

靶向c-Met的I型小分子抑制剂的研究进展

黄牧坤¹ 南祥^{2,3} 王秋旭^{1*} 任杰³

(¹三二〇一医院药学部, 汉中 723000; ²深圳市第二人民医院口腔颌面外科, 深圳 518035;

³汉中市食品药品监督检验检测中心, 汉中 723000)

摘要 间质-表皮转化因子(cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-Met)为受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)亚家族的一个原型成员,也是目前已知的唯一肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)受体。在正常生理条件下, c-Met/HGF信号通路在调控细胞增殖、运动、迁移和侵袭等多过程中起着至关重要的作用。然而这一信号通路的异常激活已成为细胞癌变的驱动性因素。此外, c-Met/HGF信号通路的失调也被证明与临床疗效和耐药相关。因此, c-Met/HGF信号通路作为抗癌药物的新靶点备受关注。现已有多种策略用于调控c-Met/HGF的异常激活,其中小分子c-Met抑制剂因有大量化合物进入临床或上市而备受瞩目。因I型c-Met抑制剂与ATP位点结合时在Met1211残基周围形成“U”型构象,这种特殊的结合模式使I型抑制剂比II型抑制剂对c-Met更具选择性。因此,该文就c-Met/HGF信号通路在肿瘤中的作用及I型小分子c-Met抑制剂的药物化学和临床研究进展作一综述。

关键词 肿瘤; 间质-表皮转化因子; 肝细胞生长因子; 信号转导; 小分子抑制剂; 靶向治疗

Research Progress of Type I Small Molecular Inhibitors for Targeting c-Met

HUANG Mukun¹, NAN Xiang^{2,3}, WANG Qiuxu^{2*}, REN Jie³

(¹Department of Pharmacy, 3201 Hospital, Hanzhong 723000, China; ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, China; ³Hanzhong Center For Food and Drug Control, Hanzhong 723000, China)

Abstract c-Met (cellular-mesenchymal epithelial transition factor) is a prototype member of a subfamily of heterodimeric RTKs (receptor tyrosine kinases) and is the only known receptor for HGF (hepatocyte growth factor) till now. Under normal physiological conditions, the c-Met/HGF signalling pathway is crucial in mediating various cellular processes including proliferation, motility, migration and invasion, etc. However, aberrant activation of this signalling pathway has frequently been found as the driving factor in human cancers. Moreover, dysregulation of c-Met/HGF signalling has also demonstrated which is associated with poor clinical outcomes and resistance acquisition to some approved targeted therapies. Consequently, c-Met has emerged as a promising target for cancer drug development. Up to now, many strategies have been applied to modulate c-Met/HGF signaling pathway in human clinical studies for the treatment of cancer, and small molecule c-Met inhibitors have draw the most attention from the pharmaceutical industry due to a considerable number of compounds entering clinical trials or being marketed as anticancer drugs. Because type I c-Met inhibitors commonly bind to the entrance of ATP-binding site in “U” shape, this binding mode makes type I c-Met inhibitors more selective than that of type II inhibitors. This review provides an overview of c-Met/HGF signaling pathway in cancer and reviews the recent advancements in medicinal

收稿日期: 2021-05-26

接受日期: 2021-08-10

国家科技部2019年重点专项基金(批准号: 2019YFF0302403)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13020321146, E-mail: 1085779616@qq.com

Received: May 26, 2021

Accepted: August 10, 2021

This work was supported by the National Key Research and Development Program for 2019 Special Fund (Grant No.2019YFF0302403)

*Corresponding author. Tel: +86-13020321146, E-mail: 1085779616@qq.com

chemistry development and clinical applications of type I small molecule c-Met inhibitors.

Keywords cancer; c-Met; HGF; signal transduction; small molecule inhibitor; targeted therapy

在发达国家, 肿瘤已超越心脑血管疾病成为严重危害人们健康的恶性疾病^[1]。基于对肿瘤的深入研究, 现已认识到肿瘤形成的主要原因是: 原癌基因激活或致癌因子的诱导可引起机体正常细胞癌变, 从而失去对细胞增殖的调控能力, 使得细胞逃脱正常的凋亡过程并具有自主或相对自主的无限增殖能力, 最终形成肿瘤^[2-3]。基于目前认知, 细胞信号通路在多种生理病理活动中发挥重要作用。其中, 蛋白激酶(protein kinases, PKs)为一类可从高能供体分子(如ATP)转移磷酸基团至特定底物的酶, 在细胞信号转导中起着关键作用。蛋白激酶可通过从高能供体分子转移磷酸基团结合到蛋白质特定的氨基酸残基上, 使蛋白质磷酸化后产生构象变化而发挥多种生理作用。其中对于蛋白酪氨酸激酶的研究最为广泛, 目前已有多个此类药物成功上市。现有资料表明, 超过50%的原癌基因和癌基因产物均具有酪氨酸激酶活性^[4-5]。

1 c-Met的结构和生物学功能

间质-表皮转化因子(cellular-mesenchyma epithelial transition factor, c-Met)作为受体酪氨酸激酶家族的重要成员之一, 与内源性配体肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)结合或与其他途径交联激活酪氨酸激酶活性, 诱导细胞增殖、侵袭、迁移及血管生成等一系列生物学效应。c-Met与HGF的异常表达则与肿瘤细胞的发生、侵袭、转移和凋亡等多种异常活动密切相关。同时, c-Met与HGF的高表达与肿瘤的预后与耐药息息相关。因此c-Met作为抗肿瘤药物的靶点备受关注。

原癌基因 *c-met* 是1984年COOPER等^[6]在研究人骨肉瘤Hos细胞系时用化学致癌物*N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚甲基胍克隆出的具有转化活性的基因片段, 随即被命名为*c-met*, 其表达产物为具有酪氨酸激酶活性的受体蛋白。*c-met*基因位于人染色体7q21-q31, 全长大于120 Kb, 包括20个内含子及21个将内含子相互间隔开的外显子^[7]。*c-met*基因的调控主要集中在翻译和剪切水平。如转录的起始位点和剪切方式不同, 可出现多种转录产物。每种转录产物的具体功能尚不完全清楚, 但相应的转录产物只在特定的

