

· 药学前沿 ·

共价修饰类药物的研究进展

何思雨, 孙昊鹏*

(中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘要 共价修饰类药物通过共价键与靶标结合而发挥其药理作用, 由于其可能带来脱靶效应及不良反应, 长期以来在药物设计领域尽可能被避免。随着对已上市的重磅级共价药物结合模式的深入研究, 越来越多共价修饰类药物重新得到研发人员的重视, 寻找高选择性、低不良反应的共价修饰类药物已成为目前研究的热点。本文对一些共价修饰类药物进行分类, 对其与靶标结合的模式以及近年来共价修饰类药物设计的新策略进行综述, 为共价药物的合理药物设计提供参考。

关键词 共价修饰类药物; 药物-靶标结合模式; 合理药物设计

中图分类号 R914.2 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)05-0503-12

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170501

引用本文 何思雨, 孙昊鹏. 共价修饰类药物的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(5):503-514.

Cite this article as: HE Siyu, SUN Haopeng. Advances of covalently modified drugs[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(5):503-514.

Advances of covalently modified drugs

HE Siyu, SUN Haopeng*

School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Covalently modified drugs, which exert their pharmacological effects by covalently binding to the targets, have been avoided as far as possible for a long time in drug design due to the potential off-target effects and other side-effects. With the in-depth study of binding modes of market blockbuster covalent drugs, more and more attention has been concentrated on covalently modified drugs. Current challenges remain in development of potent selective covalently modified drugs with fewer adverse effects. This paper reviews the classification of some covalently modified drugs, the drug-target binding modes and the new strategies of designing covalently modified drugs, in order to provide reference for rational design of covalent drugs.

Key words covalently modified drugs; drug-target binding modes; rational drug design

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81573281)

共价修饰类药物通常指含有亲电性基团或经体内代谢产生亲电基团, 通过共享电子的方式与靶标亲核部位结合形成复合物使靶标失活而发挥药理作用的一类物质。共价修饰类药物与靶标常为不可逆结合^[1], 多见于抗感染、抗肿瘤、心血管系统、神经系统和代谢类型等疾病的药物结构中(如图1所示)。现上市的大多数共价药物以疾病产生的相关酶为靶标, 通过对靶蛋白亲核部位共价修

饰发挥药理作用。由于对突变体抵抗和肿瘤治疗有更有效的作用, 靶向共价药物在临床上多用于治疗一些严重威胁病人生命但却没有更好治疗方法的疾病。相较于非共价药物, 共价药物亲电性较强, 对亲核基团缺乏足够的选择性, 往往产生非特异性结合而出现脱靶效应, 在体内产生诸多不良反应甚至毒性反应, 造成组织损伤或免疫反应。如20世纪60年代研发的抗肿瘤药物通过对核酸的

烷基化而发挥抗肿瘤活性,但这类药物亲电性强,对正常细胞和肿瘤细胞缺乏选择性,导致严重的不良反应。这类不良反应后果严重且难以预测,因此在相当长的时间里,共价药物发展比较缓慢。近年

来,随着药物设计理念及技术的不断进步,共价修饰类药物展现出了强大而独特的疗效,因此又重新被广大药物化学家所重视,成为了新药研发的热门领域^[2]。

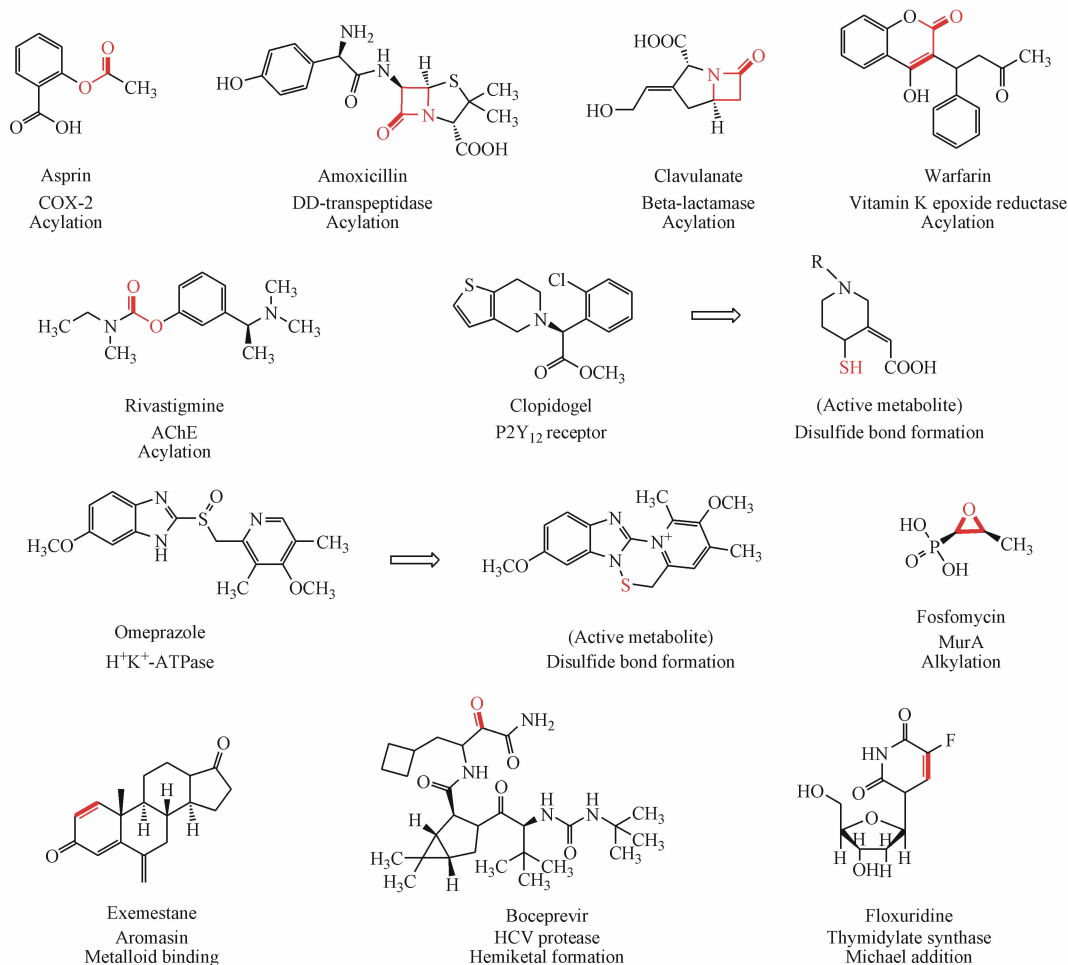


Figure 1 Examples for classical covalently modified drugs and their reaction types

药物或其代谢产物与靶标蛋白通过形状互补和化学互补进行分子识别后进一步结合形成复合物,药物首先以非共价形式结合到靶蛋白上,形成中间体[EI] (K_1 为中间体生成速率常数, K_{-1} 为解离速率常数) (图 2),使配体的亲电基团贴近靶蛋白的活性共价结合位点,其活性中心含有多种亲核基团,如 Cys 残基上的巯基、Ser/Thr 残基上的醇羟基和 Tyr 残基上的酚羟基等,随后共价结合位点亲核进攻药物的亲电基团形成共价键。若成键过程不可逆时, $K_{-2} = 0$, 则称该抑制剂为不可逆抑制剂;若 K_{-2} 大于 0, 意味着药物与靶标形成的共价键可解离,这类药物称为可逆性共价键药物。

