

SHP2变构抑制剂的研究进展

堵桐弘, 吕遐师, 赖宜生*

中国药科大学新药研究中心, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏省代谢性疾病药物重点实验室, 江苏 南京

收稿日期: 2022年4月29日; 录用日期: 2022年5月11日; 发布日期: 2022年5月31日

摘要

蛋白酪氨酸磷酸酶在维持蛋白质酪氨酸磷酸化的稳态中起重要的调节作用。SHP2是首个被证实的致癌性蛋白酪氨酸磷酸酶,其信号失调与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。作为多条信号通路的交汇点,SHP2不仅影响肿瘤细胞的增殖、转移和侵袭等过程,并且还参与PD-1/PD-L1介导的肿瘤免疫逃逸,从多方面促进肿瘤的发生发展。因此SHP2被认为是一个理想的肿瘤干预靶标。然而,多年以来,人们为开发靶向SHP2的抗肿瘤药物付出了诸多努力,却收效甚微,为此SHP2曾一度被认为是“无药可及”的靶点。直至最近,以TN0155为代表的SHP2变构抑制剂相继进入临床开发,才为攻克这一极具挑战性的靶点带来希望。至今为止,已有13款SHP2变构抑制剂开展临床研究。本文简介SHP2的结构、功能及其与肿瘤的相关性,侧重综述近年来SHP2变构抑制剂的研发历程和临床试验的进展。

关键词

蛋白酪氨酸磷酸酶, 催化位点, 变构位点, 自抑制构象, 变构抑制剂

Research Progress in Allosteric SHP2 Inhibitors

Tonghong Du, Xiashi Lyu, Yisheng Lai*

Jiangsu Key Laboratory of Drug Discovery for Metabolic Diseases, State Key Laboratory of National Medicines, Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Apr. 29th, 2022; accepted: May 11th, 2022; published: May 31st, 2022

Abstract

Protein tyrosine phosphatase plays an important role in maintaining protein tyrosine phosphorylation homeostasis. SHP2 is the first confirmed carcinogenic protein tyrosine phosphatase, whose dysregulation is closely related to the occurrence and development of a variety of malignant tu-

*通讯作者。

mors. As the intersection of multiple signaling pathways, SHP2 not only affects the proliferation, metastasis and invasion of tumor cells, but also participates in PD-1/PD-L1-mediated tumor immune escape, promoting the occurrence and development of tumors in many aspects. Therefore, SHP2 has been considered as an ideal target for cancer intervention. However, over the years, efforts to develop anti-tumor drugs targeting SHP2 have had little success. Hence, SHP2 was once considered as an “undruggable” target. It is only recently that the clinical development of allosteric SHP2 inhibitors, represented by TNO155, has brought hope for tackling this challenging target. So far, there have been 13 candidates in clinical trials. This review briefly introduces the structure and functions of SHP2 and its correlation with tumors, and focuses on the development process and clinical trial progress of allosteric SHP2 inhibitors in recent years.

Keywords

Protein Tyrosine Phosphatase, Catalytic Site, Allosteric Site, Autoinhibited Conformation, Allosteric Inhibitor

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



1. 引言

蛋白质磷酸化是人体内重要的蛋白翻译后修饰，其过程分别受磷酸化酶与去磷酸化酶调控，在细胞信号转导过程中起着重要的作用[1]。蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)为磷酸酪氨酸蛋白的去磷酸化酶，与蛋白酪氨酸激酶(PTK)共同维持体内酪氨酸蛋白磷酸化的平衡，控制着细胞增殖、分化、生长和凋亡进程中的多个方面。酪氨酸蛋白磷酸化的失调通常与癌症、自身免疫性疾病和糖尿病等多种疾病的发生发展密切相关[2]。实际上，在过去 20 多年里，以 PTK 抑制剂为代表的靶向抗肿瘤药物取得了快速发展，丰富了临床用药，改善了患者的预后[3]。然而，靶向 PTP 的药物研发却进展缓慢[4]。

在 PTP 家族中，含 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (SHP2)是目前唯一被证实的原癌蛋白，其由蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型 11 (PTPN11)基因编码，在人体内广泛表达[5]。作为非受体 PTP，SHP2 位于多条受体酪氨酸激酶(RTK)信号通路上的节点位置，是这些通路不可或缺的调控分子。此外，SHP2 还参与程序性死亡受体 1 及其配体 1 (PD-1/PD-L1)介导的免疫逃逸[6]。正是由于 SHP2 处于多条重要信号通路的枢纽位置，其基因突变或过表达与人类多种肿瘤的发生发展相关[7]。PTPN11 的功能获得性(GOF)突变往往会使得 SHP2 始终处于活化状态，从而过度激活下游信号[8]，促进肿瘤的发生发展。研究表明，约 35%幼年型粒单核细胞白血病(JMML)患者、7%急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)患者和 5%急性髓系白血病(AML)患者存在 PTPN11 突变。其中常见的突变形式为 E76K、E69K 和 G60R/V 等[6]。然而，值得一提的是，成人白血病和实体瘤患者却罕见 PTPN11^{GOF}突变，而其主要表现为 SHP2 过表达，并且 SHP2 高表达往往与这些患者的预后不良有关[9]。因此，多年来人们一直致力于研发 SHP2 抑制剂。可是，至今为止尚无一款靶向 SHP2 的抗肿瘤药物上市，为此 SHP2 蛋白一度被认为是“无药可及”的靶点[4]。直至近来多款 SHP2 变构抑制剂进入临床试验才给该靶点带来曙光。

2. SHP2 的结构及生物学功能

2.1. SHP2 蛋白结构

SHP2 由 593 个氨基酸残基组成，其包括 N 端两个串联的 SH2 结构域(N-SH2 和 C-SH2)、一个具有

催化活性的 PTP 结构域和包含两个酪氨酸磷酸化位点(Tyr542 和 Tyr580)的 C 末端尾部。晶体结构(PDB ID: 2SHP)显示, SHP2 在静息状态下保持自抑制的闭合构象, 此时 N-SH2 结构域的 D'E 环和两侧的 β D' 及 β E 链伸入 PTP 催化位点的裂缝中, 与催化口袋的 P 环、pTyr 环和 Q 环形成相互作用, 从而阻止底物与催化位点结合。当受到生长因子或细胞因子刺激时, 两个 SH2 结构域表面暴露的磷酸酪氨酸(pTyr)识别位点与 RTK 或细胞因子受体表面特定的酪氨酸基序结合, 导致 N-SH2 域与 PTP 域分离, 从而诱导 SHP2 的闭合构象改变成开放型构象, 让底物有机会与暴露的催化位点结合, 最终实现去磷酸化(图 1) [5]。

