酸序列为 1 093~1 411),用

MgATP 处理使自磷酸化而预活化, 微流体的凝胶滞缓实验测定受试物竞争 ATP 结合的动力学数据, 计算受试物的 K_i 值。

2.2 受试物对细胞内磷酸-ALK 作用的 ELISA 测定

96 孔板每孔加入 20 000 细胞, 加入血清温孵过夜。加入不同量的受试物, 温孵 1 h。除去培养液, 溶解细胞, 用 ELISA 试剂盒测定溶解液中磷酸化的 ALK (Tyr1604) 含量, 根据拟合量效曲线计算 IC_{50} 。

2.3 激酶的选择性评价

基于荧光共振能量转移 (FRET) 的 Z'-LYTE 分析方法, 测定受试物对其他 207 个激酶的活性, 以评价化合物的脱靶作用。

3 以克唑替尼为起始物的优化

3.1 变换不同部位的取代基

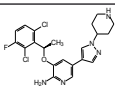
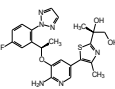
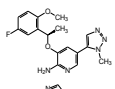
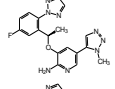
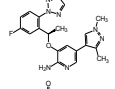
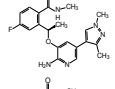
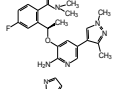
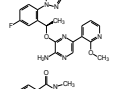
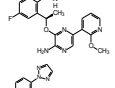
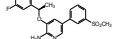
辉瑞公司为克服克唑替尼 (**1**) 对 ALK 发生变异的癌细胞缺乏活性, 这与被 P-糖蛋白的外排作用相一致 [MDR BA/AB ratio (>2.5)], 同时, 中枢内水平因而很低。以 **1** 为起始物, 变换环上的取代基或者变换吡啶为哌嗪, 合成的代表性化合物及其活性和药代/理化参

数列于表 1。

构效关系解析: ① 化合物 **4** 是用亲水的双羟基片段替换哌啶环, 这是优化理化性质常用的策略。分子中两个大体积和疏水的氯原子用三唑替换等, **4** 无论在酶或细胞水平, 对野生型和 ALK^{L1196M} 变异型 (门户氨基酸由 Leu 变异成 Met) 的活性分别提高了 105 和 128 倍, 这是引入极性基团的结果。然而尽管 LipE 显著提高, 但仍有较强的外排作用, **4** 在大鼠的脑脊髓液 (CSF) 水平也低。② 化合物 **5** 和 **6** 的外排作用显著降低, MDR 的比值在 2.5 或以下, 预示进入中枢的能力增强, 但由于减少了极性基团, 与野生型和变异型的 ALK 结合力都减弱, 体现了药效与药代之间的纠结, 这是优化中常见的。**7** 也有类似的趋势。③ 化合物 **8**、**9** 和 **11** 是将苯环上的三唑换成酰胺, 部分维持了 sp^2 杂化态、平面性和极性, 降低了亲脂性, 提高了亲脂性效率 (**8** 比 **7** 的分布系数降低 1.1 对数单位)。**9** 比 **8** 多一个 N-甲基, 活性显著降低。④ 甲砒基化合物 **12** 的活性虽强但选择性不高 (数据省略)。

综上, 这些开链化合物未能同时满足对 ALK^{L1196M}

Table 1 Potency and ADME of compound **1** and other typical compounds. a: ALK with mutation of L1196M; b: Cell with ALK^{L1196M} mutation; c: logD was measured at pH 7.4; d: LipE = $-\log(p\text{ALK-L1196M cell } IC_{50}) - \log D$; e: MDCK-MDR1 BA/AB efflux at 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ substrate concentration and pH 7.4

Compd.	Structure	$K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$		log D^c	LipE ^d	MDR BA/AB ^e (ratio)
		ALK/Mu-ALK ^a	$IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ALK cell/Mu-ALK cell ^b			
1		0.74/8.2	80/843	2.0	4.1	12.5/0.28 (44.5)
4		<0.1/0.2	0.76/6.6	2.9	5.3	30.6/2.6 (10.9)
5		4.0/38	95/3200	2.4	3.1	16.3/20.0 (0.82)
6		9.0/70	249/2650	2.4	3.2	27.5/11.0 (2.5)
7		<0.2/2.6	14/176	3.4	3.4	16.5/10.9 (1.5)
8		2.8/35	116/1 665	2.1	3.7	12.6/0.74 (17.0)
9		22/310	—	2.1	—	18.8/2.5 (7.6)
10		<0.2/0.7	9.7/53	4.0	3.3	5.1/3.2 (1.6)
11		0.85/8.2	16/312	3.6	3.5	33.8/7.7 (4.4)
12		<0.2/1.4	4.6/54	3.4	3.9	15.6/11.4 (1.4)

