

多靶点药物设计策略及其研究进展

周俊廷¹, 蒋学阳¹, 冯 锋^{1*}, 孙昊鹏^{2*}

(中国药科大学 1. 天然药物化学教研室, 2. 药物化学系, 江苏 南京 211198)

摘要: 单靶点药物在治疗多因素疾病如肿瘤、心血管系统和内分泌系统疾病时, 往往难以达到预期效果, 还可能引发毒性。而多靶点药物可以通过调控疾病的多个环节, 提高疗效, 减少不良反应, 并改善耐药性, 呈现出良好的应用前景。本文着重介绍了多靶点药物设计策略 (包括药效团连接法、药效团叠合法和药效团融合法) 及近年来多靶点药物的研究进展, 并对多靶点药物现存的问题与挑战进行讨论, 以为多靶点药物的研究提供新的思路。

关键词: 多靶点药物; 药物设计策略; 药效团; 杂泛性; 肿瘤; 阿尔茨海默病; 心血管疾病

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-2012-14

Multi-target drug design strategy and its research progress

ZHOU Jun-ting¹, JIANG Xue-yang¹, FENG Feng^{1*}, SUN Hao-peng^{2*}

(1. Department of Natural Medicinal Chemistry; 2. Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: Currently, single-target drugs are often difficult to achieve the desired results in the treatment of multifactorial diseases such as tumors, cardiovascular and endocrine diseases, and may also cause toxicity. Multi-target drugs can improve the efficacy, reduce side effect and drug resistance by regulating multiple links of the disease, showing good prospects for the application. The main aim of this article is to review the strategies of designing multi-target directed ligands (MTDLs) (including conjugated-pharmacophore, fused-pharmacophore and merged-pharmacophore) and the research progress in recent years. The existing problems and challenges of multi-target drugs are also discussed, to provide new ideas for the study of multi-target drugs.

Key words: multi-target drugs; drug design strategy; pharmacophore; promiscuity; cancer; Alzheimer's disease; cardiovascular diseases

在过去几十年中, 药物发现的研究大部分集中于设计或寻找作用于单靶点的高选择性的药物分子, 但一些复杂的多病因疾病如恶性肿瘤、心脑血管疾病、中枢神经系统疾病、免疫性疾病等, 具有稳定性, 而且是由复杂的网络和环节调控, 干预其中一个靶点或环节往往不能改变疾病的整体状态^[1]。按照单靶

点药物“一种疾病, 一个靶点, 一种治疗药物”的常规模式, 当疾病的一条通路被抑制时, 机体可能会激活另一条相关途径, 以维持疾病的稳定。因此, 对于复杂病因的疾病, 单靶点药物常常难以干扰疾病完整的网络调控且产生的毒性较大。此外, 针对病毒、细菌和肿瘤细胞的化疗药物, 长期干预单一靶点常常不能达到治愈的目的, 因为外源性生物为保护自身生存以抵御药物的侵袭, 关键性酶会发生变异而产生耐药性, 导致化疗失败^[2]。

2004年Morphy等^[3]为药物发现提供了一种全新的思路: 多靶点药物治疗 (multi-target therapeutics),

收稿日期: 2018-07-24; 修回日期: 2018-09-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872728, 81573281).

*通讯作者 Tel: 13951934235, E-mail: sunhaopeng@163.com;

Tel: 86-25-86185180, E-mail: fengfeng@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0671

从此多靶点药物研究与发展进入了一个新时期。相比于单靶点药物,多靶点药物可以作用于在疾病中具有内在联系的多个靶点,即使其针对单一靶点的活性相比于单靶点药物可能有所降低,但由于多靶点调节所产生的协同作用,使总效应大于单个效应的总和,从而产生更好的疗效和更小的不良反应^[2]。抗精神病药物氯氮平(clozapine, **1**)是一种多靶点药物,曾是世界销量前20名的药物,可以至少对10种神经递质受体产生拮抗作用;非甾体抗炎药阿司匹林(aspirin, **2**),抗白血病药物伊马替尼(imatinib, **3**)都是多靶点药物(图1)。它们都可以对多个靶点平衡调节,充分展现了多靶点药物的优势^[4]。