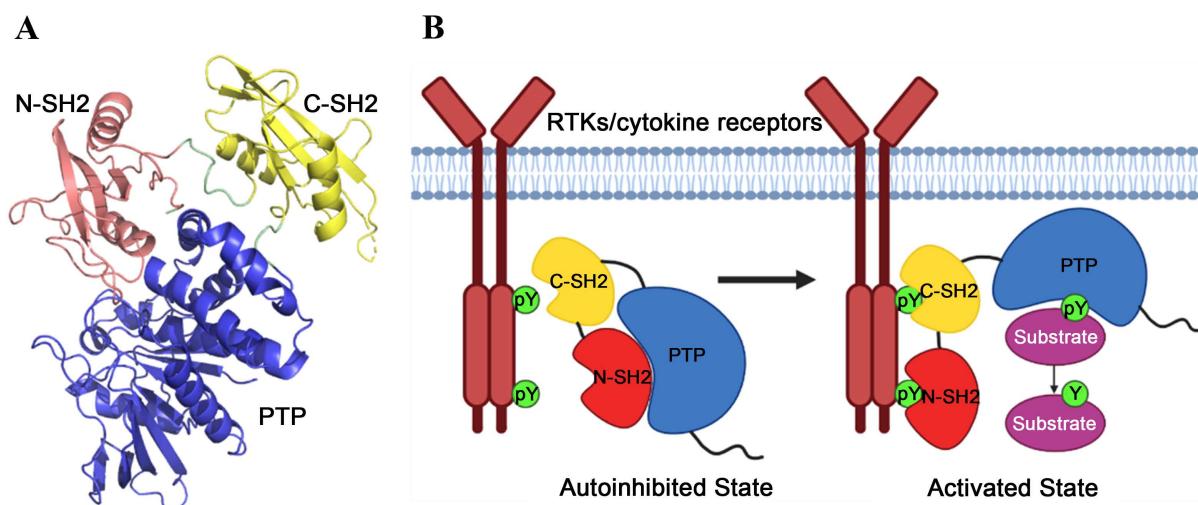


Figure 1. Crystal structure of SHP2 (A) and schematic diagram of SHP2 autoinhibited and activated states (B)

图 1. SHP2 的晶体结构(A)及其自抑制和活化态示意图(B)

2.2. SHP2 调控的信号通路

SHP2 在维持蛋白质酪氨酸磷酸化的稳态过程中起重要的作用, 参与细胞内 RAS/RAF/MEK/ERK、PI3K/AKT 和 JAK/STAT 等信号通路的调控, 影响细胞的增殖、分化、衰老和凋亡等生命活动(图 2) [6]。其中, SHP2 是 RAS/ERK 通路的正调控因子, 可通过多种方式激活该通路。首先, SHP2 可以作为衔接蛋白与 Grb2、SOS1 形成复合物, 促进 RAS 的 SOS1 依赖性激活, 从而激活下游 RAF/MEK/ERK 级联反应[10]。其次, SHP2 能够直接使 RAS 中的 pTyr32 去磷酸化, 从而减弱 RAS 与 RAF 的抑制性结合, 增强下游信号转导[11]。此外, SHP2 可以使 RAS 通路中的相关蛋白(如 EGFR 和 Sprouty 等)表面特定的 pTyr 去磷酸化, 从而维持 RAS 的活化状态(RAS-GTP), 激活下游信号, 进而促进细胞的增殖、生长和分化等过程[12]。而 SHP2 对 PI3K/AKT 和 JAK/STAT 通路则表现出正负双重调控作用。其中, SHP2 对 PI3K/AKT 通路的调节与上游刺激信号有关, 而对 JAK/STAT 通路的调控则显示底物特异性和细胞特异性[6]。

此外, SHP2 还参与免疫检查点共抑制分子 PD-1/PD-L1 信号通路的调控。一方面, PD-1 与 PD-L1 结合后会通过胞内免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)和免疫受体酪氨酸基开关基序(ITSM)结构域招募 SHP2, 使 T 细胞受体(TCR)下游信号分子去磷酸化, 阻断信号转导, 从而抑制 T 细胞介导的免疫应答。另一方面, SHP2 可以在 PD-1 激活后优先使 T 细胞表面表达的共刺激分子 CD28 去磷酸化, 抑制其介导的 PI3K 激活, 阻断共刺激信号, 从而进一步抑制 T 细胞的功能。此外, SHP2 还能够使 TCR 复合物中的 ZAP70 去磷酸化, 削弱 ZAP70 与 CD3 ζ 上免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的结合, 从而抑制下游信号转导, 导致 TCR 介导的 IL-2 合成减少, 并抑制 T 细胞的增殖[6]。实际上, 抑制 SHP2 能够恢复 T 细

胞的应答[13]。

综上所述，作为多条信号通路的汇聚节点，SHP2的过度活化与多种癌症驱动机制相关，因此SHP2抑制剂不仅有希望成为广谱的抗癌药物，而且可以与其它药物联合使用来达到增强疗效、克服或减缓耐药性的产生。因此人们研发了一系列靶向PTP催化位点的正构抑制剂。然而，由于PTP催化域的氨基酸序列高度保守，再加上该催化位点呈现正电荷环境，导致SHP2正构抑制剂通常缺乏选择性，并且透膜性差[14]。于是，人们将注意力转向研发变构抑制剂，并很快便取得积极的进展。

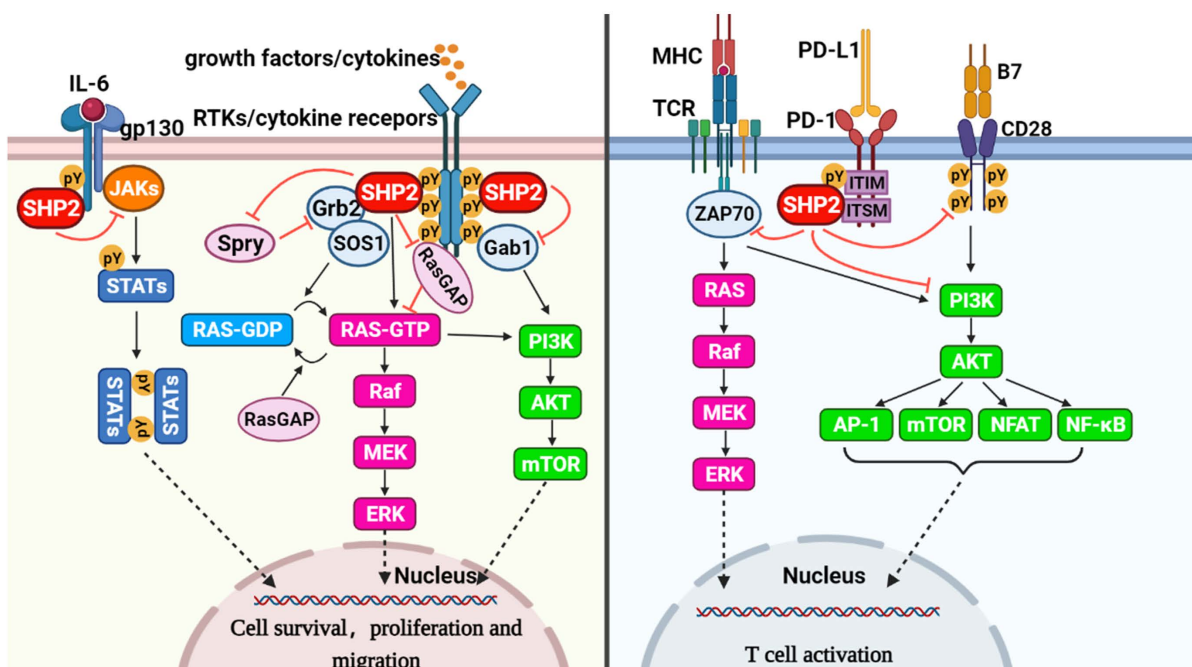


Figure 2. SHP2 mediated signaling pathways [6]

图 2. SHP2 介导的信号通路[6]

