

· 药学前沿 ·

B-Raf 激酶抑制剂的研究进展

董高超, 周 湘, 唐伟方, 陆 涛*

(中国药科大学有机化学教研室, 南京 210009)

摘 要 原癌基因 B-Raf 存在于多种肿瘤细胞中, 尤其在黑色素瘤和甲状腺癌中。选择性 B-Raf 激酶抑制剂 vemurafenib 的上市引起了人们对此类抑制剂的广泛关注。通过分析 vemurafenib 与 B-Raf 激酶的结合模式, 人们对 B-Raf 激酶抑制剂提出了新的分类。依据此分类, 本文对蛋白质晶体数据库 (PDB) 出现的 B-Raf 激酶抑制剂进行了分析, 比较每种类型抑制剂的作用模式, 分析其构效关系, 并对 Raf 激酶抑制剂的未来进行了展望。

关键词 B-Raf 激酶; B-Raf 激酶抑制剂; 分类

中图分类号 R914 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)01-0001-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140101

Advances in the research and development of B-Raf inhibitors

DONG Gaochao, ZHOU Xiang, TANG Weifang, LU Tao*

Department of Organic Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Oncogenic B-Raf has been identified in a variety of cancers with high incidence, especially in malignant melanoma and thyroid cancer. In 2011, selective B-Raf kinase inhibitor vemurafenib was approved by FDA, and that stimulated increasing interest in B-Raf inhibitors as anticancer agents. Through analyzing the X-ray crystal structure of vemurafenib bound to B-Raf kinase, new classification of B-Raf kinase inhibitors was proposed. This review focuses on diverse small-molecule inhibitors of B-Raf kinase published in protein data bank (PDB) from 2011 to date based on the new classification. The binding modes and structure-activity relationship (SAR) as well as the future development of these inhibitors are discussed.

Key words B-Raf kinase; B-Raf kinase inhibitor; classification

This study was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JKQ2009013, JKZ2011005)

丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号转导通路在细胞的生长、分化和增殖中起着重要作用。该通路通过 Ras、Raf、有丝分裂原活化蛋白激酶 (MEK) 及胞外信号调节激酶 (ERK) 的特异性级联磷酸化将信号由细胞外传入细胞核内 (图 1)^[1]。该通路中蛋白成员的过度表达或者突变会导致肿瘤的发生。2002 年, Davies 等^[2]揭示了突变型的 Raf 激酶在肿瘤发生中的重要作用, 激起了人们对该信号通路中 Raf 激酶的研究兴趣。

Raf 激酶家族有 3 个亚型: A-Raf、B-Raf 和 C-Raf, 这 3 个亚型均有 3 个保守区域 (conserved

regions, CR): CR1、CR2 和 CR3 (图 2)^[4]。CR1 由 Ras 结合域 (Ras-binding domain, RBD) 和富含半胱氨酸结构域 (cysteine-rich domain, CRD) 构成。CR1 能和 Ras 蛋白以及细胞膜磷脂相作用。CR2 是一个富含丝氨酸/苏氨酸结构域 (serine/threonine rich domain), 此区域含有一个能与调节蛋白 14-3-3 结合的位点, 磷酸化后的该位点与 14-3-3 结合产生抑制效应。CR1 和 CR2 区域位于激酶 N 端调节区。CR3 是催化结构域 (protein kinase domain), 此区域靠近激酶 C 端。在 3 个保守区域中, CR3 是 3 个 Raf 激酶亚型同源性最高的区域。

* 收稿日期 2013-11-20 * 通信作者 Tel: 025-86185180 E-mail: lutao@cpu.edu.cn

基金项目 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目 (No. JKQ2009013, JKZ2011005)

在 C 端也存在 1 个与 14-3-3 结合的位点。

虽然 Raf 激酶各亚型之间高度保守,但它们的活性、组织分布及受调控的方式均不相同^[4]。在激酶基础活性方面,A-Raf 最弱,B-Raf 最强。在 3 个亚型中突变率最高的是 B-Raf,大约在 7% 的人类肿瘤中 B-Raf 会发生突变,其中在黑色素瘤中突变率最高,大约为 50% ~ 80%。最常见的 B-Raf 突变发生在临近保守 DFG 序列(Asp-Phe-Gly,天冬氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸)的 600 位氨基酸残基上,由谷氨酸取代了缬氨酸(B-Raf^{V600E},图 2)^[2]。该位点突变使得 B-Raf 激酶中的甘氨酸富集区(glycine-rich loop,G-loop,有时也称之为 P-loop)与活化环(A-loop)的相互作用被阻断,而这个相互作用能保持 B-Raf 激酶处于非活化状态,所以突变型的 Raf 激酶能持续激活 MAPK 信号转导通路,引起肿瘤的发生。研究表明 B-Raf^{V600E} 的催化活性比野生型 B-Raf 活性高 500 倍^[3]。

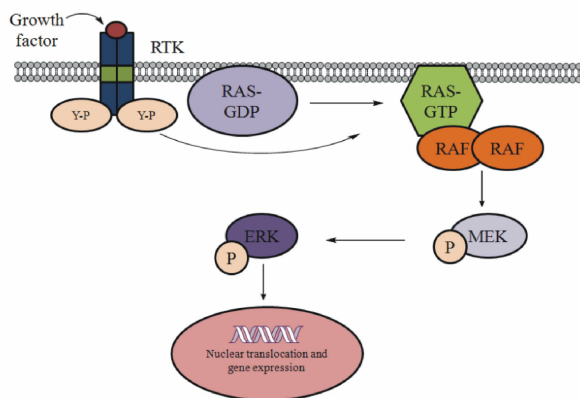


图 1 MAPK 信号转导通路。生长因子结合位于细胞膜表面的酪氨酸激酶受体(RTK),促使细胞内的 Ras-GDP 转变为 Ras-GTP。随着细胞内 Ras-GTP 浓度的升高,使得细胞内的 Raf 激酶聚集到其表面形成一个活性效应器。与很多其他激酶一样,Raf 激酶也是通过二聚化、磷酸化以及去磷酸化控制其活性状态的。Raf 激酶的激活使得下游的 MEK 以及 ERK 磷酸化。磷酸化后的 ERK 转移进细胞核内,引起一系列生物学效应^[1]。除了上述途径,该通路中一些基因的突变也能激活该通路,例如 Ras 和 B-Raf^[3]。

