

• 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。

恩曲替尼是全球第二个上市的泛组织抗肿瘤药,或称作“广谱”抗肿瘤药,研制者原本的目标是对间变性淋巴瘤激酶(ALK)发生变异的肿瘤和脑转移患者有效的治疗药,却得到对多种与ALK相关的融合蛋白有强效抑制的化合物,而且对在多种组织器官发生的癌变都有治疗效果。这对以靶标为核心的创制提供了又一个跨组织跨器官治疗药的范例。从药物化学视角看,本品以复合物的三维结构为指导,通过分析构效关系反馈于高活性和高选择性的化合物设计。在选定候选物时,对物化性质、化合物的配体效率和药代性质等成药性因素进行了全方位的考量。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0702

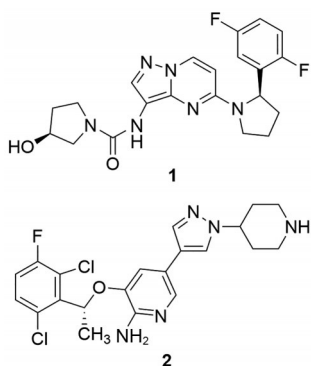
“广谱”抗癌药物恩曲替尼的研制

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 研发背景

1.1 泛组织抗肿瘤药物 以靶标为核心研制肿瘤靶向药物,其精准性在于对肿瘤组织的靶标示物有准确的认定,从而可在分子层面上对有相同治疗标示物的不同组织部位的肿瘤,实现一药多治的泛组织抗癌药物疗法。2018年Loxo Oncology和拜尔公司研发上市的拉罗替尼(1, lalotrectinib),可口服治疗因神经生长因子受体酪氨酸激酶(NTRK)基因融合而发生的多种实体肿瘤,被认为是第一个具有高治愈率的“广谱”抗肿瘤小分子药物。拉罗替尼的研制历程拟另文讨论,本文叙述第二个口服治疗泛组织肿瘤的药物恩曲替尼。



1.2 克服对ALK激酶的耐药性 与肿瘤相关的一个靶标是由于染色体易位,使得间变性淋巴瘤激酶(ALK)与正常表达的核磷蛋白(NPM)融合,将NPM

嵌合到ALK激酶的结构域中,形成NPM-ALK融合蛋白,后者是一些肿瘤发生的诱导因子,最早发现的就是间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。ALK融合蛋白还可引起人非小细胞肺癌(NSCLC)和炎性肌纤维母细胞瘤(IMT)等肿瘤。

上市的第一代ALK抑制剂克唑替尼(2, crizotinib),临床治疗NSCLC。但由于呈现耐药性和克唑替尼难以穿越血脑屏障(NSCLC往往发生脑转移),复发和治疗效果受限。罗氏公司研发的目标是克服耐药的ALK靶标的肿瘤,并可进入中枢系统的ALK抑制剂。由于ALK激酶是多种肿瘤的致癌因子,结果意外地研制出对多种肿瘤有治疗价值的“广谱”抗肿瘤小分子药物。

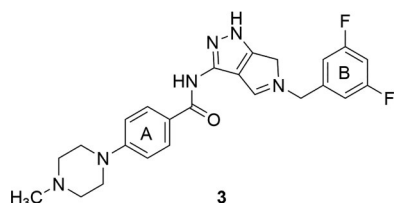
2 体外活性评价

化合物对ALK的活性和选择性评价是用含有多种酪氨酸和丝/苏氨酸激酶的“激酶选择性筛选系统”进行的,以不同浓度的受试物与ATP竞争性结合ALK后,测定剩余的ATP量,计算受试物的 K_i 值,按照Cheng-Prusoff方程确定 IC_{50} 值。对其他相关激酶的活性也以类似的方法测定。

测定受试物对细胞的抑制活性,是在384孔板上接种细胞,温孵24 h后加入不同浓度的受试物温孵72 h,用基于荧光素酶方法测定ATP量,评价细胞的存活率,计算受试物抑制高表达ALK细胞Karpas299的 IC_{50} 值。

