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2021年第8期刊登了索托雷塞条目 (时称索托拉西), 是安进公司于2021年6月上市的KRAS^{G12C}抑制剂, 治疗非小细胞肺癌, 成为变构抑制和划时代的首创性药物。本品阿达雷塞由Array BioPharma公司研制, 2022年6月上市, 也是治疗KRAS^{G12C}变异的晚期肺癌患者。后继一年批准上市意味着独立研究、没有借鉴和参考, 所以本质上也具有首创意义。针对突变的KRAS^{G12C}隐匿性, 两家研制者都利用共价结合, 攻击变异的亲核性强的半胱氨酸的巯基, 而且也都在结构生物学指引下进行设计。但具体的路径和优化的内容不同, 因而结构类型不同, 读者可在细节的对比中领略不同的技术应用。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0184

变构抑制剂阿达雷塞的研制

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 引言

癌基因中*KRAS*是最常发生突变的基因, 高居《人癌体细胞突变目录》(COSMIC) 700个之首位, 尤其在胰腺、结直肠和肺癌占比很重。KRAS最常发生的是Gly12突变成Cys12, KRAS^{G12C}。虽然以RAS为靶标的药物研究已30多年, 但因该蛋白缺乏适宜的结合腔穴而成效甚微, 被认为是非成药性靶标。该KRAS^{G12C}隐藏在变构腔穴中。最早确定成为靶标的科学突破是Shokat等发现在KRAS开关-II效应区附近有个未被发现的腔穴, 用带有亲电基团的化合物可以捕获腔穴中的Cys12, 发生共价结合, 将结合的GDP锁定为非活性状态 (Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al. K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. Nature, 2013, 503: 548−551)。

2 活性评价

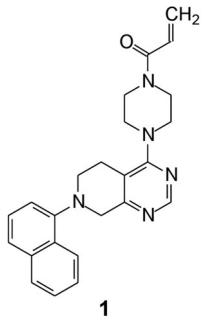
2.1 化合物对KRAS^{G12C}酶的抑制活性 一定量的KRAS^{G12C}的缓冲溶液加入3 nmol·L^{-1}受试化合物混匀, 在15 min、3 h和24 h时间点淬灭反应, 滤除缓冲剂, 蛋白的乙腈溶液注入LC-MS测定每个蛋白质的质量数占样品总蛋白的%含量, 再经空白液的蛋白量作归一化处理, %值称作POC (对照%含量), 相比空白的增加值就是被受试物结合的%数, 越大表明受试物活性越高。

2.2 化合物对细胞的抑制活性 用表达KRAS^{G12C}不同的细胞和表达野生KRAS细胞分别与经3倍稀释的受试化合物温孵, 洗涤后加入Phospho-ERK1/2抗体和GAPDH液, 温孵, 磷酸缓冲液洗涤后, 加入抗家兔AlexaFluor 680抗体和抗小鼠IRDye 800CW, 温孵, 用红外扫描仪测定phospho-ERK 1/2信号, 与空白对照计算化合物抑制细胞生长的半数有效浓度IC$_{50}$。浓度越低活性越强。

3 先导化合物和初步优化

3.1 3-羟基-1-萘基化合物的发现 经过系统地筛选含有亲电基团的化合物库发现的苗头化合物, 经基于酶结构的分子设计得到了化合物**1**, **1**中含有的亲电基团是丙烯酰胺片段, 是与Cys12共价结合基团。图1是化合物**1**与KRAS^{G12C}复合物单晶结构图。丙烯酰胺与Cys12侧链SH共价结合清晰可见, 酰基与Lys16的氨基形成氢键 (用红色虚线表示), 嘧啶的N1与His95的NH也发生氢键结合, 萘环进入了由Val9、Met72、Phe78、Tyr96、Ile100和Val103组成的疏水腔中。基于**1**所处的空间状态, 设计合成了第一轮化合物列于表1。