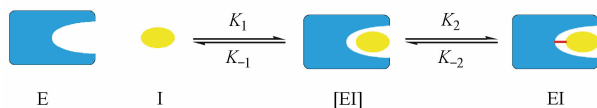
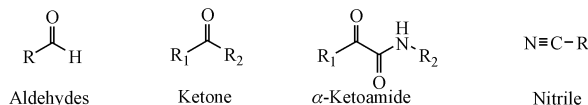


Figure 2 Binding diagram of drug to target. Covalent bond is shown as a red line

随着对共价结合机制的深入研究,目前有许多亲电基团常被用于设计与靶酶共价结合的酶抑制剂或受体配体^[3] (图 3)。可逆的亲电基团主要有醛类、活化酮类、 α -酮基酰胺类、腈类和硼酸衍生物等,多用于蛋白酶体、丝氨酸水解酶、组织蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶等靶标的可逆共价抑制剂的设计。不可逆抑制剂与蛋白质靶标形成加合物后,不容易

从与靶蛋白结合过程中解离出来,这类抑制剂含有的亲电基团主要有丙烯酰胺、 α -卤酮、环氧化物、氮丙环、乙烯基砜、活化乙炔等,大多用于激酶类抑制的设计^[4]。

Reversible electrophilic warheads:



Irreversible electrophilic warheads:

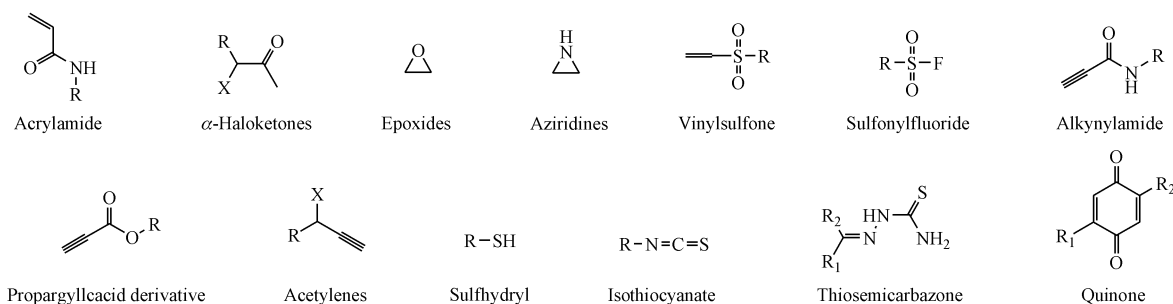


Figure 3 Commonly used electrophilic warheads for covalently modified inhibitors

1 蛋白激酶类共价药物

蛋白激酶是由多种高度保守酶组成的酶系,主要负责将 ATP 的 γ -磷酸基团转移给酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸等多种氨基酸,这些氨基酸在细胞中起到信号传导的作用。靶向共价抑制剂的靶点大多是激酶,在治疗肿瘤等疾病中发挥重要的作用。目前全球新药研发项目中 30% 为蛋白激酶类抑制剂。

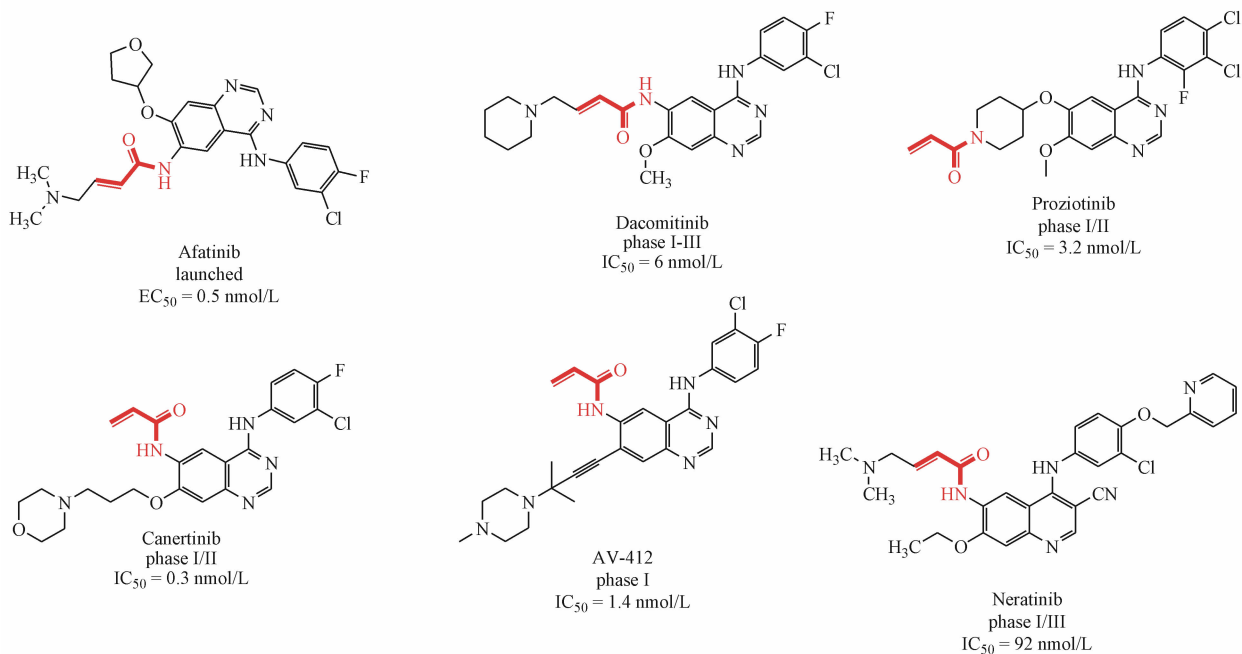
1.1 EGFR 抑制剂

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 信号通路对细胞的生长、增殖和分化等生理过程发挥重要作用,其过表达与肿瘤的转移、浸润有关。现已有数个生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂作为抗肿瘤药上市,还有一些处于临床试验阶段(图 4)。第一代 EGFR 抑制剂主要是 ATP 竞争性抑制剂,与酪氨酸激酶可逆结合(非共价),但这类抑制剂容易产生耐药性等问题。第二代 EGFR 抑制剂克服了第一代抑制剂的耐药性问题,对突变型 EGFR 也有较好的活性,这类药物分子中多含有丙烯酰胺片段,可与靶标分子中半胱氨酸的巯基发生迈克尔加成,形成共价结合。如 Afatinib

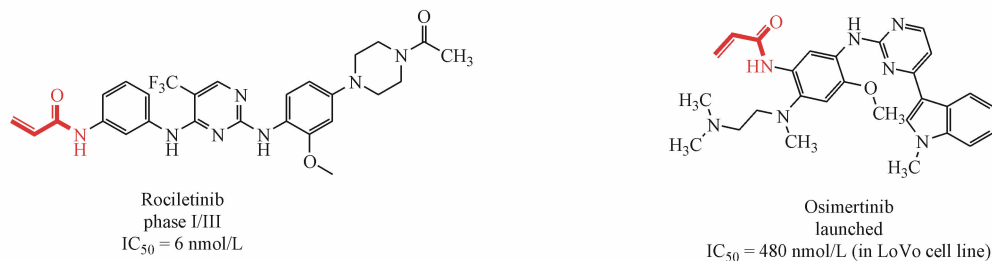
本综述根据近年来共价修饰类药物作用的靶标将其进行分类,并对其设计思路及发展过程进行论述,为新型共价药物的设计提供参考。

