

# 基于片段方法创制的药物

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)

**摘要:** 小分子药物与靶标的结合大都以非共价键结合, 氢键、静电、疏水和范德华作用以维持结合力, 这些因素越多结合越牢固, 活性越强。但往往伴随分子尺寸变大, 产生过膜吸收代谢等药代问题, 最终影响成药性。基于片段的药物发现 (fragment-based drug discovery, FBDD) 是普筛高质量片段以发现苗头分子, 结合结构生物学, 在片段生长、连接和融合中形成先导物, 以及优化出候选物的运行中, 始终兼顾化合物活性和物化性质之间的协调性。基于片段的药物发现与基于靶标结构的药物发现存在密切关系。本文以数个上市的药物简释 FBDD 的应用原理。

**关键词:** 基于片段的药物发现; 计算机辅助药物设计; 配体效率; 片段生长、连接和融合  
**中图分类号:** R914      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0513-4870(2023)12-3490-18

## FBDD and drugs originated from FBDD

GUO Zong-ru\*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,  
Beijing 100050, China)

**Abstract:** The binding of small molecule drugs to targets is mostly through non-covalent bonds, and hydrogen bond, electrostatic, hydrophobic and van der Waals interactions function to maintain the binding force. The more these binding factors lead to strong bindings and high activities. However, it is often accompanied by the increase of molecular size, resulting in pharmacokinetic problems such as membrane penetration and absorption, as well as metabolism, which ultimately affects the drug success. Fragment-based drug discovery (FBDD) is to screen high-quality fragment library to find hits. Combine with structural biology, FBDD generates lead compounds by means of fragment growth, linking and fusion, and finally drug candidates by the optimization operation. During the value chain FBDD is closely related to structure-based drug discovery (SBDD). In this paper, the principle of FBDD is briefly described by several launched drugs.

**Key words:** fragment-based drug discovery; computer aided drug design; ligand efficacy; fragment growth, linking and fusion

在以靶标为核心的药物创制价值链中, 生物学初始环节是发现靶标, 化学的初始节点是发现苗头化合物 (hit), 先导化合物是由苗头演化而成的 (hit-to-lead)。基于片段的药物发现 (fragment-based drug discovery, FBDD) 是发现苗头并自然过渡到先导化合物的一种技术, 其特点是将高通量筛选低分子量优质片段库, 并以结构生物学和计算机模拟作指导, 演化成先导化

物乃至进一步优化。FBDD 与基于靶标结构的药物发现 (structure-based drug discovery, SBDD) 常常交集和融合一起。本文拟扼要叙述 FBDD 的技术要点, 重点讨论以 FBDD 手段研制成功的上市药物。因为是能够满足患者需求的药物, 其创制构成的合理性毋庸置疑。

### 1 苗头和先导分子尺寸宜小

就属性而言, 小分子药物有两大支柱, 即活性和成药性。活性含有强度和选择性, 成药性包括过膜性、吸收性、安全性、代谢稳定性, 以及物理化学性质等。溶解性和过膜性大体由类药 5 原则 (RO5) 界定了小分子

收稿日期: 2023-08-08; 修回日期: 2023-09-20.

\*通讯作者 E-mail: zrguo@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0955

口服药物的物理化学特征, 虽然也有许多突破 RO5 的优质药物如大环、寡肽和天然药物等。

以靶标为核心研制药物, 药物分子与靶标结合是呈现药效的原动力, 这就要求分子之间在结合的形状、骨架和功能基团互补或相容(疏水性融合)。药物与靶标之间结合因素越多, 系统自由能变化越大, 结合力越强, 活性越高。但另一方面却因分子尺寸增大, 导致溶解性和过膜性变差, 降低了成药性。这就是大尺寸苗头分子进行结构优化的难处, 因为可修饰的化学空间已窄。因此, 苗头和先导化合物的分子尺寸宜小, 为优化结构预留出足够的化学空间。FBDD 就是从低分子量化合物出发的。

## 2 片段分子特征

为进行 FBDD, 筛选的化合物宜遵循片段“三原则”, 即相对分子质量  $< 300$ , 亲脂性(正辛醇/水系统的分配系数  $\log P$  或 pH 7.4 缓冲液的分布系数  $\log D$ )  $\leq 3$ , 氢键给体(N-H, O-H)  $\leq 3$  个, 氢键接受体(N, O)  $\leq 3$  个, 极性表面积  $\leq 60 \text{ \AA}^2$ , 可旋转键为零<sup>[1]</sup>。这样就确保了片段的小尺寸, 但因此与靶标结合力也很弱, 浓度通常在  $100 \sim 10\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 为此需要片段分子有较好的水溶性, 以保障有足够的浓度获得片段分子活性值, 例如  $K_d$  或  $\text{IC}_{50}$ 。此外, 片段结构应有可修饰的位点, 作为片段连接和(或)增长点。这些特征都是为起始物优化预留空间。

## 3 筛选方法

由于片段分子的活性较低, 测定活性(结合力)方法需要有较高灵敏度, 最常用的评价手段是生物物理法, 例如结合生化测定解析配体-靶标复合物的 X-射线晶体结构, 其优点是进行基于靶标结构设计化合物时的直观与可视性。

在液相中测定靶标-配体的二维核磁共振谱也是常用的方法, 既可观测蛋白质的结构变化, 也可发现配体的结合状态。为此需要对靶标蛋白的某些原子作同位素标记, 例如  $^{15}\text{N}$  和(或)  $^{13}\text{C}$  以甄别化学位移的变化。

表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)也是广泛使用的筛选方法, SPR 需将靶标蛋白固定在传感器的芯片上, 例如用生物素标记蛋白, 经链霉亲和素与生物素相结合而固定, 或连接在蛋白侧链上有功能基的氨基酸(例如赖氨酸)直接固定在芯片上。含有片段溶液流经芯片表面, 当片段分子与靶标蛋白结合, 会改变芯片表面的折射率, 基于片段浓度与折射率变化的关系, 可计算出片段分子的解离常数  $K_d$ , 即结合强度。SPR 的定量性质也是研究结构类似片段并确定其构效关系和结合动力学的理想方法。

热迁移分析(thermal shift analysis, TSA)是利用

靶标蛋白与配体结合可提高蛋白的热力学稳定性的特性, 评价片段分子与靶标的结合强度。每种蛋白都有自身的热熔曲线, 随着温度的升高, 蛋白发生降解。当靶标蛋白与配体结合, 稳定性增加, 在测定过程中根据蛋白溶解温度( $T_m$ )的变化判断配体对蛋白的作用强弱。用生物化学方法测定活性, 较少提供三维结构信息, 需辅以结构生物学和分子模拟。

## 4 配体效率和片段的生长、连接与融合

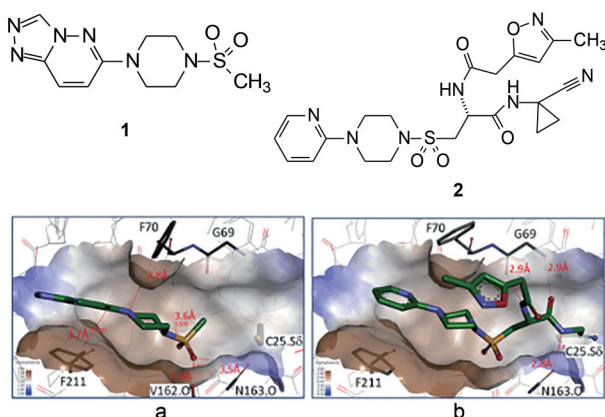
**4.1 配体效率** 从物理化学视角看, 药物(配体)与靶标蛋白结合的驱动力是配体-靶标整体系统的能量降低, 结合能绝对值越大意味着配体活性越强。所以分子尺寸大、氢键形成多、静电引力强、疏水作用广, 就有利于提高活性。然而过多的这些因素却不利于药代动力学和安全性(ADME/T), 导致成药前景暗淡。

为了限制分子中无用原子的存在, FBDD 实践中常常使用配体效率(ligand efficiency, LE)作为衡量化合物质量的参数, 其定义是每个非氢原子(即重原子, HA)对活性(或自由能变化)的贡献。计算方法是,  $\text{LE} = -\log K_d(\text{IC}_{50}) \times 1.37/N_{\text{HA}}$  计算 LE 值, 单位是能量 kJ 或 kcal/HA。LE 值越大化合物的效率越高, 片段的质量越高。因而 LE 在一定程度上同时表征了化合物体外活性与成药性的量度。

增加分子的亲脂性可提高配体与靶标的疏水-疏水相互作用, 以熵的形式贡献于活性, 却一定程度损害了药代动力学(代谢复杂性)和安全性, 因而片段质量可用配体亲脂性效率(ligand lipophilic efficiency, LLE)加以表征。亲脂性效率的定义是:  $\text{LLE} = -\log K_d(\text{IC}_{50}) - \log P(D)$ ,  $\log P$  或  $\log D$  代表化合物的分配系数或分布系数, LLE 数值越大, 配体的质量越高。在苗头演化中应避免分配系数增大<sup>[2,3]</sup>。

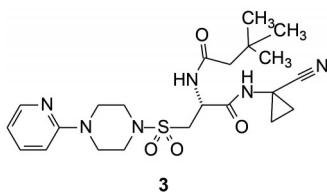
**4.2 片段的生长** FBDD 获得初始苗头后, 常常在结构生物学或分子模拟的指引下增添片段或基团, “生长”成先导物。例如 Grünenthal 公司为研制治疗自身免疫和炎症疾病的药物, 以组织蛋白酶 S(cathepsin S, Cat S)为靶标, 经 FBDD 研制 Cat S 抑制剂, 用  $^{15}\text{N}$ -标记的 Cat S 筛选 1 858 个多样结构的片段分子, 测定  $^{15}\text{N}$ -HSQC NMR 二维谱的化学位移变化, 发现了 28 个苗头分子, 其中化合物 **1** 活性  $K_d = 96 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 相对分子质量 282,  $\text{ClogP} -0.7$  (水溶性强), 配体效率  $\text{LE} = 0.29$ , 配体亲脂性效率  $\text{LLE} = 4.7$ 。**1** 与 Cat S 复合物晶体结构显示, 分子只结合于 F211 和 V162 组成的疏水腔(S2), 而没有占据 F70 和 G69 组成的 S3 以及催化中心 C25.s $\delta$  的 S1 腔, 如图 1a 所示。

在三维结构信息的指引下, 经过多轮优化和复合物晶体结构的分析, **1** 添加片段与基团“生长”成为化合物

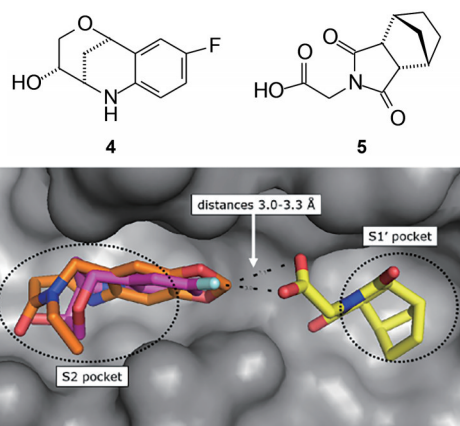


**Figure 1** The X-ray structure of complex of cathepsin S with compound **1** (a) or **2** (b)

**2**, 分子量增加到501, 活性显著提高,  $K_d = 0.345 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 配体效率基本未变  $\text{LE} = 0.292$ ,  $\log D$  1.3 (分布系数), 配体亲脂性效率  $\text{LLE} = 6.3$ , 高于 **1** 的4.7。 **2** 的甲基异噁唑乙酰胺片段占据了由G69和F70构成的S3腔, 环丙叉氰乙氨基则处于含有催化基团的半胱氨酸C25的S1腔中, 脂肪氧基的弱亲电性足以同腔内亲核性巯基发生可逆性共价结合, 是提高活性的重要因素, 这是片段增长“因地制宜”地加入了共价结合元素(图1b)。进一步结构优化用叔丁乙酰胺基替换异噁唑乙酰胺基, 化合物**3**分子量降为477, 活性更高,  $K_d = 0.09 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{LE} = 0.442$ ,  $\text{ClogP}$  1.2 (适宜的分配系数), 配体亲脂性效率  $\text{LLE} = 8.7$ 。化合物**3**现处于临床阶段<sup>[4]</sup>。



