

• 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、产品开发和疗效评价等多维科技活动。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重性质。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。

克服耐药性是肿瘤治疗的永恒课题。辉瑞公司在研制了首创药物克唑替尼治疗非小细胞肺癌 (NSCLC) 7年之后,上市了本品劳拉替尼,对克唑替尼耐药的 ALK 呈阳性的 NSCLC 和脑转移患者有显著疗效。研制的路径是从克唑替尼结构出发,以结构生物学和分子模拟作指导,对变异的酶和细胞的活性和选择性、代谢稳定性、亲脂性效率和穿越血脑屏障等多项指标作为目标,在分析构效关系和微观结构特征的基础上,采用大环化合物的策略,降低构象能提高分子对靶标的结合力,将上述的诸多要求落实到形成大环化合物结构中。小分子大环化合物的研究是当今药物化学的一种策略 (Cummings MD, Sekharan S. Structure-based macrocycle design in small-molecule drug discovery and simple metrics to identify opportunities for macrocyclization of small-molecule ligands. *J Med Chem*, 2019, 62: 6843-6853)。(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-1072

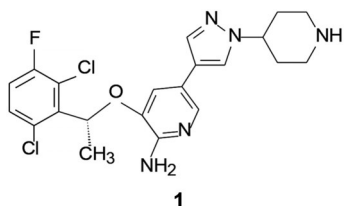
基于靶标结构研制的大环小分子药物劳拉替尼

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 研发背景

辉瑞公司于 2011 年研发上市的克唑替尼 (1, crizotinib), 针对的靶标是恶性实体瘤间变性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, ALK), ALK 与核磷蛋白 (nucleophosmin, NPM) 的融合蛋白高表达于肿瘤细胞, 该融合蛋白是发生间变性淋巴瘤、炎性肌纤维细胞瘤和非小细胞肺癌的关键性酶。克唑替尼还抑制 MET 和 ROS1 等激酶, 成为治疗非小细胞肺癌 (NSCLC) 的首创性药物, 也是首选治疗药。然而使用中出現耐药性和难以进入中枢的缺点 (NSCLC 常常发生脑转移), 辉瑞公司继续研制克服耐药性和能够透过血脑屏障治疗脑转移的新一代 ALK 抑制剂。



2 活性评价

2.1 生化法测定受试物对激酶的抑制活性 用杆状病毒表达野生型和发生 L1196M 突变的 ALK 蛋白激酶域 (氨基酸 1093~1441), 经 Mg-ATP 自磷酸化预活

化后, 用微流控迁移率测定法, 测定和计算受试物的 K_i 或 IC_{50} 值。

2.2 受试物对激酶选择性的测定 评价受试物对 160 种激酶的活性, 使用基于荧光共振能转移 (FRET) 的 Z-LYTE 检测法, 或基于时间分辨荧光共振能转移 (TR-FRET) 的 Adapta 检测法, 若受试物呈现低或无活性, 提示有较少的脱靶作用。

2.3 对细胞中磷酸-ALK 的活性测定 用 ELISA 方法测定不同浓度受试物对高表达野生或突变的磷酸-ALK 的活性抑制作用, 计算受试物的 IC_{50} 值。

2.4 测定并计算受试物的亲脂性效率 亲脂性效率 (LipE) 的定义是受试物的 IC_{50} (或 K_i) 值的负对数减去受试物的分布系数, 即 $LipE = pIC_{50}(\text{or } pK_i) - \log D$, LipE 数值越大受试物质量越高。由于 $\log D$ 表征了化合物的亲脂性, 亲脂性与体内的氧化清除率又呈正相关, 高 $\log D$ 值不利于药代行为, 因而 LipE 的意义是评价受试物每单位亲脂性与靶标结合的效率 (Freeman-Cook KD, Hoffman RL, Johnson TW. Lipophilic efficiency: the most important efficiency metric in medicinal chemistry. *Future Med Chem*, 2013, 5: 113-115)。

3 以克唑替尼为先导物的优化

3.1 ALK 突变细胞的耐药性和结构生物学特征 持

续应用克唑替尼引起 ALK 激酶的点突变和残基插入, 患者口服剂量是 $250 \text{ mg} \cdot \text{day}^{-1}$, 每日 2 次, 血药浓度平均为 $45 \sim 70 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 只接近于体外野生型 (wt) 的重组 3T3-EML4-ALK 细胞的 IC_{50} , 低于单点突变细胞的 IC_{50} 大约 2~38 倍, 所以治疗剂量下克唑替尼对耐药株无效。表 1 列出了克唑替尼对野生株和突变株的抑制活性。