癌组织中出现, 提示特异性的转录产物可能与特定组织的癌变有关。8 Kb的转录产物在人体内最为常见, 其编码的蛋白质前体分子量为170 kDa, 经糖基化作用后形成190 kDa的单链前体, 随后被裂解和切割成由 α 链(50 kDa)和 β 链(140 kDa)通过二硫键连接的异二聚体^[8]。高度糖基化的 α 链全部位于胞外, β 链分为胞外域、跨膜结构域及胞内的酪氨酸激酶结构域^[9-10]。其中, 胞外域包括3个不同的功能区: (1) 整个 α 链和 β 链N-端的SEMA结构域(semaphorin domain)共同参与配体HGF的结合; (2) 半胱氨酸富集结构域(plexin-semaphorin-intergrin, PSI)亦称为Met相关序列(Met-related sequence, MRS); (3) 含免疫球蛋白的IPT(immunoglobulin plexin transcription), 主要作用为识别并结合HGF。跨膜区由高度疏水的氨基酸残基组成, 是将胞外信号进行跨膜转导的重要部分。胞内域由3个功能域组成: (1) 具有Tyr1003磷酸化位点的近膜结构域(juxtamembrance domain)具有对受体正向调节的作用, 通过蛋白激酶C或 Ca^{2+} /钙调蛋白激酶对丝氨酸残基S985及酪氨酸残基Y1003的磷酸化, 之后与泛素连接酶(E3)Cbl结合, 促进受体泛素化、内化或降解; (2) 酪氨酸激酶催化结构域, 其本身具有酪氨酸激酶活性, 待受体磷酸化后, Y1234与Y1235即以自催化方式活化; (3) C末端多功能结构域(multifunctional docking site), Y1234、Y1235自身磷酸化后, 位于胞质内的Tyr1349和Tyr1356酪氨酸残基可募集结合下游的信号分子, 如Gab-1、Grb-2及SHC等, 这也是c-Met通路的关键环节。经一系列的磷酸化后, PI3K、ERK1/2及FAK等相关的信号通路被激活, 进而诱导细胞增殖、侵袭、抗凋亡、迁移及促血管生成等作用, 在肿瘤的生成和侵袭过程中发挥重要的作用^[11]。不同于其他激酶, c-Met还可与细胞表面其他肿瘤分子(β 整合蛋白、CD44及EGFR等)相互作用, 从而交联激活放大相关效应, 极大地促进了肿瘤的发生发展与转移^[12-13]。

2 HGF/c-Met通路的激活

2.1 依赖HGF的激活机制

在生理/病理条件下有多种机制可激活c-Met, 但最常见的方式仍是HGF和c-Met的结合。两者的

结合使受体自身构象发生改变引起受体二聚化, 导致受体酪氨酸催化区域和C末端多功能对接结构域的自磷酸化。除受体自身磷酸化外, c-Met还可募集下游Gab-1、Gth-2及c-Cbl等衔接蛋白。此外, c-Met的磷酸化还可引发PI3K、ERK1/2及PLC γ 等多种底物的活化^[14]。

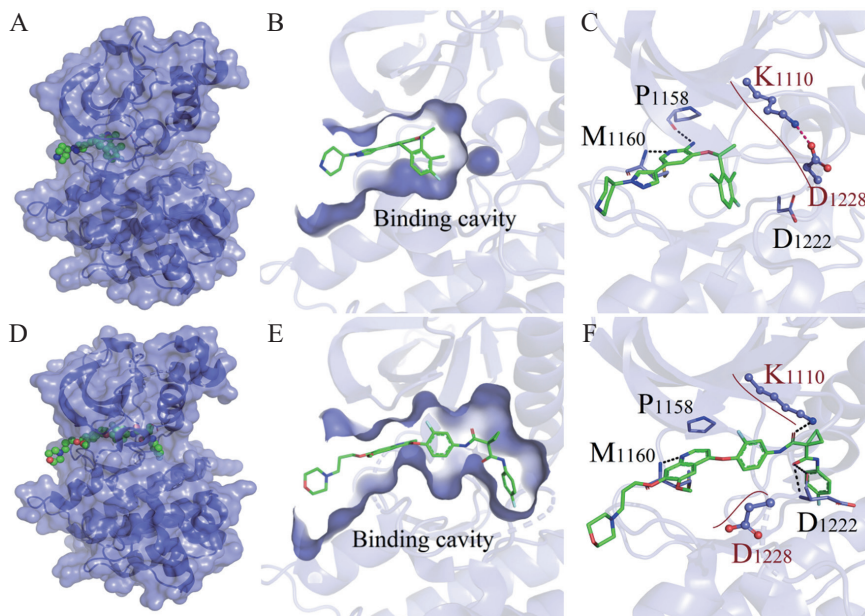
2.2 不依赖HGF的激活机制

c-Met也可以不依赖HGF而被激活, 即c-met基因的突变、扩增及过表达导致的c-Met异常活化。此外, 异常的蛋白加工或机体内负调节物的缺失也可导致c-Met的持续性活化。

3 I型小分子c-Met抑制剂的研究进展

基于c-Met晶体结构的报道, 靶向于c-Met信号通路的抗肿瘤小分子药物研发已进入高速发展的阶段。小分子c-Met抑制剂通过阻断c-Met酪氨酸残基的磷酸化而发挥抑制作用, 属于ATP竞争性抑制剂。c-Met的结合域为一高度保守的催化区域^[15], 此

区域为12个亚基通过折叠连接而成的“双叶”结构。与其他酪氨酸激酶相同, c-Met激酶结合域亦含有一个起始端为天冬氨酸-苯丙氨酸-谷氨酸(Asp-Phe-Gly, DFG)与终止端为丙氨酸-脯氨酸-谷氨酸(Ala-Pro-Glu, APE)的环状活化区域(activation loop)。因环状活化区域有多种构象, 故催化活性可通过这一部分氨基酸序列的不同构象进行调节(图1)。当DFG序列中的Asp和Phe朝向ATP结合位点时, 此构象为激酶的活化构象, 被规定为“DFG in”。针对“DFG in”构象的抑制剂又称I型抑制剂^[15], 此类抑制剂可以一种与ATP近乎相同的构象与c-Met识别并结合, 从而对c-Met通常具有高选择性。当DFG序列中Phe朝向ATP结合位点时, 此时的构象恰好阻挡了ATP与激酶的结合, 即“DFG out”, 为非活化构象^[16]。因环状活化区域的运动, 使此种构象的激酶产生了一个额外的疏水口袋, 又称变构位点。此种构象的抑制剂不仅可占据c-Met的ATP结合区域, 同时还可与疏水口袋形成疏水相互作用, 具此构象的抑制剂又称