3. SHP2 变构抑制剂的研发

3.1. SHP099

2016年，诺华公司首次报道SHP2变构抑制剂。他们通过高通量筛选得到一些苗头化合物，其中SHP836(1)对SHP2的抑制活性(IC_{50} 值)为12 μ M，而对PTP催化域无作用。共晶结构(PDB ID: 5EHP)显示，SHP836通过与位于C-SH2、N-SH2和PTP的交界处的隧道状变构口袋结合，使SHP2稳定在自抑制的闭合构象，从而使其催化活性受到抑制[15][16]。构效关系研究发现，以4-氨基哌啶替代哌嗪环，同时在4位引入甲基能使氨基稳定于平伏键，从而维持哌啶环的优势构象(2)，可使活性提升46倍。将哌啶环改为1,2,4-三嗪(3)，可保持活性。考察其作用模式可知，三嗪环上的1位N原子趋向于Arg111，而2位N原子几乎对结合亲和力影响不大，因此删除该N原子得到吡嗪化合物SHP099(4)(图3)。结果发现，采用吡嗪环替代可显著增强抑制效力，SHP099对SHP2的生化抑制活性比SHP836提高170倍，并且对SHP1和PTP1B无抑制作用。共晶结构(PDB ID: 5EHR)显示，SHP099同样结合于隧道状变构口袋中。其中，哌啶片段占据变构口袋的极性区域，4-氨基与Phe113主链羰基产生氢键作用。此外，吡嗪上的氨基与Glu250主链羰基形成氢键，而1位N原子则与Arg111形成氢键，该氢键可促进Arg111与二氯苯基之间形成 π -阳离子堆积[15]。

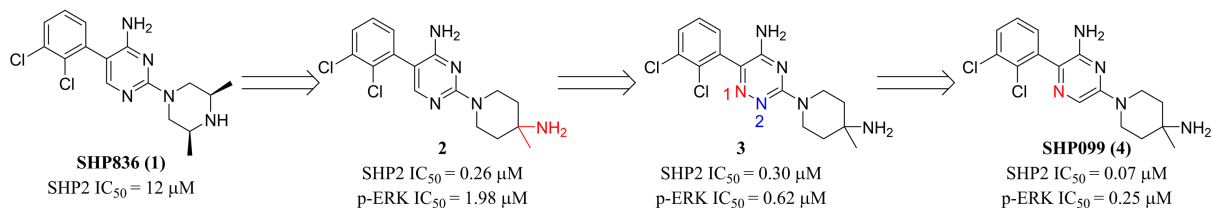


Figure 3. The structural optimization: from hit SHP836 to lead SHP099

图 3. 从苗头化合物 SHP836 到先导化合物 SHP099 的结构优化过程

小鼠药代动力学(PK)实验结果表明, SHP099 表现出可接受的口服暴露量(5 mg/kg po, 565 μ M/h)和生物利用度($F = 46\%$)。药效学(PD)实验表明, 每日给药剂量在 100 mg/kg 时可观察到肿瘤停滞[15], 并且与 PD-1 抑制剂联用产生协同作用, 机制上与其能够增加肿瘤组织中 $CD8^+$ $IFN-\gamma^+$ T 细胞数量有关[17]。可惜 SHP099 具有光毒性和心脏毒性风险[18]。

3.2. TNO155

为了克服 SHP099 存在的问题, 诺华团队在分析其它苗头化合物时发现, 硫醚类化合物(5)与 SHP099 的结合模式相似。为此他们利用 5 的硫醚片段对 SHP099 进行改造, 结果发现化合物 6 对 SHP2 的生化抑制活性和对 KYSE-520 细胞系 p-ERK 水平的下调作用均有所提高。然而, 硫醚的引入导致 6 的亲脂性升高($\text{Log}P = 3.6$), 并且仍然存在 hERG 抑制作用和光毒性。共晶结构(PDB ID: 7JVN)显示, 6 的作用模式与 SHP099 以及 5 类似。在生理条件下, 碱性伯胺可通过质子化形成季铵盐, 然后 3 个质子通过水分子介导间接与邻近的 Thr108、Glu110 和 Thr253 形成相互作用, 提示将伯胺片段延伸至这些残基的附近, 或许不需要水分子作介质而直接与残基作用。据此, 将 6 的氨基延伸一个碳原子, 7 的活性提高两倍, 但其脂溶性和 hERG 毒性无明显改善。为此, 将 7 的二氯苯基替换成 3-氯-2-氨基吡啶(8), 可以有效降低脂溶性($\text{Log}P = 1.97$), 并且显著减弱对 hERG 的抑制作用[18]。

接着, 将 8 的甲基和亚甲基环合成环戊基, 发现可稳定氨基的构象。其中 *S* 异构体(9)的活性优于 *R* 型异构体, 特别是 9 的细胞活性显著增强。随后, 在螺环中引入氧原子(10)能够降低氨基的 pK_a , 并且能提高生化活性, 但其细胞效力却显著降低。为了改善细胞渗透性和平衡整体分子的脂溶性, 于四氢咪唑环上引入甲基, 可在保持生化活性的基础上提高细胞效力, 并且 *S,S*-异构体(TNO155, 11)效果更优(图 4)。TNO155 对 SHP2 的 IC_{50} 值为 0.011 μ M, 而其抑制 KYSE-520 细胞系中的 p-ERK 和细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 0.011 μ M 和 0.100 μ M。共晶结构(PDB ID: 7JVM)显示, TNO155 延伸的氨基确实取代了原先蛋白结构中的水分子, 并且直接与 Thr108、Glu110 及 Phe113 形成氢键作用。吡嗪 N 原子仍然可以与 Arg111 产生氢键作用, 从而促进吡啶环与 Arg111 形成 π -阳离子堆积作用。此外, 吡嗪上的氨基与 Glu250 形成一个氢键, 而吡啶上的氨基则与周围的水分子形成氢键网络, 从而间接与 Lys492 相互作用[18]。

TNO155 具有良好的水溶性(0.736 mM)、中等亲脂性($\text{Log}P = 1.6$)和较高的亲脂效率(>6), 并且无 hERG 抑制作用($IC_{50} > 30 \mu$ M)和光毒性。此外, 各类磷酸酶和激酶的筛选结果表明 TNO155 对 SHP2 具有高度选择性抑制作用。PK 实验表明, TNO155 在四种临床前动物中均显示较低的清除率和较短的达峰时间($T_{\max} = 0.8\sim 2.0$ h), 并具有中等的血浆蛋白结合率(61%~81%)和较高的口服生物利用度($F = 60\%\sim 100\%$)。在 EGFR 驱动的 KYSE-520 食管癌异种移植模型中, TNO155 显示剂量依赖性抗肿瘤活性, 在 10~20 mg/kg (bid)时肿瘤达到停滞状态[18]。

基于临床前实验的良好数据, 诺华公司于 2017 年 4 月将 TNO155 推入临床研究(NCT03114319), 并在 2021 年美国临床肿瘤学会(ASCO)年会上公布剂量探索研究初步结果。截至 2021 年 2 月 8 日, 共有 125 名患者接受了不同的给药方案, 其中超过一半的入组病人患有结直肠癌(52.8%), 其次为胃肠道间质瘤

(16.8%)和非小细胞肺癌(12.0%)。截至数据统计时,共有 94%的患者因各种原因停止治疗,其中多数因疾病进展(82%)。治疗相关的不良反应(AEs)多为 1 级或 2 级,并且未出现 5 级不良反应。PK 分析表明,给药后 TNO155 可被迅速吸收,给药第 1 天中位达峰时间(T_{max})为 1.1 h,中位半衰期($T_{1/2}$)为 34 h。观察到的最佳反应为疾病稳定(SD),共有 28 例(24%)患者报告 SD,中位 SD 持续时间为 5.6 个月[19]。