**4.3 片段连接** 若FBDD筛选出两个(或多个)分子结构不同而且结合位点相异的苗头片段, 可以用连接基(linker)组装成一个分子, 由于降低了熵损失, 可大幅度提高结合性能, 成为优化的起始物。例如默克公司为研制治疗多发性硬化症和心血管疾病的药物, 设定线粒体同种型的亲环素D(cyclophilin D, CypD)为靶标, 用SPR方法筛选2 688个片段分子, 经SPR反复“浓缩性”遴选, 得到6个结构不同、结合位点也不同的片段, 活性( $K_d$ )在 $1.1\sim 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围。经双片段组合发现片段分子**4**和**5**经酰胺连接优化得到的化合物**6**, 活性提高10 000倍, 体现了FBDD的优势。表1列出了**4**~**6**的活性、疏水性和化合物效率, 显示了两个片段结合成单一分子结合热力学优势。图2是**4**和**5**与组织蛋白酶S复合物三维结构图。



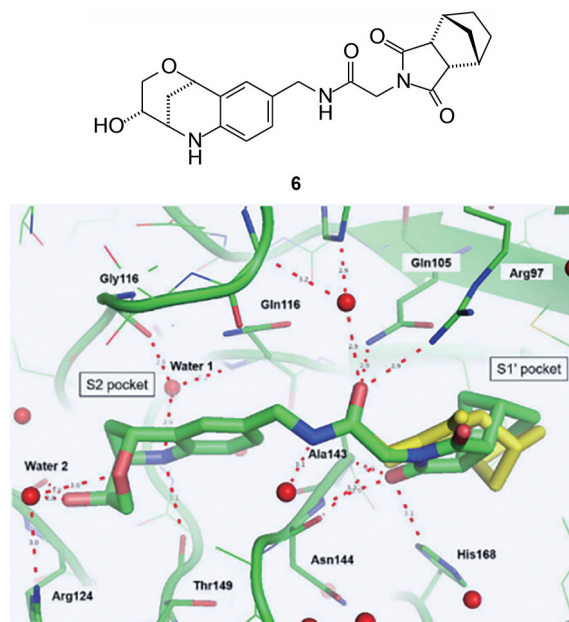
**Figure 2** The X-ray structures of complex **4** (magenta) and **5** (yellow) binding to S2 and S1' pockets of cathepsin S, respectively

**Table 1** Comparison of parameters of fragment **4** and **5** as well as the designed compound **6**

Compd.	Mol Wt	No. of HA	$K_d/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Clog <i>P</i>	LE	LLE
<b>4</b>	209	15	7 300	0.8	0.20	1.3
<b>5</b>	223	16	>10 000	1.0	<0.17	<1.0
<b>6</b>	425	31	0.66	0.6	0.27	5.6

图3是片段**4**和**5**经连接形成的化合物**6**与亲环素D复合物三维结构图。片段**4**部分于S2腔中, 与Thr149形成氢键, 还经过两个结构水的介导与多个氨基酸残基发生氢键结合。双环马来酰胺(片段分子**5**)处于S1'腔中, 由于单键可旋转 $180^\circ$ 可采取两种构象(绿色和黄色)相结合, 此时琥珀酰亚胺的羰基氧与Asn144和His168发生氢键结合, 连接基上的羰基直接与Arg97氢键结合, 并经结构水与Gln116结合<sup>[5]</sup>。

**4.4 片段的融合** FBDD得到的苗头分子群, 若与靶



**Figure 3** Cyp D X-ray structure in complex with compound **6**

标蛋白结合的两个片段在空间上有交集, 可将此交集部分精简为共享, 重叠部分融合为一, 这样, 在扩大结合范围的同时还简化了配体结构, 这种片段融合也可视作修剪性的片段连接或生长。

诺华研制胞质金属酶白三烯 A4 水解酶 (LTA4H) 抑制剂, 用于治疗慢性炎症。采用 FBDD 方法的片段融合策略。差示扫描荧光法 (DSF) 测量折叠的纯化蛋白质在与配体结合后发生去折叠而引起温度变化, 作为测试化合物活性的方法。溶剂化变色染料 (solvatochromic dye) 随着蛋白外露的疏水部分与配体结合而温度变化, 表明发生了去折叠化。筛选了 1 800 个片段得到 14 个苗头分子, 其中化合物 **7** 和 **8** 与 LTA4H 复合物晶体结构显示二者的苯环重叠在一起, 都与 Phe314 发生  $\pi$ - $\pi$  堆积作用 (图 4a), 图 4b 是 **8** 与 LTA4H 活性中心的结合模式, 伯氨基本身或经水分子介导与活性中心形成氢键网络。将 **7** 和 **8** 重叠的苯环融合共用, 生成的化合物 **9** 活性提高 1 000 倍, 差示扫描荧光的温度变化和配体效率也有显著提高, 如表 2 数据所示。进一步对 **9** 的两端作多轮的结构优化, 得到化合物 **10** (代号 LYS006), 目前处于临床研究阶段<sup>[6]</sup>。

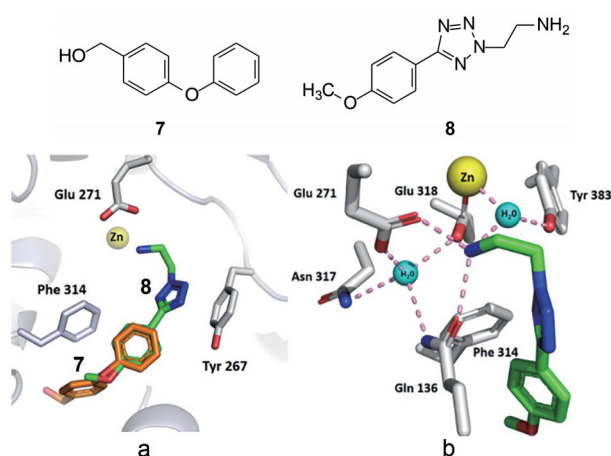


Figure 4 Fragment hits **7** and **8** bound to LTA4H (a) and hydrogen bonding network for compound **8** (b)

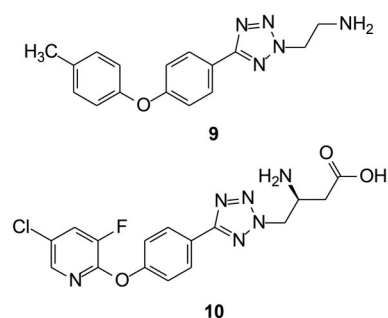
Table 2 Comparison of parameters of fragment **7** and **8** as well as the designed compounds **9** and **10**

Compd.	$K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$ at $12.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	No. of HA	LE
<b>7</b>	4.5	0.08	15	0.49
<b>8</b>	8.8	0.2	16	0.43
<b>9</b>	0.003 6	4.2	22	0.52
<b>10</b>	0.003 5	Not test	27	0.43

下面讨论始自于 FBDD 的成功药物。

## 5 维罗非尼

**5.1 高效率研制的 BRAF<sup>V600E</sup> 靶向药物** 维罗非尼是由 Plexxikon 公司与大学合作, 率先应用 FBDD 技术研制



成功的药物。从 2006 年启动项目到 2012 年批准上市, 用 6 年时间完成, 体现了高效率。其中 FBDD 和计算机辅助药物设计 (computer aided drug design, CADD) 是确定候选物的卓越实例。

*BRAF* 是人类最重要的原癌基因之一, 表达产物 BRAF 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员之一, 大约 8% 的肿瘤发生 *BRAF* 突变, 多为 BRAF<sup>V600E</sup> 突变体, 突变产物导致下游 MEK-ERK 信号通路持续激活, 加速肿瘤的生长增殖和侵袭转移, 主要表现于黑色素瘤和结肠癌。

**5.2 多种丝/苏氨酸激酶筛选和晶体结构解析** 研究团队用生化方法对多种激酶评价了 20 000 个化合物, 相对分子质量为 150~350, 发现其中 238 个在  $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下对 Pim-1、FRGR-1 和 B-Raf 3 种激酶的抑制率 > 30%。继之将这 238 种分子与至少 1 种激酶作共结晶分析, 获得了上百个复合物晶体 X-射线衍射数据。

发现 3-苯胺基-7-氮杂吡啶 (**11**) 与 Pim-1 结合位点和结合模式具有新颖性。**11** 对 Pim-1 的  $\text{IC}_{50} = 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 其结合特征是 7-氮杂吡啶的两个 N 原子与激酶铰链区的 DFG 链形成两个氢键, 分别为氢键给体和接受体 (图 5a)。

**5.3 晶体结构指导下的片段生长** 基于 **11**-Pim-1 的晶体结构, 以片段“生长”方式设计合成了 **12**, **12** 抑制 FGFR1 活性  $\text{IC}_{50} = 1.9\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 严格说来不同的酶之间虽然没有可比性, 但甲氧基的引入增添了氢键结合 (图 5b), 提高活性强度 50 倍, 也提高配体效率, 对下一步设计有参考价值。

基于 **12** 的结合模式, 在苯环的其他部位引入不同基团, 经药物化学的结构优化 (原文未展开说明), 得到了化合物 **13**, 对 BRAF<sup>V600E</sup> 的抑制活性  $\text{IC}_{50} = 0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由于非氢原子数的增加, 配体效率略有降低 (LE = 0.40)。

化合物 **13** 对突变体 BRAF<sup>V600E</sup> 的活性强于野生型 BRAF 约 12 倍, 对其他 70 种激酶的活性甚低, 有较高的选择性。对高表达 BRAF<sup>V600E</sup> 多种细胞系的抑制生长的活性强于野生型细胞数十倍。**13** 的代号为 PLX4720, 曾进行了临床研究, 结果却有不足之处<sup>[7]</sup>。

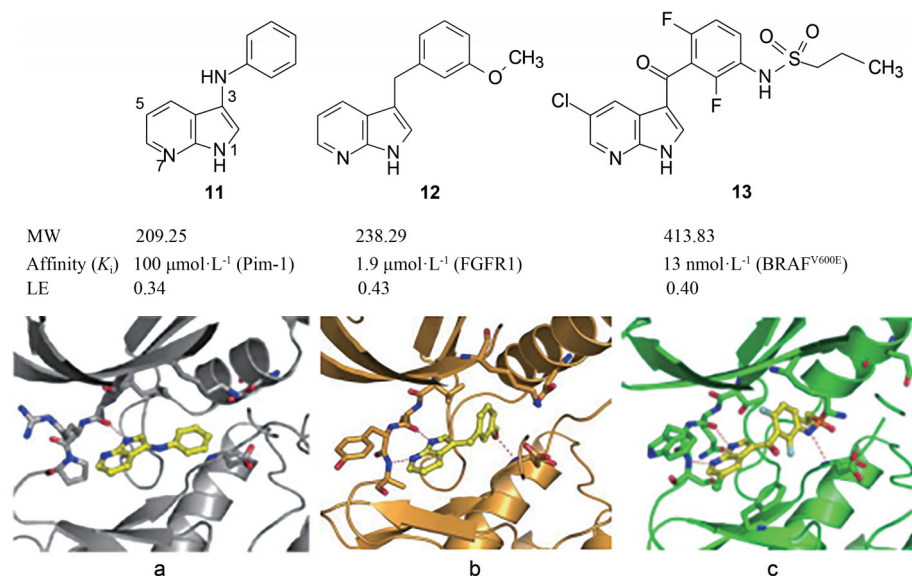


Figure 5 Crystallography of the co-structure of **11** with Pim-1 kinase (a), **12** with FGFR1 (b), and **13** with BRAF<sup>V600E</sup> (c)

