•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。

本品是我国百济神州研制的第二代Bcl-2抑制剂, 也是克服耐药的全球第二个上市“克拉”药物。小分子干扰和抑制蛋白−蛋白之互作, 需要有多位点的结合以竞争两个蛋白 (BH3与Bcl-2) 的结合, 但分子尺寸过大对药代和物化性质不利, 需要兼顾多维性质, 所以2016上市的奈维克拉到本品之成功相距近10年之久。本品在结构生物学指导下, 分析了奈维克拉与突变耐药的Bcl-2蛋白结合的特征, 对连接基的骨架、分子两端的药效团进行了“地毯式的”基团变换, 评价抑制野生和突变靶标的活性、细胞活性、脱靶作用和对CYP的影响, 读者可领略到药物化学和新药研究的复杂与艰辛。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2026-0137

全球第二个Bcl-2抑制剂索托克拉的研制

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 肿瘤细胞通过Bcl-2蛋白抗拒凋亡而存活

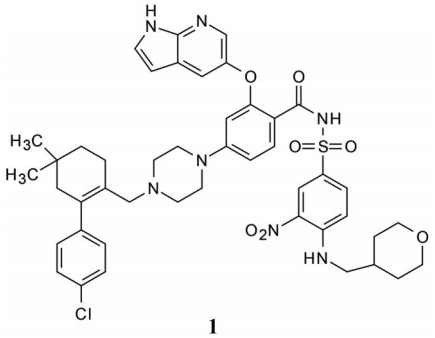
细胞凋亡是一种程序性细胞死亡形式, 对于维持组织稳态至关重要。逃逸细胞凋亡是肿瘤发生与发展所共有的标志性特征。

激活细胞凋亡可通过两条通路: 外源性通路和内源性通路。内源性通路介导的凋亡过程受B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 家族蛋白调控, 该家族包含三个亚家族: 促凋亡蛋白 (如BAX和BAK蛋白) 是细胞凋亡过程的核心效应分子; 抗凋亡蛋白 (如Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-W和Mcl-1) 通过抑制促凋亡蛋白来促进细胞存活; BH3结构域蛋白 (包括BIM、PUMA、BID、NOXA、BMF、BIKHE和HRK) 通过与促凋亡蛋白直接结合, 或通过释放促凋亡蛋白的方式, 启动并促进细胞凋亡进程。

抗凋亡蛋白Bcl-2与其他已知癌基因的区别是促进细胞存活, 而不是加速细胞增殖, Bcl-2在血癌和部分实体瘤常呈现高表达状态, 它通过与BH3结构域相结合发挥作用。因此, 靶向抑制Bcl-2与BH3的蛋白−蛋白互作, 是抗肿瘤药物治疗的靶标。途径是用模拟BH3结构域的小分子化合物, 与Bcl-2结合, 阻断抗凋亡通路。既然与BH3竞争同Bcl-2的结合, 所以小分子抑制剂尺寸也不会很小。

2 已上市的维奈克拉及其不足

2016年雅培公司首创上市的维奈克拉 (**1**, venetoclax) 的抗肿瘤活性是抑制Bcl-2与BH3的结合, **1**作为抑制剂阻断两个蛋白的互作 (PPI), 其相对分子质量是868, 尺寸超过Lipinski的类药五原则 (RO5)。**1**口服有效治疗慢性淋巴白血病 (CLL) 和急性髓性白血病 (AML) (Souers AJ, Leverson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. Nat Med, 2013, 19: 202−208)。然而患者用于治疗2～3年会出现耐药而减效, 是由于癌细胞的Bcl-2发生了Gly101Val变异而耐药。克服耐药性是靶向药物的永恒课题。



1

3 基于已有复合物的分子设计

我国百济神州公司的研究者分析了雅培公司**1**的先驱化合物那维托拉 (**2**, navitoclax, ABT-263, 曾进入临床试验, 因不良反应而终止) 与Bcl-2复合物晶体结构, 发现结构片段P2和P4分别处于蛋白的S2和S4结