表1化合物的酶和细胞活性显示, 1-萘基 (**1**) 和4-吲唑基 (**2**) 有近似的酶活性, 但较弱, 变换成取代苯基的**3**和**4**酶活性更弱, 可解释为与疏水腔结合减弱的缘故。这些化合物在16 μmol·L^{-1}浓度下都没有显示细胞活性。化合物**5** (3-羟基-1-萘基) 在浓度为5 μmol·L^{-1}时抑酶活性达99%, 而且抑制细胞的IC$_{50}$ = 7.6 μmol·L^{-1}, 显示出活性。但7-羟基-1-萘基 (**6**) 没有任何活性, 羟



1

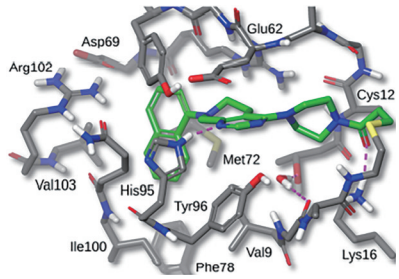
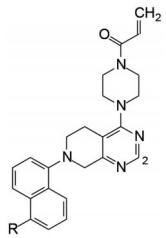
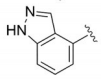
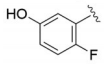
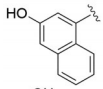
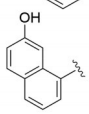


Figure 1 X-ray crystal structure of **1** in complex with KRAS-G12C

Table 1 Comparison of naphthyl replacement SAR. a: IC_{50} of suppression of ERK phosphorylation for ERK of H368 cells at 3 h time point (the same below)

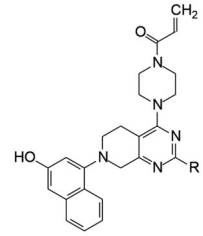


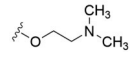
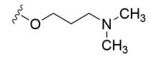
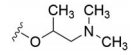
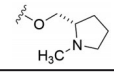
Compd.	R	POC (3 h, 5 μmol·L^{-1})	H368 IC_{50}/μmol·L^{-1} a
1		13%	>16
2		22%	>16
3		2%	>16
4		2	>16
5		99%	7.6
6		0%	>16

基的位置很重要。

3.2 C2碱性侧链有助于结合 进一步分析嘧啶的C2接近Glu62的侧链羧基, 若C2引入碱性基团, 与Glu62羧基的静电引力可提高结合力。以**6**为新的起点合成的化合物列于表2。测定表2化合物的抑酶活性是用3 μmol·L^{-1}的受试物浓度, 观察15 min对蛋白的共价结合%数。可以看到由于C2连接了碱性侧链**7**～**9**的酶和细胞活性都显著强于**6**, **9**的活性强于**7**和**8**, 提示降低柔性有利于活性。**9**是手性化合物, 测定的样品是混旋体, 而生成复合物的晶体结构是*R*-**9**, 将*S*-**9**分子对接到KRAS-G12C中能量显著增高, 提示*R*-**9**是优映体。化合物**10**为*N*-甲基四氢吡咯, 减少一柔性键, 其*R*构型活性非凡的高。*R*-**10**体内小鼠实验表明有良好的抑瘤作用和量效关系, 对野生型KRAS和其他蛋白没有抑制作用。但*R*-**10**口服吸收差 (F = 2.4%) 和酚羟基发生广泛II相代谢 (葡醛酸化和硫酸化), 仍需进一步优化 (Fell JB, Fischer JP, Baer BR, et al. Discovery of tetrahydropyridopyrimidines as irreversible covalent inhibitors of KRAS-G12C with *in vivo* activity. ACS Med Chem Lett, 2018, 9: 1230−1234)。