Table 1 Cell-based efficacy of crizotinib against wild type and various mutants of ALK ($\text{IC}_{50}/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Compd.	wt	L1196M	G1269A	S1206Y	C1156Y	F1174L	L1152R
1	80	843	605	626	478	165	1 026

结构生物学研究提示, 耐受克唑替尼患者的 ALK 激酶与克唑替尼的复合物单晶显示多位点发生残基变异或插入, 如图 1a 列出的突变和插入位点, 其中 L1196M、G1269A 和 G1202R 是直接与克唑替尼接触的残基, L1196 是门户氨基酸残基, 是最容易发生变异的守门员。

由于患者 ALK 激酶最容易发生突变 L1196M, 因而用 L1196M 激酶和重组表达 L1196M 的细胞作为评价化合物的首选标准, 达到设定的标准后进一步评价对其他突变位点的 AKL 的活性。

克唑替尼 (**1**) 与 ALK 野生型和 L1196M 突变型的晶体结构 (图 1a) 表明, 分子的定位和结合模式几乎完全相同, 例如, 虽然门户氨基酸残基发生变异, 但 **1** 与野生型铰链处的 M1199、E1197 和 L1196M 的氢键结合与距离几乎完全相同; **1** 的环外胺基与门户氨基酸残基 L1196M 及 R-甲基的疏水结合也相同; 吡啶环和二氯氟苯基片段的结合模式也相同。图 1b 是克唑替尼与 ALK (灰色) 和 L1196M 突变型 (青色) 晶体结构的叠合图。

3.2 考察二氯原子的作用 仔细比较 ALK 空蛋白与 ALK-克唑替尼复合物的晶体结构, 发现分子的头端基 (head group) 二氯氟苯基的 2-氯与 G1269 骨架的羰基非常靠近, 迫使该羰基扭转了 30° , 提示 2-氯对结合构成不利因素。为此合成了去 2-氯化合物 **2**, 测定了对 L1196M ALK 酶和细胞活性、清除率、过膜性和 $\log D$, 并计算亲脂性效率 LipE, 列于表 2 中。结果提示化合物 **2** 的活性、清除率和亲脂性效率都优于克唑替尼, 因而苯环的 2 位不宜有取代基。

为了考察分子头端基的 6-氯对活性和药代的影响, 固定 2-去氯克唑替尼的结构不变, 合成的代表性化合物列于表 3。化合物 **4**~**6** 的酶与细胞活性都高于氟

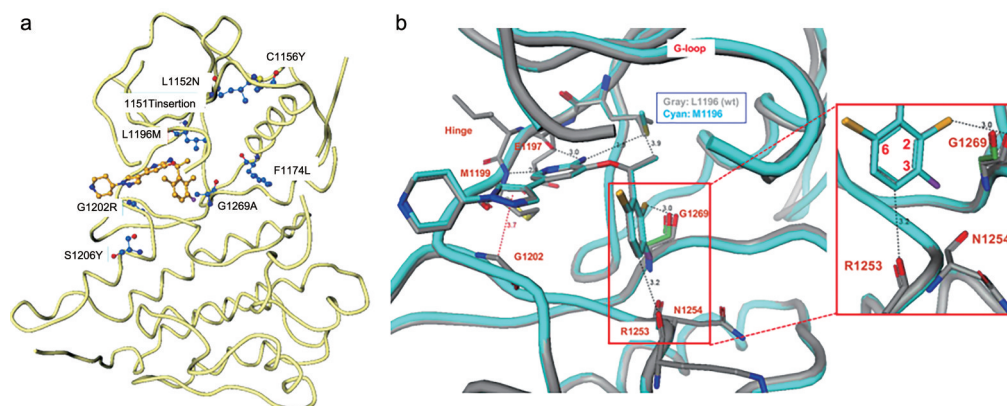
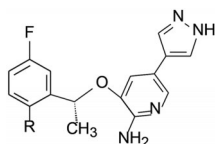