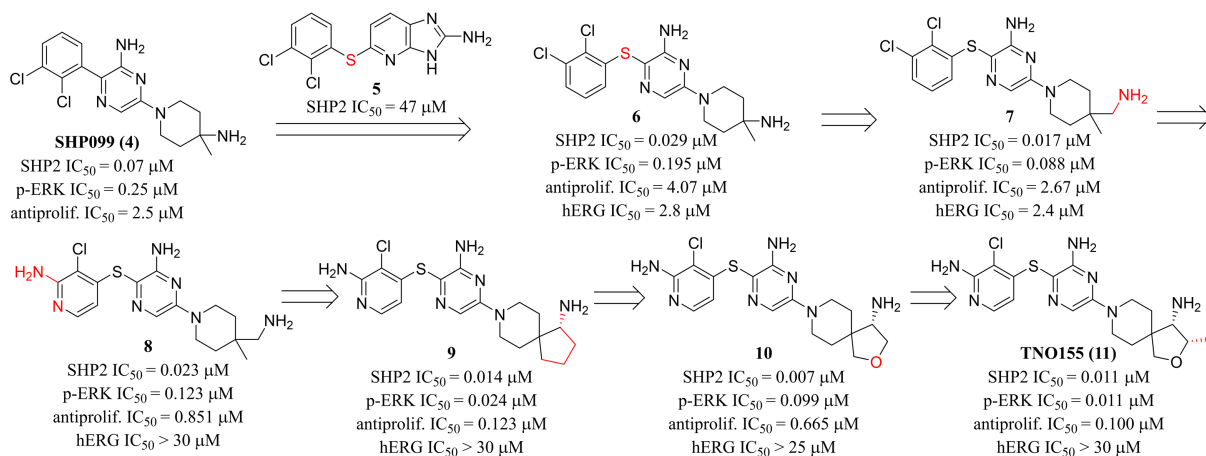


Figure 4. The structural optimization: from lead SHP099 to candidate TNO155

图 4. 从先导化合物 SHP099 到候选药物 TNO155 的结构优化过程

从美国临床试验数据库(clinicaltrials.gov)查询可知, TNO155 与其它药物联合使用的 8 项临床研究正在进行中。其中,与 KRAS 抑制剂联用最受关注。2019 年,诺华最先与 Mirati 公司达成合作协议,共同开展 TNO155 与后者开发的 KRAS^{G12C} 抑制剂 Adagrasib 联合治疗携带 KRAS^{G12C} 突变的晚期实体瘤的临床试验。2021 年,随着诺华自主研发的 KRAS^{G12C} 抑制剂 JDQ443 进入临床试验,该公司立即启动与 TNO155 联合治疗的 I/II 期研究。随后,安进公司和礼来公司也分别与诺华达成合作,将 TNO155 纳入他们各自研发的 KRAS^{G12C} 抑制剂 Sotorasib 和 LY3537982 的联合用药临床试验方案。至此,已有 4 款 KRAS^{G12C} 抑制剂与 TNO155 进行联合用药临床研究。此外, TNO155 还与多款作用于 SHP2 相关靶点的药物联合使用,其中包括 EGFR 抑制剂(Nazartinib, I 期)、BRAF 抑制剂(Dabrafenib, Ib 期)、MEK 抑制剂(Trametinib, Ib 期)、ERK 抑制剂(LTT462, Ib 期)和抗 PD-1 抗体(Tislelizumab 或 Spartalizumab, I/II 期)等。

3.3. SHP389 和 SHP394

为了拓展作用于隧道状变构口袋的不同结构类型的抑制剂,诺华团队在 SHP099 基础上衍生出吡唑并嘧啶酮[20]和嘧啶酮[21]两类变构抑制剂。他们通过分析 SHP099、苗头化合物 12 和 13 各自与 SHP2 结合的复合物晶体结构,发现与隧道状变构口袋结合的抑制剂主要包括五个药效团:与 Glu250 主链羰基作用的氢键供体、与 Phe113 作用的氢键供体、与 Arg111 胍基作用的氢键受体、与 Arg111 产生 π -阳离子作用的片段、以及与 Pro491 和 Leu254 形成范德华力的芳基部分。据此,他们采用拼合原理设计得到吡唑并嘧啶酮类化合物 14。该化合物对 SHP2 具有较强的抑制活性,并且能下调 KYSE520 细胞中 p-ERK 水平。14 共晶结构(PDB ID: 6MDB)证实了上述药效团模型所有相互作用的预测。此外,14 还表现出可接受的 PK 参数($Cl = 34$ mL/min/kg, $F = 25\%$),但其对 hERG 存在明显的抑制作用。为此他们参考 TNO155 的优化策略,引入螺环和氨基吡啶得到化合物 15,其生化和细胞活性均明显提高,并且无 hERG 抑制作用。随后在吡啶氨基上引入环丙基(SHP389, 16),其生化和细胞效力均随亲脂性的增加而提高(图 5)。共晶结构(PDB ID: 6MDC)显示, SHP389 的作用模式包含了上述药效团的大部分相互作用,此外,碱性氨

基质化后还能与 Thr108 和 Glu110 产生氢键。然而, SHP389 在体外大鼠肝微粒体实验中表现出较高的清除率($Cl = 26.1 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$, $T_{1/2} = 53.2 \text{ min}$), 分布容积较大($3.9 \text{ L}/\text{kg}$), 终末半衰期为 2.7 h, 并且口服生物利用度仅为 2%, 因此不适合进一步开发[20]。

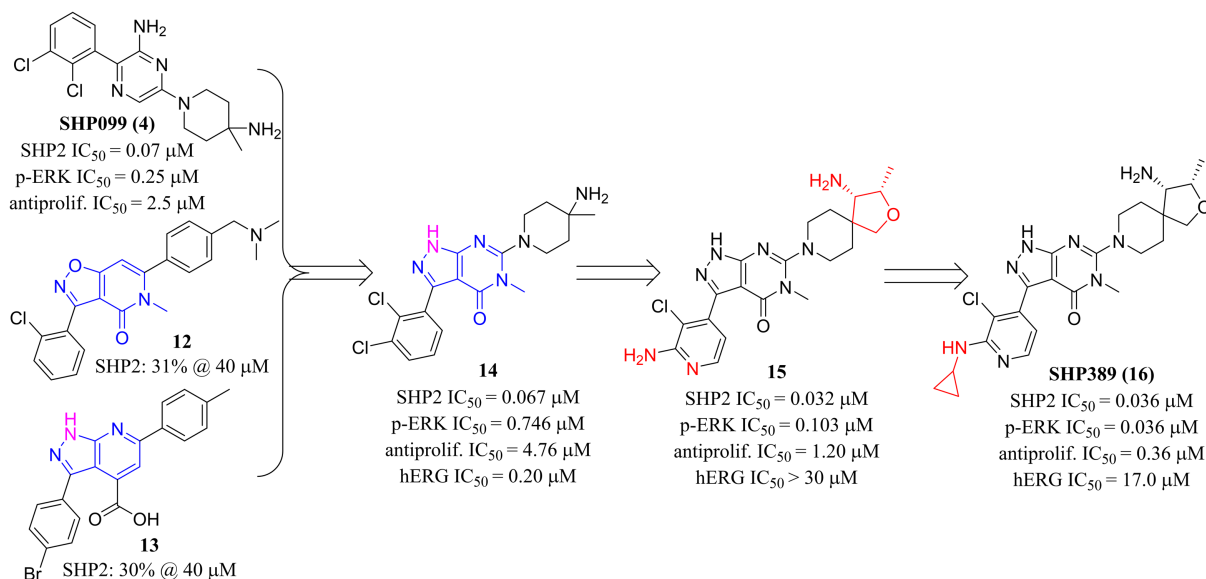


Figure 5. The structural optimization: from hits **12** and **13** to preclinical candidate compound SHP389