因此,本文将对多靶点药物的概念、设计策略、近年研究进展几个方面进行综述,并对目前多靶点药物面临的问题与挑战进行讨论。

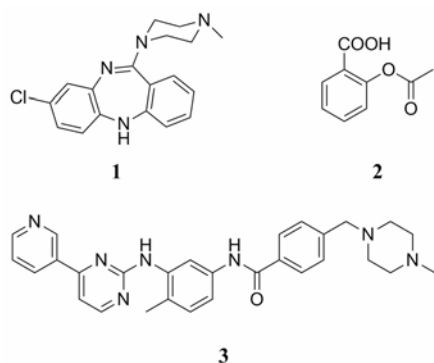


Figure 1 Multi-target drugs in clinical

1 多靶点药物的概念

多靶点药物治疗方式可以分为3类:药物联合应用、多组分药物治疗和真正意义上的多靶点药物治疗(单一成分药物)。本文侧重于讨论多靶点药物的设计策略及其研究进展,因此对于其他两类不再赘述。

多靶点药物(multi-target drug)是指可以同时选择性地作用于两个或多个分子靶点的单一组分的药物^[5]。相比于联合用药和多组分药物,多靶点药物有着明显的优势:由于是单一组分,在药物代谢上优于联合用药和多组分药物;克服了各组分之间因相互作用导致的不良反应;用药方便,不存在组合用药的剂量或比例问题;具有可预测的药效学(pharmacodynamics, PD)和药物代谢动力学(pharmacokinetics, PK)性质;在相同疗效的前提下,由于协同作用可使药物给药剂量降低,从而改善高选择性单靶点药物的不良反应;减缓耐药性的发生。但设计开发一个具有多靶点活性,且具有良好成药性的多靶点药物,从技术层面上难于前两种药物形式^[2]。

2 多靶点药物设计策略

2.1 多靶点药物的靶点组合

多靶点药物的理论基础是确定相关靶点在病理过程中的重要作用,因此,发现并确定靶点的组合是设计双靶点药物的前提条件和重点。合理的靶点组合可以产生协同作用从而达到良好的治疗效果。目前,虽然还没有系统的靶点组合的研究,但仍有许多合理靶点组合的方法可供参考。除了根据配体之间的化学结构相似性进行靶点组合^[6],目前主要有3种靶点组合的方法:临床经验、表型筛选和计算机模拟技术。

2.1.1 基于临床经验的靶点组合 针对多病因疾病,临床上的单靶点药物常常不能达到理想疗效,针对不同靶点的药物联合使用应运而生。然而,不同药物之间PK性质的差异(如药物半衰期、药物分布和药物-药物相互作用)使一些联合用药的应用受到限制。虽然联合用药存在缺陷,但是其疗效的提高可以初步验证这些靶点组合的可行性和安全性。除了对选择多靶点组合的指导作用,药物联合使用的临床经验还可以发掘老药针对新适应症^[7]的作用,即老药新用^[8]。经临床经验验证靶点组合的可行性和安全性后,可以再对结构上具有相似性的药物(或活性分子)进行药效团拼接或融合,设计新颖的多靶点药物。

例如,临床上第一代用于治疗精神病的药物是一种多巴胺D₂样受体抑制剂,但其经常伴随着椎体外系不良反应。随后,经临床用药发现,当其与5-HT_{2A}抑制剂联用时,患者的不良反应将大大减轻^[9]。据此,具有降低不良反应并增强疗效的抗精神病类药物被研发问世,如阿立哌唑和卡利拉嗪^[10]。

2.1.2 基于表型筛选的靶点组合 除了临床经验,还可以通过化学探针或已确证的高选择性配体来筛选具有协同作用的靶点组合。但是,采用动物模型进行靶点组合筛选是很不方便的,因为随着测试化合物或靶点数量的增多,所需要的实验动物数量将呈指数型增加,这并不符合动物伦理学。此时,对多靶点中与探针结合的靶点进行基因敲除或沉默,可以有效减少用于表型筛选的动物数量^[11],而且可以避免由于化学探针在体内不合适的PK性质导致的假阴性的实验结果。