Figure 1 a: Crystal structure of crizotinib bound to the ALK kinase domain, showing the positions of clinically identified crizotinib-resistant mutations. b: Co-crystal structure of crizotinib with ALK wt (gray) overlaid with L1196M mutant (cyan) and the G1269 residue from L1196M apo structure

Table 2 Potency, ADME, and efficiency of crizotinib (**1**) and its des-2-chloro analog (**2**). a: $\log D$ measured at pH 7.4; b: HLM CL refers to the total intrinsic clearance obtained from scaling *in vitro* half-lives in human liver microsomes; c: RRCK cells with low transporter activity were isolated from Madin-Darby kidney cells and were used to estimate intrinsic absorptive permeability; d: $\text{LipE} = -\log K_i - \log D$



Compd.	R	L1196M Enz/nmol·L ⁻¹	L1196M cell/nmol·L ⁻¹	$\log D^a$	HLM CL ^b /mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	RRCK ^c $P_{app}(A \text{ to } B)/10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	Lip E ^d
1	Cl	8.2	843	2.0	44	0.8	6.1
2	H	5.0	387	1.7	27	2.3	6.5

取代物 **3**, 推测大体积基团有利于结合, 而电性因素不明显, 亲脂性效率优于 **3**。其中甲氧基 (**5**) 和三唑基 (**6**) 的细胞活性优于氰基取代 (**4**)。然而甲氧基的代谢稳定性不如三唑基, 而且后者的过膜性也优于 **5**, 所以化合物 **6** 优于其他化合物。

化合物 **6** 与野生型 ALK 激酶的共晶结构与克唑替尼与 ALK 的共晶结构相比较 (图 2), 其重要区别是三唑环与苯环的两面角呈 60° , 同 ALK 的 G-环套骨架的 L1122-G1123 存在相互作用, 而克唑替尼的氯原子达不到此处, 同时 G1269 的羰基仍处于像脱辅蛋白那样呈无拘束状态, 而克唑替尼的氯原子则有位阻的干预, 这就是化合物 **6** 的优胜之处。不过 **6** 的结构中末端无取代的吡唑环可被葡萄糖醛酸苷化而容易清除, 需要对这一位置作结构优化。

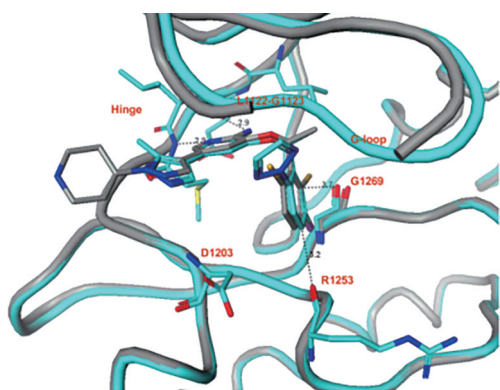


Figure 2 Co-crystal structures of crizotinib/ALK wt (gray) and **6**/ALK wt (cyan)

3.3 分子尾端的变换 为了避免吡唑环的葡萄糖醛苷化, 将吡唑 *N*-甲基化, 化合物 **7** 和 **8** 的抑制酶活性基本不变, LipE 值与 **6** 也相近。**7** 的清除率并没有改善, 但 **8** 增加了代谢稳定性, 这可能与氰基拉电子降低了电荷密度相关。变换成 1-吡唑 (**9**) 或三唑 (**10**) 的 LipE 值降低 0.5 对数单位, 所以是不利的。噻唑环与吡唑环比较, LipE 值降低了 0.4。图 2 的晶体结构显示一些极性基团如羰基和 Asp1203 的羧基靠近酶的边缘, 临接水

相。正是由于尾端芳环所处的位置, 可在此处连接亲水性基团, 因而合成了含有羟基侧链的化合物 **13** 和 **14**, 以助进入水相。**14** 的活性和 LipE 明显高于 **13**, 复合物的晶体显示, **14** 的叔醇基与 Asp1203 羧基发生氢键结合, 而 **13** 的叔醇基团位置不适宜, 不能提供结合助力 (图 3)。