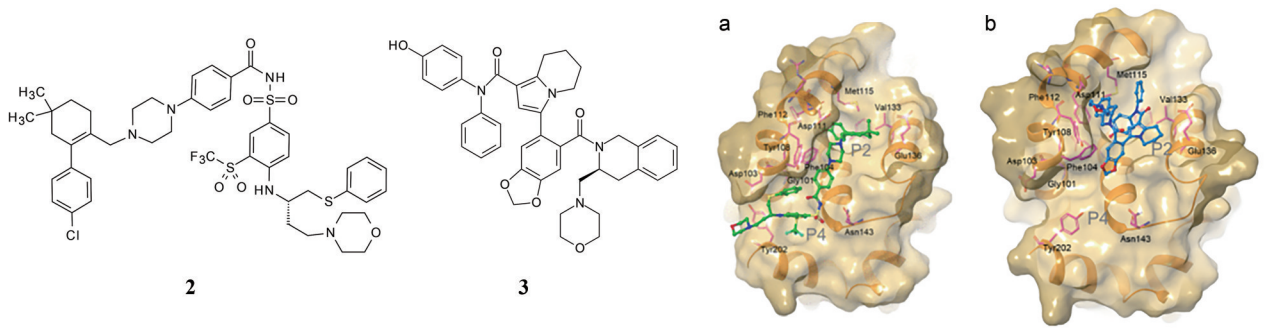


Figure 1 Crystal structures of Bcl-2 with (a) ABT-263 (**2**) and (b) S55746 (**3**) indicating the high flexibility of the S2 pocket

构域 (图 1a), 而施维雅公司研制的 S55746 (**3**, 抑制 Bcl-2 活性 K_i = 1.3 nmol·L^{-1}) 只处于 S2 结合域 (图 1b), 提示 S2 的结合域有较大的可塑性。

此外, Bcl-2^{G101V} 突变体与维奈克拉 (**1**) 的共晶结构 (PDB: 6O0L, 图省略) 揭示了获得性耐药的分子机制, **1** 的氯苯结构域原本可进入野生型 Bcl-2 的 S2 腔内, 而当突变体 Bcl-2^{G101V} 的 Gly 变为大体积的 Val 时, 关键残基 Glu152 被挤压至 S2 腔底部, 与氯苯发生碰撞的位阻效应, 导致维奈克拉与 Bcl-2^{G101V} 的亲和力下降 180 倍。基于此, 利用 S2 结合域的可塑性, 可通过变换抑制剂结构, 使化合物对野生型 Bcl-2 和 Bcl-2^{G101V} 突变体都能结合, 呈现抑制活性。

4 活性评价

评价化合物的活性强度是用生化竞争性结合实验, 基于时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET) 方法, 测定化合物与 Bcl-2:BAK、Bcl-2^{G101V}:BAK 及 Bcl-xL:BAK 复合物的解离作用, 作为评价与靶标蛋白的亲和力。同时, 采用细胞活力实验测定化合物对癌细胞活性: 用 Bcl-2 依赖性细胞系 RS4:11 评价靶标特异性活性; 用 Bcl-xL 依赖性细胞系 MOLT-4 评价化合物的脱靶活性。

5 初探构效关系

以维奈克拉 (**1**) 作为初始物, 对处于 S2 结合腔的片段作初步结构改造, 以探索 S2 腔的空间容积和对构象柔性容忍性, 围绕野生型 Bcl-2 开展初步构效关系研究, 首先对维奈克拉分子中的哌嗪片段作结构变换。结果表明变换成多种连接链都有良好的活性。大于或小于哌嗪环的片段连接的分子都保持高活性 (Hu N, Guo Y, Guo YH, et al. Methods of cancer treatment using Bcl-2 inhibitor. WO 2021110102 A1, 2021; Guo YH, Xue H, Wang ZW, et al. Bcl-2 inhibitors. WO 2019210828 A1, 2019), 这一结果证明了 S2 结合腔具有较大的空间容积与可塑性。