对 T790M 型突变细胞较第一代抑制剂有更好的活性,已被 FDA 批准上市,用于治疗非小细胞肺癌,其 α, β -不饱和酰胺中的 α 位与位于活性口袋附近的 Cys797 相邻,合适的距离配合半胱氨酸巯基的强亲核性,对酶起到共价抑制作用(图 5)。Dacomitinib 对野生型 EGFR 有较高活性,同时它对过表达的 L858R/T790M 双突变的细胞系也有显著抑制活性。同样,Proizotinib、AV-412 和 Canertinib 对突变型也有较高的活性^[5],目前处于临床研究阶段。Neratinib 是 HER2 和 EGFR 的高选择性抑制剂,可用于治疗乳腺癌,目前已递交上市申请。第二代抑制剂对野生型 EGFR 存在强抑制作用,容易产生皮疹和腹泻等不良反应,临床上需控制剂量,现逐渐被高选择性的第三代抑制剂所替代^[6]。Rociletinib (CO-1686) 对 L858R/T790M 双突变型有较好的抑制活性 ($IC_{50} < 0.5$ nmol/L),对野生型 EGFR 也有较好的选择性^[5],目前处于治疗非小细胞肺癌 (NSCLC) 的 III 期临床试验中。Osimertinib (AZD9291) 在不同的细胞系中对 EGFR 有不同的抑制活性,对 L858R/T790M 的选择性比野生型 EGFR 高近 200 倍,在治疗 T790M 突变型 NSCLC 中有良好的效果^[6],于 2015 年 12 月被 FDA 批准上市。

Second generation covalent EGFR inhibitors:

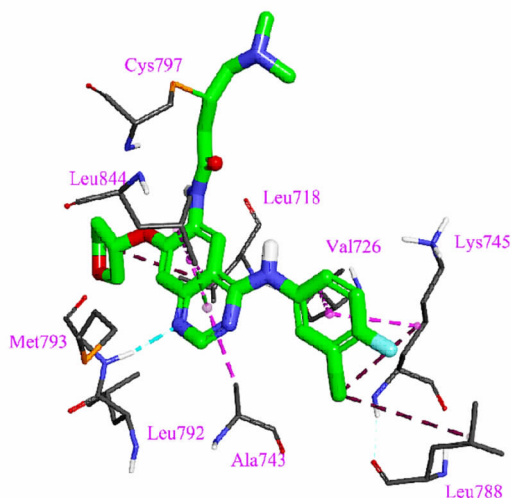


Third generation covalent EGFR inhibitors:

**Figure 4** Clinical and launched covalent EGFR inhibitors

1.2 BTK 抑制剂

Bruton 酪氨酸激酶 (Bruton tyrosine kinase, BTK) 属于 Tec 家族, 在大多数造血细胞如 B 细胞、肥大细胞和巨噬细胞中表达, 是 B 细胞受体 (BCR) 信号通路中的必需激酶, 是慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和其他 B 细胞恶性肿瘤以及自身免疫性疾病的靶点, 现已有多个 BTK 抑制剂作为抗肿瘤药被开发出来 (图 6)。Ibrutinib 是第一代 BTK 抑制剂, 其不饱和丙烯酰胺基团与 BTK ATP 绑定口袋中的 Cys481 形成共价键以形成非活性加合物抑制酶的活性, 还通过在 Tyr223 处抑制其自磷酸化导致 BTK 不能完全激活^[7]。FDA 在 2013 年 11 月批准 Ibrutinib 口服用于治疗套细胞淋巴瘤和 CLL, 耐受性良好。Ibrutinib 同时也对 EGFR 和除 BTK 以外的 Tec 家族蛋白产生抑制作用, 从而导致不良反应 (如出血、皮疹、腹泻和心

**Figure 5** The crystal structure of Afatinib (PDB ID: 4G5J). Hydrogen bonds are shown as blue broken lines; covalent bond is shown as a yellow line; Pi-Alkyl is shown as pink lines; Alkyl is shown as purple lines

房颤动等)以及耐药性的出现^[8],为克服这些缺点,第二代 BTK 抑制剂逐渐被开发出来。Acalabrutinib (ACP-196) 目前处于治疗 CLL 临床 III 期试验,和 Ibrutinib 相比,对 EGFR 没有抑制活性,对 BTK 选择性更高^[9]。Spebrutinib (CC-292) 通过共价结合 BTK,在 Ramos 人类伯基特淋巴瘤细胞系中消除 BCR 信号,并选择性抑制其自磷酸化以及 PLC γ 2 和 BTK 的其他下游底物的激活^[7],

目前正处于类风湿性关节炎、CLL 和淋巴瘤的 II 期临床试验中。ONO-4059 对易复发难治性 B 细胞恶性肿瘤有很好的安全性^[10]。HM-71224 是一种高选择性的 BTK 共价抑制剂,对 EGFR 的抑制活性弱 ($IC_{50} > 1\ 000\text{ nmol/L}$),能抑制 B 细胞、骨髓细胞和树突状细胞的激活,改善实验性关节炎并防止动物模型中的关节破坏,目前处于临床研究中^[11]。

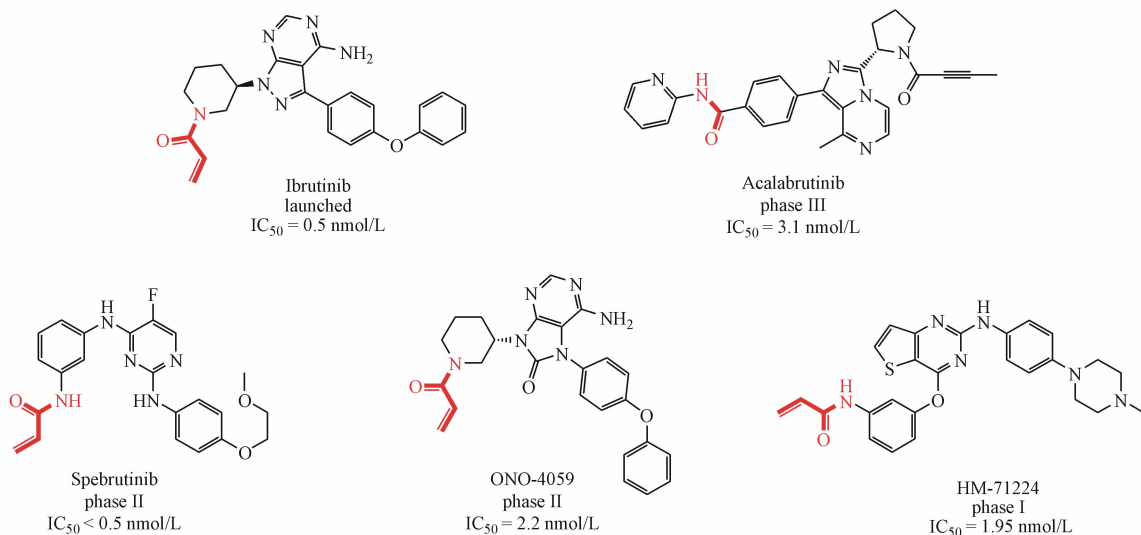


Figure 6 Clinical and launched BTK inhibitors

1.3 其他蛋白激酶类抑制剂

纤维母细胞生长因子受体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR) 属于酪氨酸蛋白激酶家族,其激活会使细胞过度增殖、逃避凋亡、容易迁移。针对 FGFR 的靶向治疗已成为临床研究的热点领域。BLU-9931 (图 7) 是 FGFR4 不可逆抑制剂,与其 ATP 铰链区附近的特有的 Cys552 共价结合,具有高选择性 [FGFR4 ($IC_{50} = 3\text{ nmol/L}$), FGFR1 ($IC_{50} = 591\text{ nmol/L}$), FGFR2 ($IC_{50} = 493\text{ nmol/L}$), FGFR3 ($IC_{50} = 150\text{ nmol/L}$)]^[12]。在完全耐受的剂量下,BLU-9931 在 HCC 异种移植模型中有显著的抗肿瘤活性。BLU-554 (图 7) 是对 BLU-9931 进行结构改造的得到的共价抑制剂,2015 年 9 月获得 FDA 批准的孤儿药,用于治疗肝细胞癌。

磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 是磷酸化磷脂酰肌醇肌醇环的信号转导酶家族,在细胞增殖、凋亡和其他细胞功能中起作用,目前已成为抗肿瘤药物研发的一个重要靶点。Sonolisib (PX-866) (图 7) 是基于与 PI3K 共价

结合的不稳定天然甾体化合物 Wortmannin 而开发的结构类似物,通过插烯转酰胺化反应与 PI3K 的催化位点中的赖氨酸残基作用^[13],导致该激酶的不可逆抑制,目前处于 II 期临床试验,用于治疗前列腺癌和多形性成胶质细胞瘤。

促分裂原活化蛋白激酶 1 (Mitogen-activated protein kinase 1, MEK1) 在 Ras-Raf-MEK-ERK1/2 途径中的信号转导中发挥关键作用,通常与癌发生有关^[14]。E6201 (图 7) 是 MEK1 的共价抑制剂,其大环内的烯酮在 MEK1 的活性位点与半胱氨酸发生结合。目前在急性淋巴性白血病、慢性骨髓单核细胞性白血病和骨髓增生异常综合征的 II 期临床试验中。

目前还有很多共价类蛋白激酶不可逆抑制剂在治疗肿瘤等疾病中发挥着重要作用,对很多突变型靶点能产生很强的效力。以激酶为靶点的药物大多含有丙烯酰胺的官能团,主要与激酶活性部位的半胱氨酸残基发生共价结合。这类抑制剂大多是不可逆的,靶蛋白将永久失去活性,只能通过自

身的新陈代谢重新生成新的靶蛋白才能恢复活性。

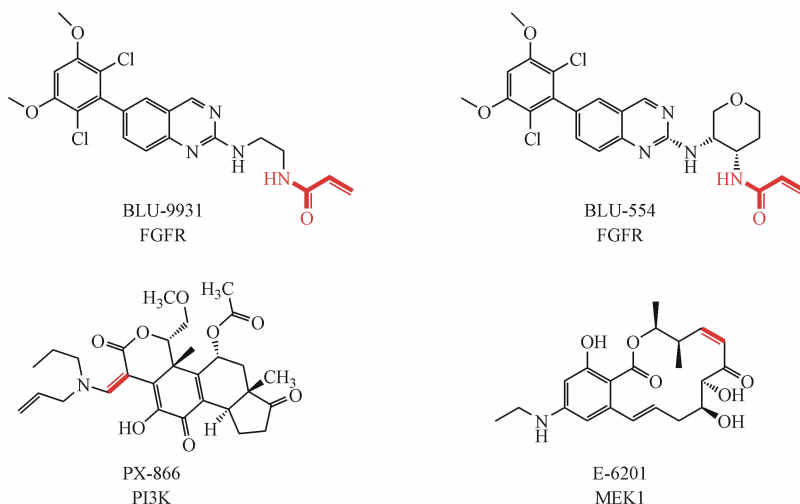


Figure 7 Covalent inhibitors targeting other protein kinases

2 蛋白酶体抑制剂

蛋白酶体是 ATP 依赖的高度保守且具有多种催化功能的蛋白酶复合物,主要功能是负责依赖泛素的蛋白质降解途径,其在细胞周期调控、信号转导、细胞死亡、蛋白质表达控制中有重要作用。蛋白酶体抑制剂按其不同的末端亲电基团可分为硼酸肽类、环氧酮肽类、醛基肽类和乙烯基砜肽类^[15],而共价类蛋白酶体抑制剂多为硼酸肽类、环氧酮肽类(图 8)。2003 年上市的 Bortezomib 能在纳摩尔级别抑制蛋白酶体活性,用于治疗多发性骨髓瘤和淋巴瘤,其分子中的硼原子含有一个空的 p 轨道,与蛋白酶体活性中心的 Thr1 羟基形成配位键,共价结合成硼酸酯,对蛋白酶体产生不可逆的抑制作用^[16]。为克服 Bortezomib 的治疗窗窄、耐药性等问题,第二代硼酸肽类蛋白酶体可逆抑制剂 Ixazomib (MLN-9708) 被开发出来,具有比 Bortezomib 更短的蛋白酶体解离半衰期以及更高的活性^[17],2015 年 11 月作为治疗多发性骨髓瘤的药物上市。Carfilzom 是 Proteolix 公司对天然产物 epoxomicin 结构优化后得到的活性更好、选择性更优的双重共价结合蛋白酶体抑制剂,含四肽环氧酮结构,靶蛋白亲核基团与其亲电三元杂环结合发生烷基化,Ser 残基上羟基与酮基加成,形成半缩酮,2012 年获 FDA 批准上市,用于治疗多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤。Oprozomib (ONX-0912) 是为了克服 Carfilzom 不可口服的缺点开发出来的抑制

剂,具有与 Carfilzom 相当的诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡的能力,目前处于 II 期临床试验^[17],2014 因治疗 Waldenstrom 巨球蛋白血症与多发性骨髓瘤而获美国孤儿药资格。Marizomib (NPI-0052) 是具有 β -内酯并 γ -内酰胺环结构的 20S 蛋白酶体抑制剂,目前处于临床 I / II 期试验,用于治疗多发性骨髓瘤^[18]。

3 胰脂肪酶抑制剂

减肥药 Orlistat 由罗氏公司研发,模拟胰脂肪酶底物通过与三酰基甘油脂肪酶发生共价结合而阻止脂肪酸甘油酯的水解,使摄入的脂肪不易吸收,其作用机制是通过体外将其标记¹⁴C 绑定在猪胰酯酶的研究得到的。Orlistat 结构中的四元环 β -内酯具有张力,使酰基具有亲电性,胰酯酶活性中心的催化三元体 Ser162、Asp176 和 His263 之间相互作用,使 Ser162 亲核性提高,其羟基对 Orlistat 的 β -内酯发起亲核进攻,Ser162 残基被酰化(如图 9 所示),使胰酯酶失活^[19]。目前只有 Orlistat 作为共价类药物被 FDA 批准用于治疗肥胖症。

4 DPP-IV 抑制剂

二肽基肽酶 IV (dipeptidyl peptidase IV, DPP-IV) 是一种以二聚体形式存在的高特异性丝氨酸蛋白酶,是治疗 2 型糖尿病的靶点,其抑制剂能延长和提高内源性胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 和糖依赖性胰岛素释放肽 (GIP) 活性,促进胰岛素分

泌,降低血糖。DPP-IV 共价抑制剂通常含有氰基结构,其经典药物 Vildagliptin (图 10) 是通过 NVP-728 进行结构改造得到的具有较高稳定性的 DPP-IV 抑制剂 ($IC_{50} = 35 \text{ nmol/L}$),其中金刚烷基可占据 DPP-IV 的 S1 疏水口袋,质子化的仲氨基与 Glu205、Glu206 和 Tyr662 残基形成盐键和氢键,羰基与 Asn710 残基形成氢键。同时,氰基与临近的

Ser630 残基上羟基发生 Pinner 反应,生成可逆性共价结合的脒酯^[20] (图 11),具有较高的酶抑制活性。Saxagliptin (图 10) 是在 Vildagliptin 结构基础上将环丙基并入氨基吡咯烷结构,增加稳定性和抑制活性 ($IC_{50} = 3.37 \text{ nmol/L}$),人体口服生物利用度可达 75%^[21]。