A: I型抑制剂Crizotinib(已上市)与激酶的活性构象结合, 其中DFG序列中的天冬氨酸和苯丙氨酸残基指向ATP结合口袋(DFG-in); B: Crizotinib与c-Met激酶的结合空腔图(蛋白质三维结构数据文件编码: 2wgj); C: Crizotinib与c-Met激酶的作用细节; D: II型抑制剂Foretinib(临床II期)结合并稳定激酶的非活性构象, 翻转的天冬氨酸残基朝向结合囊外(DGF out); E: Foretinib与c-Met激酶的结合空腔图(蛋白质三维结构数据文件编码: 3LQ8); F: Foretinib与c-Met激酶的作用细节。

A: type I inhibitor Crizotinib (launched) bind to the active conformation of the kinase with the aspartate and phenylalanine residue of the DFG motif pointing into the ATP-binding pocket (DFG-in); B: binding cavity for Crizotinib/c-Met (PDB code: 2wgj); C: the interaction details between Crizotinib and c-Met; D: type II inhibitor Foretinib (phase II) bind and stabilize the inactive conformation of the kinase with the flipped aspartate residue facing outward of the binding pocket (DGF-out); E: binding cavity for Foretinib/c-Met (PDB code: 3LQ8); F: the interaction details between Foretinib and c-Met.

图1 c-Met的结构及与不同类型小分子抑制剂的结合构象

Fig.1 Structure of c-Met and binding conformation with different types of small molecule inhibitors

II型抑制剂。因疏水口袋的存在,使得II型抑制剂对靶酶c-Met的选择性较差。基于此,我们对已报道的高选择性I型小分子c-Met抑制剂的研究进展及构效关系作一归纳总结,以期为新型小分子c-Met抑制剂的设计及优化提供思路。

3.1 吡啶-2-酮类

最先被报道的小分子c-Met激酶抑制剂是星状孢子素类似物K-252a(1),可在mmol/L水平上抑制c-Met活性。SCHIERING等^[17]揭示了c-Met激酶与K-252a复合物的晶体结构,发现了K-252a内酰胺环的羰基和氢原子分别与M1160的氨基氢、P1158的羰基氧形成氢键,平面的吡啶唑啉环插入氨基端和羧基端P环形成的狭窄缝隙中。Sugen公司受此启发,通过高通量筛选得到了一系列吡啶-2-酮类化合物(图2),代表性化合物有SU11271(2)、SU11274(3)、SU11606(4)和PHA665752(5)^[18],构效关系表明吡啶-2-酮5位的疏水片段及吡咯环的4位碱性取代对于其活性是必需的。SU11271对c-Met($IC_{50}=0.04 \mu\text{mol/L}$)具有良好的抑制作用,对Ron($IC_{50}=5.6 \mu\text{mol/L}$)及FLK-1($IC_{50}=1.28 \mu\text{mol/L}$)亦有一定程度的抑制,同时可显著抑制A549胞内c-Met的磷酸化。SU11606对c-Met($IC_{50}=0.17 \text{ mol/L}$)、Ron($IC_{50}=2.5 \text{ mol/L}$)、FGFR1($IC_{50}=1.8 \mu\text{mol/L}$)及FLK-1($IC_{50}=0.18 \mu\text{mol/L}$)均有较好的抑制作用。SU11274对c-Met($IC_{50}=0.01 \mu\text{mol/L}$)具有高效的抑制作用,同时较Ron、FLK-1、EGFR及CDK2,其对c-Met表现出可观的选择性。基于SU11274良好的激酶选择性,Sugen公司联合哈佛大学医学院对其进一步深入研究,结果表明:SU11274以浓度依赖性方式高效抑制BaF3-TPR-Met细胞的增殖,1 $\mu\text{mol/L}$ SU11274作用18 h可完全抑制BaF3-TPR-Met胞内c-Met的磷酸

化,同时抑制PI3K及AKT等下游信号的表达。此外,还可以浓度依赖性方式诱导BaF3-TPR-Met细胞的凋亡并阻滞其细胞周期在G₁期。遗憾的是,其药代动力学性质较差,生物利用度低,故未再进行更加深入的研究。为了克服SU11274的劣势,Sugen公司继续对其进行结构优化得到了化合物PHA665752,现处于临床前研究。其对c-Met的 IC_{50} 为9 nmol/L,且较FLK-1、c-cabl、FGFR-1、EGFR及c-src对c-Met表现出一定的选择性。同时其以浓度依赖性方式诱导GTL-16细胞的凋亡,并抑制ERK1/2、AKT、FAK、PLC- γ 及STAT-3等下游信号。在裸鼠GTL-16肿瘤模型中,将PHA665752以30 mg/kg的剂量每天一次腹腔注射至其体内,连续给药9天,肿瘤体积大幅下降,肿瘤生长抑制率为68%。

3.2 三唑并三嗪类

Sugen公司通过高通量筛选得到的3-酰肼-吡啶-2-酮类化合物6对c-Met($K_i=0.101 \mu\text{mol/L}$)具有高度特异性,之后对其优化以进一步探究此类化合物对c-Met激酶的抑制潜力^[20](图3)。去甲基化的化合物7可显著提高激酶抑制活性。吡啶-2-酮母核的适宜取代对于c-Met和肿瘤细胞的抑制活性亦是有益的。经优化后的化合物7对于c-Met($K_i=1.3 \text{ nmol/L}$)的抑制效力较化合物6有了显著提高,亦可有效抑制c-Met自磷酸化高表达的A549细胞($IC_{50}=7 \text{ nmol/L}$)。鉴于脲化学键在体内代谢不稳定,VOJKOVSKY等^[19]利用环合原理设计出了四环类化合物8,该物质体外活性较好,但因含稠环结构使得成药性低。Sugen公司在此基础上继续优化,将母核简化为水溶性及成药性更高的三唑并三嗪得到了化合物9,其对c-Met的 IC_{50} 为6 nmol/L^[20]。中国科学院上海药物研究所CHEN等^[21]