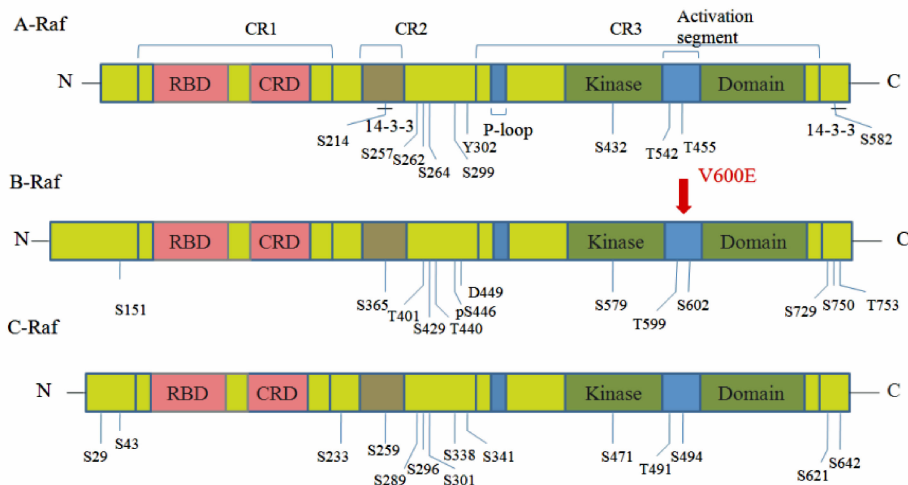


图 2 Raf 激酶的基因序列示意图(CR1、CR2 和 CR3 为激酶的 3 个保守区,B-Raf 激酶突变的 V600E 位置用红色箭头标出)

1 B-Raf 激酶的结构

与大多数蛋白激酶一样,B-Raf 激酶由 3 个区域组成: N 端、C 端以及铰链区(the hinge region)^[5]。N 端主要由 β 折叠(β -sheets)组成,而 C 端主要由 α -螺旋(α -helices)组成。由于激酶类抑制剂主要模拟 ATP 与激酶的结合模式,所以主要研究的激酶结构区域为与 ATP 结合的催化裂口

(catalytic cleft)。催化裂口中重要的结构片段为:甘氨酸富集区(G-loop)、gatekeeper 残基(在铰链区的前段,Thr529)、N 端的 α C-螺旋(α C-helix in the N-terminal domain)、活化环(activation loop,A-loop)和其上的 DFG 序列以及由 Lys483(in β -sheet III)与 Glu501(in α C-helix)形成的盐桥(salt bridge)(图 3)。

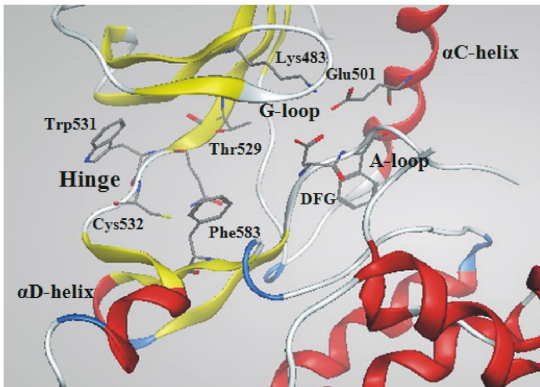


图 3 B-Raf 激酶的结构

随着人们对 B-Raf 激酶结构的不断认识,设计并合成了很多结构类型的 B-Raf 激酶抑制剂,如三芳基咪唑类、嘌呤类、吡嗪类、苯并咪唑类等。根据与 B-Raf 激酶结合模式的不同,将这些抑制剂分为两类: I 型和 II 型^[6]。与 I 型抑制剂结合的 B-Raf

激酶处于活性构象(active conformation, DFG-in),典型的 I 型抑制剂为 SB-590885(图 4)^[7]。与 II 型抑制剂结合的 B-Raf 激酶处于非活性构象(inactive conformation, DFG-out),典型的 II 型抑制剂为 sorafenib(索拉菲尼, BAY43-9006, 图 4)^[8]。该方法是依据 DFG 序列位置的不同而分类的。2011 年美国食品及药品管理局(FDA)批准了 vemurafenib(威罗菲尼, PLX4032, 图 4)的上市,该化合物为第 1 个用于临床的选择性 B-Raf^{V600E} 激酶抑制剂。分析该化合物与 B-Raf 激酶的晶体复合物,发现此 Raf 激酶与上述两种构象都不一样^[9]。虽然构象中 DFG 序列的位置与 I 型相类似,但 α C-螺旋的位置发生了改变,使得此构象介于活性构象与非活性构象之间(“ active-like conformation ” , DFG-in, α C-helix out)。

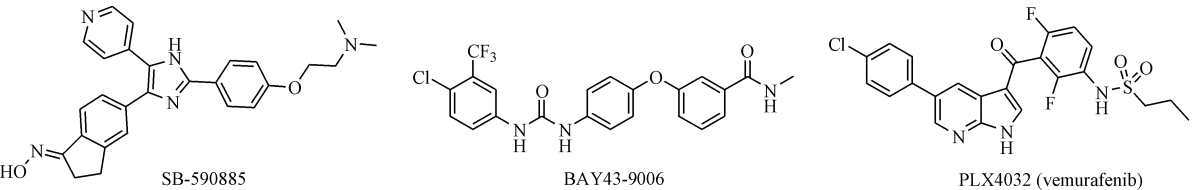


图 4 SB-590885、BAY43-9006 和 PLX4032 的化学结构式

随着新型 Raf 激酶构象的发现,人们对 B-Raf 激酶抑制剂有了新的分类^[10]。根据 DFG 序列以及 α -C 螺旋位置的不同,现可将 B-Raf 激酶抑制剂分为 3 类: I、II A 和 II B。依据此分类,本文综述