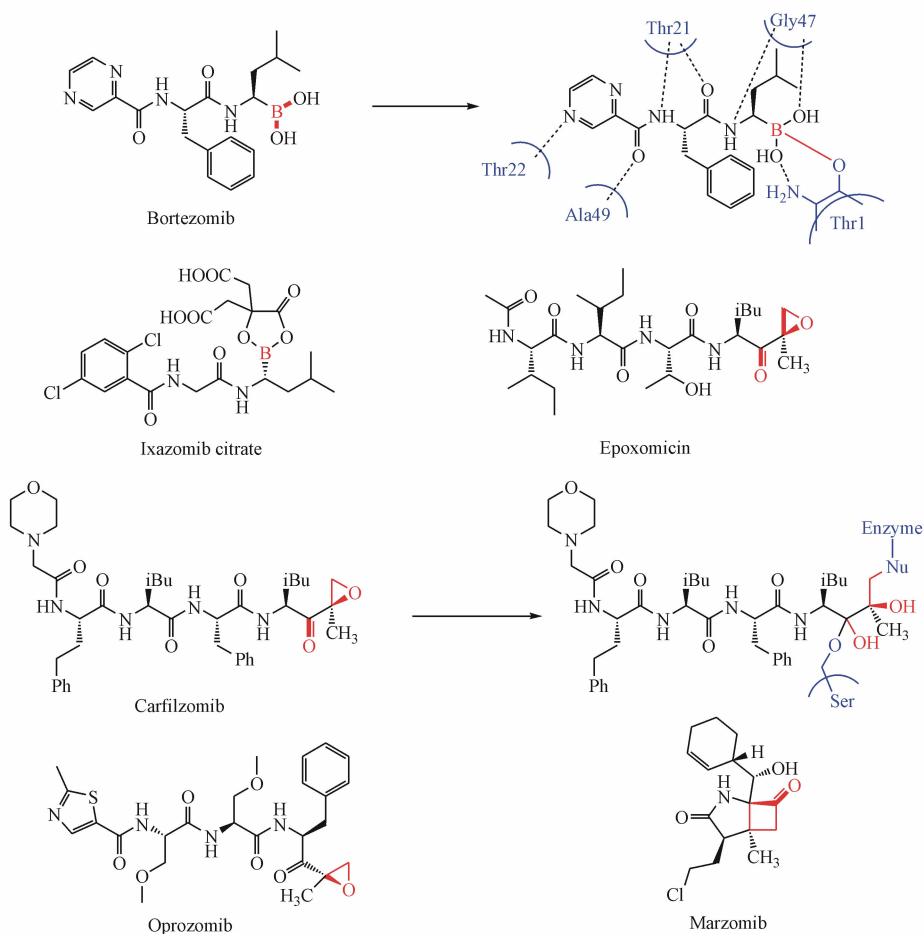


Figure 8 Clinical and launched proteasom inhibitors

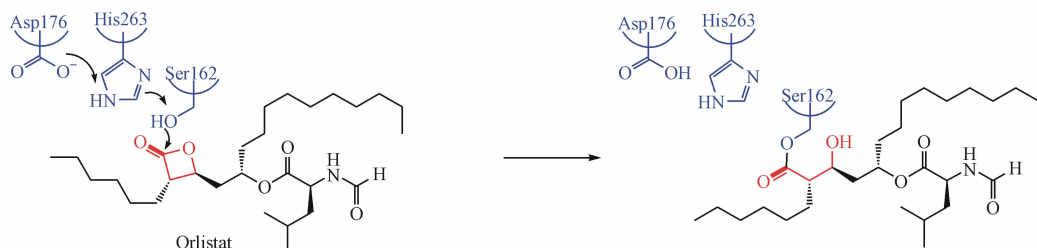


Figure 9 Covalent binding diagram of orlistat to pancreatic lipase

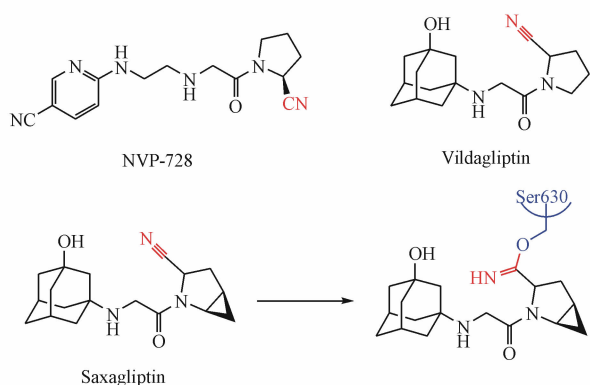


Figure 10 Structures for typical clinical and launched covalent DPP-IV inhibitors

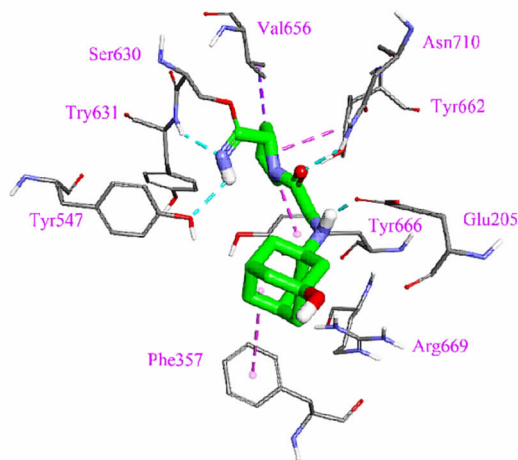


Figure 11 Crystal structure of vildagliptin (PDB ID: 3W2T). Hydrogen bonds are shown as blue broken lines, covalent bond is shown as a red line. Pi-Alkyl is shown as pink lines. Alkyl is shown as purple lines

5 Cat K 抑制剂

组织蛋白酶 K (cathepsin K, Cat K) 属于木瓜蛋白酶家族的半胱氨酸蛋白酶的一种类型, 参与骨胶原降解, 对骨骼重塑和吸收有重要作用。Odanacatib 由默沙东研发, 可与靶酶的 Cys25 部分形成共价键, 与氨基发生 Pinner 反应而可逆共价结合 (图 12), 作为组织蛋白酶 K 的抑制剂在临床 III 期试验中用于治疗绝经后妇女的骨质疏松症^[22]。Odanacatib 能够有效增加骨密度并降低骨折风险, 但不幸的是, 该药同时也增加了房颤和脑卒中风险, 2016 年 9 月默沙东宣布停止其临床开发。