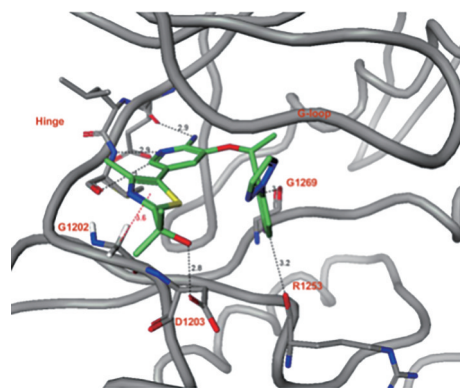


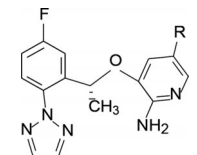
Figure 3 Co-crystal structure of **14** and ALK wt protein










图 3 还显示了 **14** 的噻唑环与胺基吡啶的两面角旋转了 30° , 这种构象使得 Gly1202 的 C-H 与噻唑环的 π 电子云发生了有利的结合作用。表 4 化合物的吡啶-杂环构象经计算表明, 环的平面夹角为 30° 是最适宜的构象, 例如化合物 **15** 的两面角若呈 30° , 需要付出 $1.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的扭转能, 所以 **15** 的活性低于化合物 **9** 大约 25 倍, LipE 降低 0.5。化合物 **14** 的活性最强, 但亲脂性也强, 因而 LipE 不高, 下一步是降低噻唑环上取代基的亲脂性, 以改善化合物的药代性质。

3.4 噻唑环的取代基变换 以化合物 **14** 为优化的新起点, 变换噻唑环的侧链, 合成的化合物列于表 5。分析构效关系如下: ① 侧链的偕二甲基变换成氮杂环丁烷 (**16**), 活性未变, 但清除率增高, 不过由于亲脂性降低, LipE (酶水平) 增高。**16** 因极性加大, 细胞活性降低, 故细胞水平的 LipE 降低。② 化合物 **17** 对酶的活性影响不大, 但细胞活性降低了, 代谢稳定性也显著降低。环砜化合物 **18** 的细胞活性提高, LipE 值略有改

Table 3 Potency, ADME, and efficiency of the substituted fluorophenyl head group

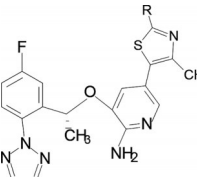
Compd.	R	L1196M		log <i>D</i>	HLM CL/mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	RRCK		Lip E
		Enz/nmol·L ⁻¹	cell/nmol·L ⁻¹			<i>P</i> _{app} (A to B)/10 ⁻⁶ cm·s ⁻¹		
3	F	16	1 254	3.4	31	18	4.3	
4	CN	11	805	2.7	37	20	5.2	
5	OCH ₃	2.0	69	3.5	65	14	5.2	
6		2.6	60	3.3	46	21	5.3	

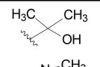
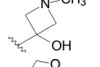
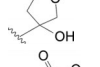
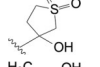
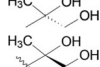

Table 4 Potency, ADME, and efficiency of tail substitution


Compd.	R	L1196M	L1196M	log <i>D</i>	HLM	RRCK	Lip E
		Enz/nmol·L ⁻¹	cell/nmol·L ⁻¹		CL/mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	<i>P</i> _{app} (A to B)/10 ⁻⁶ cm·s ⁻¹	
6	—	2.6	60	3.3	46	21	5.3
7		2.6	176	3.4	68	27	5.2
8		2.8	105	3.3	22	18	5.2
9		7.5	677	3.3	17	22	4.8
10		70	2 650	2.4	3	24	4.7
11		1.3	256	3.7	38	14	5.1
12		15	772	3.1	49	22	4.7
13		6.1	328	3.6	49	14	4.6
14		0.4	27	3.6	23	18	5.8
15		190	—	2.4	80	21	4.3

善。③ 噻唑环上含有二羟基丙基侧链的化合物 **20** (*R* 构型) 的酶和细胞活性以及代谢稳定性都显著提高, 亲脂性效率也比较高。

化合物 **20** 对 ALK 野生型和 L1196M 突变型的酶和细胞有显著高的抑制活性, 适度的亲脂性 ($\log D$ 2.9) 和高 LipE 值, 曾拟作为候选物作深入研发, 并且制备