**5.4 维罗非尼的上市和与靶标的结合模式** 分析化合物 **13** 与 BRAF<sup>V600E</sup> 激酶的晶体结构 (图 5c), 发现 7-氮杂吡啶的 5 位氯原子的方向仍有空间, 以氯原子作为“生长锚点 (anchor and grow)”, 连接不同的基团和片段, SAR 优化出 4-氯苯基取代的化合物 (**14**), 改善了大动物的药代性质, 作为候选药物定名为维罗非尼 (vemurafenib), 经临床研究, 证明对发生了 V600E 突变的 BRAF 的黑色素瘤有明显疗效, 于 2011 年经 FDA 批准上市, 为晚期恶性黑色素瘤患者的治疗药<sup>[8]</sup>。

图 6 是维罗非尼 (**14**) 与 BRAF<sup>V600E</sup> 的共晶结合模式, 磺酰胺基与 DFG-in 的 Asp594 形成氢键网络, 异丙基进入一小疏水腔内, 7-氮杂吡啶 5 位的氯苯基与 Trp531、Gln530 和 Cys532 形成的疏水腔相结合。

## 6 厄达替尼

### 6.1 针对膀胱上皮癌的靶标 FGFR 成纤维细胞生

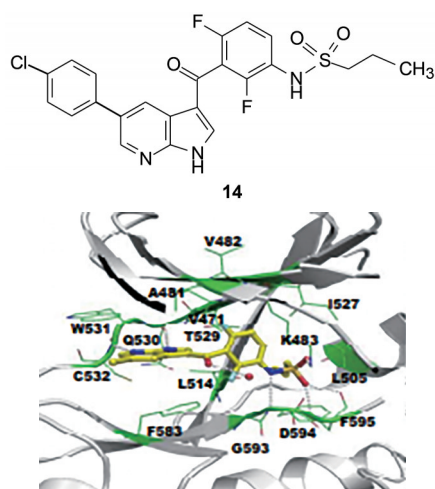


Figure 6 The co-structure of vemurafenib (**14**) with BRAF<sup>V600E</sup>

长因子受体 (FGFR) 是受体型酪氨酸激酶, 有 4 种亚型 FGFR 1~4, 与配体 FGF 结合发生二聚化和自磷酸化, 调节细胞生长和增殖。当 FGFR 变异 (例如基因扩增易位融合等) 而异常活化会发生多种癌症。例如转移性的膀胱上皮癌患者有 20% 发生 FGFR 变异。由于 FGFR 与 VEGFR 蛋白有较高的同源性, 脱靶于 VEGFR 会带来不良反应而限制治疗窗口, Astex 公司与大学合作, 以 FBDD 方法启动研制 FGFR 抑制剂, 后与杨森公司合作研制成功厄达替尼 (erdafitinib), 是选择性的泛 FGFR 抑制剂。

**6.2 生化筛选与晶体结构结合的片段生长** Astex 用生化方法筛选公司的片段库对 FGFR3 的抑制活性, 发现 6-氨基喹啉 (**15**) 有微弱活性  $\text{IC}_{50} = 120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 因相对分子质量小, 所以有不错的配体效率 ( $\text{LE} = 0.49$ ), 但对 VEGFR2 也有抑制活性 (表 3), 需要避免该脱靶作用, **15** 与 FGFR3 复合物晶体结构 (图 7a) 显示在 3 位处尚有结合空间, 遂得到 3-*N*-甲基吡啶化合物 **16**, 提高了近 20 倍, 而 VEGFR2 脱靶作用降低了 300 倍, 甲基吡啶提高了化合物的选择性。基于 **16** 的复合物晶体结构 (图 7b) 作基团虚拟筛选, 6 位的氯原子被 3',5'-二甲氧基苯胺取代, **17** 的活性提高到  $0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而且保持了选择性 (图 7c)。

**6.3 药物化学优化和厄达替尼上市** 为提高 **17** 的活性, 将二甲氧基苯胺换成二甲氧基苯胺 (减少一个  $\text{sp}^3$  杂化碳原子), **18** 降低了分子柔性, 还更接近门户氨基酸残基后面的疏水腔, 对 FGFR3 的抑制活性提高到  $0.012 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。进一步参考既往研究发现疏水性侧链占据了一定的空间, 如同图 8a 紫色所示的位置, 蓝色

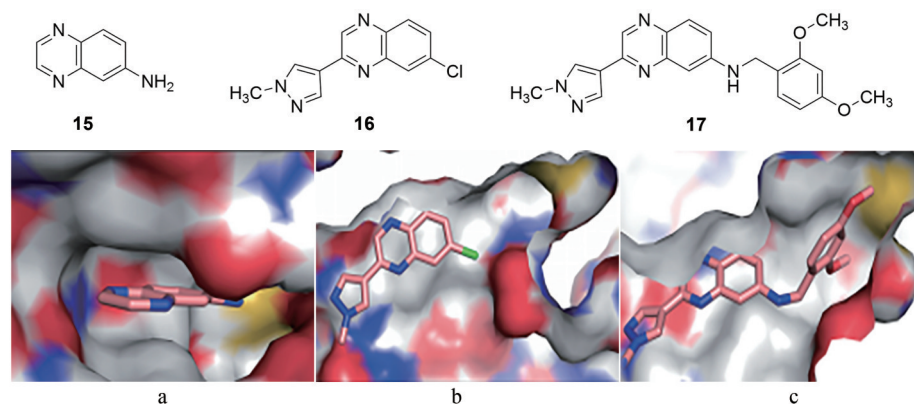


Figure 7 Co-structure of FGFR3 with compounds 15 (a), 16 (b) or 17 (c)

Table 3 The activity and selectivity of the compounds on FGFR3

Compd.	Mol Wt	No. of HA	FGFR3 $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	LE	VEGFR2 $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
15	145	11	120	0.49	140
16	245	17	6.5	0.42	0.46
17	375	28	0.33	0.32	5.5
18	361	27	0.012	0.40	0.56
19	446	33	0.003	0.35	0.037

为化合物 18 处于的空间, 从而在苯胺的氮原子上引入含有碱性氨基的烷基化合物 19, 碱性氮原子与 DFG 铰链上的 Asp641 发生静电引力作用, 而且也有助于分子的水溶性。图 8b 是 19 与 FGFR3 的结合模式, 对 FGFR1、FGFR2、FGFR3 和 FGFR4 各个亚型的  $IC_{50}$  分别为 0.001 2、0.002 5、0.003 和 0.005 7  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 所以是 FGFR 泛抑制剂。19 定名为厄达替尼 (erdafitinib), 2019 年美国 FDA 批准用于 FGFR 基因发生突变的晚期或转移性尿路上皮癌患者的治疗<sup>[9]</sup>。

## 7 维奈托克

**7.1 概述** 美国艾伯维公司和瑞士罗氏旗下的基因泰克公司合作研发生产的维奈托克 (venetoclax), 是靶向 B 细胞淋巴瘤因子 2 (Bcl-2) 的选择性抑制剂, 主要针对肿瘤细胞的凋亡途径, 于 2015 年获得美国 FDA 批准上市, 用于治疗慢性淋巴细胞白血病与难治性或复发性缺失 17p 突变基因的患者。

细胞程序化死亡 (凋亡) 是机体清除衰老的、受损伤的和无用细胞的首要机制, 许多疾病的发生是由于凋亡过程的损坏, 例如肿瘤、自身免疫疾病和阿尔茨海默病等。B 细胞淋巴瘤 (Bcl) 蛋白家族中包含有抗凋亡蛋白如 Bcl-2 和 Bcl-xL, 也有促凋亡蛋白如 Bak、Bax 和 Bad, 二者精确地调控表达, 处于平衡状态。肿瘤为了逃逸凋亡, 高表达 Bcl-2 或 Bcl-xL, 因而成为研制抗肿瘤药物的靶标, 通过结合 Bcl-2 或 Bcl-xL, 释放促凋亡蛋白如 Bak、Bax 和 Bad 的功能, 达到治疗目的。

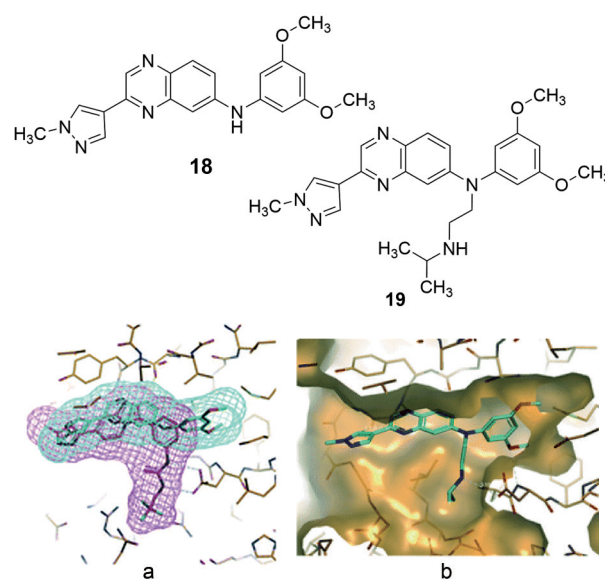


Figure 8 a: The overlap of binding modes of 18 (blue) and alkali side chain (purple) with FGFR3. b: The co-crystal of compound 19 with FGFR3

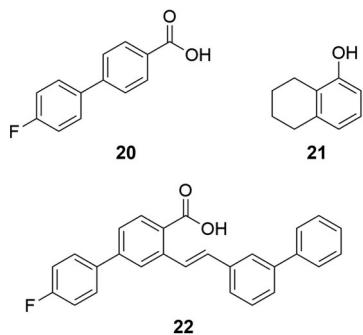
**7.2 Bcl-2 蛋白特征** Bcl-2 蛋白家族的三维结构有相同的折叠形式: 两个疏水性螺旋, 由 5~7 个两亲性的  $\alpha$  螺旋包围, 后者形成抗凋亡蛋白 Bcl-xL 和 Bcl-2 的疏水性沟槽, 是结合促凋亡蛋白 Bak、Bax 和 Bad 的部位。该蛋白-蛋白相互作用的面积广泛 (750~1 500  $\text{\AA}^2$ ), 表浅且无特征性结合位点, 增加了设计药物的难度。Bak 的 BH3 肽与 Bcl-xL 的结合面积相对较小, 大约 500  $\text{\AA}^2$ , 而且结合 Bcl-xL 的位点是较深的疏水沟槽, Bak 蛋白的 BH3 肽为两亲性螺旋, 占据并结合于疏水沟槽, 这些信息为分子设计提供了线索<sup>[10]</sup>。

维奈托克是第一个上市的干扰蛋白-蛋白相互作用的小分子药物。两个蛋白的相互作用, 往往是广泛而表浅的弱结合作用, 难以确定切入点。维奈托克研制历程, 涉及了 FBDD、NMR 和 X-射线衍射等多种技术应用。

**7.3 片段连接** 艾伯维公司用核磁研究构效关系 (SAR by NMR) 平台技术筛选 9 000 余个片段分子 (MW < 210) 对 Bcl-xL 的结合位点, 得到了第一个结合片段 4'-氟-联苯-4-甲酸 (**20**),  $^{15}\text{N}$ -2D-NMR 显示 **20** 结合于 Bcl-xL 疏水沟槽内的 Gly94 和 Gly138,  $K_d$  为  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

通过比对化合物 **20** 与 Bcl-xL 的复合物与 Bak 和 Bcl-xL 复合物的 NMR, 发现另处存在第二个结合位点。为发现结合第二位点的苗头分子, 在化合物 **20** 的存在下, 用 NMR 方法筛选了 3 500 个 MW < 150 的小分子, 发现 **21** 结合于第二个位点,  $K_d$  为  $4\ 300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