例如,近期122名患有血液恶性肿瘤的患者参与48种药物的组合使用,结果发现B细胞淋巴瘤抑制剂维奈托克和丝裂原活化蛋白激酶抑制剂考比替尼具有协同作用,随后,通过CRISPR/Cas9基因沉默和相应体内实验证明了该靶点组合的可行性。

此外, 细胞、组织或非哺乳动物模型都是进行靶点组合表型筛选的不错选择。器官模型 (如斑马鱼或果蝇模型) 可以用于复杂的高通量表型筛选^[12]。例如, Sonoshita 等^[13]采用果蝇甲状腺髓样瘤模型筛选出了具有良好疗效和安全性的多靶点激酶抑制剂 sorafenib。

2.1.3 基于计算机虚拟筛选的靶点组合 计算机虚拟筛选也是一种验证靶点组合的有效方式。其中, 基于系统生物学理论, 对生物系统网络进行分析的网络药理学已成功应用于多靶点分子的设计。例如, 通过机器学习分析多靶点之间的信号通路^[14], 从而筛选出可能具有协同作用的靶点组合, 是其中一种最常用的手段。显然, 计算机虚拟筛选技术只能提供靶点组合的一种假设, 后续还需要体内外的实验去验证该假设的有效性和安全性。因此, 体内外实验和计算机虚拟筛选技术结合可作为筛选具有协同作用的靶点组合的有效方式。

此外, 在选择靶点组合时还有以下几点注意事项: ① 如果靶点之间关系相近, 其药效团具有相似特征的可能性更大, 更易进行药效团融合, 提高成药性。一般来说, 对于差异较大的靶点, 基于此设计的多靶点化合物分子尺寸越大, 药代动力学性质也更差, 成药性相对前者较小。此外, 组织分布相同或区域相近的靶点更易发挥协同作用。因此, 在选择靶点时, 应尽量选择关系相近且组织分布相近的靶点, 例如具有同一内源性配体, 或属于同一家族, 或互为亚型, 根据它们的药效团的相似特征进行融合, 从而简化结构。如果靶点间差异较大, 也应尽量发掘共享部分, 如利用结构生物学数据和分子模拟技术, 从微观上找到靶点的相似性, 对药效团进行融合, 或者根据配体之间的结构相似性进行药效团融合。例如, Bertinaria 等^[15]报道了一种具有环氧酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 抑制和血栓素受体拮抗的双功能配体, 虽然两个靶点之间差异较大, 但它们相应的两个配体结构之间具有相似性, 说明两个靶点的结合位点也具有一定程度相似性, 可能会容纳同一配体。② 与目标靶点密切相关的其他靶点数目不宜过多, 否则易出现较难解决的选择性问题^[3]。③ 结合于同一叠合型 (或融合型) 配体的两个 (或多个) 目标靶点之间, 应具有相近的空腔几何性质和电性分布^[16], 否则一个分子骨架难以满足对多个靶点空腔的同时结合。

2.2 多靶点先导物的发现和优化

研发多靶点药物的过程与创制单靶点药物没有区别, 都包括先导物的发现和优化两个阶段^[17]。先导

物的发现可以是基于分析临床上应用的药物或活性化合物的结构, 通过经典的药物化学原理或分子模拟, 设计出新的分子; 也可以通过对化合物库的筛选或目标库的活性评价, 获得苗头化合物或先导物。获得的苗头物或先导物可能存在 3 种情况 (以双靶点化合物为例): ① 得到的化合物 P 对靶点 A 和 B 都有选择性活性, 但活性强度有差异; ② 化合物 P 除了对靶点 A 和 B 有活性外, 还对不希望产生影响的靶点 C 有作用; ③ 得到两个化合物 P₁ 和 P₂, 分别对两个靶点 A 和 B 有选择性作用。