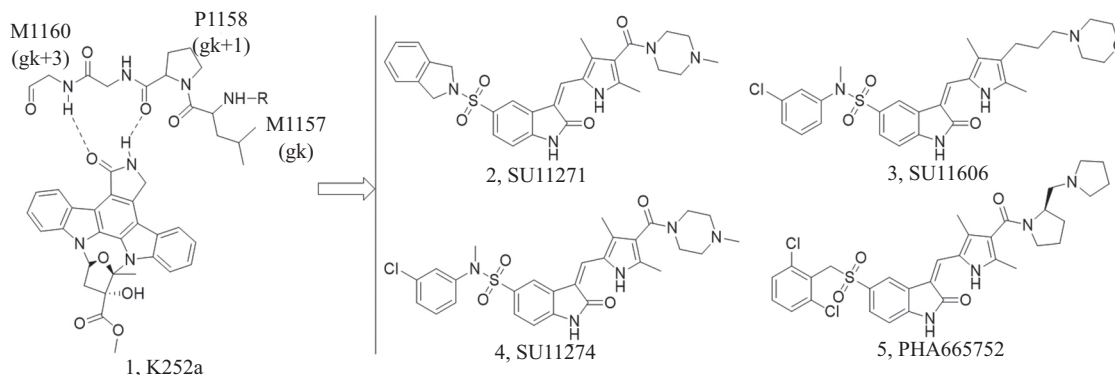


图2 吡啶-2-酮类c-Met抑制剂

Fig.2 Indole-2-one based c-Met inhibitors

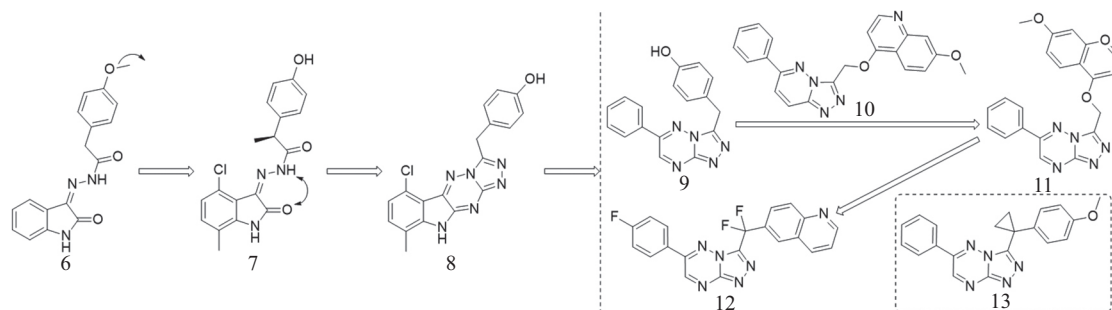
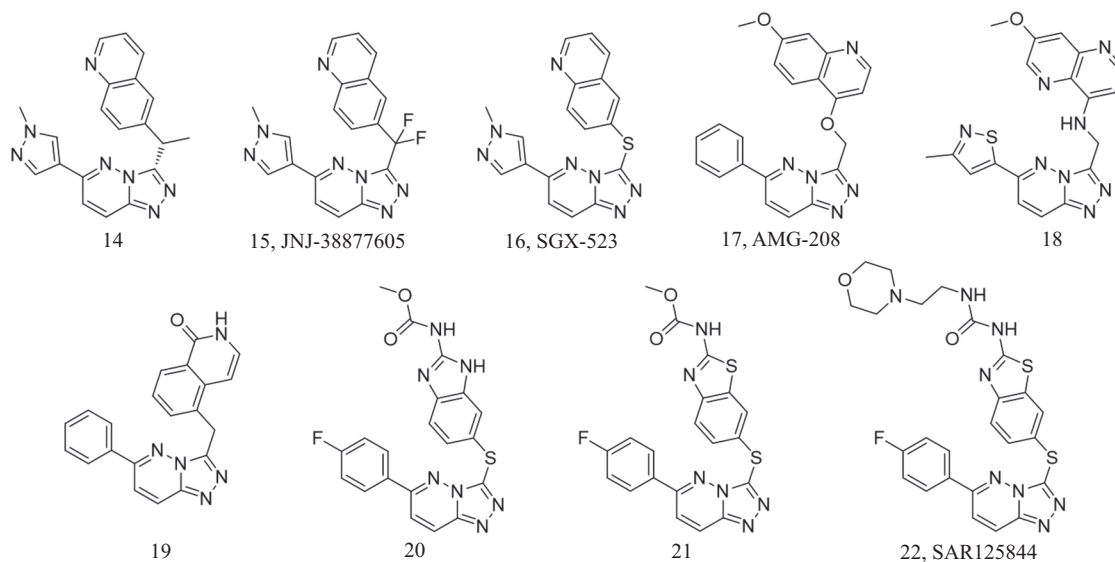


图3 三唑并三嗪类c-Met抑制剂

Fig.3 Triazolotriazine based c-Met inhibitors

图4 三唑[4,3-*b*]吡嗪类c-Met抑制剂Fig.4 Triazolo[4,3-*b*]pyridazine based c-Met inhibitors

以化合物9及10为基础, 基于拼合策略得到了化合物11, 其对c-Met和肿瘤细胞的抑制水平较化合物16均有显著的提高, 对c-Met、MKN-45与EBC-1的 IC_{50} 分别为0.12 nmol/L、21 nmol/L与12 nmol/L, 且较包括Ron在内的其他15种酪氨酸激酶对c-Met表现出高选择性。遗憾的是, 化合物11在体内表现出脱烷基代谢与较低的抗肿瘤作用。为了提高代谢稳定性, 并同时获得良好的体内抗肿瘤作用, ZHAN等^[22]引入代谢更加稳定的 $-CH_2-$ / $-CF_2-$ 代替 $-OCH_2-$, 最优化合物12在激酶及细胞水平均表现出良好的抑制活性, 对c-Met及EBC-1的 IC_{50} 分别为0.24 nmol/L与0.85 nmol/L, 同时酶谱测试表明化合物12为高选择性c-Met抑制剂。此外, 化合物12可显著抑制EBC-1、MKN-45、BaF3/TPR-Met及U87MG胞内的c-Met磷酸化, 并有效抑制AKT与ERK等下游信号。同时化合物12亦表现出良好的药代动力学(Dose=10 mg/kg; C_{max} =869 ng/mL,