3 高通量筛选获得先导化合物

研制者用公司的化合物库筛选了5万个化合物,以 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的受试物浓度对重组的 ALK 蛋白做活性评价,经 Kinase-Glo 试剂测定荧光信号强度评价化合物活性,发现 3-氨基-5-取代的吡唑 (**3**) 具有活性,对 ALK 酶 IC_{50} 为 $0.073 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对高表达 ALK 的 Karpas299 细胞的抑制活性 IC_{50} 为 $0.253 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,**3** 作为先导化合物显然质量相当高。



4 先导物的优化

4.1 复合物晶体结构分析 为了优化先导物**3**,研制者分析了公司既有的化合物 PHA-E429 (**4**) 与 ALK 激酶的复合物晶体结构(图1)。**4**与**3**都具有氨基吡唑母核。分析图1中氨基吡唑的3个N原子可认为相当于ATP腺嘌呤的N原子,结合于ATP结合腔的铰链处,**4**中羰基结合的水分子所占据的空间是ATP的核糖位置,显示出尚有容纳基团的空间。对应于先导物**3**则是在A环的2'位可连接出占据核糖部位的基团或片段。为此,在保持苯环B的二氟代不变前提下,对A环进行结构变换。

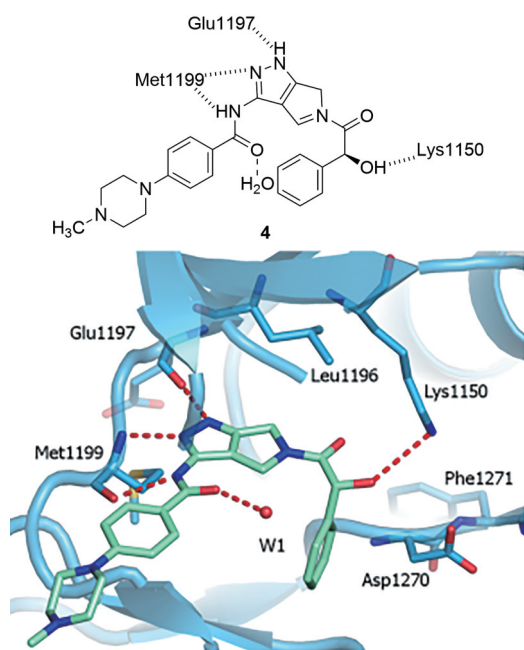
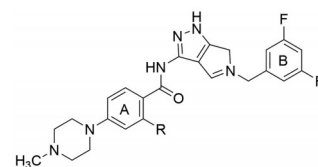


Figure 1 ATP-binding site occupied by PHA-E429 with the observed water molecule W1. The dotted lines represent hydrogen bonds

4.2 苯环A的取代基变换 A环的2'位连接出的基团最接近ATP核糖的位置,因而变换的基团都在2'位。表1列出了化合物的活性,构效关系分析如下:①化合物**4**(2'-NH₂)的活性与**3**基本相同,而引入甲氧苄胺基链的活性略低于**3**(例如化合物**5**、**7**和**8**),化合物**6**的抑酶活性与**3**持平,抑制细胞的活性显著提高。②**9**和**10**的侧链含有氟或羟基,抑酶活性很高,**9**也有良好的细胞活性($\text{IC}_{50} = 0.049 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),化合物**11**~**13**的活性差,可能是由于没能进入糖的腔穴中。③环己胺基化合物**14**的活性较低,但环的对位连接羟基提高了活性,尤其是化合物**15**酶与细胞活性都高,**15**是反式构型,比顺式化合物**16**活性高,晶体结构显示,**15**的羟基经氢键结合的水分子介导与环套上His1124羰基形成氢键结合,而顺式物**16**的羟基位置不能形成氢键。④氨基上连有N-甲基哌啶(**17**)或四氢吡喃(**18**)的化

Table 1 SAR of substituents on ring A. a: Insulin-like growth factor 1 receptor; b: Insulin receptor. NT: Not test

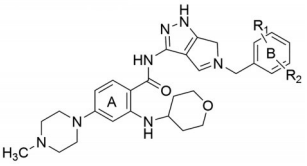


Compd.	R	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
		ALK	IGF1R ^a	IR ^b	Karpas299
3	H	0.073	1.441	1.806	0.253
4	NH ₂	0.067	1.335	1.303	0.214
5		0.210	2.112	1.764	0.243
6		0.073	NT	1.069	0.074
7		0.135	NT	1.190	0.194
8		0.099	NT	1.642	0.340
9		0.014	0.271	0.462	0.049
10		0.026	NT	0.906	0.118
11		0.067	0.244	0.353	0.368
12		0.378	NT	3.694	1.259
13		0.684	NT	9.866	0.991
14		0.560	NT	3.822	0.609
15		0.010	0.124	0.189	0.068
16		0.008	0.762	0.707	0.162
17		0.015	0.209	0.330	0.438
18		0.012	0.122	0.209	0.031