2011 年以来, PDB 出现的 B-Raf 激酶抑制剂(表 1, 4E26 列为其他类), 比较每种类型抑制剂的作用模式, 分析构效关系, 为今后 B-Raf 激酶抑制剂的设计提供依据。

表 1 B-Raf 激酶抑制剂的分类

激酶类型	激酶构象	晶体复合物编号(PDB 编号)	参考文献
I	DFG-in/ α C-helix in	3PSB, 3PPJ, 3PPK, 3PRI, 3PRF, 3PSD, 4BB4, 4H58	[11], [13 - 15]
II A	DFG-out/ α C-helix in	4DBN, 4FCO, 4KSQ, 4KSP, 3Q96, 4G9R	[18], [20 - 22]
II B	DFG-in/ α C-helix out	3TV4, 3TV6, 3KSC, 4EHG, 4EHE, 4MBJ, 4E4X	[24 - 28]

2 I 型 B-Raf 激酶抑制剂

该类抑制剂(图 5)为 ATP 竞争性抑制剂, 与激酶的活性构象相互作用。此类抑制剂是模仿 ATP 与激酶的作用模式, 因此该类抑制剂结构中大都有杂环占据腺嘌呤区, 与激酶铰链区的关键氨基酸残基形成 1 ~ 2 根氢键。与杂环相连的其他基团也会占据激酶的其他口袋, 比如靠近腺嘌呤区的疏水口袋、核糖区(ribose region)以及磷酸化区(phosphate region), 以此来增强激酶抑制剂的活性和选择性。

Buckmelter 等^[11]通过计算机辅助药物设计发现了化合物 **1** 具有较强的 B-Raf 激酶抑制活性(图 5)。该化合物的结合模式与 SB-590885 相类似(图 6, PDB code: 3PSB), 脒基能与 Lys483 和 Glu501 形成两个氢键, 吡啶的氮原子与 Cys532 形成氢键。然而化合物 **1** 噻吩环在体内代谢不稳定以及对 CYP3A4、2C19 和 1A2 均有较强的抑制作用^[12], 因此利用生物电子等排的原理用咪唑环替代噻吩环, 得到化合物 **2**。由于脒基在体内易被代谢为酮, 化合物 **2** 在体内实验中的药代动力学性质

也较差。为了改善化合物 **2** 的成药性,在呋喃环 2 位氨基引入萘酚结构,得到化合物 **3**^[13]。化合物 **3** 中酚羟基的作用与化合物 **2** 中的肟类似。但是羟基易与体内的葡萄糖相结合,化合物 **3** 的体内清除率很高,成药性也较差。化合物 **4** 存在同样的问

题。经过分子对接发现呋唑环结构在空间上也能与 Lys483 和 Glu501 形成两个氢键,因此引入呋唑环改善药代动力学性质。化合物 **5** 中呋唑环 3 位的羟丙基占据着 ATP 第 2 个磷酸基团的位置,羟丙基的引入可能增加额外的氢键。

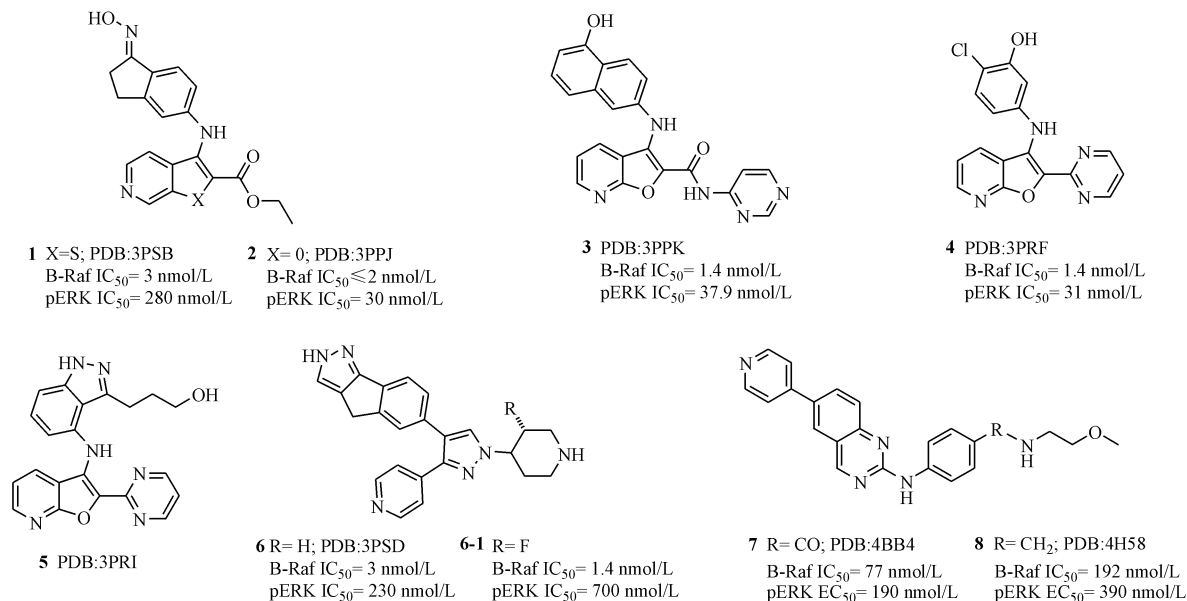


图5 I型激酶抑制剂的化学结构式

Newhouse 等^[14]通过引入吡唑环来取代肟基,设计并合成了另一类 I 型 B-Raf 激酶抑制剂。化合物 **6**(图5)的结构类型与三芳基咪唑类相类似,其中心环为吡唑环。由于哌啶基的碱性,化合物 **6** 的药代动力学性质较差。在哌啶基上引入氟原子,得到了化合物 **6-1**。虽然化合物 **6-1** 细胞活性有所降低,但成药性有所改善。

Vasbinder 等^[15]也开发了结构新颖的 I 型 B-Raf 激酶抑制剂。化合物 **7**、**8** 与上述化合物不同,在铰链区形成两根氢键,但这两个化合物没有与 Lys483 和 Glu501 形成氢键的基团,仅依靠吡啶基占据靠近 gatekeeper 的疏水口袋,该类化合物的细胞活性较差。