T_{max} =1 h, $AUC_{0-\infty}$ =2 377 ng·h/mL, F_{po} =48.3%)与药理学性质(MKN-45异种裸鼠模型, Dose为6.25、12.5、25 mg/kg, bid, 3周; TGI结果等于46.8%、80.1%、96.5%)。此外, Incyte公司报道了一类采用环丙基作为连接链的三唑并三嗪类化合物, 最优化合物13对于c-Met的 IC_{50} 为12.9 nmol/L, 但对包括构效关系在内的其他信息未过多披露。

3.3 三唑并吡嗪类

因三唑并三嗪类化合物对肝微粒体代谢不稳定, Pfizer公司将三唑并三嗪母核替换为代谢较为稳定的三唑并吡嗪类结构, 经优化后得到了化合物14^[23]。该化合物显示出了良好的抑酶活性(c-Met, K_i =11 nmol/L, 选择性超过208种激酶)及抗增殖活性(A549, IC_{50} =6.0 nmol/L), 同时在小鼠体内显示出良好的药代动力学($T_{1/2}$ =1.9 h, F_{po} =58%, CL =21 mL·min⁻¹·kg⁻¹, V_{ss} =3.5 L/kg)及药理学性质。遗憾的是, 此化合物

抑制磷酸二酯酶活性,可引起心率持续性增加、收缩指数下降等一系列严重的不良反应,临床前研究现已终止。随后研究人员以三唑啉酮骨架结构为基础,对两端取代基及连接臂进行了大量改造,得到了化合物15~22)^[23](图4)。美国强生公司开发的化合物15(JNJ-38877605)可高效且选择性抑制c-Met(IC₅₀=4 nmol/L,选择性超过200种激酶),主要作用于实体瘤。但临床I期效果较差,且有严重的肌酐升高不良反应。Eli Lilly公司研发的化合物16(SGX-523)^[24]主要作用于实体瘤,但在临床I期研究中出现了不可逆的肾脏毒性反应。Amgen公司继续对三唑并吡啶类化合物进行改造得到了化合物17(AMG-208),其主要用于治疗前列腺癌及实体瘤,目前处于临床II期)^[25]。AMG-208对c-Met具有高选择性(IC₅₀=9 nmol/L),在SD大鼠体内表现出良好的药代动力学性质(Dose=0.5 mg/kg, vi; CL=0.37 L·h⁻¹·kg⁻¹, V_{ss}=0.38 L/kg, T_{1/2}=1 h, F_{po}=43%),但因结构中存在-OCH₂-结构,在体内代谢不稳定。为了克服-OCH₂-连接臂在体内代谢不稳定的隐患,Amgen继续优化结构,得到了以-NHCH₂-为连接臂的三唑并吡啶类化合物18,其在激酶(c-Met, IC₅₀=5 nmol/L)及细胞(PC-3, IC₅₀=3 nmol/L)水平均表现出良好的抑制活性,同时具有可观的药代动力学性质(T_{1/2}=1.8 h, AUC_{0-∞}=3 500 ng·h/mL),遗憾的是水溶性较差,致使体内抗肿瘤活性不佳。异喹啉酮取代的三唑啉酮类化合物19对c-Met(IC₅₀=3 nmol/L)具有很高的选择性,并对c-Met扩增的肿瘤细胞有显著的抑制作用(SNU-5, IC₅₀=59 nmol/L; MKN-45, IC₅₀=38 nmol/L),同时亦表现出良好的药代动力学性质(Dose=10 mg/kg, po; T_{1/2}=5.3 h, F_{po}=35%)。SCHIOF等^[25]通过高通量筛选

技术发现的化合物20对c-Met具有高效抑制作用,遗憾的是该化合物具有显著的抑制微管蛋白活性的能力。随后用苯并噻唑替代苯并咪唑得到了化合物21,这样虽提高了c-Met激酶的选择性,但水溶性却大大降低。为进一步改善其水溶性,在苯并噻唑2位引入脲基得到的化合物22具有优异的抗肿瘤活性(c-Met, IC₅₀=4 nmol/L; MKN-45, IC₅₀=7 nmol/L),水溶性也得到了较大改善。

3.4 吡啶酮类

Merck Serono公司通过高通量筛选发现磷酸二酯酶抑制剂噻二唑酮类化合物23对c-Met具有一定的抑制作用(IC₅₀=400 nmol/L),且其与c-Met蛋白的结合模式与JNJ-38877605(15)相似。基于上述信息,研究人员对化合物23进行了全面的结构优化(图5)。为了消除化合物23的磷酸二酯酶活性(PDE3=1 500 nmol/L, PDE4=60 nmol/L)并改善其理化性质(清除率=6 L·h⁻¹·kg⁻¹, F_{po}<5%),他们随之将3,4-二甲氧苯基优化为3,5-二氟苯基,得到化合物24。不仅消除了磷酸二酯酶的不良影响,而且提高了c-Met抑制效力(IC₅₀=23 nmol/L),同时也改善了其理化性质(CL=3.4 L·h⁻¹·kg⁻¹, F_{po}=25%)。继而将代谢不稳定的噻二唑酮母核用吡啶酮代替得到了化合物25(c-Met, IC₅₀=42 nmol/L),其在保持活性的同时,理化性质较化合物24有一定的改善(CL=3.1 L·h⁻¹·kg⁻¹, F_{po}=30%)。为了规避氨基甲酸酯类结构在体内代谢的不稳定,引入3-甲基嘧啶得到的化合物26保持了激酶活性(c-Met, IC₅₀=40 nmol/L),遗憾的是水溶性较低(<1 μg/mL, PBS buffer pH7.4)。为进一步改善水溶性,在嘧啶2位引入N,N-二甲氨基丙基得到了化合物27,其理化性质较化合物26有了较大改善。随