Table 2 Exploration of the basic C-2 side chain

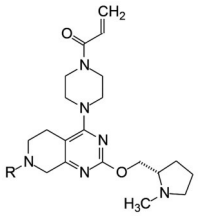


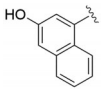
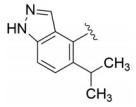
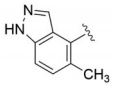
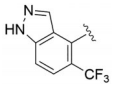
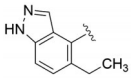
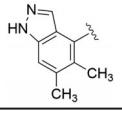
Compd.	R	POC (15 min, 3 μmol·L^{-1})	H368 IC_{50}/μmol·L^{-1}
6	H	8%	7.6
7		52%	1.9
8		22%	1.5
9		21%	0.54
10		84%	0.070

4 改善药代动力学的优化

4.1 变换萘酚环 化合物**10**与KRAS-G12C的晶体学分析表明, 萘环与Val9、Met72、Phe78、Tyr96、Ile100和Val103形成的疏水腔有良好的契合, 酚羟基与Asp69的羧基氢键结合 (图省略)。下一轮设计了简单取代吲唑置换萘酚, 烷基取代可能是弥补疏水之不足, 吲唑既有双环的体积, 也有氢键给体。合成的化合物列于表3。**11**～**13**低活性, 而三氟甲基和二甲基取代的**14**和**15**活性仅降低2～3倍, **14**和**15**有一定的代谢稳定性, 肝提取率 (HER) < 55%, 低于**10**大约8倍。但被糖蛋白的外排作用显著, 因而吲唑系列不再做深入研究。

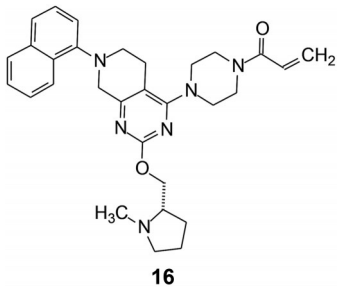
Table 3 Exploration of substituted indazoles as hydroxy naphthyl replacements



Compd.	R	H368 IC_{50}/nmol·L^{-1}	Compd.	R	H368 IC_{50}/nmol·L^{-1}
10		142	**13**		1 180
11		1 080	**14**		351
12		1 500	**15**		254

4.2 再回到萘系列 化合物**10**的主要问题是过膜性差和易代谢性, 后者是羟基的II相代谢所致, 因而合成了没有羟基的化合物**16**, **16**的活性低于**10**, 但小鼠实验表明其代谢稳定性、过膜性和生物利用度优于**10**。为了确定优化活性的方向, 分析**16**与KRAS-G12C复合物晶体结构 (图2), 一个重要特征是在哌嗪附近有个结构水分子与Thr58的羟基和Gly10的羰基同时形成两个氢键。因此, 若在哌嗪环上引入可发生氢键结合的基团, 代替结构水分子的氢键结合, 会提高化合物活性 (二元复合物比三元的生成熵效应占优)。

4.3 哌嗪环连接羟烷基或氰烷基 为此, 将羟烷基或氰烷基连接在哌嗪环的2或3位, 合成的代表性化合物列于表4。结果表明, 羟甲基或羟乙基无论在哌嗪的2或3位 (**17**～**20**) 活性与**16**基本相同, 提示羟基未能履行结构水的氢键介导作用。2-氰甲基**21** (消旋体) 的活性显著增强, 高于**16**大约300倍, 拆分成光活体, *S*-**21**强于*R*-**21**大约100倍。然而3-氰甲基 (**22**) 活性近于**16**。氰基除介导形成氢键外, 拉电子性增强了丙烯酰胺的亲电性, 加速了亲核加成的速率, 例如**16**与谷胱甘肽的共价结合消耗的$t_{1/2}$ = 17 h, 而*S*-**21**和*R*-**21**的$t_{1/2}$分别为4和1 h。