6 变换化合物 1 的左端片段

为了适配 S2 腔的可塑性并赋予结构新颖性, 变换了哌嗪基和左端的片段, 发现化合物 **4a** 对野生型 Bcl-2 活性 IC_{50} = 28 nmol·L^{-1}, 提示这样的骨架变换对优化结构是可行的, 为此合成了表 1 化合物, 测定了对野生型 Bcl-2 蛋白活性和对 Bcl-xL 的脱靶作用, 以及对相应细胞的活性和脱靶作用。

表 1 化合物的构效关系分析如下: ① 末端苯环上氯的取代位置对活性影响很大, 从对位 (**4a**) 移至邻位 (**4c**) 活性提高 4 倍, 该邻位取代基的影响在其他化合物也存在。② 邻位甲基～叔丁基化合物 (**4o**～**4r**) 的活性都很高, 邻位疏水性和一定的体积有利于提高活性, 而电性影响较小。③ 邻位环丙基 (**4s**) 活性尤其高, 拆分后 *R*-异构体 (*R*-**4s**) 活性显著强于 *S*-构型 (*S*-**4s**), 提示基团所处的空间方向对活性影响很大。然而邻位体积大的苯基 (**4n**)、环丁基 (**4t**)、环戊基 (**4u**) 和环己基 (**4v**) 的活性都下降了, 提示该处的空间有限度。④ 邻联苯基 (**4n**) 活性低于邻位甲基苯 (**4o**), 换成 4-吡啶基 (**4j**) 或环己基 (**4l**) 活性更弱, 而 3-吡啶基活性 (**4k**) 与苯基相近。

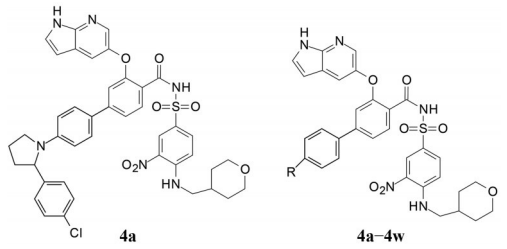
由以上左端片段的构效关系优化出对 Bcl-2^{WT} 活性最强的是 *R*-**4s**, IC_{50} = 0.62 nmol·L^{-1}, 对脱靶的 Bcl-xL 抑制作用 IC_{50} = 230 nmol·L^{-1}, 选择性高达 370 倍, 对相应高表达细胞的选择性高达 92 倍。化合物 *R*-**4s** 体外抑制野生型 Bcl-2 活性和选择性很高, 但动物体内药效不高, 而且对 CYP2C9 有抑制作用, 需要进一步结构优化。

7 连接基哌嗪的优化

连接基的尺寸和连接方式对左端药效团与 Bcl-2 的 S2 结构域结合有重要影响, 因而以 **4s** 为新的起点, 合成的 **5a**～**5x** 化合物列于表 2。

表 2 化合物的构效关系分析如下: ① 不同位置的氟苯基 (**5a**、**5b**) 活性基本未变, 但氯原子因位阻效应, 影响联苯的两面角可能不利于结合, 因而 **5c** 失去活性, 吡啶为连接基的 **5d** 活性略强, 但细胞活性弱, 极性强难以过膜之故。② 为了延长连接基和增加柔性在苯环一侧或两侧加入 1 个 sp^3 碳原子 (**5e**～**5j**), 结果都

Table 1 Bcl-2 inhibition of compounds with different left headgroup. **The structure of **9j** in the original table is phenyl-substituted and is the same molecule as **4g**. Verification against the NMR data in the appendix confirms it is pyridine-substituted