6 作用于 Keap1-Nrf2 通路的药物

Keap1-Nrf2 系统在抵抗氧化应激的细胞防御

中起主要作用。Nrf2 是在细胞应激反应中上调具有细胞保护作用的基因表达的转录因子, 在无应激条件下 Nrf2 与支架蛋白 Keap1 形成复合物, 通过核输出和蛋白水解作用诱导 Nrf2 降解。共价修饰 Keap1 的半胱氨酸蛋白, 将导致 Nrf2 的积累和随后的核易位, 使 Nrf2 诱导超过 100 种保护性基因的转录^[23], 这对诸多疾病如慢性肾脏疾病 (CKD)、慢性阻塞性肺病 (COPD)、哮喘和神经变性疾病等具有重要意义。Sulforaphane (图 13) 是一种天然产物, 含异硫氰酸酯基团, 与 Keap1 的半胱氨酸发生可逆结合生成二硫代氨基甲酸酯, 诱导 Nrf2 通路, 目前处于临床 II 期试验, 用于治疗复发性前列腺癌。富马酸二甲酯 (MMF) (图 13) 是 Nrf2 的激活剂, 能与谷胱甘肽和 *N*-乙酰半胱氨酸结合, 最重要的是其代谢物的单甲延胡索酸酯能与 Keap1 蛋白的 Cys151 可逆共价结合抑制其活性^[24], 于 2013 年被 FDA 批准治疗多发性硬化症。巴多索隆 (CDDO)、甲基巴多索隆 (CDDO-Me) 和 CDDO-Im (图 13) 是齐墩果酸的衍生物, 具有抗炎活性, 其不饱和酮与 Keap1 蛋白的 Cys151 发生迈克尔加成^[25]。CDDO-Me 目前在临床试验中用于治疗慢性肾病, 2015 年因治疗肺动脉高压获美国孤儿药资格。Omaveloxolone (RTA-408, 图 13) 在低浓度下激活 Nrf2, 抑制炎症, 较高浓度下抑制肿瘤细胞生长, 目前处于转移性非小细胞肺癌或黑色素瘤 I 期临床^[26]。TBE-31 是从一系列化合物中筛选得到的三环类化合物, 结构中含有双迈克尔受体, 是目前最有效的 Nrf2 激活剂, 在纳摩尔剂量下诱导 Nrf2 依赖性细胞保护反应, 还能在动物体内保护黄曲霉素诱导的肝癌发生, 其 C 环上的炔基氰二烯酮结构是一个高活性可逆亲电片段, 可用于新型 Nrf2 激活剂的设计^[27]。同样, 通过对 CDDO 结构改造得到 TX63541 和 TX63718 (图 13) 能与 Keap1 蛋白的 Cys151 可逆结合, 剂量依赖性增加 Nrf2 活性, 是有效的抗氧化剂和抗炎化合物, 为 Nrf2 激活剂结构的设计提供了参考^[28]。

7 DPP- I 抑制剂

二肽基肽酶 I (dipeptidyl peptidase I, DPP-I) 是溶酶体半胱氨酸蛋白酶, 是一个治疗慢性阻塞性肺病 (COPD) 的重要靶点, 其共价抑制剂大多含有能与活性位点 Cys234 共价结合的亲电弹头。

葛兰素史克近年研发了第一个含 α, β 不饱和酰胺的不可逆 DPP1 抑制剂 GSK2793660 (图 14)^[29], 但由于副反应和不理想的效果, 该项目被终止。后来

Doyle 等^[29]通过对含酰胺基乙腈结构的化合物结构进行改造, 得到了高效高选择性的 AZD7986 ($\text{pIC}_{50} = 8.4$) (图 14), 目前处于 I 期临床试验。

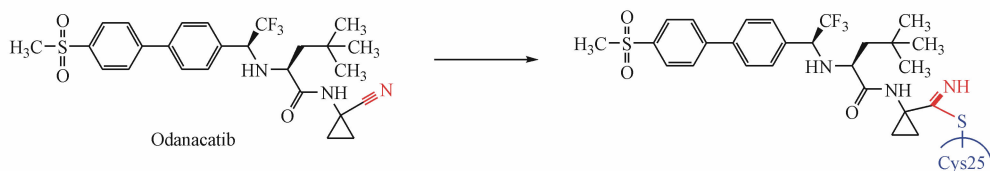


Figure 12 Covalent binding diagram of odanacatib to cathepsin K

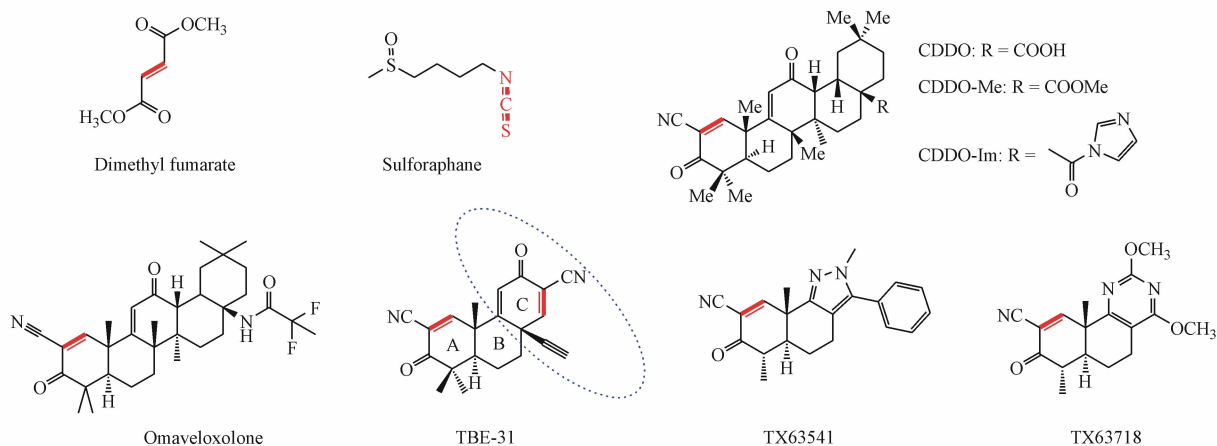


Figure 13 Molecules targeting to Keap1-Nrf2 pathway

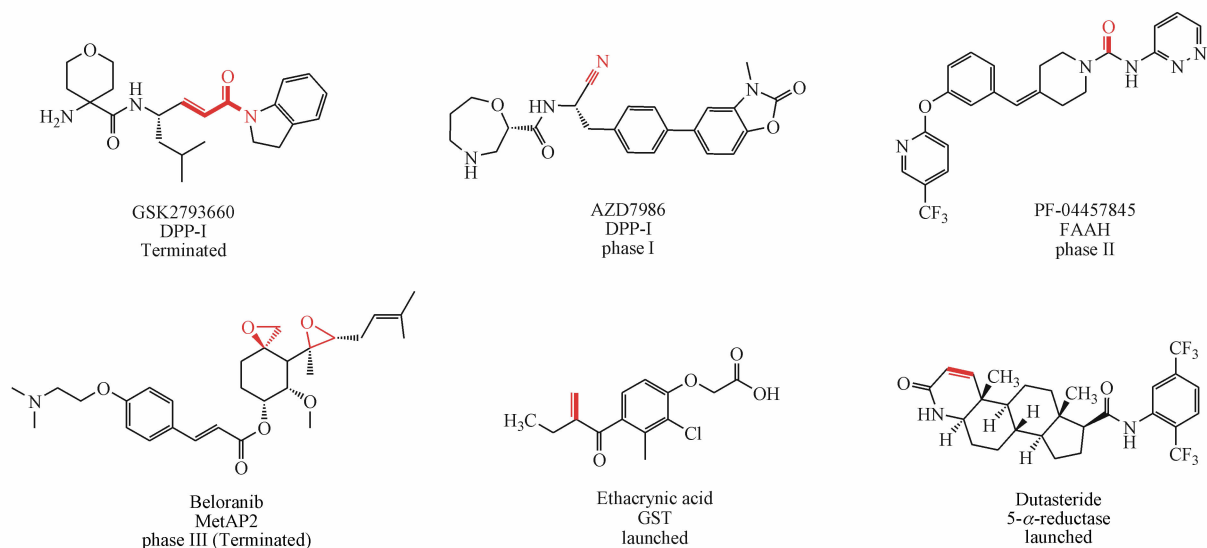


Figure 14 Examples for covalent drugs of different targets

8 FAAH 抑制剂

脂肪酸酰胺水解酶 (fatty acid amide hydrolase, FAAH) 是负责生物活性脂肪酸酰胺水解的内在膜

蛋白, 在疼痛接受和炎症中起作用。PF-04457845 (图 14) 是辉瑞开发的口服可用的 FAAH 共价抑制剂, 与 FAAH 的催化亲核体 Ser241 共价结合形成氨基甲酸酯键, 抑制酶活性^[30], 目前正在临床 II 试