3 II A 型 B-Raf 激酶抑制剂

II A 型 B-Raf 激酶抑制剂也是一类 ATP 竞争性激酶抑制剂(图7)。此类抑制剂中激酶的构象为非活性构象,是由 DFG 序列位置的改变产生的。DFG 构象发生重排并移动进入到 ATP 结合口袋,阻碍了该口袋与 ATP 的结合,形成非活性构象,此构象中 α C-螺旋的位置并没有发生变化(DFG-out, α C-helix in)。由于 DFG 序列位置的改变,暴露出了 1 个与 ATP 结合位点直接相邻的疏水结合位点(DFG-out 变构结合位点,“allosteric site”),同时在激酶的后端裂口暴露出来 1 个疏水性口袋^[16]。

索拉菲尼是第 1 个报道的 II A 型 B-Raf 激酶抑制剂^[3]。但是在转移性黑色素瘤的 III 期临床试验中,索拉菲尼并没有显著疗效。可能是在黑色素

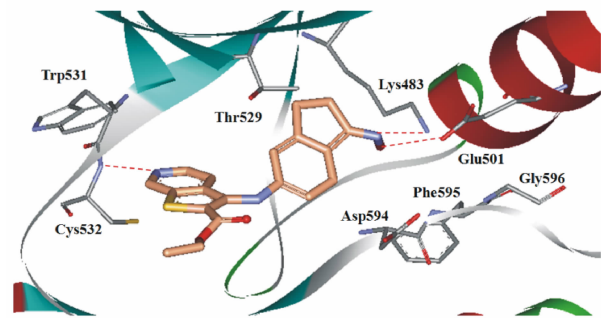


图6 化合物 **1** 与 B-Raf 激酶的结合模式图

比较上述 I 型 B-Raf 激酶抑制剂,其结构中含有能与 Lys483 和 Glu501 形成氢键的基团,而且均含有吡啶基与 Cys532 形成关键氢键。同时通过改变分子结构中易被代谢的基团以及改变伸向溶剂可及区的基团来改善分子的药代动力学性质。

瘤中,索拉菲尼对 Raf 激酶没有特异性的作用^[17]。因此开发选择性的 II A 型 B-Raf 激酶抑制剂成为热点。

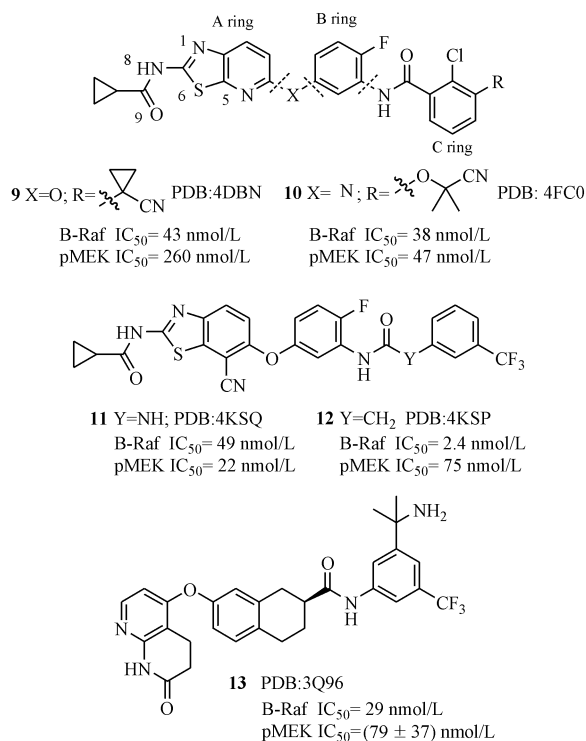


图7 II A 型激酶抑制剂的化学结构式

Okaniwa 等^[18]通过高通量筛选,设计并合成了一系列五元并六元环化合物,通过对该类化合物进行结构改造,得到了活性较好的 Raf、VEGFR2 双靶点激酶抑制剂化合物 9(图7)。分析化合物 9 与 B-Raf 激酶的晶体复合物(图8, PDB code:4DBN)可以发现:①1 位的 N 和 8 位的 NH 与 Cys532 形成氢键;②6 位的 S 原子与 9 位的 O 原子有分子内范德华力的作用,该作用能够稳定分子的空间构型,有助于与激酶的结合;③由于 Trp531 与 Gly534 形成的空腔较小,此处环丙烷较合适,如引入空间结构大的基团,活性将明显降低;④C 环苯甲酰胺上的羰基与 Asp594 形成氢键, NH 与 Glu501 形成氢键, C 环占据着疏水口袋并且 C 环间位的取代基也占据着一疏水性空腔。B 环与 C 环卤素的引入可改善药代动力学性质。在铰链区,该化合物可能与 Trp531 存在 π - π 堆积作用。但是化合物 9 的溶解度较差,为了提高该类化合物的成药性,需改善该类化合物的溶解度。化合物的溶解度与分子的晶格能(crystal packing energy)有关。晶格能越大,分子的溶解度越好^[19]。因此用 NH 取代 A 环与 B 环

的连接子 O 原子,同时将 NH 甲基化,使得 A 环与 B 环在空间的扭转角度增加,扩张了晶格能,提高了化合物的溶解度,得到了成药性较好的化合物 10(图7)^[20]。为了提高上述化合物对 Raf 激酶的选择性,利用生物电子等排的原理用 CH 取代 A 环 5 位的 N 原子(图7),并在该位引入氰基,因为在该处 B-Raf 激酶的空腔要大于 VEGFR2。用脲或者乙酰胺基取代 C 环酰胺基分别得到化合物 11 和 12^[21]。与化合物 11 相比,化合物 12 的乙酰胺基柔性更强,使得 C 环及其 CF₃ 基团与 B-Raf 激酶的疏水作用更合适,并且化合物 12 的成药性更好。化合物 13 属于一类含有四氢萘结构的 B-Raf 激酶抑制剂,该类抑制剂的作用模式与上述化合物基本类似^[22]。