4a **4a−4w**

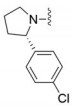
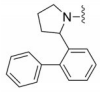
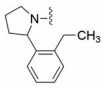
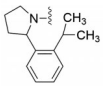
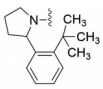
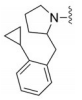
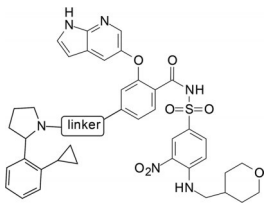
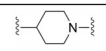
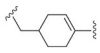
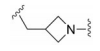
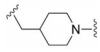
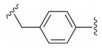
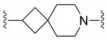
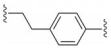
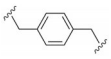
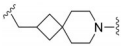
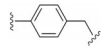
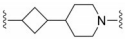
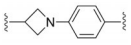
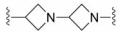
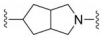
Compd.	R	Protein IC_{50}/nmol·L^{-1}		Cell IC_{50}/nmol·L^{-1}		Compd.	R	Protein IC_{50}/nmol·L^{-1}		Cell IC_{50}/nmol·L^{-1}	
		Bcl-2^{WT}	Bcl-xL	RS4;11	MOLT-4			Bcl-2^{WT}	Bcl-xL	RS4;11	MOLT-4
4a		28	7 152	651	5 331	**4n**		15	Not test	404	>10 000
4b		51	3 049	1 084	7 107	**4o**		3.0	926	50	>10 000
4c		5.5	2 145	74	>10 000	**4p**		4.1	879	69	4 498
4d		11	2 915	123	4 145	**4q**		3.0	645	30	5 156
4e		9.1	4 570	518	9 305	**4r**		8.9	900	Not test	Not test
4f		3.3	2 326	213	>10 000	**4s**		2.1	900	39	5 095
4g		249	>10 000	Not test	Not test	***R*-4s**		0.62	230	25	2 299
4h		23	>10 000	803	>10 000	***S*-4s**		12	4 096	147	>10 000
4i		46	>10 000	1 613	6 689	**4t**		6.7	1 237	145	>10 000
4j**		34	>10 000	1 096	8 911	**4u**		9.8	2 169	260	9 176
4k		7.2	1 381	1 599	>10 000	**4v**		40	3 059	Not test	Not test
4l		41	>10 000	1 144	5 797	**4w**		84	>10 000	Not test	Not test
4m		15	5 889	454	7 301						

Table 2 Effects of various linkers on Bcl-2 inhibition



Compd.	Linker	Protein IC_{50}/nmol·L^{-1}		Cell IC_{50}/nmol·L^{-1}		Compd.	Linker	Protein IC_{50}/nmol·L^{-1}		Cell IC_{50}/nmol·L^{-1}	
		Bcl-2^{WT}	Bcl-xL	RS4;11	MOLT-4			Bcl-2^{WT}	Bcl-xL	RS4;11	MOLT-4
4s		2.1	900	39	5 095	**5n**		0.99	763	144	>10 000
5a		7.5	699	135	4 900	**5o**		1.3	3 900	282	>10 000
5b		3.1	974	123	6 548	**5p**		2.4	1 923	586	>10 000
5c		>100	5 827	Not test	Not test	**5q**		0.27	2 178	48	8 933
5d		1.4	423	82	3 800	**5r**		0.049	55	5.8	5 890
5e		23	>10 000	565	5 194	*S*-**5r**		0.039	35	1.2	1 840
5f		>100	>10 000	Not test	Not test	*R*-**5r**		1.2	829	119	>10 000
5g		>100	>10 000	>10 000	>10 000	**5s**		0.12	85	11	>10 000
5h		8.1	>10 000	425	9 497	**5t**		6.2	>10 000	103	>10 000
5i		47	>10 000	Not test	Not test	**5u**		6.4	5 684	124	>10 000
5j		11	>10 000	Not test	Not test	**5v**		8.9	>10 000	340	>10 000
5k		24	7 143	154	9 783	**5w**		9.0	3 371	511	>10 000
5l		0.88	1 421	60	>10 000	**5x**		2.6	6 400	2 750	>10 000
5m		1.1	1 816	56	7 722						