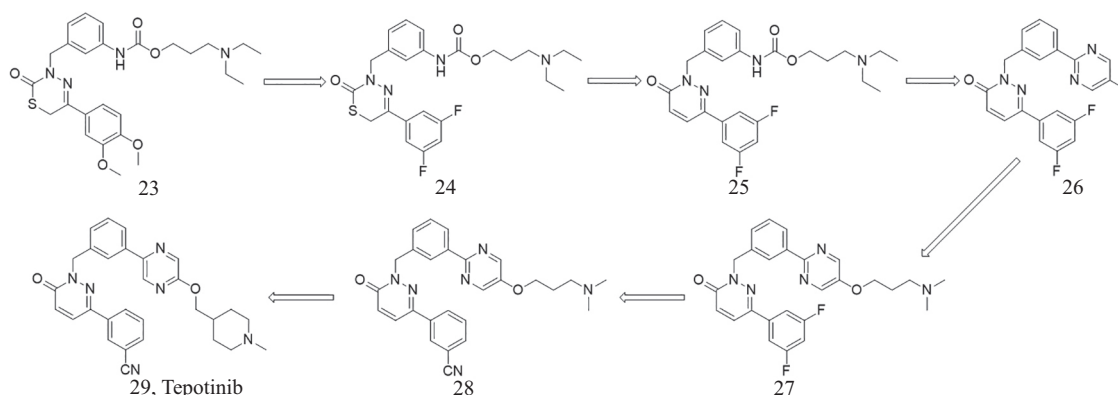


图5 Tepotinib的研发历程

Fig.5 The research and development course of Tepotinib

后为进一步完善构效关系,在化合物27的基础上继续优化,将3,5-二氟苯基用3-氰基苯基取代,嘧啶环3位用*N*-甲基哌啶取代,最终得到了化合物29(Tepotinib)。Tepotinib对c-Met有高选择性的抑制作用(c-Met, $IC_{50} < 1$ nmol/L; 在208个激酶测试中, $0.1 \mu\text{mol/L}$ 时只抑制c-Met),并在大鼠($T_{1/2}=2.1$ h, $C_{\text{max}}=62.2$ ng/mL, $F_{\text{po}}=41\%$)、小鼠($T_{1/2}=3.2$ h, $C_{\text{max}}=66.0$ ng/mL, $F_{\text{po}}=55\%$)及猴子($T_{1/2}=10$ h, $C_{\text{max}}=55.5$ ng/mL, $F_{\text{po}}=25\%$)体内均表现出良好的药代动力学性质,同时该化合物在c-Met扩增的人非小细胞肺癌EBC-1异种移植模型中显示出优良的抗肿瘤作用(Dose=15 mg/kg, 连续5天给药, 随后2天停止给药, 以此循环; qd/po, 32天, 8/8 mouse-complete regression)^[26]。2018年3月, Tepotinib被日本厚生劳动福利部授予了治疗携带*met*基因第14号外显子跳跃突变的晚期NSCLC患者的创新药物资格。2020年3月25日, Merck公司宣布日本厚生劳动省批准了Tepotinib的上市, 该药物可用于治疗不可切除、*met*外显子14跳跃突变的晚期或复发性非小细胞肺癌。Tepotinib同时也成为全球第一个用于治疗携带*met*基因突变的晚期非小细胞肺癌肺癌的口服抑制剂。

3.5 2-氨基吡啶类

Pfizer收购Sugen后,在其基础上继续针对c-Met小分子抑制剂研发。尽管PHA665752(5)可高效抑制c-Met及肿瘤细胞,但因其低溶解度、高清除率及低渗透性导致在体内活性差,这些问题限制了对它的进一步研发。为了改善上述缺陷, Pfizer公司工作人员首先将吡啶酮羰基与吡咯环锁定在同一个环内

(30),以维持吡啶酮与c-Met的关键氢键作用,但因形成了稠环结构使得溶解性未得到改善。继而拆环得到母核2-氨基吡啶(31),随后用2,6-二氯苄基代替2,6-二氯吡啶基得到了化合物32($K_i=3.83 \mu\text{mol/L}$, 亲脂效率=0.35),其对c-Met表现出了一定的抑制活性,同时溶解性得到了一定的改善(图6)。5-芳基片段暴露在蛋白质口袋外与胞质液接触,可调节分子整体的理化性质。基于此,研究人员进而在5位苯环引入PHA665752的四氢吡咯酰胺片段,2位苯环上引入氟原子,同时在苄位上引入甲基,得到了化合物33(c-Met, $K_i=0.012 \mu\text{mol/L}$; 亲脂效率=4.60),其对c-Met的抑制活性较32提高了300多倍,且理化性质也得到了较大改善。为进一步提高分子的成药性,在吡啶环5位引入水溶性最佳的哌啶基吡啶得到了化合物34(c-Met, $K_i=0.018 \mu\text{mol/L}$; 亲脂效率=4.60),其在高效抑制c-Met活性的同时,水溶性也得到了一定提高。随后,研究人员对于消旋体34进行了手性拆分,发现(*R*)-35(PF-02341066, Crizotinib; c-Met, $K_i=0.002 \mu\text{mol/L}$)活性优于(*S*)-35(c-Met, $K_i=0.161 \mu\text{mol/L}$)^[27]。同时, PF-2341066对c-Met具有高选择性。PF-2341066在体内也表现出了良好的抗肿瘤活性,每天按50或者75 mg/kg剂量处理GTL-16小鼠模型,可引起肿瘤明显衰退。鉴于PF-2341066良好的体内外活性, PF-02341066于2011年8月26日被FDA批准上市,商品名为Crizotinib。