图 5. 从苗头化合物 **12** 和 **13** 到临床前候选化合物 SHP389 的结构优化过程

此外, 为了降低结构优化的难度, 诺华团队将 **14** 中的吡唑切除亚甲胺得到氨基嘧啶酮类化合物 **17**, 其活性与 SHP099 和 **14** 相当。随后采用 TNO155 优化的相似策略, 在苯环与嘧啶酮之间插入硫原子, 并引入螺环得到化合物 **18**, 其生化活性比 **17** 提高 21 倍, 但对 hERG 无选择性。为此将二氯苯基替换成 2-三氟甲基吡啶得到 SHP394 (**19**) (图 6)。尽管生化和细胞活性均有所下降, 但该化合物具有良好的水溶性 (0.98 mM), 且无 hERG 抑制作用。此外, SHP394 在大鼠体内具有较低的清除率、良好的半衰期 ($Cl_{int} = 21 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$, $T_{1/2} = 10.9 \text{ h}$)、中等口服暴露量 ($1 \text{ mg}/\text{kg po}$, $0.45 \mu\text{M}\cdot\text{h}$) 和生物利用度 ($F = 29\%$)。在 Detroit-562 小鼠模型中, 单次剂量爬坡实验观察到剂量依赖性暴露和药效学标记物 *DUSP6* mRNA 表达减少。在 $40 \text{ mg}/\text{kg}$ (bid) 给药组可在第 21 天观察到肿瘤停滞, 而 $80 \text{ mg}/\text{kg}$ (bid) 给药组在 14 天后观察到了肿瘤消退。然而, SHP394 的渗透性较差 ($P_{A-B} = 1.02 \times 10^{-6} \text{ cm}/\text{s}$), 并且观察到明显的外排现象[21]。

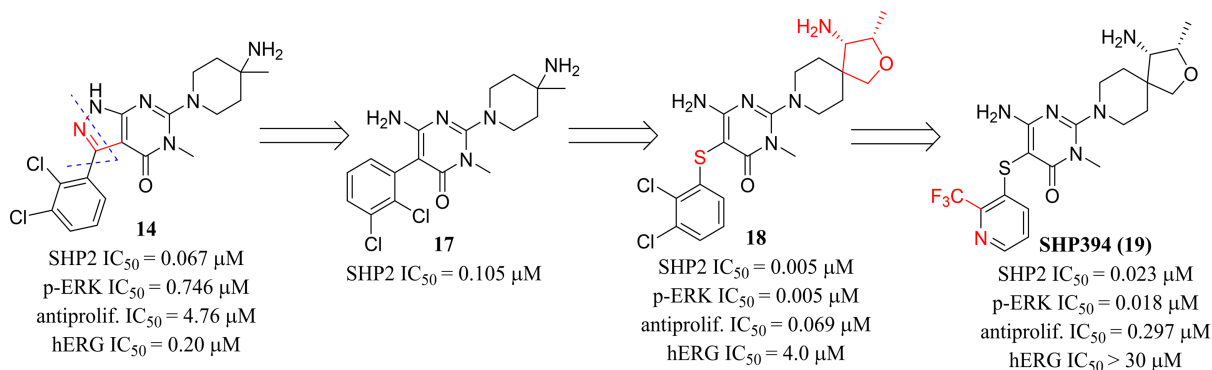


Figure 6. The structural optimization: from lead **14** to preclinical candidate compound SHP394

图 6. 从先导化合物 **14** 到临床前候选化合物 SHP394 的结构优化过程

尽管 SHP389 和 SHP394 的成药性不佳而无法作为候选药物推进临床开发,但其良好的活性证明了 SHP2 的隧道状变构口袋可以容纳不同结构类型的抑制剂。此外,值得一提的是,诺华公司上述的开创性工作引起了学术机构和业界的关注,多家制药公司纷纷跟进开展 Me-too 研究。

3.4. RMC-4550 和 RMC-4630

Revolution 公司以 SHP099 为先导化合物,利用甲基替换吡嗪环上的氨基(**20**),但其生化 and 细胞活性均有所下降。接着,他们采用 TNO155 的改造策略,将碱性氨基延伸出一个碳原子,并关环形成螺环化合物(**21**),其生化活性和细胞效能分别提高 3 倍和 4 倍。共晶结构显示,吡嗪上的甲基占据一个由 Leu254、Glu250 和 Pro491 组成的疏水口袋,而 Leu216 则与吡嗪母核接近,提示在甲基的对位引入极性基团或许可以与 Leu216 形成氢键。为此在吡嗪 2 位引入羟甲基(**22**),其生化活性和细胞效能均比 **21** 提高 5 倍(图 7)。共晶结构显示, **22** 的羟基的确可以作为氢键供体与 Leu216 的主链羰基形成相互作用。随后,在螺环上引入甲基和氧原子, RMC-4550 (**23**)可进一步提升活性[22],其在小鼠和大鼠的口服生物利用度分别达到 52% 和 76%。重要的是, RMC-4550 被证明在携带 BRAF3 突变、致癌 RAS 突变和 NF1^{LOF} 突变的人类癌症模型中均有效[10]。此外,它可促进 CD8⁺T 细胞的浸润,减弱 CSF1 受体信号转导,从而选择性消耗促肿瘤 M2 巨噬细胞,并且通过独立于 CD8⁺T 细胞或 IFN- γ 的机制增加 M1 巨噬细胞数量,从而激活抗肿瘤免疫应答[13]。然而, RMC-4550 对 SHP2^{E76K} 突变体的抑制作用较弱[10]。

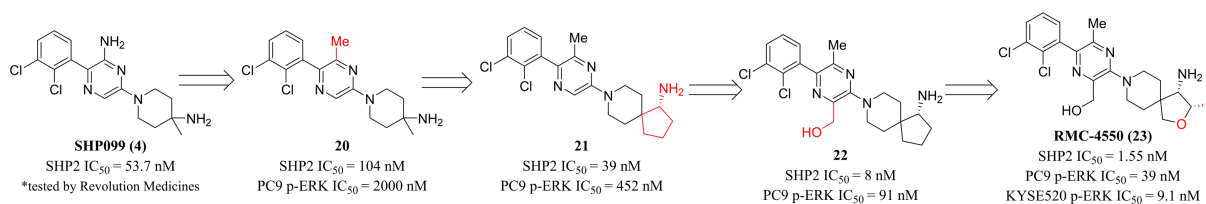


Figure 7. The structural optimization: from lead SHP099 to preclinical candidate compound RMC-4550

图 7. 从先导化合物 SHP099 到临床前候选化合物 RMC-4550 的结构优化过程

为此,该公司进一步优化获得了候选药物 RMC-4630 (结构未公开),并于 2018 年与 Sanofi 公司签订合作开发协议,将 RMC-4630 推入临床研究(NCT03634982)。2019 年,Revolution 与安进公司合作推动 RMC-4630 与 Sotorasib 联合治疗携带 KRAS^{G12C} 突变的晚期实体瘤临床试验。2020 年,Revolution 在美国癌症研究学会(AACR)年会上公布了 RMC-4630 的临床前实验数据。结果显示,该候选药物能选择性抑制 SHP2 活性,其生化及细胞活性俱佳(SHP2 IC₅₀ = 1.3 nM, H358 细胞 p-ERK IC₅₀ = 20 nM, 抗 H358 细胞增殖 IC₅₀ = 32 nM),并且具有良好的水溶性(180 μ M)、渗透性(P_{A-B} = 125 nm/s)、口服生物利用度(F = 73%)和血浆蛋白结合率为(60%) [22]。随后,该公司在 AACR 的 2021 年会上公布了 RMC-4630 的 I 期临床数据。共有 106 名患者入组接受不同给药方案的治疗,其中 49 名患者为每日单次连续给药,余者均为间歇给药,即每周仅给药两天,最终以第一天和第二天分别给药 200 mg 为 II 期临床试验的推荐方案。在该剂量下仅有两例患者(20%)出现三级以上治疗相关不良反应。此外,在第二天给药后,血药浓度可达到凋亡阈值(EC₇₅),并且在整个给药周期内,患者血药浓度均在抑制细胞生长阈值(EC₅₀)之上。在携带 KRAS 突变的非小细胞肺癌患者中, RMC-4630 的疾病控制率(DCR)为 58%,其中 G12C 突变患者的 DCR 可达 75%。在携带 NF1^{LOF} 突变的患者中, DCR 为 56%,其中一位子宫癌患者出现了肿瘤消退(CR) [23]。