两个片段分子连接成一个分子, 变三元复合物成二元体系, 减少了熵损失, 理论上可提高结合能力。经不同的连接基和连接位点变换, 优化出新的苗头分子 **22**, 经荧光偏振检测化合物抑制 Bcl-xL 活性  $K_i$   $1.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。然而二维核磁谱表明乙烯基并非良好的连接基。



**7.4 优化连接基** 为此, 用 N-酰化的磺酰胺基作为连接基, 以融合处于邻位的乙烯基和羧基的功能, 因为  $-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{CO}-$  含有两个酰基, 拉电子效应使 NH 的酸性接近羧基, 合成的 120 个分子的集中库经荧光偏振测试, 发现化合物 **23** 抑制 Bcl-xL 活性  $K_i = 0.245 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 比 **22** 强 5 倍。图 9 是 **23** 与 Bcl-xL 的结合模式, 联苯基处于两个  $\alpha$  螺旋之间, Bcl-xL 的 Phe97 区分开两个片段, Phe97 的苯基与 Tyr194 同硝基苯片段发生  $\pi-\pi$  叠合作用。化合物 **23** 可视为 3 个片段构成: 第一片段是联苯基, 第二片段为硝基苯磺酰胺, 第三片段为苯并异硫代吡喃。

**7.5 片段 3 的优化** 对片段 3 进一步优化, 合成了上百个分子, 其中 **24** 活性高达  $K_i$  值  $36 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。图 10 是 NMR 方法显示的 **24** 与 Bcl-xL 的结合特征, 表明第一和第二片段的位置与 **23** 相同, 但第三个片段的硫苯基折返回到硝基苯的下方, 此时硫苯基处在蛋白的 Phe97 与 **24** 的硝基苯之间, 而硝基苯在 Tyr194 下方, 形成层叠的  $\pi-\pi$  堆积。这些相互作用说明了 **24** 的活性强于以前的化合物<sup>[11]</sup>。

**7.6 人血清对活性分子的失活** 然而 **24** 活性虽高, 但介质中若含有人血清则活性下降, 10% 血清使其完全失

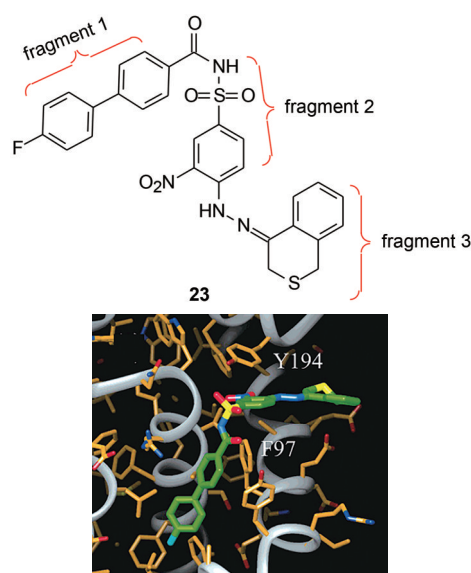


Figure 9 The binding mode of **23** (green) to Bcl-xL by NMR

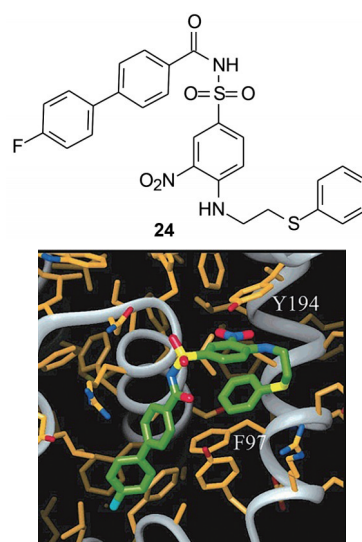
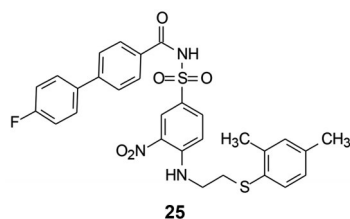


Figure 10 The binding mode of **24** (green) to Bcl-xL by NMR

活。后来证明是白蛋白 (HSA) 的结合, 是因为 HAS-III 的结构域与 **24** 的酸性基团 N-酰化的磺酰胺相结合, **24** 与 HAS-III 的结合力  $K_i < 100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**7.7 类似物的启示** 在合成的 125 个化合物中, **25** 是 **24** 的二甲基取代物。NMR 表明 **25** 与 Bcl-xL 和 HAS-III 的结合模式都与 **24** 不同。 **25** 的第三片段与 HAS-III 的结合呈伸展形, 苯硫乙基埋入非极性的氨基酸残基中, 提示 Bcl-xL 和 HAS-III 的末端分别为极性 (因此 **24** 的苯环向回折曲) 和非极性, 因而设想变换乙基为有极性基团不会影响与 Bcl-xL 的结合, 并促使末端进入溶剂相, 从而削弱与 HAS-III 的结合力, 例如胺、酰胺或砜基不利于与 HAS-III 结合<sup>[12]</sup>。

**24** 的第一片段与 Bcl-xL 和 HAS-III 相结合的氟代联苯基所处的环境不同, Bcl-xL 在氟端尚留有空间, 而



且发生部分溶剂化, 而HAS-III结合的氟苯基被非极性残基满满地包围, 没有空隙。提示该片段也可加入或变换为极性基团, 以使与Bcl-xL和HAS-III结合的差异化。图11是化合物**24**进行分子设计的示意图<sup>[13]</sup>。

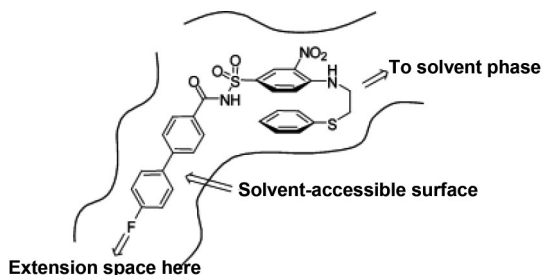


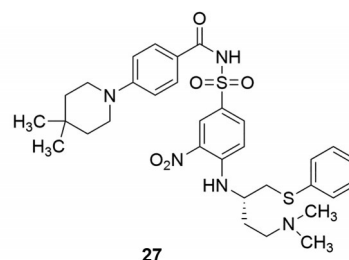
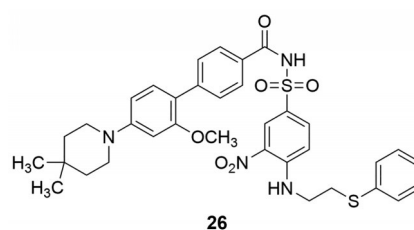
Figure 11 Conformation of **24** in the binding site

**7.8 氟代联苯基的变换** 依照上节的分析, 在氟代联苯基引入含有极性基团的长度不同的碳链, 经构效关系研究得到化合物**26**, 抑制Bcl-xL活性的 $K_i$   $0.019 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 介质中含有1%血清对Bcl-xL活性的 $K_i$   $0.652 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 提示极性基团的引入一定程度克服了与HAS-III的结合。

**7.9 另一端苯硫醚基的变换** 以化合物**26**的2'-甲氧基-4',4'-二甲基哌啶为固定基团, 变换片段**3**的结构, 即在乙硫基的 $\alpha$ 位连接含胺基的侧链, 以提高抑制Bcl-xL的活性和降低HAS-III的结合作用。优化出化合物**27**, Bcl-xL活性的 $K_i$   $0.0008 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 介质中含有10%血清对Bcl-xL活性的 $K_i$   $0.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 还证明R构型是优映体。**27**具有高抑制Bcl-xL活性和高耐受HAS-III作用, 并证实可促进紫杉醇对非小细胞肺癌(高表达抗凋亡蛋白Bcl-xL)的杀伤, 表明有促凋亡作用。

**7.10 双靶标的研制** 然而, R-**27**对多种人癌细胞的抑制效果不高。推测是基于Bcl-xL结构设计的, 没有考虑对Bcl-2蛋白的抑制, 对人体多种高表达Bcl-2的肿瘤抑制作用很弱, 所以抑瘤谱窄。Bcl-xL与Bcl-2序列的同源性虽然只有49%, 但三维结构却很相似<sup>[14]</sup>, 例如两个蛋白都有疏水性沟槽, 是结合促凋亡蛋白的BH3结构域的位置。为了提高抗肿瘤活性, 新的目标是对Bcl-xL/Bcl-2双靶标作用。

**7.11 化合物28的启示** **28**是变换片段**1**时合成的化合物, NMR研究与Bcl-xL结合时, 片段**1**的苯乙基呈



伸展型构象结合于疏水沟槽; 与Bcl-2结合时, 苯乙基则埋入疏水沟槽中。这为设计双靶标抑制剂提供了修饰位置。图12是**28**与Bcl-xL (a) 和Bcl-2 (b) 的结合模式。然而**28**对Bcl-xL/Bcl-2的活性都不强。

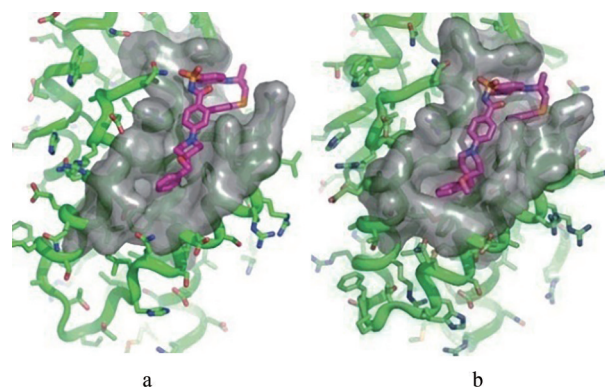
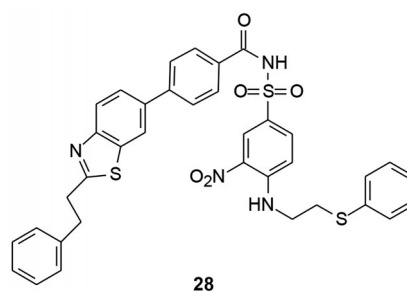


Figure 12 Co-crystals of **28** with Bcl-xL (a) and Bcl-2 (b)

**7.12 兼有碱性和疏水性的片段1** 以**28**为双靶标苗头分子, 整合**26**的哌啶单元, 多轮SAR后, 得到**29**~**31**三个活性较好的化合物, 对两个蛋白和高表达的细胞抑制活性列于表4。

**29**~**31**都连接了联苯结构, 增加了疏水性, 深入到Bcl-2蛋白的疏水腔穴中, 但不影响与Bcl-xL的结合。化合物**31**活性显著强于**29**和**30**, 用3株高表达Bcl-2蛋白的滤泡性淋巴瘤细胞评价**31**活性, 即使含



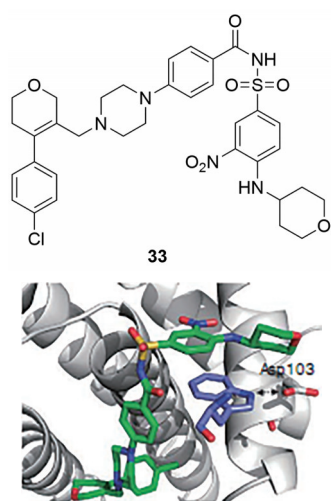


Figure 13 Co-crystal of 33 binding to Bcl-2

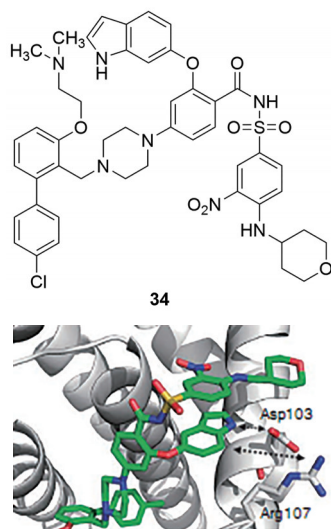
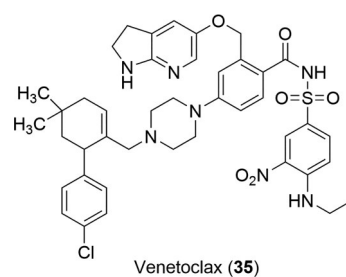