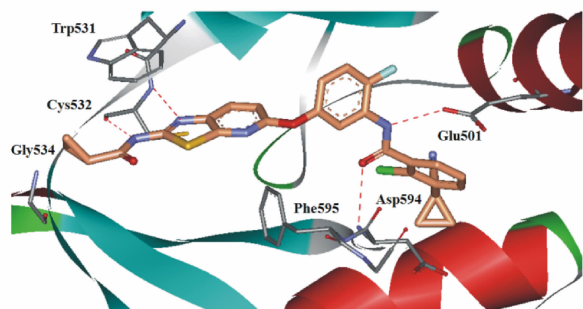


图8 化合物 9 与 B-Raf 激酶的结合模式图

比较上述 II A 型 B-Raf 激酶抑制剂,可以发现:①这类化合物的结构都为三环式结构(图7);②A 环占据铰链区与 Cys532 形成关键性氢键;③B 环占据与 ATP 临近的疏水口袋;④B 环与 C 环之间的连接可以为酰胺、脲或者乙酰胺,这些基团均能与 Glu501 和 Asp594 形成两根关键性氢键;⑤C 环及其疏水性取代基对小分子与激酶非活性构象相作用贡献较大,并且取代基在间位活性最强;⑥在 B 环和 C 环上引入卤素能改善化合物体内药代动力学性质。由于该类抑制剂的结构与其他激酶 II 型抑制剂的结构相类似,因而此类抑制剂对激酶的选择性较差。

4 II B 型 B-Raf 激酶抑制剂

II B 型 B-Raf 激酶抑制剂为一类新型 Raf 激酶抑制剂。现分析 PLX4032 与 B-Raf^{V600E} 蛋白激酶的晶体复合物,比较该类抑制剂与上述抑制剂的差别。图9为 PLX4032 与 B-Raf^{V600E} 的作用模式(PDB code:3OG7),可以发现:①7-氮杂吡啶环占

据着 ATP 结合口袋,其中 7 位 N 原子作为氢键受体与 Cys532 形成氢键,1 位 NH 作为氢键供体与 Gln530 形成氢键;②3 位取代的羰基可以与一个水分子形成氢键;③二氟苯基占据着由 Ala481, Val482, Lys483, Val471, Ile527, Thr529, Leu514 以及 Phe583 形成的疏水性空腔,两个氟原子的引入可改善药代动力学性质;④磺酰胺上的 N 原子能与 Asp594 形成氢键,O 原子与 Phe595 和 Gly596 形成两根氢键,丙基占据着 Raf 激酶选择性口袋 (Raf-selective pocket,其他激酶很少有这个选择性口袋)^[23]。与上述两种结合模式相比,该模式中发现了 B-Raf 选择性口袋。该口袋是由于 α C-螺旋位置的改变与 N 端的 β 折叠形成,并且 α C-螺旋位置的改变也使得 Lys483 与 Glu501 形成的保守性盐桥断裂(在 type I 和 type II A 型抑制剂中,该盐桥仍然存在)。该口袋的发现使得该类激酶抑制剂的选择性大大增加。

PLX4032 的成功上市以及该类新型结合模式的发现,使得该类抑制剂成为近年来的研究热点,2011 年至今 PDB 中出现较多的便是该类激酶抑制剂(图 10)。Wenglowsky 等^[24]利用计算机辅助药

物设计发现了先导化合物 **14**(图 10)。化合物 **14** 和 B-Raf 激酶的作用模式与 PLX4032 相比,区别在于:①酰胺中的 NH 能与 Thr529 (gatekeeper) 形成氢键;②溴原子占据由 Ile463, Val471, Trp531 以及 Phe583 形成的疏水口袋。用吡啶并吡啶环替代 2-氨基吡啶环,与 Trp531 形成 π - π 堆积作用。在吡啶环上引入甲氧基,其作用与溴原子类似,得到了活性更好的化合物 **15**。用苯磺酰基取代丙磺酰基得到化合物 **16**,其活性并没有下降,说明苯环也适合 Raf 选择性口袋空腔的大小^[25]。