使活性下降。③ 用环己基、环己烯基或哌啶基作连接基 (**5l**～**5n**) 抑制Bcl-2^{WT}活性提高, 细胞活性也有所提升。在这些饱和环的两侧增加饱和碳 (**5o**～**5q**) 以提高柔性, 也提高了活性。④ 由环丁–哌啶螺环连接的**5r**活性显著提高, 细胞活性也很强。混旋物拆分后的*S*-**5r**活性进一步提高 (IC_{50} = 0.039 nmol·L^{-1}), 比劣映体*R*-**5r**强30倍, 但**5r**嵌入1个亚甲基**5u**活性锐减, 提示一定的柔性和长度对高活性是很严格的。⑤ 其他的螺环、并环或单键相连的二环也有活性, 但都不如*S*-**5r**强。

以上的构效关系表明螺–环丁–哌啶是优化的连接基。

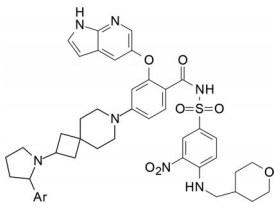
8 新连接基骨架左端苯环取代基的优化

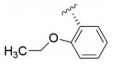
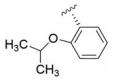
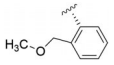
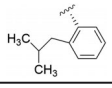
以螺–环丁–哌啶为骨架的新结构系列, 对前述优化出的2-环丙基苯片段未必是最佳组合, 需要再优化苯环上的取代基 (这是药物化学常见的“反复优化”现象), 表3列出了结构和活性, 还评价了对突变的Bcl-2^{G110V}抑制活性。

表3化合物的构效关系分析如下: ① 氯和溴取代的**6a**～**6d**显示对野生和突变性Bcl-2^{G110V}有活性, 尤其邻位取代的活性高, 但低于邻–环丙基*S*-**5r**。② 烷基作邻位取代的**6e**～**6i**保持活性, 尤以邻–异丙基**6g**对野生和突变型活性最强, 而且对肝微粒体的清除作用耐受性强 (数据省略)。③ 邻位取代基含有杂原子**6j**～**6o**不影响对蛋白的抑制活性, 但不利于细胞活性。邻–二甲氨基化合物的高活性**6n**与**6g**和*S*-**5r**相当。

此外, 对这3个高活性化合物实验比较了人、犬、大鼠和小鼠肝微粒体的稳定性 (清除率CL_{int}), 以及与药物代谢相关的CYP450的作用 (潜在的药物–药物相互作用), 结果表明化合物**6g**优于另外两个 (数据省

Table 3 Influence of substitutions on the phenyl group of compounds with a spiro linker



Compd.	Ar	Protein IC_{50}/nmol·L^{-1}			Cell IC_{50}/nmol·L^{-1}		Compd.	Ar	Protein IC_{50}/nmol·L^{-1}			Cell IC_{50}/nmol·L^{-1}	
		Bcl-2^{WT}	Bcl-2^{G110V}	Bcl-xL	RS4;28211	MOLT-4			Bcl-2^{WT}	Bcl-2^{G110V}	Bcl-xL	RS4;28211	MOLT-4
S-**5r**		0.039	1.3	35	1.2	1 840	**6i**		0.58	17	1 823	43	7 000
6a		0.36	24	266	17	>10 000	**6j**		0.061	3.5	148	13	>10 000
6b		1.6	57	1 800	262	>10 000	**6k**		0.095	4.2	86	27	>10 000
6c		28	120	5 500	517	>10 000	**6l**		0.076	3.2	133	15	>10 000
6d		1.6	13	323	11	4 016	**6m**		0.17	10	399	53	>10 000
6e		0.951	3.9	154	0.8	1 866	**6n**		0.023	0.98	29	1.4	991
6f		0.938	3.1	58	5.9	2 848	**6o**		0.18	4.2	1 408	45	>10 000
6g		0.024	1.8	56	1.4	>10 000	**1**	Venetoclax	0.24	25	65	4.3	2 823
6h		0.55	16	9 125	107	8 988							