变异型的活性 (对 ALK^{L1196M} IC₅₀ < 25 nmol·L⁻¹), 以及阻止外排的能力 (MDR BA/AB 比值 < 2.5), 因而预示难以穿越血脑屏障进入中枢。然而它们的结构生物学信息提供了进一步优化的依据。

3.2 化合物与 ALK 的结合特征

研究者分别制备了化合物 **11** 和 **12** 与野生型 ALK 活性部位的复合物晶体结构并进行了解析, 图 1 是将两个分子叠合图, 青色为 **11**, 绿色是 **12**。揭示出的信息如下: ① 两个分子的构象均呈 U 型弯曲状, 拐点在甲氧基的连接处。② 氨基吡啶与酶铰链处的 Leu1122 和 Gly1123 形成氢键, 键长分别是 1.9 Å 和 2.9 Å。③ **11** 的末端吡啶氮原子也形成氢键 (2.8 Å); ④ 苯环相连的三唑或酰胺的氮原子形成氢键 (2.80 Å); ⑤ 酰胺与三唑片段未能叠合在一起, 平面相差 20°, 以致 *N*-甲基未能参与疏水相互作用。

上面提供的重要启示是弯曲的 U 形构象, 化合物 **10**、**5** 和 **12** 也是 U 形构象, 使得两端的苯基与吡啶相互靠近, 若用片段将两端连接成大环化合物, 则可固定 U 形构象, 从而降低分子柔性, 对结合的熵效应是有利的, 也为在疏水腔内提供更有利的疏水-疏水相互作用, 提供了结合力和选择性, 推测也有利于药代和向中枢的分布。

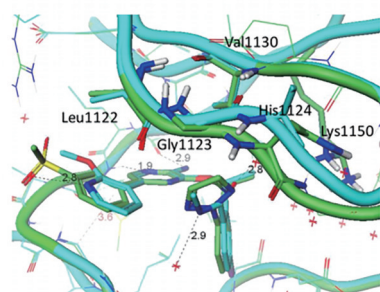


Figure 1 ALK co-crystal of **11** (cyan, PDB 4CMO) overlaid with **12** (green, PDB 4CMT) showing the triazole, amide, and G-loop conformations

4 大环化合物的设计

4.1 含醚键的大环

开始设计的大环化合物是将化合物 **5** 苯环上的甲氧基经亚烷基与三唑环相连接, 形成含有醚键的 **12**~**14** 元环, 其活性和物化性质列于表 2。化合物 **13** 和 **15** 是两个较小的 12 元环化合物, 亲脂性效率 LipE 最高, 强于其他另外 4 个环较大的化合物。尤其是 **15** 的 LipE 达到 4.4, 而且对酶和细胞、野生和 ALK 变异的活性都优于其他化合物, 更优于 **5**, 不过, **15** 的亲脂性仍过强, 距离活性强度、ADME 和向中枢的分布等综合目标仍有不足。

Table 2 Potency and efficiency of the ether-linked macrocycles

Compd.	<i>n</i>	R ₁	R ₃	K/nmol·L ⁻¹		IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹		log <i>D</i>	LipE
				ALK/ Mu-ALK	ALK cell/ Mu-ALK cell				
13	2	H	H	0.36/1.6	22/101	3.0	4.0		
14	3	H	H	0.22/<0.1	215/112	3.6	3.4		
15	2	CH ₃	CH ₃	<0.1/0.57	1.0/20	3.3	4.4		
16	3	CH ₃	CH ₃	<0.1/0.62	0.9/21	3.8	3.9		
17		-		3.8/29	86/854	3.4	2.8		
18		-		5.0/36	524/3 655	3.1	2.3		

4.2 含有内酰胺的大环

这一步的优化目的是降低含醚键的 12 元环化合物的亲脂性, 仍保持或提高化合物的亲脂性效率 LipE, 最容易实现的变换是将醚键换作酰胺键, 并减少环中的亚甲基, 仍保持 12 元环, 以维持环上基团的空间位置, 首先设计了化合物 **19**, 经分子模拟发现 **19** 与 ALK 的结合没有引起环的张力变化。酰胺的 *N*-甲基靠近 Leu1122、Gly1123 和 Val1130 构成的环套区, 羰基经结构水 (structural water) 的介导与 Lys1150 形成氢键网络而稳定化。因而合成了环状内酰胺化合物, 表 3 列出代表性化合物的结构和生物学参数。