对于以上 3 种情况, 采取的设计优化方案有所不同。对于①中的情况, 在优化过程中要平衡化合物 P 对靶点 A 和 B 的活性强度, 避免活性差别太大出现在治疗中顾此失彼的情况。对于情况②, 需要通过去除一些多余的原子或基团, 来消除分子 P 对不期望的靶点 C 的活性, 只保留对目标靶点的活性。杂泛性 (promiscuity) 是由 Hopkins 等^[18]提出的一个概念。药物分子的杂泛性是指一个药物分子可以与多个不同结构或不同功能的靶点相结合, 从而引发多种生物物理或者生物化学过程。在此情况中, 需要对多靶点药物的杂泛性进行平衡。过低的杂泛性使药物分子仅具有单一选择性, 不能作用于多靶点; 过高的杂泛性会导致药物分子产生“脱靶”的现象, 引起药物的不良反应。该策略可通过分析化合物 P 与各靶点结合的 X-射线单晶衍射数据, 从而去除化合物 P 与非目标靶点 C 的结合, 只保留对目标靶点的活性, 从而避免“脱靶”效应 (off-target), 使不良反应最低, 同时发挥协同作用, 达到最佳治疗效果。对于情况③, 可以通过分析 P₁ 和 P₂ 药效团中的相似性, 采用药效团连接、叠合或融合的方式形成新分子 P。基于药效团 (pharmacophore) 的多靶点药物设计, 是指根据选择性配体 (selective ligands) 在结构上的相似特征, 将两个或多个配体的药效团进行整合, 从而得到可同时作用于两个或多个靶点的单一配体。根据药效团之间整合程度的差异, 可以将此类药物设计方法分为 3 种: 药效团连接法、药效团叠合法和药效团融合法 (图 2)。

2.2.1 药效团连接法 (conjugated-pharmacophore)

以双靶点药物设计为例, 如果化合物 P₁ 和 P₂ 的结构中, 没有相似的药效团特征, 则可以通过不同长度或类型的连接基将 P₁ 和 P₂ 连接起来, 得到一个基本上同时保留了原来分子中全部药效结构的新分子 P。但新分子 P 由于分子量加大, 其中部分原子多余存在, 导致配体效率降低, 从而影响化合物的理化性质和

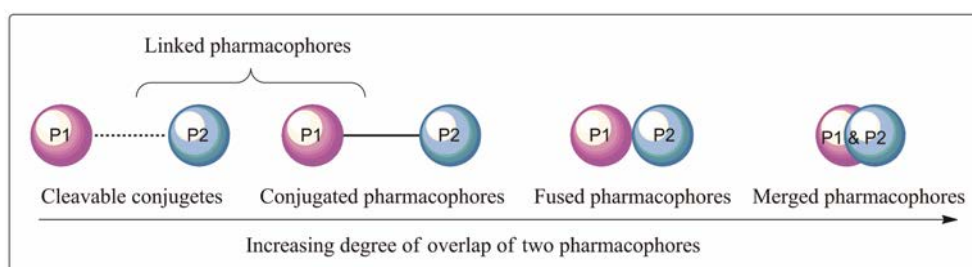


Figure 2 Multi-target drug design strategy based on pharmacophore

药代动力学性质。而且, 连接链可能会影响配体和靶点的结合。目前, 有研究报道药效团连接法可用于靶向药物, 连接链一端连着靶向药物, 一端连着活性分子, 靶向药物将活性分子传递到目标靶点从而发挥疗效。

采用药效团连接法设计的化合物, 又可分为可裂解型分子和非裂解型分子。

可裂解型分子 可裂解型分子的连接基团可以被化学或代谢途径裂解, 分子可以在体内分解成独立的配体分子, 分别作用于相应的靶点。

化合物 **6** 是 Peperidou 等^[19]于 2014 年报道的同时具有抑制脂氧合酶和止痛活性, 可用于外周神经损伤的双靶点化合物, 是由肉桂酸衍生物 **4**^[20]与解热镇痛药对乙酰氨基酚 **5**^[21]通过药效团连接得到 (图 3)。