合物酶活性很高, **18**对ALK激酶和Karpas299细胞的 IC_{50} 分别是0.012和0.031 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,是活性最强的化合物。

4.3 苯环B的取代基变换 下一步是考察苯环B的取代基变换对活性的影响,为此,固定A环的2'位为4-四氢吡喃,合成的代表性化合物列于表2,分析构效关系如下:①将**18**的两个氟原子换成H(B环无取代),化合物**19**对ALK激酶和Karpas299细胞的活性分别降低10和5倍,提示氟原子的重要性。②保留一个氟原子(**20**),或不同位置取代的二氟的化合物**21**,活性与**18**相近,但一个氟原子变换为甲基,**22**的活性显著降低,提示缺电子的二氟苯基是必要的,这与B环同富甘氨酸环套上Phe1127发生 π - π 叠合作用有关。

Table 2 SAR of substituents on ring B

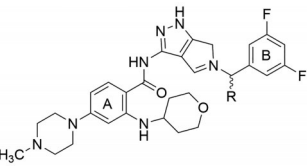


Compd.	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					
	R ₁	R ₂	ALK	IGF1R	IR	Karpas299
18	3-F	5-F	0.012	0.122	0.209	0.031
19	H	H	0.106	0.903	1.489	0.182
20	3-F	H	0.030	0.206	0.327	0.018
21	2-F	5-F	0.038	ND	0.170	0.049
22	2-CH ₃	5-F	0.181	ND	0.823	0.851

4.4 吡唑与B环的连接基的变换 为了考察吡唑环与苯环B之间的连接基对活性的影响,将化合物**18**的亚甲基做甲基取代,得到手性化合物**22**和**23**(为纯光活物质,但绝对构型未确定),活性列于表3。这两个对映体的活性略优于**18**,但考虑到制备成本和研发的复杂性,仍采用对称的CH₂为连接基。

4.5 助溶基团甲基哌嗪的变换 与苯环A相连的N-甲基哌嗪是助溶基团,以化合物**18**为基准物,变换哌嗪为其他片段,合成的化合物列于表4。结果表明,化合物

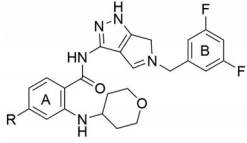
Table 3 SAR of modification of linker between indazole and phenyl ring B. a: The absolute configuration not identified



Compd.	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				
	R	ALK	IGF1R	IR	Karpas299
18	H	0.012	0.122	0.209	0.031
22	CH ₃ ^a	0.059	ND	1.163	0.041
23	CH ₃ ^a	0.019	0.132	0.189	0.016

24~27抑制ALK激酶的活性相当于或优于**18**,抑制细胞活性也相近。

Table 4 SAR of solubilizing group variations on ring A



Compd.	R	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
		ALK	IGF1R	IR	Karpas299
18	H ₃ C-N(CH ₂) ₂	0.012	0.122	0.209	0.031
24	H ₃ C-N(CH ₂) ₂ -C(=O)-CH ₃	0.015	0.364	0.457	0.050
25	HN(CH ₂) ₂	0.003	0.028	0.041	0.013
26	CH ₂ (CH ₂) ₂	0.018	0.291	0.653	0.038
27	H ₃ C-N(CH ₂) ₂ -O-CH ₂	0.009	0.181	0.196	0.043

5 体外药理学性质的比较

在高活性的化合物中选择候选化合物(表5)可从不同的角度进行,例如同时考察化合物的亲脂性与活性,是比较亲脂性配体效率(LipoLE),LipoLE的定义是化合物的 IC_{50} 的负对数与分配系数 $\log P$ 的差值,差值越大表明化合物活性越高,而且代谢稳定性好,因而是高质量的化合物。表5显示化合物**25**和**18**的质量显著高于其他化合物。**25**的活性最高,而且亲脂性也低,所以LipoLE最高。化合物**18**是次好的化合物。