3.6 三环类(吡啶并环庚酮)类

Merck公司通过高通量筛选发现了一个具有独特骨架的化合物36,其对c-Met具有良好的抑制活性。随后在36的基础上进行系统优化(图7),将C-3位

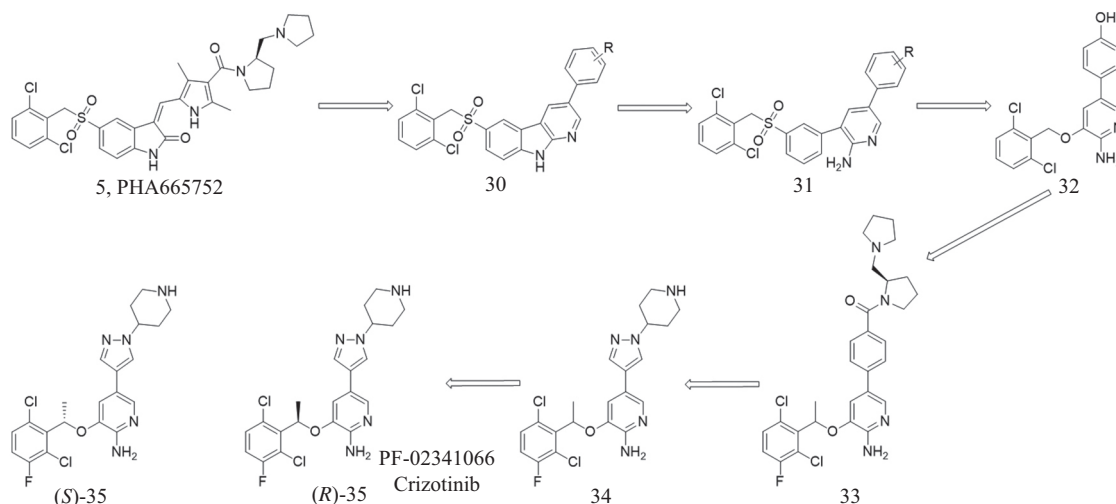


图6 Crizotinib的研发历程

Fig.6 The research and devlopment course of Crizotinib

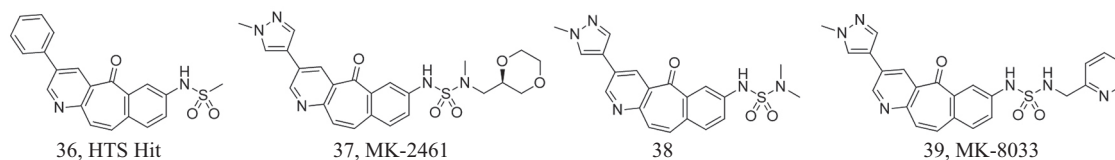


图7 5H-苯并[4,5]环庚烷[1,2-b]吡啶-5-酮类c-Met抑制剂

Fig.7 5H-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]pyridin-5-one based c-Met inhibitors

苯基替换为吡啶基,并在7位引入亲水性最佳的1,4-二氧六环药效团,得到了化合物37(MK-2461),其对c-Met($IC_{50}=2$ nmol/L)具有高效的抑制作用,同时具有良好的药代动力学(Dog, Dose=2 mg/kg; $T_{1/2}=2.9$ h, $AUC_{0-\infty}=13.7$ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $C_{\text{max}}=2.5$ $\mu\text{mol/L}$, $T_{\text{max}}=1.4$ h, $F_{\text{po}}=85\%$)及药效学性质。MK-2461现已进入到临床II期,主要针对比较顽固的实体瘤。遗憾的是, MK-2461对于c-Met的选择性不高,在高效抑制c-Met的同时,也可有效抑制 Ron($IC_{50}=7$ nmol/L)、Flt1($IC_{50}=10$ nmol/L)、Flt3($IC_{50}=22$ nmol/L)、KDR($IC_{50}=44$ nmol/L)、FGFR1($IC_{50}=65$ nmol/L)、FGFR2($IC_{50}=39$ nmol/L)、FGFR3($IC_{50}=50$ nmol/L)及Met($IC_{50}=24$ nmol/L)。为了提高MK-2461对c-Met的选择性,继续优化得到了化合物38,其虽对c-Met有高效抑制作用,同时具有良好的药代动力学性质,但有抑制CYP3A4的不良作用,且对c-Met的选择性未有明显改善。基于上述研究基础, Merck 研究人员继续发力得到了化合物39(MK-8033)^[28],其对c-Met($IC_{50}=1$ nmol/L)及肿瘤细胞均有高效的抑制作用,同时完全消除了对肝药酶CYP3A4的抑制作用,且选择性较化合物37和38也有较大改善,同时具有良好的药代动力学($CL=3.1$ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $T_{1/2}=3.1$ h, $F_{\text{po}}=33\%$)及药效学性质(人源GTL-16异种裸鼠移植模型, Dose剂量为3、10、30、100 mg/kg, bid, po; TGI结果为22%、18%、57%、86%),现处于临床III期,主要用于胃癌及早期乳腺癌的治疗。

4 总结与展望

自1984年c-Met激酶被首次发现以来, c-Met/HGF信号通路就深深吸引着药物学家和生物学家的关注。尤其在本世纪初以来,与其相关的生物学和病理学研究文献均呈指数级生长。这一信号通路的异常激活,如通过蛋白过表达、基因突变、基因扩增以及旁分泌或自分泌上调等途径已成为细胞癌变的驱动性因素。此外, c-Met/HGF信号通路的失调也被证明与临床疗效和耐药相关。c-Met/HGF信号

通路的异常激活在人类恶性肿瘤中普遍存在,这也极大推动了针对c-Met/HGF信号通路的抗肿瘤药物研发项目的快速发展。目前,包括HGF单克隆抗体、c-Met单克隆抗体和小分子c-Met激酶抑制剂在内的20多种治疗药物已进入临床试验,其中Crizotinib与Tepotinib的上市也进一步验证了c-Met/HGF在肿瘤中的致病性关键作用。

近年来,基于c-Met激酶催化区域晶体结构的解析,各种研究组利用合理的设计策略并辅之以计算机药物模拟筛选,设计开发出了结构多样性的小分子c-Met激酶抑制剂。I型抑制剂因其与ATP结合时保守的构象对c-Met激酶具有良好的选择性。在II类抑制剂中,喹啉类抑制剂取得了很好的成功,却面临着靶酶选择性及副反应多等劣势。同时现已上市的小分子c-Met抑制剂有逐渐耐药的趋势,故而开发新型小分子c-Met抑制剂已成为当前迫切的需求。基于I型抑制剂的整体高选择性,本文主要综述了I型c-Met抑制剂的发展概况,同时本文所讨论的各种临床前及上市小分子药物的研发历程及思路可为药物化学家和研究人员提供借鉴,为将来设计开发新型小分子c-Met抑制剂进一步拓展思路。