非裂解型分子 如果连接基是稳定的不可裂解的片段, 那么化合物 **P** 在体内是一整体分子, 可以与两个靶点分别识别并结合。这种情况下, 连接基的长度和理化性质对新分子 **P** 的成药性影响很大, 因为它

决定了化合物的理化性质以及与靶点结合适配程度。化合物 **9** 是 Sadek 等^[22]报道的一种组胺 H_1 和 H_2 的双重拮抗剂, 他们将美吡拉敏 (mepyramine^[23], **7**) 和不同类型的 H_2 受体拮抗剂 (如 roxatidine^[24], **8**) 采用药效团连接法用不同长度碳链连接, 同时在连接链中引入氰胍基 (一种在 H_2 受体拮抗剂中常见的基团), 得到了最优化合物 **9**, 其与 H_1 和 H_2 受体的亲和力相比于原配体都有所提高 (图 4)。

2.2.2 药效团叠合法 (fused-pharmacophore) 如果选择性配体在结构上具有相似性, 例如相同的电荷、芳环或疏水中心, 则可以采用药效团叠合法, 将药效团相互叠合, 得到兼有两个或多个药效团的新分子。药效团叠合的位置通常选择在配体和靶点结合的非关键结合位点处, 不影响原本的药效团与各自靶点的识别与结合。与连接型分子相比, 叠合型分子具有更高的配体效率。化合物 **12**^[25]是去甲氧基姜黄素 **10**^[26]和褪黑素 **11**^[27]经药效团叠合而成, 同时具有神经保护作用 and 抗氧化活性的双靶点分子 (图 5)。

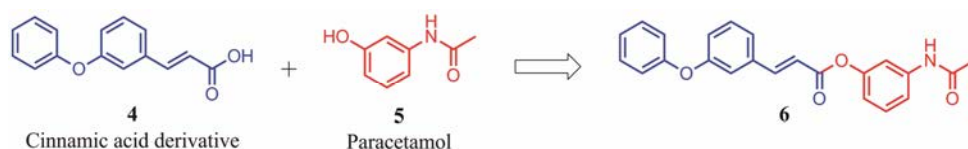


Figure 3 Representative structures of cleavable linker

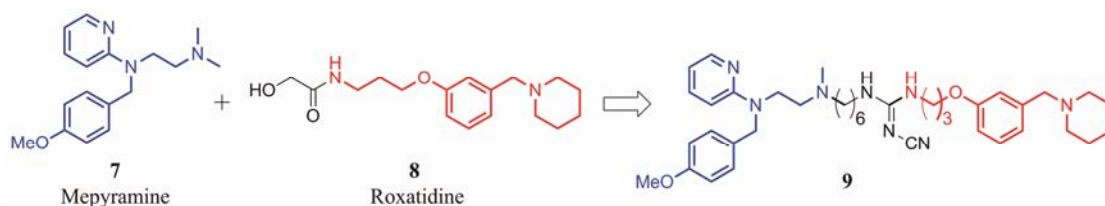


Figure 4 Representative structures of conjugated linker

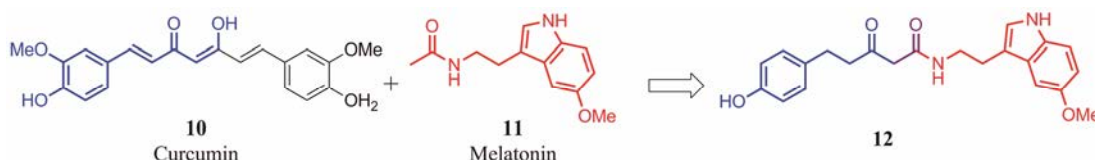


Figure 5 Representative structures of fused-pharmacophore

2.2.3 药效团融合法 (merged-pharmacophore) 根据选择性配体结构中的相似特征, 可以将两个或多个配体中的药效团融合在一个分子中, 得到同时对两个或多个靶点都具有活性的高度整合的分子。这种方法要求原配体在结构上具有高度的相似性, 融合得到的分子具有分子量小、配体效率高、理化性质好的优点。化合物 **13** 是 Sheng 等^[28]于 2015 年报道的具有 H₃ 受体拮抗、A β 聚集抑制和金属离子螯合作用的多靶点分子 (图 6)。他们将 3 个具有不同活性的化合物的药效团进行融合, 得到的化合物 **13** 展现出多重抗 AD 活性。