Figure 14 Co-crystal of 34 with Bcl-2

消除对 Bcl-xL 的作用等结构因素,经 SAR 反馈,优化出化合物 35 (ABT-199)。

35 选择性抑制 Bcl-2 蛋白 (图 15),而对 Bcl-xL 作用很弱,表 5 列出了对靶标蛋白和高表达细胞的作用。例如对 Bcl-2 高表达的急性淋巴白血病细胞 (ALL)  $EC_{50} = 8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而对 Bcl-xL 高表达的 H146 细胞  $EC_{50} > 4\,000 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。35 消除了抑制血小板的不良反应,小鼠灌胃  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $AUC = 2\,261 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),血小板计数未见变化,而 navitoclax (32) 犬口服  $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $AUC = 115 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),用药后 6 h 的血小板降低 95%,是由于作用靶标不同的缘故。

化合物 35 可口服吸收,6~8 h 血药浓度达峰,半衰



Venetoclax (35)

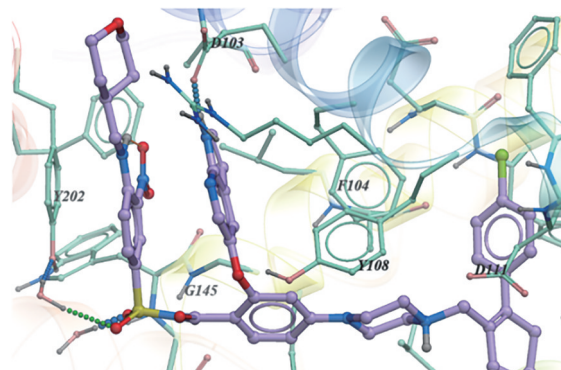


Figure 15 Co-crystal of 35 with Bcl-2

期 26 h。定为候选化合物,名为维奈托克 (venetoclax),经临床试验,证明对 17 号短臂染色体缺失的慢性淋巴白血病有效,于 2016 年 4 月 FDA 批准上市<sup>[7]</sup>。

## 8 阿思尼布

### 8.1 研制背景

慢性髓细胞白血病 (CML) 和成人 ALL 的发病原因是血液祖细胞的 9 号和 22 号染色体发生交互易位,导致 BCR 和 ABL1 基因在费城染色体 (Ph) 上融合,表达的 BCR-ABL1 融合蛋白具有 ABL1 激酶的活性结构域,使得许多信号通路异常活化,导致白血病的发生、分化、增殖的失控。已有治疗 CML 的药物如伊马替尼等有效药物,作用靶标是 BCR-ABL1 的 ATP 结合位点。然而持续用药发生 BCR-ABL1<sup>T315I</sup> 的突变而失效。阿思尼布的研究目标不是 ATP 位点,而是作用于“远方”的变构位点。

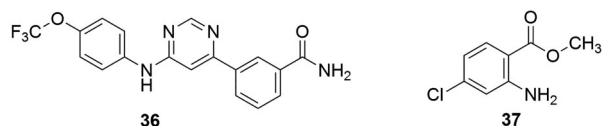
2003 年发现豆蔻酰基 (十四烷酰基) 参与 ABL1 的自调节过程<sup>[18]</sup>,当豆蔻酰基进入 ABL1 的 C 端豆蔻酰基结合腔,与 N 端发生共价结合 (酰化),致使 ABL1 降低了构象的柔性而非活化态,这是个天然的自抑制作用。而融合蛋白 BCR-ABL1 的 BCR 占据了 ABL1 的 N 端帽区的豆蔻酰基结合位点,导致了 BCR-ABL1 的结构性活化,致使细胞发生持续性分化增殖而恶性病变。BCR-ABL1 的构象与激酶 ATP 位点不同,与之结合的抑制剂之间不发生交叉耐药,这是研制变构抑制剂的

Table 5 Selective activities of 35 against Bcl-2

Cell	Bcl-2 $K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bcl-xL $K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	FL5.12 cell Bcl-2 $EC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	FL5.12 cell Bcl-xL $EC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	RS4;11/ALL Bcl-2 $EC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	H146 cell Bcl-xL $EC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
Activity	< 0.01	48	4	261	8	4 260

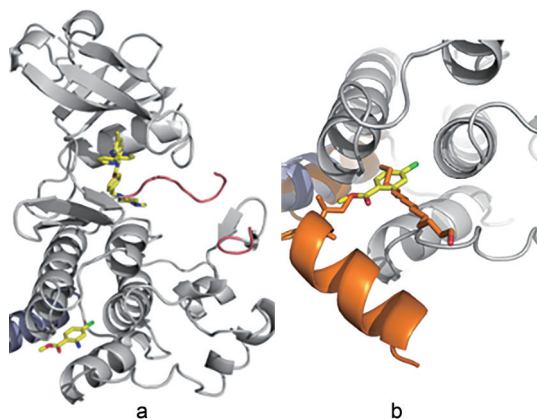
分子依据<sup>[19]</sup>。

**8.2 苗头化合物** 寻找苗头分子是依据NMR信号变化而定。方法是先用伊马替尼占据ABL1的ATP结合位点形成复合物,以确保信号的变化不是因结合ATP位点所致。筛选了500个水溶性和结构多样性小分子,通过滴定法测定ABL1-伊马替尼复合物特定<sup>1</sup>H谱化学位移的变化,确定变构苗头物与ABL1的结合常数,或者用滴定法测定受试物竞争性的排代工具药GNF-2 (**36**)与ABL1复合物,**36**结合于变构域 $K_d = 7.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (LE = 0.26)。这两种NMR测定方法有高度重合性。在发现的30个苗头中,化合物**37**的亲和力 $K_d = 6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,相对分子质量MW = 185,配体效率较高(LE = 0.66),因而是良好的苗头。



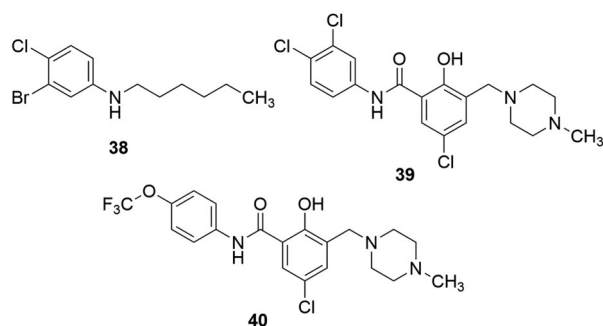
**8.3 苗头-先导物演化** 首先变换氯原子,溴代化合物结合性能提高5倍,然而生化实验没有抑制功能,对转染融合蛋白的细胞即使在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下也没有活性。研究化合物**37**-ABL1-伊马替尼三元复合物的晶体结构,表明**37**的结合位置与ABL1的螺旋1形成弯曲的抑制态构象是不相容的。图16a是三元复合物晶体结构示意图,伊马替尼和化合物**37**分别结合于ATP腔和变构区豆蔻基结合腔;图16b显示了**37**处于豆蔻酰基的结合位置,**37**的甲酯与Helix1的Ile521的侧链阻挡了Helix1转变为非活化构象,所以没有功能。

基于图16的信息,模拟豆蔻基的长链将羧基甲酯置换为正己胺基(**38**),提高了结合力( $K_d = 4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , LE = 0.49),但仍没有细胞活性。模拟工具药**36**结



**Figure 16** a: Crystal structure of ABL1 kinase domain in complex with imatinib and **37**. b: Structural detail, showing the position of **37** in the myristate pocket of ABL1 kinase

合于弯曲型Helix1的药效团,演化为化合物**39** ( $K_d = 6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , LE = 0.24),但还是没有细胞活性。研制者怀疑用<sup>1</sup>H NMR未能反映化合物结合于失活性的弯曲型Helix1构象。因而改用在Helix1上的Val525残基作<sup>15</sup>N-标记,利用<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H-HSQC信号峰的强度判断化合物的结合状态,结果表明,直线型的Helix1的Val525信号为尖锐高峰,而弯曲状Helix1的Val525只有平均峰高度。化合物**37**~**39**的信号是明显的高尖峰,而有功能活性的**36**为平均的峰高度,从而解释了无功能活性的化合物即便结合于变构区,并没有影响Helix1的直线型构型,而**36**则引起Helix1的弯曲<sup>[20]</sup>。



鉴于化合物**36**的三氟甲氧基变换位置失去功能活性,推测CF<sub>3</sub>O-对于稳定Helix1的弯曲构象是重要的药效团,因而用CF<sub>3</sub>O-基团替换**39**的二氯原子,化合物**40**对ABL1的结合活性 $K_d = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,对野生型BCR-ABL1转染Luk Ba/F3细胞增殖的抑制活性GI<sub>50</sub> =  $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,这个结果打开了深入研究的道路。去除苯环上酚羟基和氯原子,优化脂杂环,得到的**41**提高了生化活性 $K_d = 0.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (LE = 0.33)和细胞活性GI<sub>50</sub> =  $2.93 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。**41**可视作里程碑化合物。

**8.4 结构生物学指导优化结构** 图17是**41**-ABL1-伊马替尼三元复合物晶体结构,CF<sub>3</sub>O-处于狭窄结合通道的深部,氟原子与亮氨酸Leu359的羰基发生静电相互作用;酰胺基的NH经水分子介导与Ala452和Glu481形成氢键网络;两个芳环都与酶有良好的 $\pi$ - $\pi$ 相互作用;吗啉环有两种定位:一是未与酶分子接触,进入水相(图17中绿色);另一是内翻180°,进入变构域的疏水裂隙中(图17中黄色),与Thr453、Met456和Pro480组成的疏水基团发生疏水相互作用,吗啉环内翻180°的位置提示了进一步设计依据。

为了契合于疏水裂隙的空间,在苯环B的3位经单键连接嘧啶环,以可旋转的平面结构适配于疏水裂隙,4位连接亲水性基团有利于溶解性。优化的目标定为对ABL1的高抑制活性,对转染野生型和突变型(T315I)BCR-ABL1的细胞有强抑制活性,以及适宜的物理化学和体外药理学性质。优化出化合物**42**,对

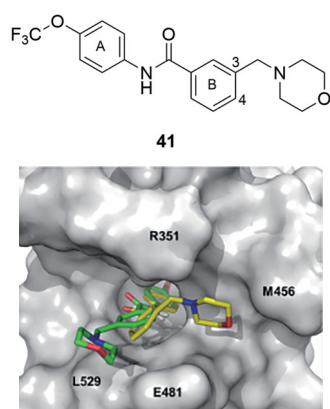


Figure 17 Two possible orientations of the morpholine ring of compound **41** in the crystal structure

ABL1 酶活性  $IC_{50} = 2.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $LE = 0.32$ ),  $\log P = 3.0$ , ( $LLE = 4.50$ ), 对高表达 BCR-ABL1<sup>T315I</sup> 的 Luc8/F3 细胞抑制活性是  $GI_{50} = 0.037 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 对大鼠肝微粒体清除率  $CL = 40 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。图 18 是 **42** 与 ABL1-伊马替尼三元复合物的晶体结构图, 分子处于疏水裂隙中, 以氢键和疏水作用结合, 羟基四氢吡咯处于开口处, 指向溶剂相。