16

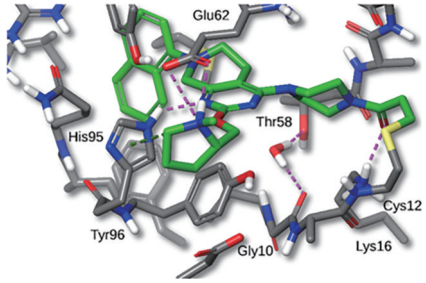
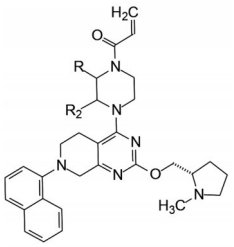


Figure 2 X-ray crystal structure of compound **16** bound to KRAS-G12C with 2.27 Å resolution, hydrogens added for clarity

4.4 化合物*S*-21进一步优化 化合物*S*-**21**体外实验表明有许多优良性质 (数据省略), 但肝脏提取率 (ER) 达

Table 4 Substituted piperazines designed to displace KRAS-G12C Gly10-bound water



Compd.	R_1	R_2	H368 IC_{50}/nmol·L^{-1}
16	H	H	4 400
17		H	4 630
18	H		4 530
19		H	4 840
20	H		>5 000
21		H	14
S-**21**		H	10
R-**21**		H	1 020
22	H		3 320

90%, 过膜性也只有中等程度, 需要进一步优化。*S*-**21** 与 $KRAS^{G12C}$ 复合物单晶衍射分析提示, 在萘环结合腔 8 位处尚有结合的空间 (图 3 中箭头所示)。

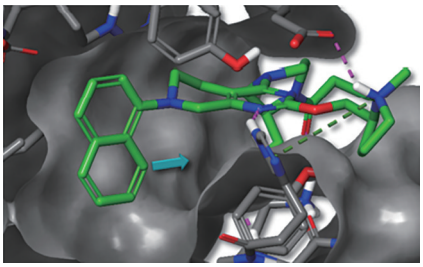
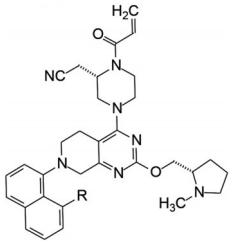


Figure 3 X-ray crystal structure of compound *S*-**21** bound to $KRAS^{G12C}$

为此, 合成了 8-取代的化合物, 结构与活性列于表 5。8-甲氧基 (**23**) 和 8-氰基 (**24**) 活性低于 *S*-**21**, 而 **27** 和 **28** 活性强于 *S*-**21** 大约 10 倍。

Table 5 Exploration of 8-naphthyl position

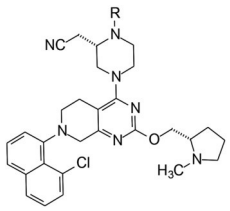


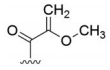
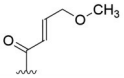
Compd.	R	H368 IC_{50}/nmol·L^{-1}	Compd.	R	H368 IC_{50}/nmol·L^{-1}
21*S*	H	10	**26**	CF_3O	4
23	CH_3O	22	**27**	Cl	1
24	CN	64	**28**	CH_3	1
25	C_2H_5	6		–	

4.5 丙烯酰胺片段的优化 化合物 **27** 和 **28** 具有很高活性, 却在血循环中都有与谷胱甘肽结合的缺点, 文献报道取代的丙烯酰胺与无取代的丙烯酰胺比较, 较少与谷胱甘肽结合 (Zhao B, Xiao Z, Qi J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of AZD9291 derivatives as selective and potent EGFRL858R/T790M inhibitors. Eur J Med Chem, 2019, 163, 367−380), 于是下一步是修饰丙烯酰胺片段。反复比较了 **27** 和 **28** 的体外和小鼠的 PD/PK, **27** 稍胜一筹 (数据从略), 故对 **27** 进行亲电基团的修饰。合成的化合物列于表 6。表中的全血细胞稳定性是测定小鼠/犬/人的全血与定量的受试物温孵, 不同的时间点, 用 LC/MS/MS 测定谷胱甘肽与受试物结合量, 计算化合物的半衰期。