验中用于治疗创伤后应激障碍、慢性疼痛和其他神经系统疾病。

9 MetAP 抑制剂

甲硫氨酸氨肽酶 (methionine aminopeptidase, MetAP) 是一种催化型金属蛋白酶, 催化新生蛋白质氨基末端甲硫氨酸的切割, 在对 MetAP2 抑制剂的研究中发现 MetAP2 可作为减肥药研究的靶点。Zafgen 生物医药公司的产品 Beloranib (图 14) 能够治疗下丘脑损伤造成的肥胖症, 与 MetAP2 活性中心的 His231 结合抑制酶活性^[31], 同时还能消耗体内脂肪维持身体机能, 在 II 期临床中取得较好的实验结果。但是在治疗普拉德-威利综合征的 III 期试验中出现患者死亡事件, 2015 年被终止开发。

10 共价修饰类药物的研究技术

近年来, 共价修饰类药物在一些重大疾病治疗中的优势越来越突显, 在药物设计领域越来越受到重视, 其设计主要有两种策略, 一种是对现存的抑制剂进行基于结构的改造 (structure-based design)^[32], 另一种是建立具有潜在活性的共价抑制剂的化合物库, 与多种靶蛋白进行广泛结合、筛选^[33]。目前, 寻找合适的靶标和其共价结合配体是发现新型共价药物最重要的部分。

药物作用的靶标依赖于对生物系统的充分研究, 可通过扰乱信号通路了解靶标的生物作用及其小分子配体进行确证^[34]。目前, 基于生物化学方法寻找新的靶标及适宜的亲电基团为共价药物的发现提供了一条明朗的途径, 其中 3 个因素至关重要, 即蛋白质中的氨基酸残基信息、质谱分析和亲电化合物库^[35]。Backus 等^[36]用基本的生物系统学方法, 用基于分子片段的配体发现方法 (fragment-based ligand discovery, FBLD) 筛选出人体细胞蛋白质组中可与亲电片段结合的 700 个具有成药性的半胱氨酸残基, 但这种方法局限于需要纯化的蛋白质, 以便观察药物与其特定口袋结合的方式。化学蛋白质组学配合质谱分析可用于识别鉴定细胞内靶标, 用于寻找蛋白激酶抑制剂^[37], Lanning 等^[35]用类似的方法在整个人类蛋白质组来确定两种临床上使用的共价激酶抑制剂的药物 Afatinib 和 Ibrutinib 的蛋白质靶标, 他们发现两个共价药物在细胞内作用于激酶和非激酶类蛋白, 这

是导致它们缺乏特异性的原因。

为了对亲电片段做系统研究, 寻找低脱靶效应高选择性的反应活性基团, Jost 等^[38]将 6 种常用于设计共价抑制剂的亲电基团丙烯酰胺、 α -卤酮类等等和 11 种胺和苯胺骨架类非反应活性部分进行组合, 验证新化合物对 11 种不同来源的酶的选择性和活性。通过 900 次以上的试验测定, 发现丙烯酰胺基和氯乙酰胺 (苯胺) 和 2-氰基乙酰胺和咪唑-1-甲酰胺先通过特异非共价作用识别靶标, 再与靶标共价结合, 表现出低脱靶效应, 可以作为合适的亲电弹头, 其中 3-溴-4,5-二氢异噁唑基部分对抗生素靶标 MurE 有选择性, 可以成为抗生素设计的有用骨架部分 (图 15)。

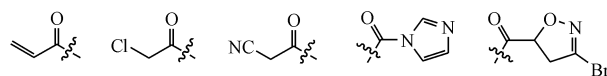


Figure 15 Electrophiles for covalent protein modification

Becker 等^[39]在寻找 3C 蛋白酶不可逆抑制剂实验中, 利用小分子片段绑定生物大分子的原理, 首先用醛-环氧化物作为双亲电体活性片段 1 通过蛋白-模板反应, 将其绑定在蛋白酶 S1 活性口袋的 Cys147 上并进行结构分析实验, 后通过化合物库筛选和分子对接发现活性片段 1 与具有激活作用的结构片段 2 结合在一起后对蛋白的抑制活性更佳。用相同的方法通过化合物库筛选得出结构片段 2 与乙烯基砜结合的化合物 20 对 7 种病毒 3C 蛋白酶有亚微摩尔级别的抑制活性 (图 16)。

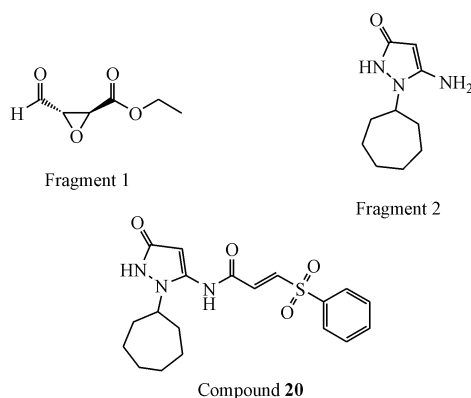


Figure 16 Irreversible inhibitors of the 3C protease through templated assembly of protein-binding fragments

随着化学信息学的广泛应用, 基于共价配体与蛋白靶标之间的虚拟筛选与分子对接作为一种药物发现的新策略也被运用于寻找合适的共价化合

物上^[40]。通过计算机模拟人类蛋白质组结构,与化合物库中的分子进行对接测试。Toledo等^[41]通过基于结构的虚拟筛选(structure-based virtual screening, SBVS)发现 HCV NS3 蛋白酶、Cat K、EGFR 和 XPO1 的共价配体,并利用薛定谔共价对接算法(CovDock)通过迈克尔加成和 α -酮羰基加成等反应预测配体结合的能力,SBVS 为发现新的多样性的共价配体提供了一个快速准确的方法。目前,基于对接的虚拟筛选(docking-based virtual screening, DBVS)也受到越来越多的关注并成功应用于发现与鉴别不同靶标的全新骨架化合物, Schroder等^[42]对人 Cat K 共价配体进行 DBVS,将44个从化合物库筛选的化合物通过高通量筛选,发现1,3,5-三嗪-2-甲腈化合物(CP243522)在体外实验中具有较好的可逆抑制活性($K_i = 21 \text{ nmol/L}$)。除了分子对接技术,针对共价抑制剂与靶点先进行非共价结合再共价结合的两个步骤,基于分子力学和量子力学或分子动力学模拟方法QM/MM的合理共价抑制剂的设计应用证实了乙烯砜结构的共价抑制剂的有效性^[43],表明利用理论方法设计具有理想特性的共价抑制剂是未来发展的趋势。

11 结 语

合理的共价药物的设计需要考虑诸多因素,首先是合适的药物靶标,需要用生物信息学分析靶标活性部位亲核氨基酸,其内部或附近的与靶标功能相关的结合位点,结合位点在蛋白家族中最好有区别,避免药物非特异性作用,以降低毒性。其次是合适的共价配体,不仅要有适当的亲电基团,与靶标结合位点有适当距离与位置,在共价结合过程中还需要适度的反应性,以增加对靶标的选择性作用,其结构可参照靶标内源性配体。在知道抑制剂与靶标共价结合的模式后,基于结构的计算方法也可以用来指导共价配体的设计。随着合理共价药物设计理念结合生物、化学信息学理论的广泛应用,越来越多有效的、低脱靶效应的、不良反应小的共价抑制剂将会被开发出来。