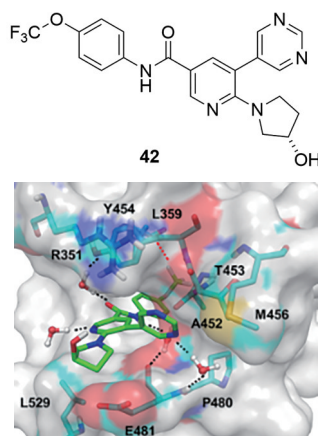


Figure 18 Co-structure of ABL1-imatinib complex bound to **42**

**8.5 进一步优化和消除对HERG蛋白的不良反应** 然而 **42** 对 HERG 蛋白有一定的抑制作用 ( $IC_{50} = 9.6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 有潜在心脏毒性, 还得作结构优化。对 HERG 显示抑制的分子多存在含氮的碱性基团, 这与提高溶解性加入碱性基团相矛盾, 矛盾之中, 仍以提高抑制变构域为主。图 18 的晶体结构显示, 三氟甲氧基的结合部位尚有空余空间, 为提高范德华作用应增大基团体积, 可用两种方式修饰, 一是硫原子替换氧原子, 另一是将一个氟原子换成氯。第二处修饰位点是右侧苯环 4-羟基四氢吡咯环的取代基变换, 变换吡啶环与 3 位咪唑环之间的扭角 (构象), 提高活性和溶解性; 第三个修饰位点是咪唑环的变换, 是由于 **42** 的咪唑环距离 Glu481 骨架

的羰基近, 有可能形成氢键, 但需要有氢键给体, 咪啉不能提供, 而 3-吡啶基的 NH 可发生氢键结合。综合上述 3 处的变换, 合成了一系列化合物 (结构从略)。在一批高活性化合物中遴选出 **43**。

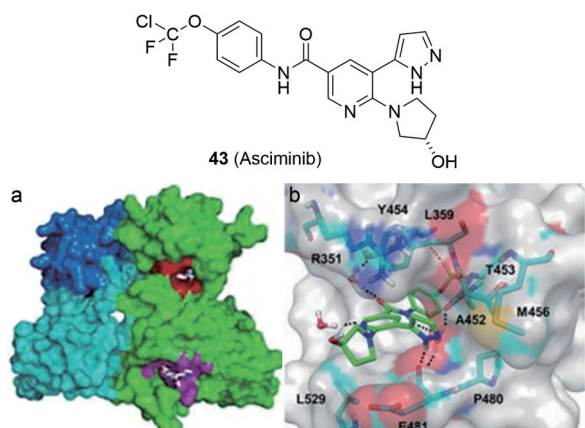
**8.6 候选物确定和阿思尼布的上市** 化合物 **43** 对 ABL1 激酶  $IC_{50} = 0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 相对分子质量 416.13,  $LE = 0.37$ ; 等温滴定量热法 (ITC) 测定的抑制 ABL1 活性  $IC_{50}$  也是  $0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 换算成结合焓 ( $\Delta H$ ) 贡献为  $-72.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 熵贡献 ( $-T\Delta S$ ) 为  $-65.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 说明 **43** 与 ABL1 变构区以特异性结合占优势。对高表达野生型 BCR-ABL1 激酶的 Luc-Ba/F3 细胞活性  $GI_{50} = 1.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 突变型 BCR-ABL1<sup>T315I</sup> 细胞活性  $GI_{50} = 25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{Clog } P$  3.3, 亲脂性效率  $LLE = 5.40$ ; 静脉注射小鼠/大鼠/犬的半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 分别为 1.1/2.7/3.7 h; 小鼠/大鼠/犬口服生物利用度 ( $F\%$ ) 分别为 21/9/66; 在  $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下对主要的药物代谢酶 CYP450 没有抑制作用, 此外用吡啶置换咪啉环消除了对 HERG 蛋白的抑制作用。随即确定为候选化合物, 定名阿思尼布 (asciminib), 经临床研究表明阿思尼布是慢性髓细胞白血病治疗药, 尤其对门户氨基酸发生变异的 T315I 而产生耐药的患者, 阿思尼布是有效的治疗药物, 美国 FDA 于 2021 年批准上市<sup>[21]</sup>。

**8.7 与 BCR-ABL1 的结合模式** 阿思尼布与 BCR-ABL1 和伊马替尼三元复合物晶体结构 (图 19a) 提示, 两个药物结合在不同的部位, 分别是变构调节域和 ATP 结合域, 使用这两种药物避免了发生交叉耐药。图 19b 是阿思尼布与变构位点的结合模式, 氯代二氟甲氧基结合于小疏水腔, 氟原子与 Leu359 的骨架羰基发生静电作用 (氟键), 左侧苯环与 Thr453 和 Met456 发生疏水作用, 酰胺的羰基氧经结构水与 Arg351 生成氢键, 吡啶的氮原子经水分子介导形成氢键, 吡啶环结合于疏水裂隙, 并与 Ala452 羰基发生氢键结合, 吡啶处于吡啶的酰基的间位形成 U 形状是非常必要的。羟基四氢吡咯处于水相边缘, 起到助溶作用。

## 9 索托雷塞

**9.1 KRAS 蛋白及其变异体** 人类肿瘤 30% 是由于癌基因 *KRAS* 突变所引起, 是肺癌等许多肿瘤的驱动基因, 肺癌中 20% 患者 *KRAS* 蛋白的 Gly12 变异成 Cys12 (*KRAS*<sup>G12C</sup>)。在生长因子的信号通路中, *KRAS* 的功能是分子开关, 通过与二磷酸鸟苷 (GDP) 结合成非活化形态, 或与三磷酸鸟苷 (GTP) 结合成活化型的开关循环, 调节下游效应蛋白的增殖。当 *KRAS* 发生 G12C 突变, 损坏了与 GTP 酶活化蛋白的结合, 使 *KRAS* 失活, 导致细胞的持续增生。

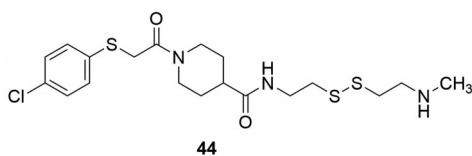
*KRAS* 蛋白已知 40 年, 却长时间未研制出药物, 原



**Figure 19** a: The bindings of imatinib (red in color) in ATP binding site and asciminib (purple in color) in allosteric domain of BCR-ABL1 protein, respectively. b: The binding mode of asciminib to ABL1 allosteric domain

因是它的可药性差: 一是 KRAS 与 GDP 酶和 GTP 酶的结合力非常强,  $K_i$  值达  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 抑制剂很难达到与 GD(T)P 酶发生竞争性结合的程度; 另一是该蛋白缺乏明显的疏水腔, 难以发现设计抑制剂的切入点。

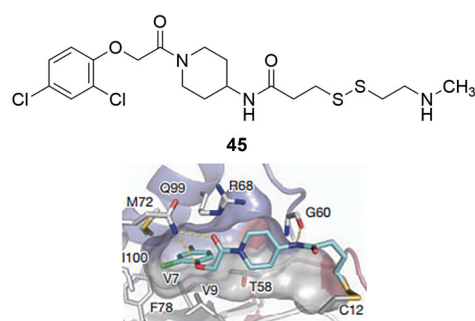
**9.2 共价结合的片段确定变构位点** 有机二硫化物具有弱亲电性, 可与亲核性强的巯基发生交换共价结合。Ostrem 等<sup>[22]</sup>用 FBDD 方法, 筛选了 380 个含有二硫键的化合物对 KRAS-GDP 复合物的结合能力, 用质谱检测全蛋白的 MS 信号, 发现了化合物 **44** 具有结合 Cys12 的能力。



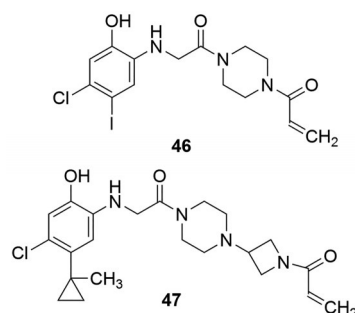
以 **44** 为苗头作先导物演化, 得到了活性较强的化合物 **45**。图 20 是 **45** 与 KRAS<sup>G12C</sup> 共晶结构, 它结合于 KRAS-GDP 的变构区域的 S-IIP 处疏水性沟槽上, 延伸到 Cys12 以外的腔穴中, 氨基与 Gly60 羰基形成氢键, 将 KRAS 固定在非活化的构象上。

**9.3 变换亲电性基团为丙烯酰胺** 二硫化物与巯基发生的是可逆性共价结合。为提高抑制活性, 变换为亲电性稍强的丙烯酰胺化合物 **46**, 用 LC-MS-MS 确证了与 KRAS 的 Cys12 发生共价结合, 生化方法测定 **46** 抑制 KRAS<sup>G2C</sup> 的速率常数 ( $k_{\text{obs}}/[I]=0.1 (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ), 显示一定活性。进而优化活性和过膜性, **47** 的活性和成药性都得到改善。

然而 **47** 与 KRAS<sup>G2C</sup> 共晶结构显示, 哌嗪-氮杂环丁烷-丙烯酰胺链超出了 S-IIP 的结构域, 从而将迈克

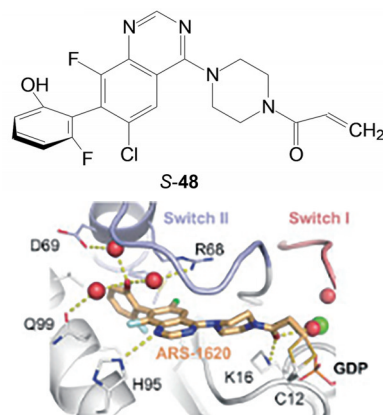


**Figure 20** Co-crystallography of compound **45** binding to KRAS<sup>G12C</sup>

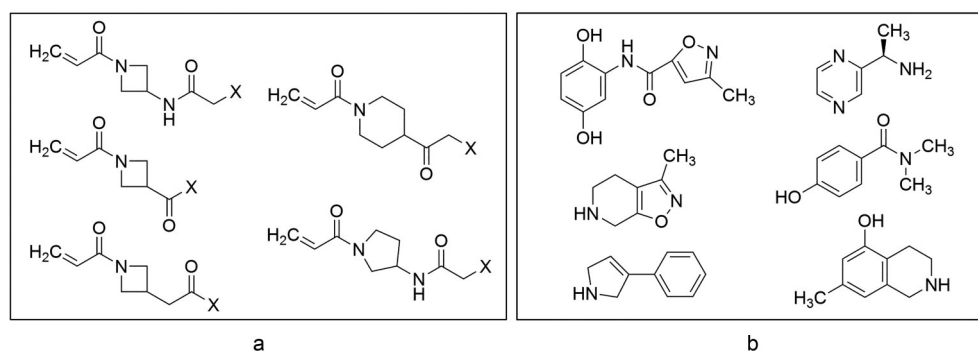


尔基团经哌嗪环直接连在母核上; 结构中邻氨基酚和甘氨酸等片段都是代谢不稳定的片段, 将邻氨基酚变换成喹啉为骨架, 合成了系列化合物, 优化出化合物 **48**。 **48** 的联喹啉-苯基邻位都有取代基, 两芳环平面呈正交构象, 由于转动受阻导致有阻转异构体存在, 拆分后 *S*-构型为优映体。图 21 是 *S*-**48** 与 KRAS<sup>G12C</sup> 共晶图, 分子以伸展形处于变构区的 S-II 腔中 (Switch-II pocket), 酚羟基经 3 个结构水与 Asp69、Arg68 和 Gln99 形成氢键网络, 喹啉 N1 与 His95 发生氢键结合, 哌嗪旁的羰基与 Lys16 氢键结合, 迈克尔基团与 Cys12 发生共价结合<sup>[23]</sup>。 *S*-**48** 没有继续下去, 是因为有了更好的片段, 但揭示的特征在后来得到了应用。