就化合物对Caco-2细胞的透过性而言,除了**24**的B-A的表现透过性高于A-B外,其余化合物的A-B与B-A值相近,化合物**18**略优于**25**。

化合物对人肝微粒体和对大鼠肝细胞的代谢稳定性显示,**25**的清除率低于化合物**18**,表明**25**的体外代谢稳定性优于**18**。所以体外的物化和药代性质优胜的似乎是**25**。

6 体内药代和药效确定了候选化合物

体内药代的权重应大于体外的权重。小鼠灌胃化合物测定了药代动力学数据列于表5(只列出血浆消除半衰期 $t_{1/2}$ 和口服生物利用度 F ,其余参数省略),结果表明,化合物**18**的半衰期($t_{1/2}=3$ h)虽然低于化合物**25**($t_{1/2}=9.6$ h),但生物利用度高达77%,显著高于**25**的2.9%。化合物**9**的生物利用度高于**18**,体外活性相近,所以**9**也具有可选性。进一步用移植ALK依赖性的非小细胞肺癌NCI-H2228细胞的裸鼠,比较化合物间的治疗效果,表明化合物**18**显著优于**9**(数据省略),这样,确定了**18**为候选化合物,定名为恩曲替尼(entrectinib)。

Table 5 Physicochemical and pharmacokinetic properties of typical active compound. a: Calculated log P values; b: Lipophilic ligand efficiency, $\text{LipoLE} = \text{pIC}_{50} - \text{ACDlog } P$; c: Caco-2 cell permeability, $P_{\text{app}} \text{ A-B} [10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}] (P_{\text{app}} \text{ B-A})$; d: Human liver microsomes, $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$; e: Rat hepatocytes, $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$; f: Half life in mice orally; g: Oral availability in mice

Compd.	pIC_{50}	$\text{ACDlog } P^a$	LipoLE^b	Permeability ^c	CI/HLM ^d	CI ^e	$t_{1/2}/\text{h}^f$	$F/\%$ ^g
9	7.854	3.796	4.058	2.4 (3.0)	24	18	9.86	99
15	8.000	4.208	3.792	1.8 (5.1)	33	45	–	7.3
18	7.921	2.313	5.608	2.4 (3.0)	25	87	2.94	77
24	7.824	3.203	4.621	2.7 (19.8)	57	42	–	–
25	8.523	2.142	6.381	0.6 (4.5)	7.5	53	9.63	2.9
26	7.745	4.552	3.193	1.1 (1.9)	40	22.9	2.25	18
27	8.046	3.952	4.094	0.3 (2.0)	12	49	4.08	29.3

7 恩曲替尼的药效学特征

化合物 **18** 对 ALK 相关的激酶家族进行了生化测定, 表 6 列出的 IC_{50} , 平均值为 $12 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, K_i 的均值为 $6.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。发现其中对 ROS1 和 TRKA/B/C 的抑制活性强于 ALK, 对其他 12 个激酶的选择性在 10 倍左右, 对另外的 40 个激酶的选择性在百倍以上。

Table 6 Kinase profile of entrectinib (compound **18**)

Kinase	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Kinase	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
TRKA	0.001	IGF1R	0.122
TRKB	0.003	FAK	0.140
TRKC	0.005	FLT3	0.164
ROS1	0.007	BRK	0.195
ALK	0.012	IR	0.209
JAK2	0.040	AUR2	0.215
ACK1	0.070	JAK3	0.349
JAK1	0.112	RET	0.393

进而测定了 **18** 对 200 株癌细胞的抗增殖活性, IC_{50} 低于 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的结果列于表 7 中, 这些敏感细胞都与 ALK 高表达相关。例如间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL) 与 Karpas 299、SU-DHL-1、SUP-M2 和 SR786 激酶相关, 非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞株与 NCI-H2228 相关, 一些结直肠癌细胞与 TRKA 激酶高表达相关等。

化合物 **18** 还对依赖于白介素 3 (IL-3)、转染有 ALK、ROS1、TRKA、TRKB 和 TRKC 激酶的 Ba/F3 细胞系呈现显著抑制活性, IC_{50} 值都在低纳摩尔水平 (数据从略), 但对没有转染激酶的正常 Ba/F3 细胞活性很差 (微摩尔水平), 提示选择性很强。**18** 还对于发生突变