Table 5 Potency, ADME, and efficiency of substituted thiazoles


Compd.	R	L1196M	L1196M	log <i>D</i>	HLM	RRCK	Lip E (enz)	Lip E (cell)
		Enz/nmol·L ⁻¹	cell/nmol·L ⁻¹		CL/mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	<i>P</i> _{app} (A to B)/10 ⁻⁶ cm·s ⁻¹		
14		0.4	27	3.6	23	18	5.8	4.0
16		0.3	52	2.6	55	3.4	6.9	4.6
17		0.6	58	3.3	138	21	5.9	3.9
18		2.6	19	3.2	13	14	5.4	4.5
19		1.1	55	2.9	15	17	6.1	4.4
20		0.2	6.6	2.9	15	19	6.8	5.3

和分析了 **20** 的晶体结构的结合模式 (图 4), 显示出分子呈倒 U 形的构象, 噻唑环侧链上的两个羟基与 Asp1023 形成强力的氢键结合, 是其高活性的重要因素。然而, 因为双羟基的极性增加, **20** 透入脑脊髓的能力很弱 (大鼠), 有明显的细胞外排作用, 故而不予入选, 须另辟蹊径 (Huang QH, Johnson TW, Bailey S, et al. Design of potent and selective inhibitors to overcome clinical anaplastic lymphoma kinase mutations resistant to crizotinib. *J Med Chem*, 2014, 57: 1170–1187)。

3.5 考察酰胺替换三唑的效果 在早期变换克唑替尼的苯环取代基中, 化合物 **5** (苯环为甲氧基取代) 与 **6** (苯环为三唑基取代) 的活性和稳定性相似, 推测可

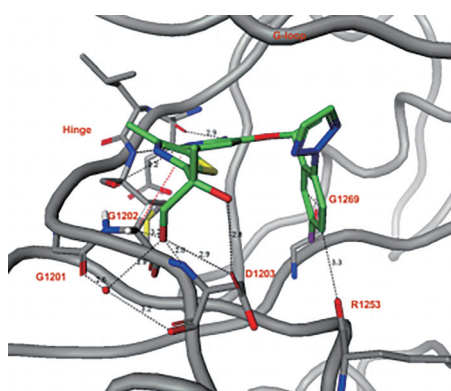


Figure 4 Co-crystal structure of **20** and ALK L1196M protein

Table 6 Potency, ADME, and efficiency of amide substituents

Compd.	Structure	L1196M Enz/nmol·L ⁻¹	L1196M cell/nmol·L ⁻¹	log <i>D</i>	HLM CL/mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	MDR BA/AB (ratio)	Lip E (cell)
1		8.2	843	2.0	44	44.5	4.1
5		2.0	69	3.5	65		5.2
21		2.6	176	3.4	66	1.5	3.4
22		35	1 665	2.1	28	17.0	3.7
23		310	–	2.1	58	7.6	–
24		8.2	312	3.0	78	4.4	3.5
25		1.4	54	3.4	10	1.4	3.9

变换为其他含有氢键给体的基团, 从而合成了酰胺化合物, 也保障基团与苯环的共面性。代表性的化合物列于表 6。结果提示, 化合物 **22** 活性不如 **21**, 但分布系数降低, 代谢稳定性提高, 导致亲脂性效率提高。**23** 的酰胺氮被二甲基取代, 不利于活性, 可能是二甲胺基对吡唑环有位阻作用。尾端的吡唑环用取代的苯环取代, **24** 的活性显著高于 **23**, 只是由于分布系数使亲脂性效率略有损失。甲磺苯基取代的 **25** 虽然有较好的数据, 但选择性不高 (数据省略)。

4 大环路径

4.1 晶体结构的启示 化合物 **24** 与 ALK 激酶共晶结构显示 (图 5, 青色分子), 酰胺的羰基氧经水分子的桥连, 与 His 1124 的骨架羰基形成氢键, 而未能与 Lys1150 发生氢键结合, 因为酰胺平面与苯环两面角为 45°, 氢键的形成需要更加垂直的两面角取向, 这可从图 5 的 **25** (绿色分子) 晶体结构的三唑环与苯环的较垂直的两面角 64° 看出。因而氮上的甲基不能与 G-环套上 Leu1122、Gly1123 和 Val1130 的疏水腔发生疏水-疏水相互作用, 这是 **25** 活性强于 **24** 的重要因素。同时, 晶体结构还显示了这些抑制剂的 U 形构象, 突显了头端的氟苯基与尾端的杂环在空间的接近, 成为进一步分子设计的切入点, 即形成大环。