从美国临床试验数据库查询可知, RMC-4630 与其它抗癌药物联用的 5 项临床试验正在进行中,其中包括与 EGFR 抑制剂(Osimertinib, I/II 期)、MEK 抑制剂(Cobimetinib, I/II 期)、ERK 抑制剂(LY3214996, I 期)、KRAS^{G12C} 抑制剂(Sotorasib 或 Adagrasib, I/II 期)和抗 PD-1 抗体(Keytruda, I/II 期)等联用。与诺华的开发策略类似, RMC-4630 与 KRAS^{G12C} 抑制剂联用深受关注,其中除了与 Sotorasib 联用治疗 KRAS^{G12C}

阳性 NSCLC 已进入 II 期临床外, RMC-4630 还与 Mirati 公司的 Adagrasib 联合开展针对 KRAS^{G12C} 突变的晚期实体瘤 I/II 期研究。

3.5. IACS-15414 和 IACS-15509

IACS-15509 (BBP-398)是由德克萨斯大学安德森癌症中心(IACS)和 Navire 公司合作研发的 SHP2 变构抑制剂,已于 2020 年 8 月启动临床研究,其结构及活性数据尚未公布,但其类似物 IACS-15414 却已被报道。

在 SHP099 的基础上, IACS 团队通过构建药效团模型设计得到吡唑并嘧啶酮类化合物 **24**, 其生化活性和细胞效力均较为理想, 但其渗透率低且外排率高。将嘧啶酮环更换为吡嗪环(IACS-13909, **25**), 活性有所提升, 而且渗透性获得明显改善($6 \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} / 8.5 \times 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} \text{ A-B/B-A}$), 但却对 hERG 产生较强的作用。为此, 该团队分别尝试增强氨基片段和芳环片段的极性, 然后在母核引入羟甲基, 但收效甚微。随后, 他们尝试采用 3-芳基嘧啶酮替代吡唑并嘧啶酮(**26**), 结果发现 **26** 对 hERG 具有较高的选择性, 然而其活性却明显下降。据此, 他们采用螺环优化策略对 **26** 进行修饰, 获得的 IACS-15414(**27**)活性明显提高, 并且对 hERG 无抑制作用(图 8) [24]。

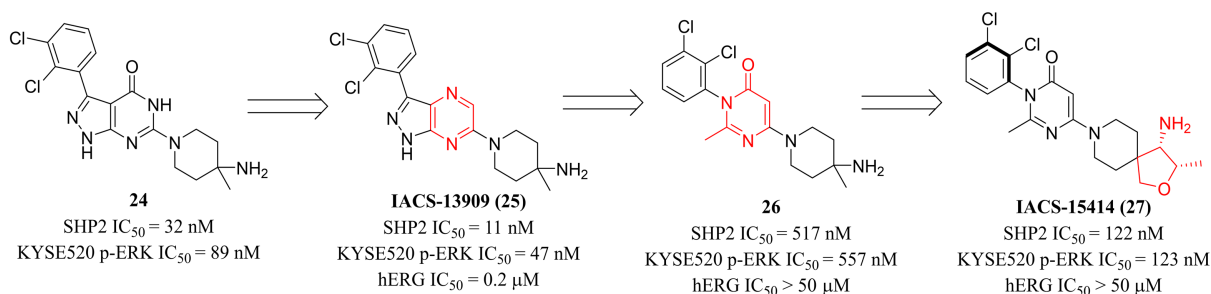


Figure 8. The structural optimization: from lead **24** to preclinical candidate compound IACS-15414

图 8. 从先导化合物 **24** 到临床前候选化合物 IACS-15414 的结构优化过程

IACS-15414 在啮齿类动物和非啮齿类动物体内均具有良好的 PK 参数。在 MIA PaCa-2 和 KYSE-520 异种移植小鼠模型中, 该化合物均呈现时间依赖性和剂量依赖性抑制 MAPK 信号通路, 并抑制 KRAS^{G12C} 突变和 EGFR^{amp} 驱动的肿瘤生长, 且具有良好的耐受性[24]。然而, IACS-15414 的活性仍不够理想。因此我们推测 IACS-15509 可能是在 IACS-15414 的基础上优化所获得的候选药物。目前该药正在进行治疗晚期实体瘤的 I 期试验(NCT04528836)。

3.6. 其它候选药物

国内多家药企也积极研发 SHP2 变构抑制剂, 其中进展最快当属加科思公司。2020 年, 加科思与 Abbvie 达成合作协议, 共同推动 JAB-3068 和 JAB-3312 (结构尚未公开)临床开发, 目前这两款候选药物均已通过 FDA 孤儿药资格认定(食管癌)。在联合用药中, 它们也是与 SHP2 相关的靶点药物联合使用, 如 EGFR 抑制剂 Osimertinib、MEK 抑制剂 Binimetinib、KRAS^{G12C} 抑制剂 Sotorasib 或 JAB-21822、PD-1 单抗 Keytruda 等。

此外, 目前还有 8 款尚未公开结构的 SHP2 变构抑制剂已进入临床开发, 包括圣和药业的 SH3809 (CTR20210522)、勤浩医药的 GH21 (CTR20213358)、奕拓药业的 ET0038 (CTR20212444)、凌达生物的 RG001 (CTR20212084)、诺诚健华的 ICP-189 (CTR20220521)、Relay 的 RLY-1971 (NCT04252339)、Erasca 的 ERAS-601 (NCT04670679)和辉瑞的 PF-07284892 (NCT04800822)。

3.7. 作用于新变构口袋的抑制剂

除了上述隧道状变构口袋外, 诺华团队还报道了 SHP2 蛋白中适合小分子结合的另一个变构位点, 即 N-SH2 和 PTP 结构域界面上的一个裂隙, 距离隧道状变构口袋约 20 Å, 根据其形状称之为“门锁”口袋。为获得结合于该口袋的小分子抑制剂, 该团队发展新的筛选方法, 在筛选得到苗头化合物后, 利用先前构建的 SHP2^{T253M/Q257L} 突变型蛋白剔除作用于隧道状口袋的化合物, 得到 SHP244 (28)。其对 SHP2 具有一定的抑制活性, 而对 PTP 结构域无作用。对 SHP244 改造获得 SHP844 (29) 和 SHP504 (30), 它们的生化活性明显提升(图 9)。当 SHP504 与 SHP099 联用时, 随着 SHP504 浓度的增加, SHP099 的抑制活性亦轻微提高, 二者共同使 SHP2 蛋白稳定于自抑制构象, 表明两种抑制剂与靶蛋白的结合模式之间存在协同作用。此发现为将来解决作用于隧道状口袋的变构抑制剂的耐药问题提供了新的思路[25]。