**9.4 新的片段组合** 安进公司与 Carmot 公司合作, 利



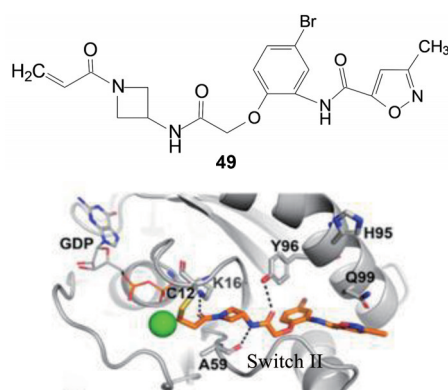
**Figure 21** Co-crystallography of compound *S*-**48** binding to KRAS<sup>G12C</sup>



**Figure 22** Chemotype evolution leading to the discovery of **49**. a: Fragments where X indicates the active handle of the acrylamide; b: Fragments being coupled to target compounds

用Carmot拥有化学型演化 (chemotype evolution) 技术平台, 用含有迈克尔基团的片段分子与有成药骨架的片段分子缩合成单一化合物组成的化合物库, 进行筛选。图22是两类片段的代表性结构, 图22a是含有丙烯酰胺的片段分子, X为片段偶联位点。22b是3 000多个结合于亲电性片段的分子。平台合成出大约两万个单个纳克级目标分子, 用生化和质谱方法快速评价化合物的结合性能, 凡是达到所设定标准的苗头, 制备毫克级的纯净化合物进一步评价, 这样得到苗头化合物**49**。

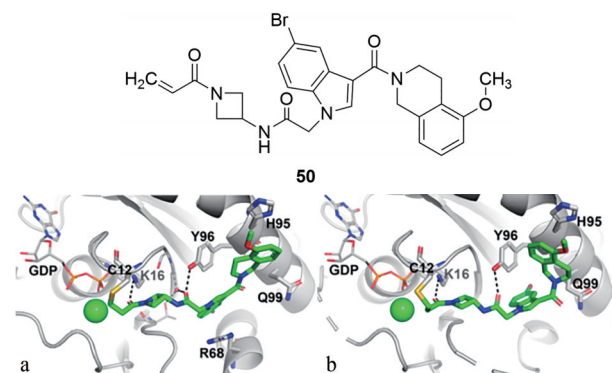
图23是化合物**49**与KRAS<sup>G12C</sup>共晶的X射线衍射图, 结合特征是丙烯酰胺骨架结合于Cys12, 而且羰基氧与Lys16形成氢键, 另一个羰基与Ala56和Tyr96的羟基形成两组氢键。溴苯基深入到疏水腔中, 溴原子被众多疏水残基环绕。噁唑啉酰胺处于Gln99侧链和Switch II之间。



**Figure 23** Co-crystallography of compound **49** binding to KRAS<sup>G12C</sup>

**9.5 环合母核以稳定构象** 将**49**的溴代苯与旁边的氨酰基环合成吡啶环以稳定构象, 变换吡啶3-位连接的末端片段, 综合评价动力学数据 ( $k_{obs}/[I]$ )、生化转化活性 ( $IC_{50}$ ) 和细胞活性 ( $IC_{50}$ ), 得到化合物**50**。**50**与KRAS<sup>G12C</sup>的共晶结构有两个低能构象, 如图24a、b所

示, 图24a的吡啶环在Arg68侧链的上面, 发生范德华结合, 3位的酰胺平面与吡啶环的CCCO两面角为155°, 几乎呈共面性。5-甲氧基四氢异喹啉 (THIQ) 处于Tyr96和Gln99环之间, 与His95的咪唑环发生 $\pi$ - $\pi$ 叠合。图24b的酰胺平面与吡啶环的CCCO两面角为69°, THIQ所处的位置与图24a不同, 除了与His95的 $\pi$ - $\pi$ 叠合外, 还与Tyr96发生边-面的 $\pi$ - $\pi$ 叠合。两种共晶的其他部位的结合方式相同, 例如与Lys16和Tyr96的氢键结合以及与Cys12的共价键结合等。



**Figure 24** X-ray cocrystal structures of **50** in complex with KRAS<sup>G12C</sup>

下一步保持甲氧基-THIQ不变, 对吡啶环各个位置作单个和多组合的变换, 优化出化合物**51**, 抑制细胞活性达到 $IC_{50} = 0.219 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

图25是**51**与KRAS<sup>G12C</sup>复合物晶体结构图。**51**的结合模式与**50**大体相同, 重要的区别是四氢异喹啉环进入新的“神秘”腔内, 是由于His95的侧链旋转, 形成了由Tyr96、His95和Gln99组成的腔。2-环丙基的引入降低了扭转两面角的能耗, 同时也增加了范德华作用力, 因而活性提高了。吡啶环上7-甲基处于Thr58、Tyr71和Gly60所在结合范围的范德华力, 增加了活性贡献<sup>[24]</sup>。

然而化合物**51**在啮齿类的口服生物利用度较低,

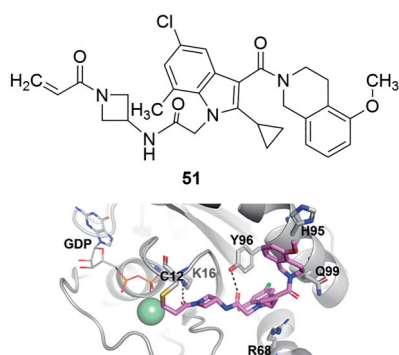


Figure 25 X-ray cocrystal structure of **51** in complex with KRAS<sup>G12C</sup>

体内的消除率却很高, 仍需作进一步优化。

**9.6 骨架的变换** 化合物**51**的结构是各个优势片段的组合, 似乎优化到了尽头。研制者想到前述的**S-48**。当叠合**S-48**和**51**的活性构象, 发现**S-48**的喹唑啉N1位连接出的疏水片段相当于**51**的四氢异喹啉所占的位置, 因而合成了以酞嗪和喹啉酮为母核的新类型化合物, 优化得到**52**, 对酶和细胞活性比**51**分别提高了3和9倍。图26是**52**与KRAS<sup>G12C</sup>复合物晶体图, 苯环上异丙基与Tyr95之间的疏水作用是提高活性的主要片段。

共晶结构还显示化合物**52**的喹啉酮环与异丙基苯环的构象呈正交取向, 也由于2-F, 6-OH-苯与

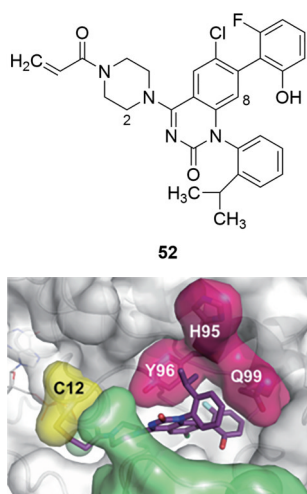


Figure 26 X-ray cocrystal structures of **52** with KRAS<sup>G12C</sup>

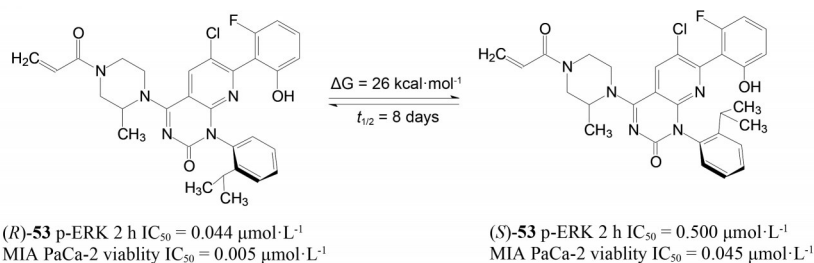


Figure 27 Compound **53** atropisomers are not configurationally stable at 25 °C

喹啉酮环的阻转异构, 存在光学异构体, 经色谱拆分和测定活性发现**R-52**为优映体, 抑制细胞活性的IC<sub>50</sub> = 0.130 μmol·L<sup>-1</sup>, 显著高于**S**-异构体。

**52**的共晶结构还提示了在哌嗪的C2位置有可与Cys12、Glu62和Tyr96接触的空间; 末端的氟代苯酚处, 还有空间可加入疏水性基团与Val9和Ile100结合, 以及与Arg68和Asp69的极性基团的结合空间。这些都是进一步优化**52**结构的契机。因为**52**的水溶性很低, 而且过膜性和生物利用度也较差。**52**已是通往成药的最后的先导化合物。

**9.7 进一步优化** **R-52**作进一步优化, 包括提高活性和对G12C变异细胞株的选择性, 因而用发生G12S变异的A539细胞作为评价脱靶的度量, 同时还评价化合物的物化性质和药代行为, 结构变化的位置是喹啉酮的7位引入疏水基团, 以增强与该空间的疏水性结合。同时探索在哌嗪环的2位甲基取代对活性的影响。此外还考察母核的8位元素CH作N等排变换的作用。合成的众多化合物中优选出**53**, **53**是2'-甲基-8-氮杂-**52**, 活性和选择性超过**52**, 8-氮杂电子等排体使酚羟基与8-氮杂形成分子内氢键, 降低了酚羟基为穿越细胞膜需去溶剂化的能量损耗, 结果表明, **53**的过膜性显著提高, 也提高了溶解性。**53**的生物利用度达到33%, 而且细胞活性很高 (p-ERK IC<sub>50</sub> = 44 nmol·L<sup>-1</sup>; MIA PaCa-2活力 IC<sub>50</sub> = 5 nmol·L<sup>-1</sup>)。

**9.8 光活体的稳定性和索托雷塞的批准上市** **53**的母核氮杂喹啉酮与异丙基苯的连键由于邻位取代基而形成阻转异构, 发生**R**和**S**异构体。图27是两个对映体互相转化的能量变化和光活体的活性。然而**53**的光活体在25 °C下逐渐消旋化, 半衰期为8天, 转化自由能垒ΔG<sup>‡</sup> = 26 kcal·mol<sup>-1</sup>, 所以优映体**R-53**研制成药物有不稳定之缺点。

解决的办法是变换结构, 途径有三个: 一是提高构型转化的能垒, 使活化自由能ΔG<sup>‡</sup>提高到30 kcal·mol<sup>-1</sup>以上, 这样在室温下能以稳定的构型存在; 二是将转化能垒降低到20 kcal·mol<sup>-1</sup>以下, 成为容易转化的混合物, 研发成消旋体; 三是制备对称的取代基, 消除手

性轴。

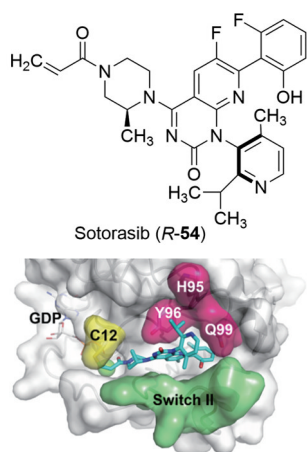
变换异丙基苯片段设计不同的单或双取代基和苯环变为芳杂环, 评价化合物光活体的化学稳定性用两种方法测定化合物转换构型的能垒。对于慢速转化的化合物用<sup>1</sup>H NMR信号随时间的变化得到的阻转异构体的比例的信息, 拟合艾林方程 (Eyring equation) 求出活化自由能值  $\Delta G^\ddagger$ ; 快速转化的化合物用变温核磁谱 (VT-NMR) 加以确定<sup>[25]</sup>。

经过多轮的构效关系和反馈, 化合物 *R-54* (光活体转化自由能  $\Delta G^\ddagger > 30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 在 25 °C 半衰期计算为  $t_{1/2} > 180$  年) 显示高活性和选择性, 药代和物化性质优胜其他分子 (数据从略), 因而确定为候选化合物, 定名为索托雷塞 (sotorasib), 于 2018 年开始临床研究, 对 KRAS<sup>G12C</sup> 变异的中晚期肺癌在免疫疗法和化疗无效的患者, 88% 症状明显改善, 于 2021 年 5 月经美国 FDA 批准上市<sup>[26]</sup>。