4.2 大环化合物的设计 开链分子折叠呈 U 形活性

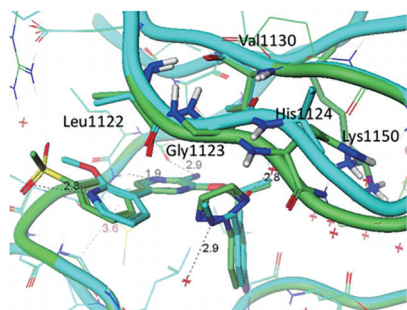


Figure 5 ALK cocrystal of **24** (cyan) overlaid with **25** (green) showing the triazole, amide, and G-loop conformations

构象损失的构象熵, 可以通过连接首尾端基呈大环分子固定下来, 加以克服, 同时连接的片段还可对疏水结合做出贡献。成环后分子中的单键转动也受到限制, 从而可弥补简化结构损失的结合能, 以有利于穿越血脑屏障进入中枢神经系统中。为此将化合物**5**的甲氧基或**22**的酰氨基与尾端的吡唑环经不同的连接基形成大环分子。

4.3 醚键连接的大环化合物 以化合物**5**作为起始物, 设计合成含醚键的12~14元环化合物, 结构与活性参数列于表7。所设计的成对的化合物活性提示, 较小的12元环化合物**26**、**28**和**30**的LipE值高于相应环较大的化合物**27**、**29**和**31**。其中**30**的亲脂性效率高达4.4, 对突变型酶的活性达到 $0.57 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而且穿越细胞的能力也较强($\text{IC}_{50} 20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。然而大环醚

化合物的亲脂性较高, 难以同时达到活性、药代和穿越血脑屏障的目标。

4.4 酰胺连接的大环化合物 上述含醚键大环分子的构效关系提示, 12元环为优选的环尺寸, 为降低分子的亲脂性, 用酰胺置换醚键, 维持12元环, 在酰胺与吡唑以一碳相连。酰胺的氮甲基化是为了增强与G环套的Leu1122、Gly1123和Val1130构成的疏水腔的结合作用。化合物的log*D*可保持在2~3。合成代表性的化合物结构与活性参数列于表8, 简要的构效关系如下:

① 化合物**32**的活性显著提高, 与非环化的化合物**21**相比, 对ALK-L1196M变异的细胞活性提高了10倍, 而且亲脂性降低1个单位, 因而**32**的LipE比**21**提高了2个单位。代谢稳定性也因环状结构而提高了, 例如与**32**相对应的开链分子**23**的清除率高达 $58 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 而**32**只有 $8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 糖蛋白对**32**的外排作用也显著低于**23**, 所以内酰胺大环分子的活性和稳定性有巨大的改善。② 大环上甲基的构型对活性有显著影响, *R*构型为优映体, *S*为劣映体, 如**32**和**35**比相应的对映体**33**和**36**的活性分别提高210和610倍。没有甲基的**34**亲脂性效率也低于**32**。③ 氨基吡啶和氨基吡嗪的成对分子(**32/35**、**37/38**、**39/40**)的活性提示, 含吡嗪的化合物活性高于吡啶系列, 但LipE的提高并不显著, 原因是多出的氮原子隐于分子中, 非但不能发生水合有助于溶解性, 还降低了氨基吡啶的碱性。④ 含甲

Table 7 Potency and efficiency of the ether-linked macrocycles

Compd.	Structure	L1196M Enz/nmol·L ⁻¹	L1196M cell/nmol·L ⁻¹	log <i>D</i>	Lip E (cell)
26		1.6	101	3.0	4.0
27		<0.1	112	3.6	3.4
28		29	654	3.4	2.8
29		36	3 655	3.1	2.3
30		0.57	20	3.3	4.4
31		0.63	21	3.8	3.9

磺酰基的化合物 **39** 和 **40** 的活性与 **32** 和 **35** 相当, **40** 的 LipE 值最高, 可能是磺酰基可溶剂化而降低了亲脂性, 也不会为了去溶剂化而耗费能量。

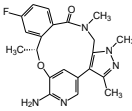
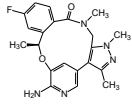
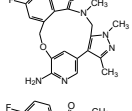
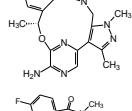
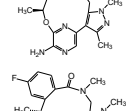
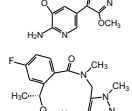
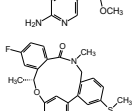
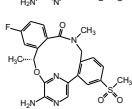