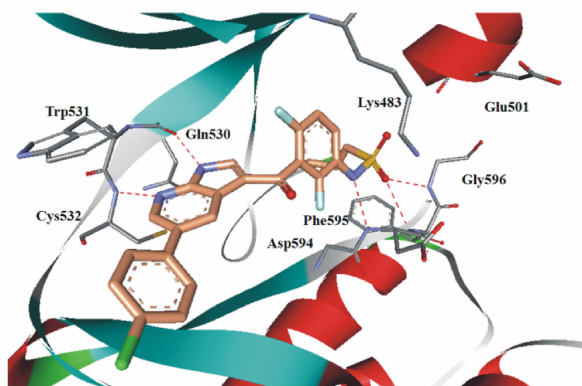


图9 PLX4032 与 B-Raf 激酶的结合模式图

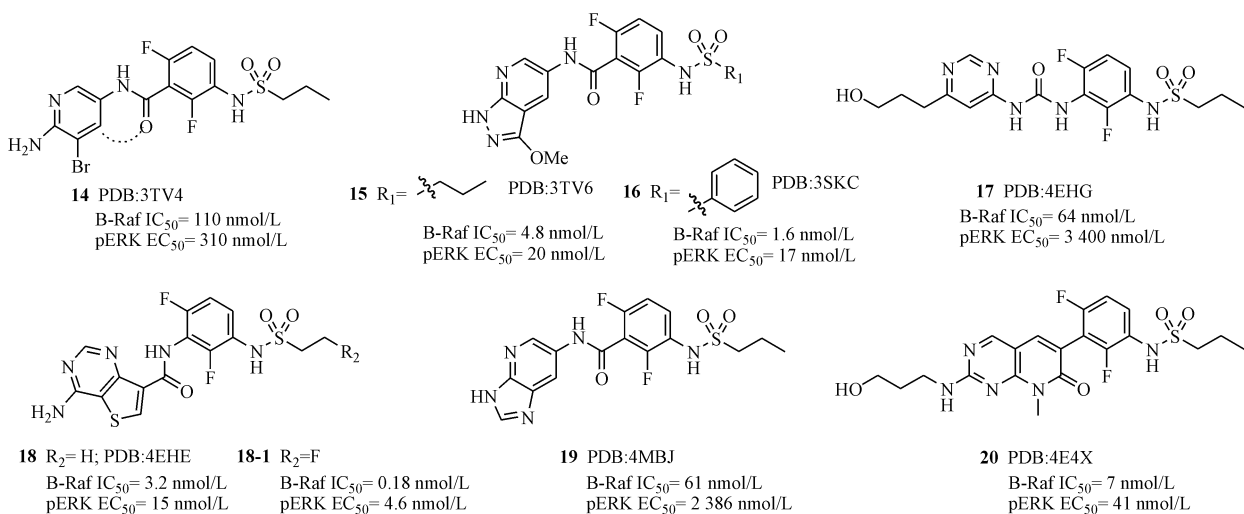


图10 II B 型激酶抑制剂的化学结构式

化合物 **15** 的溶解度较差, Wenglowsky 等^[26]继续对其进行结构改造。为了保持吡啶并吡啶环的空间构型,用嘧啶环取代该环并用脲的结构代替了酰胺。脲中的羰基与嘧啶环的 N 原子有分子内范德华力的作用,使得该基团与嘧啶环处于一个平面中,满足了上述要求,得到了化合物 **17**。也正是由于分子内范德华力在体内的不稳定性,化合物

17 体内代谢较快。4-氨基嘧啶并噻吩环的引入也能满足上述要求,且把酰胺基的羰基与 NH 互换位置,得到了化合物 **18**。在丙磺酰基的末端引入 F 原子时,其活性增强,成药性更好(图 10, 化合物 **18-1**)。

利用“骨架迁移 (scaffold-hopping)”的策略, Newhouse 等^[27]对化合物 **14** 进行了结构改造,得到

了吡啶并咪唑类化合物 **19** (图 10), 该类化合物活性较差。Ren 等^[28] 对化合物 **14** 进行结构改造, 得到了一类内酰胺类化合物 (图 10, 化合物 **20**)。由于苯甲酰胺类化合物的代谢毒性 (图 10, 化合物 **14**), 因此在酰胺处用环系取代。比较五元环和六元环发现, 用五元环取代是不合适的, 因为五元环的引入, 阻止了分子与 DFG 序列的作用, 激酶与细胞活性均大大降低。因此选择 N-取代内酰胺作为六元环, 并引入取代氨基的嘧啶环进行联合, 在铰链区增加氢键作用。氨基取代基为羟基丙基时, 得到化合物 **20**, 化合物 **20** 结构中的羟基能与 Ser536 形成氢键。

比较该类抑制剂的结构, 可发现该类抑制剂基本都有丙磺酰基或者苯磺酰基, 因为这类基团能识别 B-Raf 激酶的选择性口袋并能与 DFG 序列形成氢键, 大大提高了该类抑制剂的选择性。二氟苯基中一个氟原子被氯原子取代其活性和药代动力学性质有可能更好^[25-26]。

比较上述 3 种类型的抑制剂结构 (图 11), 可以发现: ① 3 种类型的抑制剂都占据着 ATP 的结合口袋; ② I 型抑制剂与 Glu501 和 Lys483 形成两根氢键, 结构大都为“U”型; ③ II A 型抑制剂都与 DFG-out 的变构位点形成氢键, 结构大都为长链型; ④ II B 型抑制剂都含有丙基磺酰基或者苯磺酰基, 能占据 B-Raf 激酶的选择性口袋, 能与 DFG 序列形成氢键 (有时也可能与 Lys483 形成氢键), 该类抑制剂的选择性最强; ⑤ 3 类抑制剂都可引入卤素或者改变溶剂可及区的结构来改善药代动力学性质。

5 其他类型抑制剂

Qin 等^[29] 通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法发现了另一系列含有羟基喹啉结构的 Raf 激酶抑制剂, 该类抑制剂与 B-Raf 激酶的作用模式与上述 3 类抑制剂有所不同 (图 12)。化合物 **21** 中的喹啉环占据 ATP 的结合口袋, 喹啉上的 N 原子并没有直接与 Cys532 形成氢键, 而是通过一个水分子形成氢键, 喹啉环可以与 Trp531、Phe583 形成 π - π 堆积作用, 氯原子指向 DFG 序列, 咪唑环指向激酶的 P-loop, 吡啶环指向激酶的 α -D 螺旋。该类抑制剂虽然与激酶的活性构象相结合, 但其结构中既没有像 I 型抑制剂能与 Lys483 和 Glu501 形成氢键的

基团, 也没有像 II B 型抑制剂能识别 Raf 激酶选择性口袋的基团。值得注意的是, 该结构中的咪唑环占据的位置可能存在疏水性口袋, 为新型 B-Raf 激酶抑制剂的设计提供思路。

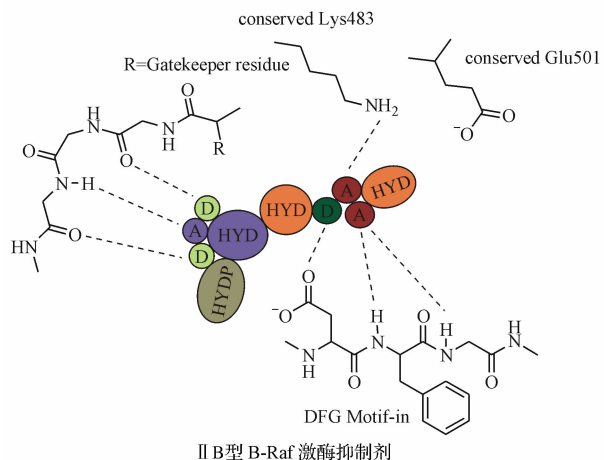
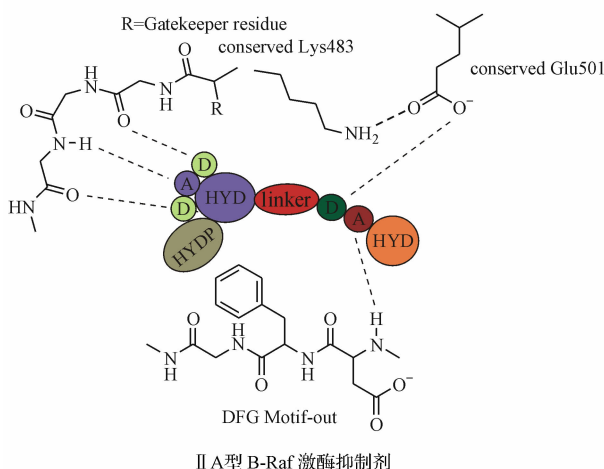
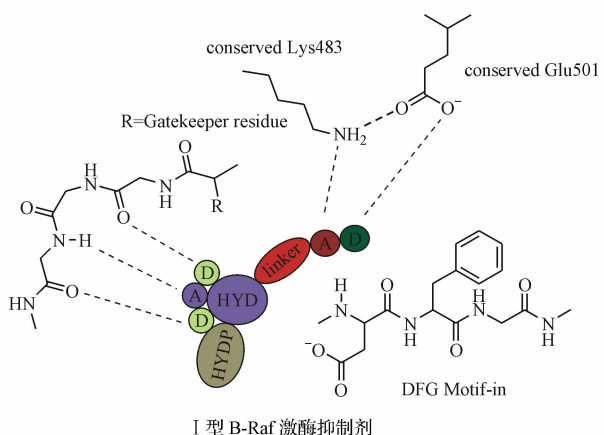