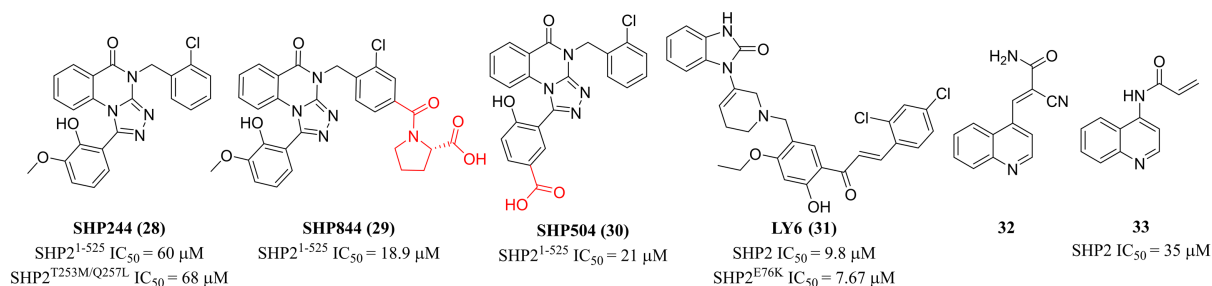


Figure 9. Representative SHP2 inhibitors binding to other allosteric sites

图 9. 作用于新变构口袋的 SHP2 抑制剂

此外, 埃默里大学 Qu 小组选择一个与隧道状口袋不同的 SHP2 表面口袋, 通过虚拟筛选结合细胞活性测试, 发现 LY6 (31) 抑制 SHP2 的 IC₅₀ 值为 9.8 μM, 是 SHP1 的 7 倍, 并且对 SHP2^{E76K} 突变体也具有相当的抑制活性(图 9)。体外实验证实 LY6 与 SHP2 的直接结合, 可有效抑制 SHP2 介导的细胞信号转导和肿瘤细胞增殖[26]。

与此同时, 阿默斯特学院 Bishop 团队发现一个在 PTP 结构域上的变构位点, 其包含一个非保守的半胱氨酸残基(Cys333)。为此, 他们通过筛选可逆共价抑制剂库发现苗头化合物 32, 对其优化得到 SHP2 不可逆抑制剂 33, 可惜其活性太弱, 缺乏开发价值(图 9) [27]。

3.8. SHP2^{E76A} 变构抑制剂

需要指出的是, 在目前已披露的 SHP2 变构抑制剂中, 大多数是针对野生型 SHP2 变构口袋而研发的抑制剂, 它们对 SHP2 突变体的抑制作用通常并不理想。因此, 人们针对一些常见的 SHP2 突变体开展变构抑制剂研究。

2017 年, 中科院上海有机所朱继东团队首次报道靶向 SHP2^{E76A} 突变体的变构抑制剂。他们通过虚拟筛选获得苗头化合物 34, 其对 SHP2^{E76A} 具有一定的抑制活性, 并且对 PTP 催化域无抑制作用。将 34 中的苯环替换为萘环(35)可使生化活性提高 7 倍。采用 4-甲基-4-氨基哌啶替代 35 中的胺基片段, 并在萘环上引入溴原子(36), 其对 SHP2^{E76A} 和 SHP2^{WT} 的 IC₅₀ 值分别为 0.71 μM 和 1.27 μM, 表现出一定的选择性(图 10)。实验表明, 36 能够抑制 MAPK 信号转导和 YAP 的表达, 并能拮抗多种肿瘤细胞的增殖。此外, 36 在 MV4-11 移植瘤小鼠模型中也显示出一定的抑瘤作用[28]。

4. 结语与展望

作为多条信号通路的枢纽, SHP2 被认为是一个理想的癌症干预靶标。自本世纪初, 人们便致力于

SHP2 抑制剂的研究, 开发了一系列靶向 PTP 催化位点的正构抑制剂。然而, 正构抑制剂往往对其它 PTP 也产生抑制作用, 并且难以透过细胞膜, 因此难以成药。直至 2016 年, 诺华公司报道了第一款 SHP2 变构抑制剂 SHP099, 其以一种全新的变构抑制机制使 SHP2 蛋白稳定于自抑制构象。与 SHP2 正构抑制剂相比, SHP099 具有较高的抑制活性和选择性, 并且表现出良好的 PK 特性。在 SHP099 基础上优化所得的 TNO155 成为首款进入临床开发的 SHP2 变构抑制剂。随后, 国内外多家生物制药公司纷纷押注 SHP2 赛道, 逐渐将 SHP2 抑制剂的研究推向高潮。截至目前, 已有 13 款 SHP2 变构候选药物进入临床开发。值得关注的是, 在开展单药试验的同时, 多家公司侧重推动与 SHP2 相关靶点药物的联合试验, 其中与 KRAS 抑制剂联合疗法最受青睐。靶向 SHP2 的抗肿瘤疗法也因各项联合用药研究的深入开展显示出蓬勃生机。

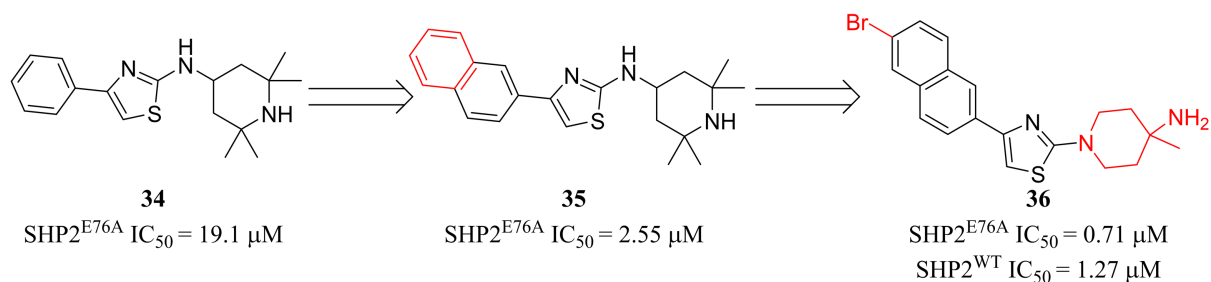


Figure 10. The structural optimization process of the allosteric SHP2^{E76A} inhibitor **36**

图 10. SHP2^{E76A} 变构抑制剂 **36** 的结构优化过程

然而尽管如此, SHP2 抑制剂的研发仍然面临着许多挑战。首先, 目前已报道的 SHP2 变构抑制剂大多数都是源自诺华公司的 SHP099 和 TNO155, 结构类型单一。其次, 大多数 SHP2 变构抑制剂是针对野生型 SHP2 蛋白而研发, 故对突变体活性普遍较弱, 而现有的几款突变型 SHP2 抑制剂的活性却很弱[8][10][29], 因此限制其进一步开发。然而, 基因突变往往与耐药现象密切相关, 因此研究针对致癌突变型 SHP2 的抑制剂迫在眉睫。再者, 尽管已有 13 款候选药物进入临床试验, 但进展仍然较为缓慢, 而且作为“first-in-class”的 TNO155 在已披露的 I 期临床结果中报告的疾病稳定率仅为 24%, 表明该类“分子胶”化合物或许在成药性方面还需要进一步优化。此外, 研究表明 SHP2 在不同肿瘤类型中扮演着不同的角色, 如在部分白血病、非小细胞肺癌、宫颈癌等恶性肿瘤中, SHP2 往往起着驱动作用, 然而在某些肿瘤如肝细胞性肝癌(HCC)中却同时起到致癌与抑癌双重作用[6], 这就提示我们需要对 SHP2 变构抑制剂的适应症进行更加深入的探索与研究。我们坚信随着研究的不断深入, 上述难题会被逐个击破, “无药可及”的 SHP2 靶点终将会被人类所攻克, 从而让靶向 SHP2 的抗肿瘤疗法惠及广大患者。