上述 3 种基于药效团的多靶点药物设计方法各有其优点和缺点。对于连接型分子, 其最大的优点就是简单易行, 仅通过连接链将药效团拼接, 从而几乎完全保留了原配体的药效团, 分子对靶点的活性可以较好地保留; 但连接法也有明显的缺点, 其设计出的多靶点分子往往体积和分子量过大, 配体效率相对于原配体降低, 使其性质偏离“Lipinski 类药五原则”。对于叠合型和融合型分子, 其最大的优点在于通过融合药效团, 去除了不必要的片段, 节约了原子, 克服了上述问题, 使药物配体效率、物理性质和药物代谢动力学性质都有所提高; 然而, 其缺点在于, 要使融合分子同时保留对多个靶点的活性, 从技术层面上难于连接法。仅有小部分的融合分子能对多靶点保持活性和平衡^[17]。

3 多靶点药物研究进展

3.1 多靶点肿瘤药物

目前, 虽然肿瘤的治疗手段已取得了一定疗效,

但仍缺乏有效的可以治愈的药物^[29]。肿瘤的发生发展、转移都是多因素的, 单靶点药物往往疗效不佳且易导致耐药, 而多靶点抗肿瘤药物可以同时阻断多条肿瘤细胞增殖转移通路, 具有很大的应用前景。

3.1.1 靶向表皮生长因子受体和 Src 激酶 在多种恶性肿瘤中, Src 非受体酪氨酸激酶表达量提高并激活, 从而影响癌症的发生发展^[30]。研究表明, EGFR 抑制剂与 Src 激酶抑制剂联合应用可以发挥协同作用, 这促进了 EGFR 和 Src 激酶双靶点抑制剂的研究^[31]。通过分析 Src 抑制剂 **14**^[32]和 EGFR 抑制剂 **15**^[33]与蛋白的 X-射线单晶衍射结合模式, Barchéath 等^[34]采用药效团连接法, 将 EGFR 抑制剂 **15** 喹唑啉的 6 位和 Src 抑制剂 **14** 吡唑并嘧啶环的 9 位相连, 优化得到双靶点抑制剂 **16**, 其 EGFR 抑制活性 IC₅₀ = 0.32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Src 激酶抑制活性 IC₅₀ = 2.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 7)。该研究报道了不同类型 (如刚性、疏水性、长度) 的连接链并讨论其对活性和理化性质的影响, 这对采用药效团连接法设计多靶点化合物具有较大的参考价值。

3.1.2 靶向受体酪氨酸激酶和微管 激活受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 可将胞外信号传导入核从而引发肿瘤细胞血管新生, 但 RTK 抑制剂往往不具有细胞毒或仅具有细胞抑制活性^[35]。微管聚集抑制剂是一类常见的细胞毒抗肿瘤药物。临床用药表明该两种药物联用对治疗肿瘤有较好疗效^[36]。Zhang 等^[37]采用药效团融合法, 设计了一种新型 RTK、微管聚集双靶点抑制剂 (图 8)。他们将 RTK 抑制剂 **18**^[38]的 5 位取代基去除, 在 4 位引入微管聚集抑制剂 **17**^[39]的活性药效团。优选化合物 **19** 表现出