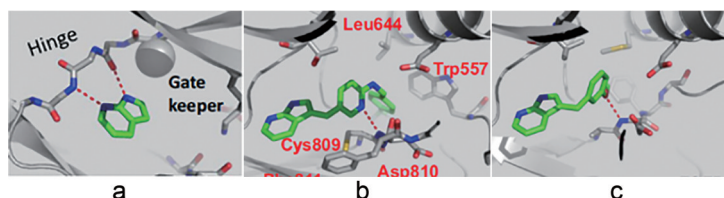
**9.9 与 KRAS 的结合模式** 索托雷塞与 KRAS<sup>G12C</sup> 的共晶结构 (图 28) 显示, 母核氮杂喹啉酮环占据了 S-II 疏水腔, 丙烯酸酯与 Cys12 的巯基发生共价键结合。S-甲基哌嗪采取扭船式构象, 使 2'-甲基与 Cys12 和 Tyr96 接触, 吡啶环上的异丙基完全进入 S-II 疏水腔中, 与 Tyr96、His95 和 Gln99 发生范德华作用。吡啶的 N 原子对手性轴的稳定性没有影响。

## 10 培西达替尼 (pexidartinib)

### 10.1 集落刺激因子 1 及其受体 集落刺激因子 1 受



**Figure 28** X-ray crystal structure of *R-54* bound to GDP KRAS<sup>G12C</sup>

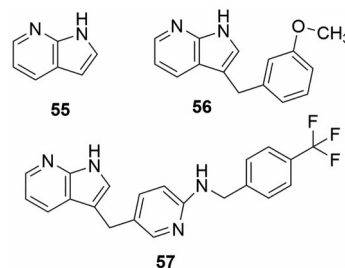


**Figure 29** The co-structures of **55** with Pim-1 (a), **56** with Kit (b), and **57** with CSF1R (c)

体 (CSF1R) 是调节巨噬细胞生长、增殖和分化的主要生长因子, 是一种跨膜的酪氨酸激酶受体, 与配体 CSF1 结合形成信号轴, 在细胞发育和生长中起重要作用。当 CSF1R 异常表达, 引起多种恶性肿瘤发生发展, 因而成为肿瘤治疗药物的靶标。

CSF1R 介导的信号通路也是驱动滑膜中异常细胞增生的主要因素。培西达替尼 (pexidartinib) 是日本第一/三共制药研制的 CSF1R 抑制剂, 2019 年美国 FDA 批准上市, 用于治疗症状性腱鞘巨细胞瘤 (TGCT) 成人患者。这些患者的疾病造成严重功能性限制, 而且无法通过手术改善疾病症状, 所以培西达替尼成为治疗 TGCT 的第一个也是迄今唯一获批的药物。只是研制者没有披露信息的药物化学研制过程。

**10.2 FBDD 的片段生长** Plexxikon 公司 (维罗非尼的研制单位) 仍是用多种激酶“垂钓”筛选。得到 7-氮杂吡啶 (**55**) 对 Pim-1 显示微弱活性 (图 29a), 基于复合物晶体结构, 生长成 3-(3'-甲氧基) 苄基-7-氮杂吡啶 (**56**) (图 29b), 进而增长并优化成 **57** (图 29c)。



进一步优化是在 7-氮杂吡啶环的 5 位引入氯原子得到的 **58** 培西达替尼, 图 30 是培西达替尼与 CSF1R (又称 FMS) 复合物晶体结构图。

**10.3 研制抗阿尔茨海默病治疗药** CSF1R 还表达于脑内的小胶质细胞。小胶质细胞是一种主要分布在中枢神经系统的星形胶质细胞, 其重要作用已成为近年来神经科学研究的热点。神经生物学研究表明, 小胶质细胞可以在野生型和阿尔茨海默病模型小鼠中持续存在, 与淀粉样蛋白  $\beta$  斑块的生成密切相关。研究表明, 通过抑制 CSF1R 蛋白, 阻断小胶质细胞的功能, 可阻止阿尔茨海默病的发展。

Plexxikon 公司以化合物 **57** 为先导物, 设计合成可口服吸收和穿越血脑屏障进入大脑的 CSF1R 抑制剂,

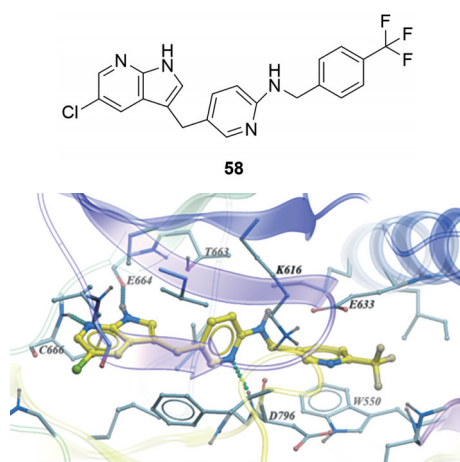


Figure 30 The co-structure of pexidartinib (58) with CSF1R

得到化合物 **59** (PLX5622), 是一种高选择性脑内 CSF1R 抑制剂。**59** 已证明可以消除大脑中的小胶质细胞。图 31 是 **59** 与 CSF1R 复合物晶体结构图, **59** 骨架与 **58** 相同, 二者结合模式大同小异, 基团的变化主要有利于口服吸收和穿越血脑屏障<sup>[27]</sup>。

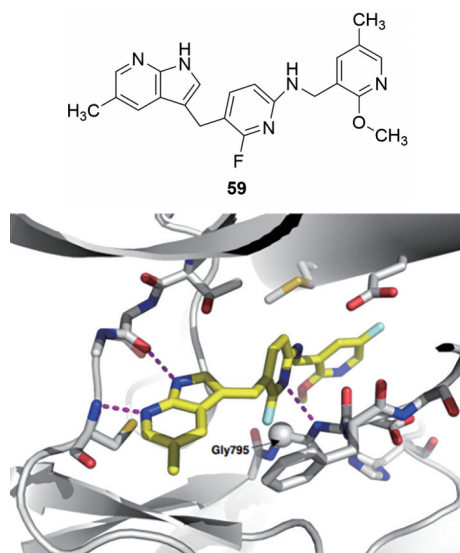


Figure 31 The co-structure of **59** with CSF1R

## 11 结语

高质量的苗头分子是高效率演化成先导物和优化出候选物的基础, FBDD 是从小尺寸分子 (作为片段) 出发, 将活性测定与多种生物物理方法相结合, 能够迅速发现苗头与靶标的结合模式, 从而演化成先导物和优化出候选物, 一路上都是以结构生物学指引的药物化学操作。高质量的片段库是发现优质苗头的前提。片段分子可以与靶标弱键结合, 也可以是可逆的或不可逆的共价结合。配体效率或配体亲脂性效率是监视苗头到先导物质量的重要指标。从维罗非尼 2011 年

第一个 FBDD 药物上市至今有 6 个成功药物, 研发的难易不同, 干预蛋白-蛋白相互作用的维奈托克和变构抑制剂索托雷塞比竞争激酶 ATP 结合位点抑制剂要困难得多, 所以确定靶标、苗头和先导物更须谨慎。

作者贡献: 郭宗儒负责论文的选题、文献调研与撰写。

利益冲突: 作者声明没有利益冲突。

## References

- [1] Congreve M, Carr R, Murray C, et al. A "rule of three" for fragment-based lead discovery? [J] *Drug Discov Today*, 2003, 8: 876-877.
- [2] Hopkins AL, Keseru GM, Leeson PD, et al. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13: 105-121.
- [3] Leeson PD, Bento AP, Gaulton A, et al. Target-based evaluation of "drug-like" properties and ligand efficiencies [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 7210-7230.
- [4] Schade M, Merla B, Lesch B, et al. Highly selective sub-nanomolar cathepsin S inhibitors by merging fragment binders with nitrile inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 11801-11808.
- [5] Gradler U, Schwarz D, Blasses M, et al. Discovery of novel cyclophilin D inhibitors starting from three dimensional fragments with millimolar potencies [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29: 126717.
- [6] Markert C, Thoma G, Srinivas H, et al. Discovery of LYS006, a potent and highly selective inhibitor of leukotriene A4 hydrolase [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 1889-1903.
- [7] Tsai J, Lee JT, Wang W, et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 3041-3046.
- [8] Bollag G, Tsai J, Zhang J, et al. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11: 873-886.
- [9] Murray CW, Newell DR, Angibaud PA. A successful collaboration between academia, biotech and pharma led to discovery of erdafitinib, a selective FGFR inhibitor recently approved by the FDA [J]. *Med Chem Comm*, 2019, 10: 1509-1511.
- [10] Petros AM, Nettesheim DG, Wang Y, et al. Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies [J]. *Protein Sci*, 2000, 9: 2528-2534.
- [11] Petros AM, Dinges J, Augeri DJ, et al. Discovery of a potent inhibitor of the antiapoptotic protein Bcl-xL from NMR and parallel synthesis [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 656-663.
- [12] Hajduk PJ, Mendoza R, Petros AM, et al. Ligand binding to domain-3 of human serum albumin: a chemometric analysis [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2003, 17: 93-102.
- [13] Wendt MD, Shen W, Kunzer A, et al. Discovery and structure-activity relationship of antagonists of B-cell lymphoma 2 family

- proteins with chemopotential activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 1165-1181.
- [14] Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644: 83-94.
- [15] Bruncko M, Oost TK, Belli BA, et al. Studies leading to potent, dual inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL [J]. *J Med Chem*, 2007, 50: 641-662.
- [16] Park CM, Bruncko M, Adickes J, et al. Discovery of an orally bioavailable small molecule inhibitor of prosurvival B-cell lymphoma 2 proteins [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 6902-6915.
- [17] Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective Bcl-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets [J]. *Nat Med*, 2013, 19: 202-208.
- [18] Hantschel O, Nagar B, Guettler S, et al. Amyristoyl/phosphotyrosine switch regulate sc-Abl [J]. *Cell*, 2003, 112: 845-857.
- [19] Fabbro D, Manleya PW, Jahnke G, et al. Inhibitors of the ABL kinase directed at either the ATP- or myristate-binding site [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804: 454-462.
- [20] Jahnke W, Grotzfeld RM, Pelle X, et al. Binding or bending: distinction of allosteric ABL kinase agonists from antagonists by an NMR-based conformational assay [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 7043-7048.
- [21] Schoepfer J, Jahnke W, Berellini G, et al. Discovery of asciminib (ABL001), an allosteric inhibitor of the tyrosine kinase activity of BCR-ABL1 [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 8120-8135.
- [22] Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions [J]. *Nature*, 2013, 503: 548-551.
- [23] Janes MR, Zhang JC, Li LS, et al. Targeting KRAS mutant cancers with a covalent C12C-specific inhibitor [J]. *Cell*, 2018, 272: 578-589.
- [24] Shin Y, Jeong JW, Wurz RP, et al. Discovery of *N*-(1-acryloylazetid-3-yl)-2-(1*H*-indol-1-yl)acetamides as a covalent inhibitor of KRAS<sup>G12C</sup> [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 10: 1302-1308.
- [25] Rotzler J, Gsellinger H, Bihlmeier A, et al. Atropisomerization of di-para-substituted propyl-bridged biphenyl cyclophanes [J]. *Org Biomol Chem*, 2013, 11: 110-118.
- [26] Lanman BA, Allen JR, Allen JG, et al. Discovery of a covalent inhibitor of KRAS<sup>G12C</sup> (AMG 510) for the treatment of solid tumors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 52-65.
- [27] Spangenberg E, Hohsfield LA, Crapser J, et al. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 3758.