参 考 文 献

- [1] Singh J, Petter RC, Baillie TA, et al. The resurgence of covalent drugs[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, **10**(4): 307–317.
- [2] Bauer RA. Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies[J]. *Drug Discov Today*, 2015, **20**(9): 1061–1073.
- [3] Barf T, Kaptein A. Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks [J]. *J Med Chem*, 2012, **55**(14): 6243–6262.
- [4] Baillie TA. Targeted covalent inhibitors for drug design[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(43): 13408–13421.
- [5] Hossain M, Lasheen DS, Abouzid KA. Covalent EGFR inhibitors: binding mechanisms, synthetic approaches, and clinical profiles [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2016, **349**(8): 573–593.
- [6] Cheng H, Nair SK, Murray BW. Recent progress on third generation covalent EGFR inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, **26**(8): 1861–1868.
- [7] Akinleye A, Chen YM, Mukhi N, et al. Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development [J]. *J Hematol Oncol*, 2013, **6**(1): 1–9.
- [8] Woyach JA, Furman RR, Liu TM, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor Ibrutinib[J]. *New Engl J Med*, 2014, **370**(24): 2286–2294.
- [9] Harrington BK, Gulrajani M, Covey T, et al. ACP-196 is a second generation inhibitor of Bruton tyrosine kinase (BTK) with enhanced target specificity[J]. *Blood*, 2015, **126**(23): 2908.
- [10] Wu J, Liu C, Tsui ST, et al. Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase[J]. *J Hematol Oncol*, 2016, **9**(1): 80.
- [11] Park JK, Byun JY, Park JA, et al. HM71224, a novel Bruton's tyrosine kinase inhibitor, suppresses B cell and monocyte activation and ameliorates arthritis in a mouse model: a potential drug for rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, **18**(1): 1–9.
- [12] Hagel M, Miduturu C, Sheets M, et al. First selective small molecule inhibitor of FGFR4 for the treatment of hepatocellular carcinomas with an activated FGFR4 signaling pathway [J]. *Cancer Discov*, 2015, **5**(4): 424–437.
- [13] Ihle NT, Williams R, Chow S, et al. Molecular pharmacology and antitumor activity of PX-866, a novel inhibitor of phosphoinositide-3-kinase signaling[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, **3**(7): 763–772.
- [14] Zhao Y, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, **11**(7): 385–400.
- [15] Zhang J, Wu P, Hu Y. Clinical and marketed proteasome inhibitors for cancer treatment [J]. *Curr Med Chem*, 2013, **20**(20): 2537–2551.
- [16] Groll M, Berkers CR, Ploegh HL, et al. Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome[J]. *Structure*, 2006, **14**(3): 451–456.
- [17] Accardi F, Toscani D, Bolzoni M, et al. Mechanism of action of Bortezomib and the new proteasome inhibitors on myeloma cells and the bone microenvironment: impact on myeloma-induced alterations of bone remodeling [J]. *Biomed Res Int*, 2015, **2015**(2): 1–13.
- [18] Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target [J]. *Chem*

- Biol, 2012, **19**(1): 99–115.
- [19] Hadvary P, Sidler W, Meister W, *et al.* The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase[J]. *J Biol Chem*, 1991, **266**(4): 2021–2027.
- [20] Nabeno M, Akahoshi F, Kishida H, *et al.* A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, **434**(2): 191–196.
- [21] Fura A, Khanna A, Vyas V, *et al.* Pharmacokinetics of the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor saxagliptin in rats, dogs, and monkeys and clinical projections[J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, **37**(6): 1164–1171.
- [22] Bone HG, Dempster DW, Eisman JA, *et al.* Olanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis: development history and design and participant characteristics of LOFT, the long-term olanacatib fracture trial[J]. *Osteoporos Int*, 2015, **26**(2): 699–712.
- [23] Wilson AJ, Kerns JK, Callahan JF, *et al.* Keap calm, and carry on covalently[J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(19): 7463–7476.
- [24] Linker RA, Lee DH, Ryan S, *et al.* Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway[J]. *Brain*, 2011, **134**(3): 678–692.
- [25] Cleasby A, Yon J, Day PJ, *et al.* Structure of the BTB domain of Keap1 and its interaction with the triterpenoid antagonist CDDO[J]. *PLoS ONE*, 2014, **9**(6): e98896.
- [26] Probst BL, Trevino I, Mccauley L, *et al.* RTA 408, A novel synthetic triterpenoid with broad anticancer and anti-inflammatory activity[J]. *PLoS ONE*, 2015, **10**(4): e0122942.
- [27] Li W, Zheng S, Higgins M, *et al.* New monocyclic, bicyclic, and tricyclic ethynylcyanodienones as activators of the Keap1/Nrf2/ARE pathway and inhibitors of inducible nitric oxide synthase[J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(11): 4738–4748.
- [28] Huerta C, Jiang X, Trevino I, *et al.* Characterization of novel small-molecule NRF2 activators: structural and biochemical validation of stereospecific KEAP1 binding[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2016, **1860**(11): 2537–2552.
- [29] Doyle K, Lönn H, Käck H, *et al.* Discovery of second generation reversible covalent DPP1 inhibitors leading to an oxazepane amidoacetonitrile based clinical candidate (AZD7986)[J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(20): 9457–9472.
- [30] Ahn K, Smith SE, Liimatta MB, *et al.* Mechanistic and pharmacological characterization of PF-04457845: a highly potent and selective fatty acid amide hydrolase inhibitor that reduces inflammatory and noninflammatory pain[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, **338**(1): 114–124.
- [31] Joharapurkar AA, Dhanesha NA, Jain MR. Inhibition of the methionine aminopeptidase 2 enzyme for the treatment of obesity[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2014, **7**: 73–84.
- [32] Butler KV, Ma A, Yu W, *et al.* Structure-based design of a covalent inhibitor of the SET domain-containing protein 8 (SETD8) lysine methyltransferase[J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(21): 9881–9889.
- [33] Zhang Y, Zhang D, Tian H, *et al.* Identification of covalent binding sites targeting cysteines based on computational approaches[J]. *Mol Pharm*, 2016, **13**(9): 3106–3118.
- [34] Schreiber SL, Kotz JD, Li M, *et al.* Advancing biological understanding and therapeutics discovery with small-molecule probes[J]. *Cell*, 2015, **161**(6): 1252–1265.
- [35] Lanning BR, Whitby LR, Dix MM, *et al.* A road map to evaluate the proteome-wide selectivity of covalent kinase inhibitors[J]. *Nat Chem Biol*, 2014, **10**(9): 760–767.
- [36] Backus KM, Correia BE, Lum KM, *et al.* Proteome-wide covalent ligand discovery in native biological systems[J]. *Nature*, 2016, **534**(7608): 570–574.
- [37] Chen YC, Zhang C. A chemoproteomic method for identifying cellular targets of covalent kinase inhibitors[J]. *Genes Cancer*, 2016, **7**(5/6): 148–153.
- [38] Jost C, Nitsche C, Scholz T, *et al.* Promiscuity and selectivity in covalent enzyme inhibition: a systematic study of electrophilic fragments[J]. *J Med Chem*, 2014, **57**(18): 7590–7599.
- [39] Becker D, Kaczmarek Z, Arkona C, *et al.* Irreversible inhibitors of the 3C protease of Coxsackie virus through templated assembly of protein-binding fragments[J]. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12761.
- [40] Kumalo HM, Bhakat S, Soliman ME. Theory and applications of covalent docking in drug discovery: merits and pitfalls[J]. *Molecules*, 2015, **20**(2): 1984–2000.
- [41] Toledo Warshaviak D, Golan G, Borrelli KW, *et al.* Structure-based virtual screening approach for discovery of covalently bound ligands[J]. *J Chem Inf Model*, 2014, **54**(7): 1941–1950.
- [42] Schroder J, Klinger A, Oellien F, *et al.* Docking-based virtual screening of covalently binding ligands: an orthogonal lead discovery approach[J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(4): 1478–1490.
- [43] Schirmeister T, Kesselring J, Jung S, *et al.* Quantum chemical-based protocol for the rational design of covalent inhibitors[J]. *J Am Chem Soc*, 2016, **138**(27): 8332–8335.