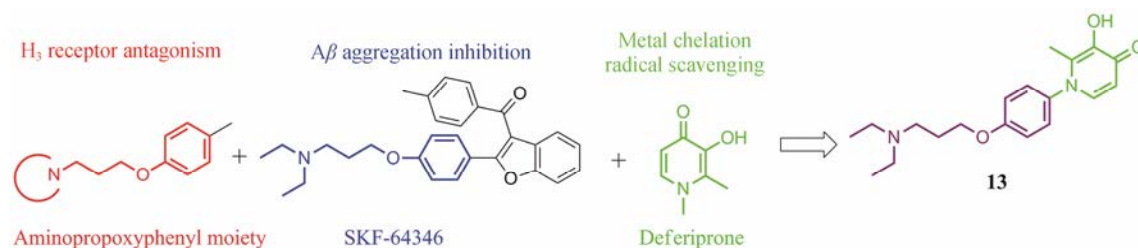


Figure 6 Representative structures of merged-pharmacophore

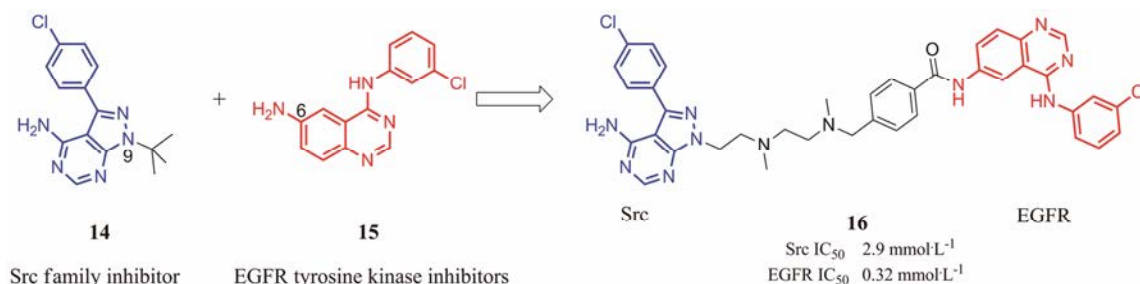


Figure 7 Design of multi-targeted agents targeting EGFR and Src kinase

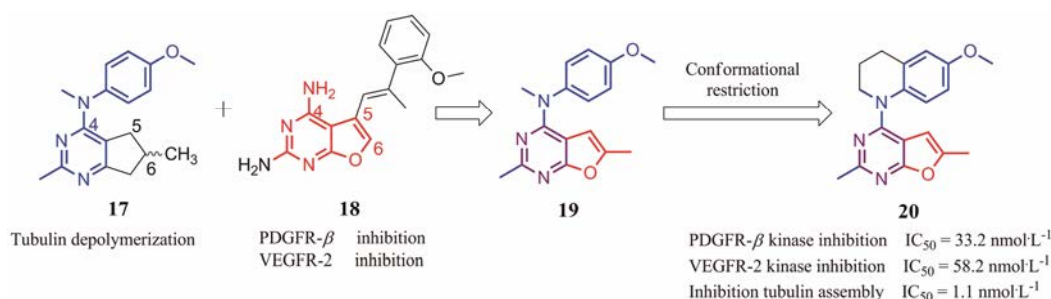


Figure 8 Design of multi-targeted agents targeting antitubulin and receptor tyrosine kinase

抑制血管新生能力 ($EC_{50}=3.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 2 倍弱于舒尼替尼 (sunitinib), 9 倍强于埃罗替尼 (erlotinib)。他们之后对 **19** 的 4 位 *N*-甲基进行构象固定。得到化合物 **20** 表现出更好的微管解聚和 RTK 抑制活性, 其 IC_{50} 均为纳摩尔水平。

3.1.3 靶向雌激素受体 α 和血管内皮生长因子受体 2
 雌激素受体 α (estrogen receptor α , $ER\alpha$) 在超过 70% 的乳腺癌患者体内过度表达, 对肿瘤细胞的增殖迁移发挥重要作用^[40]。血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) 是 RTK 家族成员, 在 VEGF/VEGFR 肿瘤血管新生通路中发挥重要作用。研究发现, Tamoxifen (一种雌激素抑制剂) 和低剂量的 VEGFR-2 抑制剂联合使用, 可以改善乳腺癌的疗效^[41]。Tang 等^[42]通过药效团连接法, 设计了新型 VEGFR-2、 $ER\alpha$ 双靶点抑制剂 (图 9)。他们将 VEGFR-2 抑制剂 (**22**^[43]和 **23**) 中的活性药效团引入 $ER\alpha$ 抑制剂 **21**^[44]中。化合物 **24** 表现出对 $ER\alpha$ 和 VEGFR-2 双重抑制活性, IC_{50} 分别为 $1.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[45]。后期, 经结构改造他们得到了新系列 6-芳基-茚并异喹啉酮衍生物。 **25** 结构