的 ALK 转染 Ba/F3 细胞的活性有很强的活性 ($\text{IC}_{50} = 28 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。所有这些都对多种肿瘤细胞抑制活性的特征, 成为恩曲替尼“广谱”抗肿瘤药物的治疗依据 (Menichincheri M, Ardini E, Magnaghi P, et al. Discovery of entrectinib: a new 3-aminoindazole as a potent anaplastic lymphoma kinase (ALK), c-ros oncogene 1 kinase (ROS1), and pan-tropomyosin receptor kinases (Pan-TRKs) inhibitor. J Med Chem, 2016, 59: 3392 – 3408)。

恩曲替尼经临床前和临床研究, 证明对依赖于 ALK、ROS1 和 TRKs 的肿瘤有显著疗效, 表现在对肺癌、乳腺癌、肠癌、肠癌及脑转移的患者都呈现显著疗效, 因而 FDA 于 2019 年 8 月批准上市, 成为第 2 个“广谱”抗肿瘤药物 (Wei G, Ardini E, Patel R, et al. Entrectinib is effective against the gatekeeper and other emerging resistance mutations in NTRK-, ROS1- and ALK-rearranged cancers [abstract no. 2136]. Cancer Res, 2016, 76 (14 Suppl): 2136)。

8 恩曲替尼与 ALK 激酶结合模式

恩曲替尼与 ALK 激酶的 ATP 结合区的相互作用包括以下因素: 氨基吡唑与酶的较链处的 Glu1197 和 Met1199 发生氢键结合, 二氟苄基吡唑片段进入由 Leu1256、Leu1122、Val1130 和门户残基 Leu119 组成的疏水腔中。富含甘氨酸残基的环套采取折拢型构象 (collapsed conformation), 环套上的 Leu1256 和 Phe1127 与 3,5-二氟苄基发生疏水-疏水叠合作用, 氟原子指向内部的 Gly1269 (DFG-1 残基之一) 和 Asn1254。四氢

Table 7 Antiproliferative activity of compound **18** (cell lines with IC_{50} below $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Cell line	Cancer type	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
KM12	Adenocarcinoma colon TRKA+	0.017
SU-DHL-1	Anaplastic large cell lymphoma ALK+	0.024
Karpas299	Anaplastic large cell lymphoma ALK+	0.031
SUP-M2	Anaplastic large cell lymphoma ALK+	0.041
NCI-H2228	Nonsmall cell lung cancer ALK+	0.068
SR786	Anaplastic large cell lymphoma ALK+	0.081
MV411	Biphenotypic B myelomonocytic leukemia	0.081

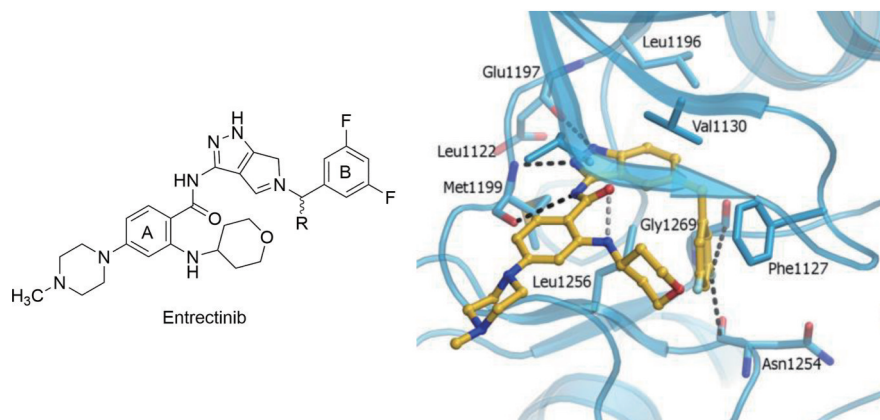


Figure 2 Binding mode of entrectinib into the ALK active site. The dashed lines indicate the hydrogen bonds and multipolar interactions

吡喃环与吡唑母核成垂直取向, 以利于填充甘氨酸环套组成的疏水腔。甲基哌嗪环没有与酶接触, 处于水

相中, 起到助溶作用。图2是恩曲替尼与ALK激酶复合物晶体结构图。