4.5 基于结构生物学的选择性分析 ALK 激酶的 ATP 结合腔由 27 个氨基酸残基构成, 为了提高结合的选择性, 要针对与其他激酶的 ATP 的不同组成上。在全部激酶家族中 ALK 激酶的 Leu1198 占 26%, 但多数激酶 (60%) 为 Phe 或 Tyr, Leu 残基体积小于 Phe 和 Tyr, 依此设计的结构若适于同 Leu 的结合而与 Phe 和 Tyr 发生位阻效应, 应可以提高选择性。由于原肌球蛋白激酶 (TrkB) 相应于 ALK Leu1198 为 Phe/Tyr, 因而作为模板进行选择性的设计大环结构和活性评价。

化合物 **32** 与 ALK 和与 TrkB 晶体结构的叠合, 显示了 **32** 与 ALKLeu1198 和 TrkB Tyr635 的相对位置 (图 6a), 可以看出 **32** 的吡唑环上甲基碳原子与 TrkB Tyr635 的酚羟基 (OH)、与羟基相连的碳 (CZ) 和邻位碳 (CE) 的距离都在原子的范德华半径允许范围内 (图 6b), 无怪乎 **32** 对 ALK 缺乏选择性作用。

4.6 新化合物的合成 基于 **32** 缺乏选择性作用, 设计合成的化合物 **41**~**44**, 都是在吡唑环的邻位引入比甲基大的基团, 测量了与 TrkB 的共晶体结构吡唑的邻位原子与 Tyr635 三点 (OH、CZ、CE) 的距离, 化合物 **42**~**44** 的距离都小于两个原子间的范德华半径, 提示这些化合物会与 Tyr635 发生碰撞, 具有选择性结合作用。

表 9 列出了化合物的结构、活性、选择性和吡唑取代的碳原子与 Tyr 的三原子距离范围。化合物 **32**、**41** 和 **42** 抑制酶和细胞活性显著强于 **43** 和 **44**, 提示吡唑或咪唑并合了六元环体积过大难以与 ALK 激酶结合。甲基吡唑 (**32**) 或环丙基吡唑 (**41**) 的分布系数和清除率虽然与氨基吡唑 (**42**) 相近, 但对 TrkB 激酶活性很高, 意味着选择性不强, 晶体学数据提示与 Tyr635 原子间距离也显示有结合作用。化合物 **42** 显示对 L1196M 突变型激酶和细胞活性、选择性、分布系数和代谢稳定性等都优于 **32** 和 **41**, 晶体结构的原子间距离为 2.1~3.1Å, 会发生原子碰撞, 难以同 Tyr635 结合, 这与实验结果的高选择性 (32 倍) 相一致。

Table 8 Potency and efficiency of the amide-linked macrocycles

Compd.	Structure	L1196M Enz/nmol·L ⁻¹	L1196M cell/nmol·L ⁻¹	log <i>D</i>	Lip E (cell)	HLM CL/mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	MDR BA/AB (ratio)
32		0.29	14	2.2	5.7	8.6	4.2
33		61	—	2.2	—	8.0	6.0
34		1.9	97	2.0	5.0	8.4	5.5
35		0.1	1.4	2.5	6.4	8.0	2.2
36		61	1 230	2.5	3.4	9.7	3.1
37		0.1	2.1	2.4	6.3	8.3	2.8
38		<0.02	0.75	2.7	6.4	23.5	2.0
39		0.4	21	1.8	5.9	9.1	9.2
40		0.12	1.9	2.2	6.5	8.0	6.7