图 11 3 种激酶抑制剂的结构总结

D 代表氢键供体, A 代表氢键受体, HYD 代表疏水区, HYDP 代表亲水区

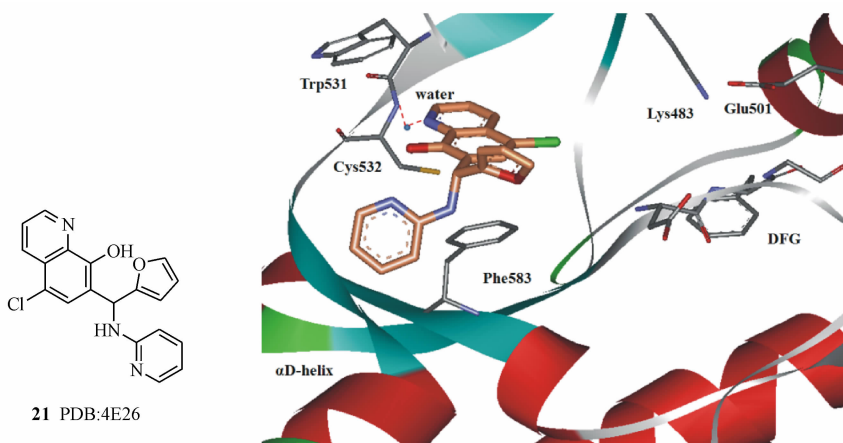


图12 化合物21的化学结构以及其与B-Raf激酶的结合模式图

6 小结与展望

本文综述了3种类型的B-Raf激酶抑制剂,分析了每种抑制剂的构效关系,并比较了3种类型抑制剂结构的区别。在这3种抑制剂中,ⅡB型抑制剂选择性最强。因为该类抑制剂中都含有丙磺酰基或者苯磺酰基,能占据B-Raf激酶的选择性口袋。ⅡA型抑制剂选择性较差,可能由于该类抑制剂的结构与其他激酶Ⅱ型抑制剂的结构相类似。

然而随着vemurafenib在临床上的广泛应用,该ⅡB型抑制剂耐药性越来越受到人们关注。患者使用vemurafenib 8~9个月后,肿瘤又可以重新快速生长。已有很多有关Raf激酶抑制剂耐药性问题的报道^[30-31]。耐药性主要通过两种途径产生:一种途径为肿瘤细胞通过NRas、C-Raf、COT(MAP3K8编码)、MEK等重新激活ERK磷酸化;另一种为激活细胞膜表面酪氨酸激酶受体(RTK),建立不依赖于ERK磷酸化的生存途径^[31]。值得庆幸的是,很少有报道表明Raf激酶抑制剂的耐药性是由抑制剂诱导激酶突变导致其构象发生改变引起的。对于黑色素瘤患者来说,抑制B-Raf激酶仍然很有希望改善患者的身体状况。现阶段针对Raf激酶抑制剂的耐药性,最多被提及的方案是联合用药。Vemurafenib与ipilimumab(B-Raf激酶抑制剂,属免疫治疗范畴)的联合使用已经在临床上开展。Raf激酶抑制剂也可与其他激酶抑制剂联合使用,如MEK抑制剂、PI3K/mTOR抑制剂等。Dabrafenib(GSK2118436,2013年被FDA批准上市的B-Raf^{V600E}激酶抑制剂)和trametinib(MEK抑制剂)的联合使用也已处于临床研

究^[32]。因此开发选择性较强的ⅡB型抑制剂依旧为研究热点。

当今多靶点药物越来越受到人们的关注^[33]。与ⅡB型B-Raf激酶抑制剂相比,ⅡA型抑制剂虽然选择性较差,但其对多个激酶都有抑制作用。已有报道,将ⅡB型B-Raf激酶抑制剂改造为ⅡA型抑制剂(PDB code:4G9R)^[34]。对ⅡB型抑制剂而言,是否可在选择性和活性这两方面找一平衡点,设计针对B-Raf激酶及引起耐药性作用激酶的多靶点激酶抑制剂来缓解其耐药性,为黑色素瘤患者的治疗提供新的途径。

7 课题组研究进展

本课题组对B-Raf激酶的结构进行了研究,利用虚拟筛选、高通量筛选、组合化学等方法设计并合成了多种结构类型的化合物:嘌呤类、咪唑类、氮杂吡啶类、二芳基脲类等。部分化合物显示了很好的B-Raf激酶抑制活性和选择性。依据vemurafenib的化学结构以及ⅡB型B-Raf激酶的空间构象,开发结构新颖的ⅡB型抑制剂相关工作也在进行。