表 3 显示内酰胺类 12 元大环的活性可与环醚系列相当, 而效率显著高于醚环, 是因为降低亲脂性提高了 LipE 的缘故。分析内酰胺类的构效关系如下: ① 连接甲基的手性碳构型对活性影响显著, *R* 构型强于 *S* 对映体, 例如优映体 **19** 和 **22** 对 ALK 变异的酶和细胞抑制活性强于劣映体 **20** 和 **23**, 活性分别高 210 和 610 倍。② 去甲基化合物 **21** 的活性显著低于 **19**, 提示 *R*-CH₃ 对活性贡献显著, 因而后来的设计都保持 *R*-CH₃。③ 氨基吡啶与对应的氨基哌啶化合物做比较 (**19/22**; **24/25**; **26/27**) 表明, 哌啶环的活性强于相应的吡啶化合物, 但是 LipE 反而下降了, 原因是环上多一个氮原子, 亲脂性不仅没有下降反而增加了。这是因为新增加的氮原子未被水合, 而且拉电子效应还降低了氨基哌啶碱性, 因而 log*D* 大于相应的氨基哌啶化合物, 致使效率降低。④ 含甲磺基化合物 **26** 和 **27** 的活性与 **19** 和 **22** 相当, 但效率更高, 是因为甲磺酰基的极性增加了溶剂化, 降低了 log*D* 的缘故。

4.3 提高选择性

4.3.1 化合物设计 利用 ALK 的 ATP 结合腔的特异性氨基酸组成, 是分子设计提高选择性的切入点。ALK 的 ATP 结合腔由 27 个氨基酸残基组成, 其中的

Table 3 Potency and efficacy of the lactam-containing macrocyclic compounds with varied substituents

Compd.	X	R ₁	R ₂	K/nmol·L ⁻¹		logD	LipE	MDR BA/AB (ratio)
				ALK/Mu-ALK	ALK cell/Mu-ALK cell			
19	CH	H ₃ C	CH ₃	<0.2/0.29	0.70/14	2.2	5.7	28.3/8.1 (4.2)
20	CH	H ₃ C	CH ₃	1.7/6.1	-	2.2	-	34.6/5.8 (6.0)
21	CH	H	CH ₃	<0.2/1.9	6.4/97	2.0	5.0	25.4/4.6 (5.5)
22	N	H ₃ C	CH ₃	<0.2/0.10	0.21/1.4	2.5	6.4	26.5/11.9 (2.2)
23	N	H ₃ C	CH ₃	17/61	156/1 230	2.5	3.4	29.6/9.6 (3.1)
24	CH	H ₃ C	OCH ₃	<0.2/0.10	0.18/2.1	2.4	6.3	19.9/7.2 (2.8)
25	N	H ₃ C	OCH ₃	<0.08/<0.02	0.11/0.75	2.7	6.4	40.3/20.1 (2.0)
26	-	-	-	0.07/0.40	1.3/21	1.8	5.9	22.1/2.4 (9.2)
27	-	-	-	<0.1/0.12	0.34/1.9	2.2	6.5	8.0/1.2 (6.7)

Leu1198 在整个激酶组学中只占 26%，大多数激酶的这个位置是 Phe 或 Tyr。Leu 的体积小于 Phe 或 Tyr，这样，设计的化合物的基团应适配于 Leu 结合，而同 Phe 或 Tyr 发生碰撞阻碍作用。由于 TrkB 激酶含有 Tyr635 相当于 ALK 的 Leu1198，因而用对 TrkB 激酶的抑制作用作为评价受试物的脱靶作用。

合成的代表性化合物列于表 4，测定了 ALK 发生变异的激酶 (L1196M) 和细胞活性以及对 TrkB 激酶的抑制作用，对后者的活性越弱，比值越大，提示对 ALK 选择性抑制越强。结果表明化合物 **19** (3-甲基吡唑) 和 **28** (3-环丙基吡唑) 对 TrkB 激酶抑制作用很强，没有显示出对 ALK-L1196M 的选择性作用。而 3-氨基吡唑 (**29**) 和甲基咪唑并吡啶 (**30**) 对 TrkB 激酶的活性弱于 ALK-L1196M 大约 40 倍，具有选择性作用，化合物 **31** (氨基咪唑并吡啶) 的选择性甚至高达 93 倍。

其实，这些化合物在合成之前曾进行了分子模拟，预示了这些化合物的活性和选择性，合成后对代表性的分子与 ALK-L1196M 的复合物制备了单晶，通过解析和对 TrkB 激酶的分子模拟，证实了基团对 TrkB 激酶的 Tyr635 空间距离引起的碰撞与选择性有密切相关性。