参考文献 (References)

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. World Health Organization, 2017.
- [2] LU X, SMAILL J B, DING K. Medicinal chemistry strategies for the development of kinase inhibitors targeting point mutations [J]. J Med Chem, 2020, 63(19): 10726-41.
- [3] NAN X, ZHANG J, LI H J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel N-sulfonylamidine-based derivatives as c-Met inhibitors via Cu-catalyze three-component reaction [J]. Eur J Med Chem, 2020, 200: 112470.
- [4] KONG X, PAN P, SUN H, et al. Drug discovery targeting anaplastic lymphoma kinase (ALK) [J]. J Med Chem, 2019, 62(24): 10927-54.
- [5] PARIKH P K, GHATE M D. Recent advances in the discovery of small molecule c-Met kinase inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2018, 143: 1103-38.
- [6] NAN X, JIANG Y F, LI H J, et al. Design, synthesis and

- evaluation of sulfonylurea-containing 4-phenoxyquinolines as highly selective c-Met kinase inhibitors [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2019, 27(13): 2801-12.
- [7] ZHUO L S, XU H C, WANG M S, et al. 2,7-Naphthyridinone-based MET kinase inhibitors: a promising novel scaffold for antitumor drug development [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 178: 705-14.
- [8] RODRIGUES G A, NAUJOKAS M A, PARK M. Alternative splicing generates isoforms of the *met* receptor tyrosine kinase which undergo differential processing [J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(6): 2962-70.
- [9] SALGIA R, SATTLER M, SCHEELE J, et al. The promise of selective *MET* inhibitors in non-small cell lung cancer with MET exon 14 skipping [J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 87: 102022.
- [10] RASHED W M. c-Met as a potential target therapy toward personalized therapy in some pediatric tumors: an overview [J]. *Crit Rev Oncol Hemat*, 2018, 131: 7-15.
- [11] PESCHARD P, ISHIYAMA N, LIN T, et al. A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(28): 29564-71.
- [12] NAKAMURA T, MIZUNO S, MATSUMOTO K, et al. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(12): 1511-9.
- [13] HUH C G, FACTOR V M, SANCHEZ A, et al. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(13): 4477-82.
- [14] NAN X, LI H J, FANG S B, et al. Structure-based discovery of novel 4-(2-fluorophenoxy)quinoline derivatives as c-Met inhibitors using isocyanide-involved multicomponent reactions [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 193: 112241.
- [15] ZHAO F, ZHANG L D, HAO Y, et al. Identification of 3-substituted-6-(1-(1*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyrazin-1-yl)ethyl) quinoline derivatives as highly potent and selective mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) inhibitors via metabolite profiling-based structural optimization [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 134: 147-58.
- [16] ZHANG L, ZHAO J, ZHANG B, et al. Discovery of [1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole derivatives as novel, potent and selective c-Met kinase inhibitors: synthesis, SAR study, and biological activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 150: 809-16.
- [17] SCHIERING N, KNAPP S, MARCONI M, et al. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(22): 12654-9.
- [18] WANG X, LE P, LIANG C, et al. Potent and selective inhibitors of the Met [hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) receptor] tyrosine kinase block HGF/SF-induced tumor cell growth and invasion [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(11): 1085-92.
- [19] VOJKOVSKY T, KOENIG M, ZHANG F J, et al. Tetracyclic compounds as c-Met inhibitors: World Intellectual Property Organization, 2005004808A2 [P]. 20050120.
- [20] DUAN W, GENG M, CHEN F, et al. [1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazine compounds, preparation method and use thereof: USA, 20130324542A1 [P]. 20131205.
- [21] CHEN F, WANG Y, AI J, et al. O-Linked triazolotriazines: potent and selective c-Met inhibitors [J]. *ChemMedChem*, 2012, 7(7): 1276-85.
- [22] ZHAN Z, PENG X, LIU Q, et al. Discovery of 6-(difluoro(6-(4-fluorophenyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*][1,2,4]triazin-3-yl)methyl) quinoline as a highly potent and selective c-Met inhibitor [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 116: 239-51.
- [23] CUI J J, SHEN H, TRAN-DUBÉ M, et al. Lessons from (*S*)-6-(1-(6-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pyridazin-3-yl)ethyl) quinoline (PF-04254644), an inhibitor of receptor tyrosine kinase c-Met with high protein kinase selectivity but broad phosphodiesterase family inhibition leading to myocardial degeneration in rats [J]. *J Med Chem*, 2013, 56(17): 6651-65.
- [24] DIAMOND S, BOER J, MADUSKUIE T P, et al. Species-specific metabolism of SGX-523 by aldehyde oxidase and the toxicological implications [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38(8): 1277-85.
- [25] UGOLONI A, KENIGSBERG M, RAK A, et al. Discovery and pharmacokinetic and pharmacological properties of the potent and selective MET kinase inhibitor 1-{6-[6-(4-fluorophenyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pyridazin-3-ylsulfanyl]benzothiazol-2-yl}-3-(2-morpholin-4-ylethyl)urea (SAR125844) [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(15): 7066-74.
- [26] TAKAMORI S, MATSUBARA T, FUJISHITA T, et al. Dramatic intracranial response to tepotinib in a patient with lung adenocarcinoma harboring *MET* exon 14 skipping mutation [J]. *Thorac Cancer*, 2021, 12(6): 978-80.
- [27] CUI J J, TRAN-DUBÉ M, SHEN H, et al. Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK) [J]. *J Med Chem*, 2011, 54 (18): 6342-63.
- [28] NORTHROP A B, KATCHER M H, ALTMAN M D, et al. Discovery of 1-[3-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)-5-oxo-5*H*-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-*b*]pyridin-7-yl]-*N*-(pyridin-2-ylmethyl)methanesulfonamide (MK-8033): a specific c-Met/Ron dual kinase inhibitor with preferential affinity for the activated state of c-Met [J]. *J Med Chem*, 2013, 56(6): 2294-310.