结果表明, α 碳引入氟原子 (**29**) 由于与双键发生 p-π 共轭, 部分抵消了氟原子的拉电子效应, 虽然抑制细胞活性有所降低, 但对小鼠/犬/人全血中的稳定性

Table 6 Substituted electrophiles to attenuate reactivity



Compd.	R	H368 IC_{50}/nmol·L^{-1}	WB stability $t_{1/2}$/h mouse/dog/human
27		1	5/2/14
29		14	>50/>50/>50
30		>5 000	>50/>50/>40
31		3	11/9/>50
32		9	11/22/>50

显著增加, 半衰期大于 50 h。α 碳连接甲氧基的化合物 **30** 没有活性, **31** 和 **32** 的细胞活性略强于 **29**, 但血液中稳定性低。

5 候选物的确定和阿达雷塞的批准上市

进一步测定/计算化合物 **29** 的参数 (表 7), 达到了成药性的基本条件, 确定为候选化合物, 定名为阿达雷塞 (adagrasib) (Fell JB, Fischer JP, Brian R, et al. "Identification of the clinical development candidate MRTX849, a covalent $KRAS^{G12C}$ inhibitor for the treatment of cancer." J Med Chem, 2020, 63: 6679−6693)。

Table 7 Properties of compound **29**

Item	Data
MW/Clog P/PSA (Å^2)	604/5.8/87
NCI-H358 cellular IC_{50} @ 3 h/nmol·L^{-1}	14
Hepatocyte ER (m, d, h)/%	61, 36, 50
Microsome ER (m, d, h)/%	57, 39, 56
Whole blood stability $t_{1/2}$/h	>50
Plasma protein binding/% (m, h)	99.0, 98.3
FaSSIF solubility (pH 6.5)/μg·mL^{-1}	568

经临床前系统研究和临床试验, 阿达雷塞具有长达 24 h 的半衰期和广泛的组织分布, 而且能够穿过血脑屏障, 有助于最大限度地发挥药物效力。2022 年 6 月 FDA 授予它突破性疗法认定, 用于治疗携带 $KRAS^{G12C}$ 突变的经治非小细胞肺癌患者。此外, 对结直肠癌及其他实体肿瘤的治疗也展现出良好的疗效, 成为继索托雷塞 (sotorasib) 之后第二款获批上市的 KRAS 抑制剂。

6　阿达雷塞 (29) 的结合模式

分析图4阿达雷塞与$KRAS^{G12C}$复合物单晶表明，Cys12的硫原子与丙烯酰胺的β-碳形成共价键，键长1.65 Å。复合物有多个氢键结合：包括Lys16的NH_2与丙烯酰胺的C=O之间；His95环上的NH与嘧啶环的N1之间；氰基N与Gly10骨架的NH之间（代替了以前化合物结合的结构水），而且使Thr58的χ1角从原来与化合物**16**结合时的65°转成−53°，从而使侧链的羟基与Val8骨架C=O之间形成了氢键。四氢吡咯的N^+与Glu62的COO^-形成静电引力；8-氯萘基占据Val9、Met72、Phe78、Tyr96、Ile100和Val103组成的疏水腔，发生疏水−疏水相互作用。

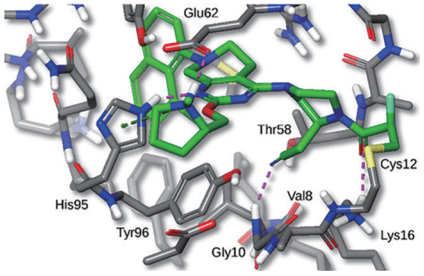


Figure 4　X-ray crystal structure of adagrasib bound to $KRAS^{G12C}$