4.3.2 结合模式 化合物 **19** 与 ALK 的复合物单晶衍射结构表明 (图 2a)，吡唑环上甲基与 TrkB 激酶的 Tyr635 的环上 C3(CE)、C4(CZ) 和 OH 的距离为 3.2~4.1 Å，化合物 **28** 的环丙基与上述三点的距离是 3.2~

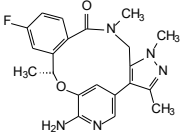
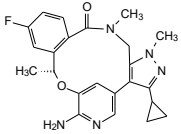
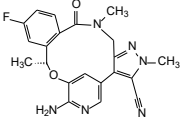
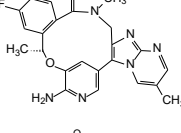
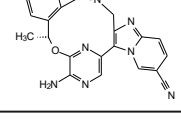
3.7 Å，在空间上是可以实现的，这个距离在能量上是允许结合的。然而 **29** 的氨基距离 Tyr635 的三点为 2.1~3.1 Å。**30** 的甲基移动距离更小，为 2.1~2.3 Å。**31** 的氨基距离只有 1.0~1.8 Å，这些距离使得化合物 **29**~**31** 的氨基或甲基与 TrkB 激酶的 Tyr635 基团过近而发生碰撞 (图 2b)，能量上的不利难以与 TrkB 激酶结合，这与实验数据是完全关联的。

4.3.3 大环与链状化合物的活性再检讨 前述的表 1~4 列出的分子只是代表性的化合物，其实，合成的数量很多，还测定了活性和分布系数。对众多的大环和链状分子作分布性分析，进一步揭示了两类化合物的区别：环状化合物有更高的活性效率。图 3 是以化合物对变异的 ALK 酶 IC₅₀ 负对数和 logD 为坐标，标出环状和链状分子的分布，浅蓝色代表大环分子，灰色是链状分子。显示出高活性效率的大都是大环分子，而且 logD 集中在 2~3 范围内，而链状分子活性弱，logD 较高。

5 评价中枢系统的生物利用度

研发 ALK 激酶抑制剂的另一个目标，是药物可穿越血脑屏障以治疗脑转移肿瘤。MDCK-MDR1 细胞是一种高表达 P-糖蛋白的细胞系，已经证明若降低化合物在该细胞系的外排作用，则可提高在脑脊液或脑中浓度与血药浓度的比值 (He H, Lyons KA, Shen X, et al. Utility of unbound plasma drug levels and P-glyco-

Table 4 Potency, ADME, and selectivity of macrocyclic analogues with lactam linkage

Compd.	Structure	Mu-ALK $K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Mu-ALK cell $\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\log D$	MDR BA/AB (ratio)	TrkB $K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (selectivity)
19		2.9	14	2.2	28.3/8.1 (4.2)	0.5 (1.7%)
28		<0.1	5.8	2.9	16.3/8.0 (2.0)	0.4 (2.0%)
29		0.70	21	2.3	28.0/19.3 (1.5)	23 (38x)
30		2.0	365	1.7	32.4/17.4 (20.2)	77 (39x)
31		0.56	45	2.4	22.1/3.8 (5.8)	65 (93x)

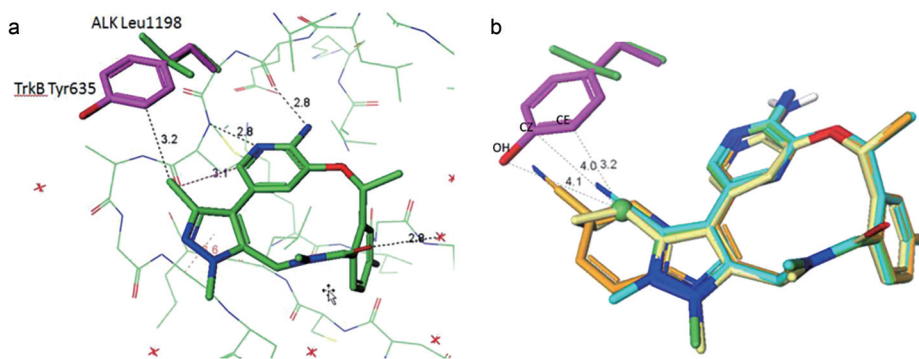


Figure 2 a: **19** and ALK-bound structure (green, PDB 4CMU) and TrkB (purple, PDB 4AT3) with selectivity residues highlighted. b: Ligands from ALK cocystal structures aligned with TrkB, demonstrating the potential for clash between the ligand and Tyr635 [**15** (CH_3 , green, PDB 4CMU), **28** (cyPr, yellow, PDB 4CTC), **29** (CN, cyan, PDB 4CLI), **31** (orange, PDB 4CTB)]. Distances shown are between the 19 methyl carbon (shown as a ball) and TrkB Tyr635. PDB