参考文献

- [1] Howe LR, Leever SJ, Gómez N, *et al.* Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf[J]. *Cell*, 1992, **71**(2): 335-342.
- [2] Davies H, Bignell GR, Cox C, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer[J]. *Nature*, 2002, **417**(6892): 949-954.
- [3] Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, *et al.* Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF[J]. *Cell*, 2004, **116**(6): 855-867.
- [4] Roskoski R Jr. RAF protein-serine/threonine kinases: structure

- and regulation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **399** (3):313–317.
- [5] van Linden OP, Kooistra AJ, Leurs R, *et al.* KLIFS: A knowledge-based structural database to navigate kinase-ligand interaction space [J]. *J Med Chem*, 2013, **10**. 1021/jm400378w.
- [6] Li HF, Chen Y, Rao SS, *et al.* Recent advances in the research and development of B-Raf inhibitors [J]. *Curr Med Chem*, 2010, **17**(16):1 618–1 634.
- [7] King AJ, Patrick DR, Batorsky RS, *et al.* Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRAF by the kinase inhibitor SB-590885 [J]. *Cancer Res*, 2006, **66** (23):11 100–11 105.
- [8] Wilhelm S, Carter C, Lynch M, *et al.* Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, **5**(10):835–844.
- [9] Bollag G, Tsai J, Zhang J, *et al.* Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, **11**(11):873–886.
- [10] Wang X and Kim J Conformation-specific effects of Raf kinase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2012, **55** (17):7 332–7 341.
- [11] Buckmelter AJ, Ren L, Laird ER, *et al.* The discovery of furo [2, 3-c] pyridine-based indanone oximes as potent and selective B-Raf inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, **21**(4):1 248–1 252.
- [12] Dalvie DK, Kalgutkar AS, Khojasteh-Bakht SC, *et al.* Biotransformation reactions of five-membered aromatic heterocyclic rings [J]. *Chem Res Toxicol*, 2002, **15**(3):269–299.
- [13] Ren L, Wenglow sky S, Miknis G, *et al.* Non-oxime inhibitors of B-Raf (V600E) kinase [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, **21** (4):1 243–1 247.
- [14] Newhouse BJ, Hansen JD, Grina J, *et al.* Non-oxime pyrazole based inhibitors of B-Raf kinase [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, **21**(11):3 488–3 492.
- [15] Vasbinder MM, Aquila B, Augustin M, *et al.* Discovery and optimization of a novel series of potent mutant B-Raf (V600E) selective kinase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2013, **56** (5):1 996–2 015.
- [16] Liao JJ. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2007, **50**(3):409–424.
- [17] Eisen T, Ahmad T, Flaherty KT, *et al.* Sorafenib in advanced melanoma: a phase II randomised discontinuation trial analysis [J]. *Br J Cancer*, 2006, **95**(5):581–586.
- [18] Okaniwa M, Hirose M, Imada T, *et al.* Design and synthesis of novel DFG-out RAF/vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) inhibitors. 1. Exploration of [5, 6]-fused bicyclic scaffolds [J]. *J Med Chem*, 2012, **55**(7):3 452–3 478.
- [19] Ishikawa M, Hashimoto Y. Improvement in aqueous solubility in small molecule drug discovery programs by disruption of molecular planarity and symmetry [J]. *J Med Chem*, 2011, **54**(6):1 539–1 554.
- [20] Hirose M, Okaniwa M, Miyazaki T, *et al.* Design and synthesis of novel DFG-out RAF/vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) inhibitors; 3. Evaluation of 5-amino-linked thiazolo [5, 4-d] pyrimidine and thiazolo [5, 4-b] pyridine derivatives [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, **20**(18):5 600–5 615.
- [21] Okaniwa M, Hirose M, Arita T, *et al.* Discovery of a selective kinase inhibitor (TAK-632) targeting pan-RAF inhibition: design, synthesis, and biological evaluation of C-7-substituted 1, 3-benzothiazole derivatives [J]. *J Med Chem*, 2013, **56** (16):6 478–6 494.
- [22] Gould AE, Adams R, Adhikari S, *et al.* Design and optimization of potent and orally bioavailable tetrahydronaphthalene Raf inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2011, **54**(6):1 836–1 846.
- [23] 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**(8):3 041–3 046.
- [24] Wenglow sky S, Ren L, Ahrendt KA, *et al.* Pyrazolopyridine inhibitors of B-RafV600E. Part 1: the development of selective, orally bioavailable, and efficacious inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2011, **2**(5):342–347.
- [25] Wenglow sky S, Ahrendt KA, Buckmelter AJ, *et al.* Pyrazolopyridine inhibitors of B-RafV600E. Part 2: structure-activity relationships [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, **21**(18):5 533–5 537.
- [26] Mathieu S, Grädl SN, Ren L, *et al.* Potent and selective aminopyrimidine-based B-Raf inhibitors with favorable physicochemical and pharmacokinetic properties [J]. *J Med Chem*, 2012, **55** (6):2 869–2 881.
- [27] Newhouse BJ, Wenglow sky S, Grina J, *et al.* Imidazo [4, 5-b] pyridine inhibitors of B-Raf kinase [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, **23**(21):5 896–5 899.
- [28] Ren L, Ahrendt KA, Grina J, *et al.* The discovery of potent and selective pyridopyrimidin-7-one based inhibitors of B-RafV600E kinase [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, **22** (10):3 387–3 391.
- [29] Qin J, Xie P, Ventocilla C, *et al.* Identification of a novel family of BRAF (V600E) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2012, **55** (11):5 220–5 230.
- [30] Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, *et al.* Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance [J]. *Nature*, 2013, **494**(7436):251–255.
- [31] Nijenhuis CM, Haanen JB, Schellens JH, *et al.* Is combination therapy the next step to overcome resistance and reduce toxicities in melanoma [J]? *Cancer Treat Rev*, 2013, **39**(4):305–312.
- [32] Greger JG, Eastman SD, Zhang V, *et al.* Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, **11** (4):909–920.
- [33] Peters JU. Polypharmacology - foe or friend [J]? *J Med Chem*, 2013, **56**(22):8 955–8 971.
- [34] Wenglow sky S, Moreno D, Laird ER, *et al.* Pyrazolopyridine inhibitors of B-Raf (V600E). Part 4: rational design and kinase selectivity profile of cell potent type II inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, **22**(19):6 237–6 241.