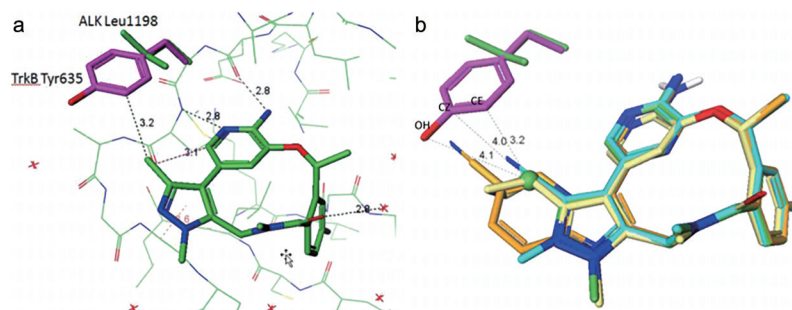


Figure 6 a: Compound **32**-ALK-bound structure (green) and **32**-TrkB (purple) with selectivity residues highlighted. PDB atom names for the terminal atoms are shown on Tyr635 (OH, CZ, CE). b: Ligands from ALK cocrystal structures aligned with TrkB, demonstrating the potential for clash between ligand and Tyr635 [**32** (CH₃, green), **41** (cyPr, yellow), **42** (CN, cyan), **44** (orange)]. Distances shown are between the **32** methyl carbon (shown as a ball) and TrkB Tyr635

4.7 化合物在中枢神经的生物利用度 多药耐药的犬肾细胞 (MDRK-MDR1) 有高表达的糖蛋白 (Pgp), 是评价药物外排作用的常用模型, 化合物对 MDRK-MDR1 的外排作用也是评价脑与脊髓液中药物与血浆中药物分布关系和比值的参考依据 (He H, Lyons KA, Shen X, et al. Utility of unbound plasma drug levels and P-glycoprotein transport data in prediction of central nervous system exposure. *Xenobiotica*, 2009, 39: 687–693)。对 MDRK-MDR1 的 BA/AB 外排比值 (efflux ratio) 低于 2.5 的化合物, 预示有较低的外排性, 有利于药物向中枢的分布。化合物 **32**、**43** 和 **44** 的外排比 MDR BA/AB 都超过 2.5, 意味着糖蛋白的强泵出作用, 难以穿越血脑屏障。而 **41** 和 **42** 的比值低于 2.5, 预示

容易进入中枢, **42** 对中枢较好分布也是胜出的因素。

5 候选物的确定和劳拉替尼的上市

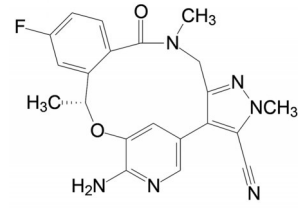
基于化合物 **42** 的高活性和选择性, 体外低清除率和外排作用, 并且对野生型和临床发生的多种变异的 ALK 癌细胞有很强的活性 (IC_{50} 为 $1\sim 1.3\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 对 ALK 和 ROS1 激酶具有高选择性抑制活性, 进而对 206 个重组激酶的作用除有 10 个显示边缘活性外 (低于对门户残基 L1196M 突变的细胞活性 100 倍), 其余都未显示抑制作用。血浆消除半衰期 $t_{1/2}$ 为 2.7 h, 大鼠口服生物利用度 100%。灌胃大鼠测定血浆、大脑和脊髓液中化合物的曲线下面积 (AUC), 表明 **42** 对血脑屏障有良好的穿越性 (数据从略), 为此确定 **42** 为候选化合物, 定名劳拉替尼 (lorlatinib), 经 III 期临床研究, 表

Table 9 Potency, ADME, and selectivity of macrocyclic analogues. *Distances between carbon on pyrazol with atoms on Tyr as defined in Figure 5

Compd.	Structure	L1196M Enz /nmol·L ⁻¹	L1196M cell /nmol·L ⁻¹	log <i>D</i>	HLM CL /mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	MDR BA/AB (ratio)	TrkB <i>K_i</i> /nmol·L ⁻¹ (selectivity)	Distance /Å*
32		0.29	14	2.2	8.6	4.2	0.5 (1.7×)	3.2–4.1
41		<0.1	5.8	2.9	14.6	2.0	0.4 (2.0×)	3.2–3.7
42		0.70	2.1	2.3	<8	1.5	23 (38×)	2.1–3.1
43		2.0	365	45	2.4	<8	77 (39×)	2.0–2.3
44		0.4	45	2.4	<8	5.8	65 (93×)	1.0–1.8

明对 ALK 和 ROS1 呈阳性的非小细胞肺癌以及对克唑替尼耐药的患者有显著治疗作用, 对脑转移患者也有显著疗效, 于 2018 年批准上市 (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), an inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and crsoncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and

broad spectrum potency against ALK-resistant mutations. J Med Chem, 2014, 5: 4720-4744)。



Lorlatinib