略), 但对CYP显示有抑制作用。

9 右端结构的优化

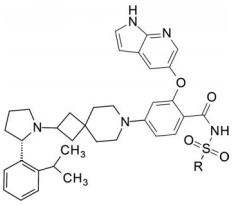
优化至此的化合物右端仍保持了维奈克拉 (**1**) 的结构未变, 从分子的完整统一性视角, 左端和连接基的改变势必影响右端的结合模式, 因此优化右端是必要的。以 **6g** 为新的起点, 变换右端, 设计的化合物列于表4。

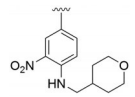
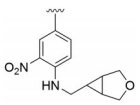
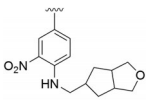
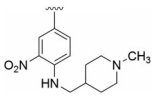
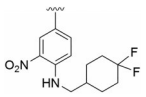
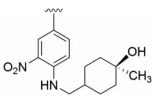
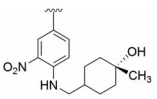
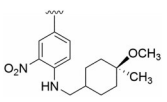
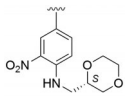
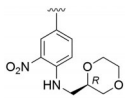
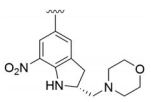
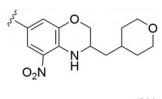
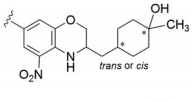
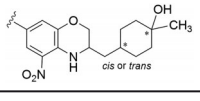
分析表4的构效关系如下: ① 将 **6g** 的四氢吡喃换作含氧双环, 或 *N*-甲基哌啶, 或二氟环己基 (**7a**～**7d**), 对Bcl-2和细胞活性都略有下降。② 变换成 *trans*-4-甲基-4-羟基环己基, 化合 **7e** 对野生和突变型Bcl-2以及细胞活性都显著提高, 而 *cis*-异构体 **7f** 的活性降低。**7e** 对5种重要的CYP有较低的抑制活性, 预示呈现药物−药物互作较弱。③ **7e** 的羟基甲醚化, **7g** 的活性略有减弱。*S*-二氧六环 (**7h**) 与 *R*-构型 (**7i**) 保持有与 **7e** 相近的活性, 其中 **7h** 对CYP2C9的抑制作用低于 *R* 构型 **7i**, 表明结构的微小变化对活性和脱靶作用有不同的影响。④ 将末端与硝基苯环环合成5-或6-元环以细调分子的柔性和构型, 合成的化合物 **7j**～**7m** 活性都低于 **7e**。所以 **7e** 是优化最好的化合物。

10 候选物的确定和索托克拉批准上市

研制者比较了 **7e** 和 **7h** (也是高活性化合物) 药代动力学性质。灌胃和静脉注射小鼠和犬, **7e** 的许多参数优胜于 **7h**, **7e** 灌胃犬的半衰期 $t_{1/2}$ = 3.56 h, 生物利用度 F = 55%, 静脉注射犬的消除率 CL = 2.96 mL·min^{-1}·kg^{-1}。**7e** 还与维奈克拉 (**1**) 和另外三个处于临床试验的化合物比较了体外抑制野生和突变型Bcl-2活性, 以及对RS4;11母系细胞和发生G110V变异的细胞活性进行了比较, 都显示强于对比的药物 (数据省略), 遂定名 **7e** 为索托克拉 (sonrotoclax), 经III期临床试验, 我国NMPA于2025年4月批准百济神州公司研制的索托克拉上市, 口服治疗既往接受过治疗的慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤 (CLL/SLL) 成人患者, 以及治疗既往接受过抗CD20治疗和BTKi治疗的套细胞淋巴瘤 (MCL) 成人患者 (Guo Y, Xue H, Hu N, et al. Discovery of the clinical candidate sonrotoclax (BGB-11417), a highly potent and selective inhibitor for both WT and G101V mutant Bcl-2. J Med Chem, 2024, 67:

Table 4 Optimization of the right tail to further improve potency and reduce CYP inhibition