基金项目

国家自然科学基金项目(21977117)。

参考文献

- [1] Hunter, T. (1995) Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90405-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90405-0)
- [2] Singh, V., Ram, M., Kumar, R., et al. (2017) Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein Journal*, **36**, 1-6. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9696-z>
- [3] Attwood, M.M., Fabbro, D., Sokolov, A.V., et al. (2021) Trends in Kinase Drug Discovery: Targets, Indications and Inhibitor Design. *Nature Reviews Drug Discovery*, **20**, 839-861. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00252-y>
- [4] Vainonen, J.P., Momeny, M. and Westermarck, J. (2021) Druggable Cancer Phosphatases. *Science Translational*

- Medicine*, **13**, eabe2967. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe2967>
- [5] Barford, D., Neel, B.G. (1998) Revealing Mechanisms for SH2 Domain Mediated Regulation of the Protein Tyrosine Phosphatase SHP-2. *Structure*, **6**, 249-254. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00027-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00027-6)
- [6] Song, Y., Zhao, M., Zhang, H., *et al.* (2022) Double-Edged Roles of Protein Tyrosine Phosphatase SHP2 in Cancer and Its Inhibitors in Clinical Trials. *Pharmacology & Therapeutics*, **230**, Article ID: 107966. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107966>
- [7] Chan, R.J. and Feng, G.S. (2007) PTPN11 Is the First Identified Proto-Oncogene That Encodes a Tyrosine Phosphatase. *Blood*, **109**, 862-867. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-028829>
- [8] LaRochelle, J.R., Fodor, M., Vemulapalli, V., *et al.* (2018) Structural Reorganization of SHP2 by Oncogenic Mutations and Implications for Oncoprotein Resistance to Allosteric Inhibition. *Nature Communications*, **9**, Article No. 4508. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06823-9>
- [9] Xu, R., Yu, Y., Zheng, S., *et al.* (2005) Overexpression of Shp2 Tyrosine Phosphatase Is Implicated in Leukemogenesis in Adult Human Leukemia. *Blood*, **106**, 3142-3149. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4057>
- [10] Nichols, R.J., Haderk, F., Stahlhut, C., *et al.* (2018) RAS nucleotide Cycling Underlies the SHP2 Phosphatase Dependence of Mutant BRAF-, NF1- and RAS-Driven Cancers. *Nature Cell Biology*, **20**, 1064-1073. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0169-1>
- [11] Bunda, S., Burrell, K., Heir, P., *et al.* (2015) Inhibition of SHP2-Mediated Dephosphorylation of Ras Suppresses Oncogenesis. *Nature Communications*, **6**, Article No. 8859. <https://doi.org/10.1038/ncomms9859>
- [12] Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., *et al.* (2004) Shp2, An SH2-Containing Protein-Tyrosine Phosphatase, Positively Regulates Receptor Tyrosine Kinase Signaling by Dephosphorylating and Inactivating the Inhibitor Sprouty. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 22992-22995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312498200>
- [13] Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., *et al.* (2012) Programmed Cell Death 1 Forms Negative Costimulatory Microclusters That Directly Inhibit T Cell Receptor Signaling by Recruiting Phosphatase SHP2. *Journal of Experimental Medicine*, **209**, 1201-1217. <https://doi.org/10.1084/jem.20112741>
- [14] Scott, L.M., Lawrence, H.R., Sebti, S.M., *et al.* (2010) Targeting Protein Tyrosine Phosphatases for Anticancer Drug Discovery. *Current Pharmaceutical Design*, **16**, 1843-1862. <https://doi.org/10.2174/138161210791209027>
- [15] Garcia Fortanet, J., Chen, C.H., Chen, Y.N., *et al.* (2016) Allosteric Inhibition of SHP2: Identification of a Potent, Selective, and Orally Efficacious Phosphatase Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, **59**, 7773-7782. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00680>
- [16] Chen, Y.N., LaMarche, M.J., Chan, H.M., *et al.* (2016) Allosteric Inhibition of SHP2 Phosphatase Inhibits Cancers Driven by Receptor Tyrosine Kinases. *Nature*, **535**, 148-152. <https://doi.org/10.1038/nature18621>
- [17] Zhao, M., Guo, W., Wu, Y., *et al.* (2019) SHP2 Inhibition Triggers Anti-Tumor Immunity and Synergizes with PD-1 Blockade. *Acta Pharmaceutica Sinica, B*, **9**, 304-315. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.08.009>
- [18] LaMarche, M.J., Acker, M., Argintaru, A., *et al.* (2020) Identification of TNO155, an Allosteric SHP2 Inhibitor for the Treatment of Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, **63**, 13578-13594. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01170>
- [19] Brana, I., Shapiro, G., Johnson, M., *et al.* (2021) Initial Results from a Dose Finding Study of TNO155, a SHP2 Inhibitor, in Adults with Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, **39**, 3005. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.3005
- [20] Bagdanoff, J.T., Chen, Z., Acker, M., *et al.* (2019) Optimization of Fused Bicyclic Allosteric SHP2 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 1781-1792. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01725>
- [21] Sarver, P., Acker, M., Bagdanoff, J.T., *et al.* (2019) 6-Amino-3-Methylpyrimidinones as Potent, Selective, and Orally Efficacious SHP2 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 1793-1802. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01726>
- [22] Koltun, E.S. (2020) Discovery and Development of Allosteric Inhibitors of SHP2. <https://www.revmed.com/media/discovery-and-development-allosteric-inhibitors-shp2>
- [23] Koczywas, M., Haura, E., Janne, P., *et al.* (2021) Anti-Tumor Activity and Tolerability of the SHP2 Inhibitor RMC-4630 as a Single Agent in Patients with RAS-Addicted Solid Cancers. *Cancer Research*, **81**, LB001. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2021-LB001>
<https://www.revmed.com/media/anti-tumor-activity-and-tolerability-shp2-inhibitor-rmc-4630-single-agent-patients-ras>
- [24] Czako, B., Sun, Y., McAfoos, T., Cross, J.B., Leonard, P.G., Burke, J.P., Burke, J.P., *et al.* (2021) Discovery of 6-[(3S,4S)-4-Amino-3-methyl-2-oxa-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl]-3-(2,3-dichlorophenyl)-2-methyl-3,4-dihydropyrimidin-4-one (IACS-15414), a Potent and Orally Bioavailable SHP2 Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, **64**, 15141-15169. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01132>

-
- [25] Fodor, M., Price, E., Wang, P., *et al.* (2018) Dual Allosteric Inhibition of SHP2 Phosphatase. *ACS Chemical Biology*, **13**, 647-656. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00980>
- [26] Wu, X., Xu, G., Li, X., *et al.* (2019) Small Molecule Inhibitor That Stabilizes the Autoinhibited Conformation of the Oncogenic Tyrosine Phosphatase SHP2. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 1125-1137. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00513>
- [27] Marsh-Armstrong, B., Fajnzylber, J.M., Korntner, S., *et al.* (2018) The Allosteric Site on SHP2's Protein Tyrosine Phosphatase Domain Is Targetable with Druglike Small Molecules. *ACS Omega*, **3**, 15763-15770. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02200>
- [28] Xie, J., Si, X., Gu, S., *et al.* (2017) Allosteric Inhibitors of SHP2 with Therapeutic Potential for Cancer Treatment. *Journal of Medicinal Chemistry*, **60**, 10205-10219. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01520>
- [29] Pádua, R.A.P., Sun, Y., Marko, I., *et al.* (2018) Mechanism of Activating Mutations and Allosteric Drug Inhibition of the Phosphatase SHP2. *Nature Communications*, **9**, Article No. 4507. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06814-w>