protein transport data in prediction of central nervous system exposure. *Xenobiotica*, 2009, 39: 687–693)。MDR BA/AB 对化合物的外排作用比值 (ERs) 若低于 2.5, 预示血脑屏障的外排作用较低, 从而脑中与血浆中药物水平的比值较大。辉瑞对公司的近 12 万个化合物的物化性质 (相对分子质量、氢键数和实验测定的 $\log D$ 等) 分析了与过膜性和外排性的相关性, 表明降低外排作用的化合物性质限制在一个小范围内, 即相对分子质量不能过高, 氢键数不超过两个, $\log D$ 在 2~3 的范围内, 所以避免外排作用是由多维参数所决定的综合效

应, 可用于研发 ALK 抑制剂的研究中。

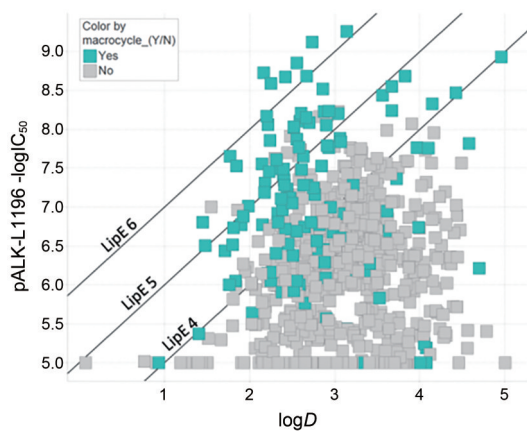
表 4 中多数化合物的 MDR BA/AB 比值大于 2.5, 提示它们是 P-糖蛋白的底物, 不易穿越血脑屏障, 只有 **28** 和 **29** 的比值低于 2.5, 预示可进入中枢神经系统。

6 候选物的确定和劳拉替尼的上市

综合评价对 ALK 和 ALK^{L1196M} 的活性强度、选择性、清除率和外排性, 确定了 **29** 为候选化合物, **29** 对临床上出现的 ALK 突变的癌细胞仍保持较强的抑制活性, 表 5 列出了化合物 **29** 与链状分子 **15** 对变异株细胞的抑制活性, 提示 **29** 显著优于 **15**。进而评价了 **29** 对

Table 5 ALK inhibition (IC_{50}) values for compounds **29** and **15** against ALK and clinical mutants of ALK

Compd.	ALK in 3T3-EML4-ALK engineering cell lines/ $IC_{50}/nmol \cdot L^{-1}$							
	ALK	F1174L	C1156Y	G1269A	S1206Y	L1196M	L1152R	G1202R
29	1.3	0.2	1.6	15	4.2	21	9.0	77
15	80	165	478	605	626	843	1 026	1 148

**Figure 3** LipE plot comparing macrocyclic (aqua) and acyclic (light gray) analogues

206个重组激酶的抑制活性,除10个激酶处于边缘活性(强度低于变异的ALK活性100倍)外,其余都没有活性(Johnson TW, Richardson PF, Bailey S, et al. Discovery of (10*R*)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2*H*-8,4-(metheno)pyrazolo[4,3-*h*][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1)

with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations. *J Med Chem*, 2014, 57: 4720–4744).

化合物**29**的大鼠药代动力学实验表明,静脉注射的血浆消除半衰期 $t_{1/2}$ 2.7 h,清除率 Cl_p 为 $15.5 mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$,分布容积 V_{ss} 为 $2.7 L \cdot kg^{-1}$,口服生物利用度 $F = 100\%$ 。灌胃大鼠 $10 mg \cdot kg^{-1}$ 评价**29**进入脑和脑脊髓液(CFS)的能力,采集并测定不同时间段的血浆、脑和CFS的药物量,表明CFS与血浆的比值为0.31,脑与血浆的比值为0.21,提示**29**可穿越血脑屏障,较小P-糖蛋白泵出作用。

综上,确定化合物**29**为候选化合物,定名为劳拉替尼(lorlatinib),经3期临床研究,表明对非小细胞肺癌发生脑转移、对克唑替尼(第一代)和第二代ALK抑制剂布加替尼耐受的患者有显著效果,于2018年批准上市。