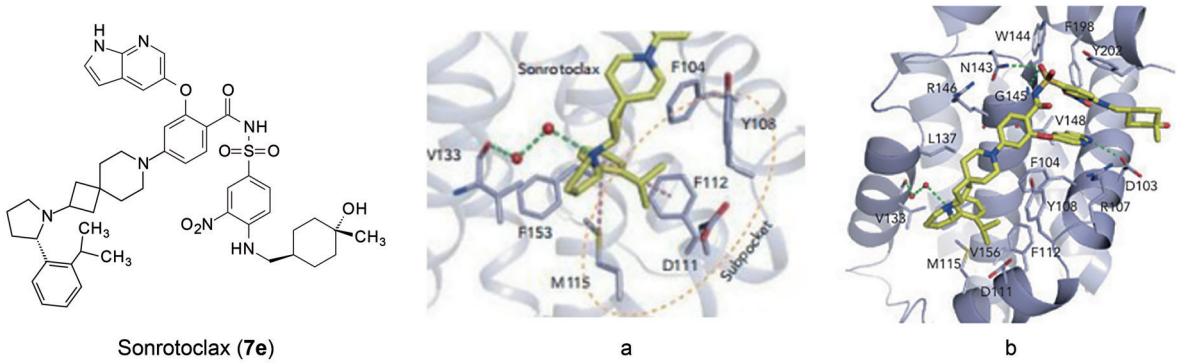


Compd.	R	Protein IC_{50}/nmol·L^{-1}			Cell IC_{50}/nmol·L^{-1}		CYP inhib 1A2/**2C9**/2C19/2D6/3A4/ IC_{50}/μmol·L^{-1}
		Bcl-2^{WT}	Bcl-2^{G110V}	Bcl-xL	RS4;28211	MOLT-4	
6g		0.024	0.18	46	1.4	>10 000	>30/**8.9**/>30/>30/21.1
7a		0.024	0.25	41	2.6	3 080	Not test
7b		0.042	0.37	21	1.9	6 070	Not test
7c		0.04	0.16	3.6	2.5	1 330	Not test
7d		0.13	2.5	115	7.8	6 040	Not test
7e		0.019	0.34	28	0.56	2 493	>30/>**30**/>30/>30/>30
7f		0.017	1.8	47	1.6	4 840	Not test
7g		0.087	1.3	371	1.3	3 410	Not test
7h		0.029	1.4	28	1.5	2 630	>10/>**10**/>10/>10/>10
7i		0.038	0.8	32	0.7	1 468	>10/>**5.4**/>10/>10/>10
7j		0.028	2.4	14	3.2	Not test	Not test
7k		0.024	1.7	32	1.0	>10 000	Not test
7l		0.015	0.69	41	0.56	>10 000	Not test
7m		0.016	0.92	47	1.0	6 000	Not test

7836−7858)。

11 索托克拉与Bcl-2结合模式

索托克拉与Bcl-2复合物晶体结构X-射线衍射分析表明, 分子特异性地结合于Bcl-2的疏水腔中 (图2), 通过与周围氨基酸残基形成的疏水互作和氢键实现系统能量下降。氯苯基深入至S2结合腔内部, 导致Phe112残基发生位置改变, 同时α3螺旋产生约1 Å的位移, Phe112重新定位, 并适配二者的相互作用。异丙基苯基则处于结合腔的入口处, 与Phe112的苯环发生边对面π-π堆叠作用, 促进了结合。异丙基的存在使S2腔的上方诱导形成了由Tyr108、Phe112、Asp111和Met115残基构成的新腔, 因而提供了额外的疏水互作。此外, 异丙基苯基的苯环与Met115的硫原子形成S-π相互作用。吡咯烷N原子经水分子介导与Val133的骨架羰基发生氢键结合 (Liu J, Li S, Wang Q, et al. Sonrotoclax overcomes BCL2^{G101V} mutation-induced venetoclax resistance in preclinical models of hematologic malignancy. Blood, 2024, 143: 1825−1836)。



Sonrotoclax (**7e**) a b

Figure 2 X-ray chrystallographies of sonrotoclax-Bcl-2 complex