中包含两个羟基, 模拟雌激素与 $ER\alpha$ 形成两个氢键结合, 表现出对 $ER\alpha$ 和 VEGFR-2 双重抑制 (分别为 $IC_{50}=7.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $IC_{50}=0.099 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

3.1.4 靶向组蛋白去乙酰化酶和人表皮生长因子受体
 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 抑制剂可以阻断组蛋白或非组蛋白脱乙酰化, 阻断肿瘤细胞周期并引起细胞凋亡^[46]。人表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor, HER) 是 RTK 家族成员, 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR 或 HER1) 是 HER 中一种细胞受体。Erlotinib 和 gefitinib 是经 FDA 批准的 EGFR 抑制剂, 临床用药发现, 单独使用此类药物会导致耐药性^[47]。为了克服耐药性问题, Cai 等^[48]进行了多种联合用药尝试。他们发现人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、EGFR 双重抑制剂和 HDAC 联用, 可以发挥协同抗肿瘤作用, 并有效延缓耐药性的发生。作者采用药效团连接法, 设计了多靶点 HDAC、EGFR 和 HER2 多靶点抑制剂 (图 10)。他们将 HDAC 抑制剂 **26**^[49]与 EGFR 抑制剂 **27**^[50]的药效团连接。在体外测试中, **28**

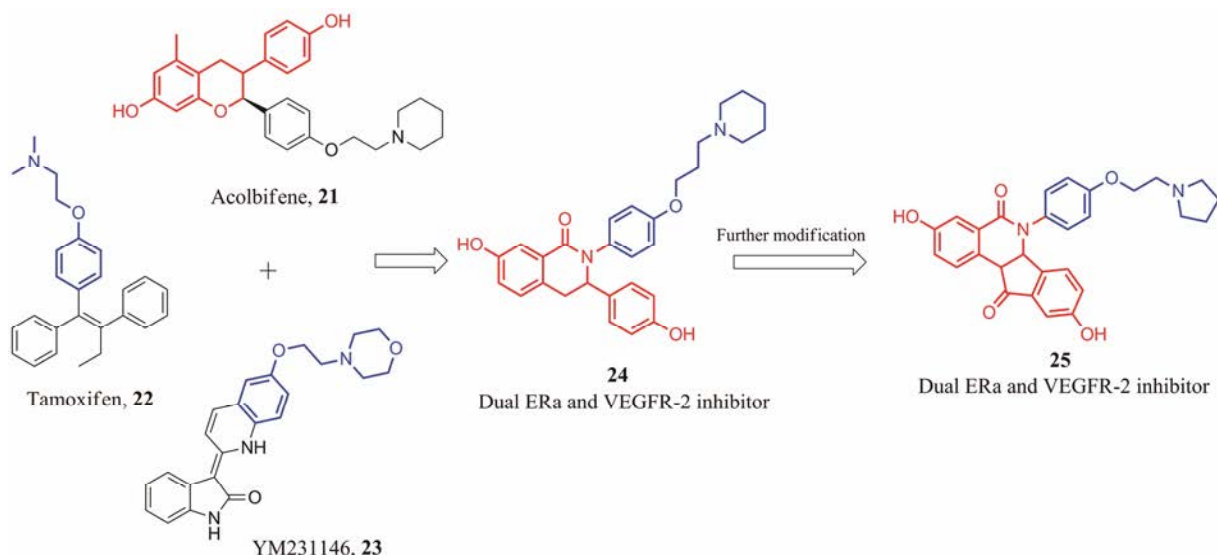


Figure 9 Design of multi-targeted agents targeting anti-estrogens and VEGFR-2

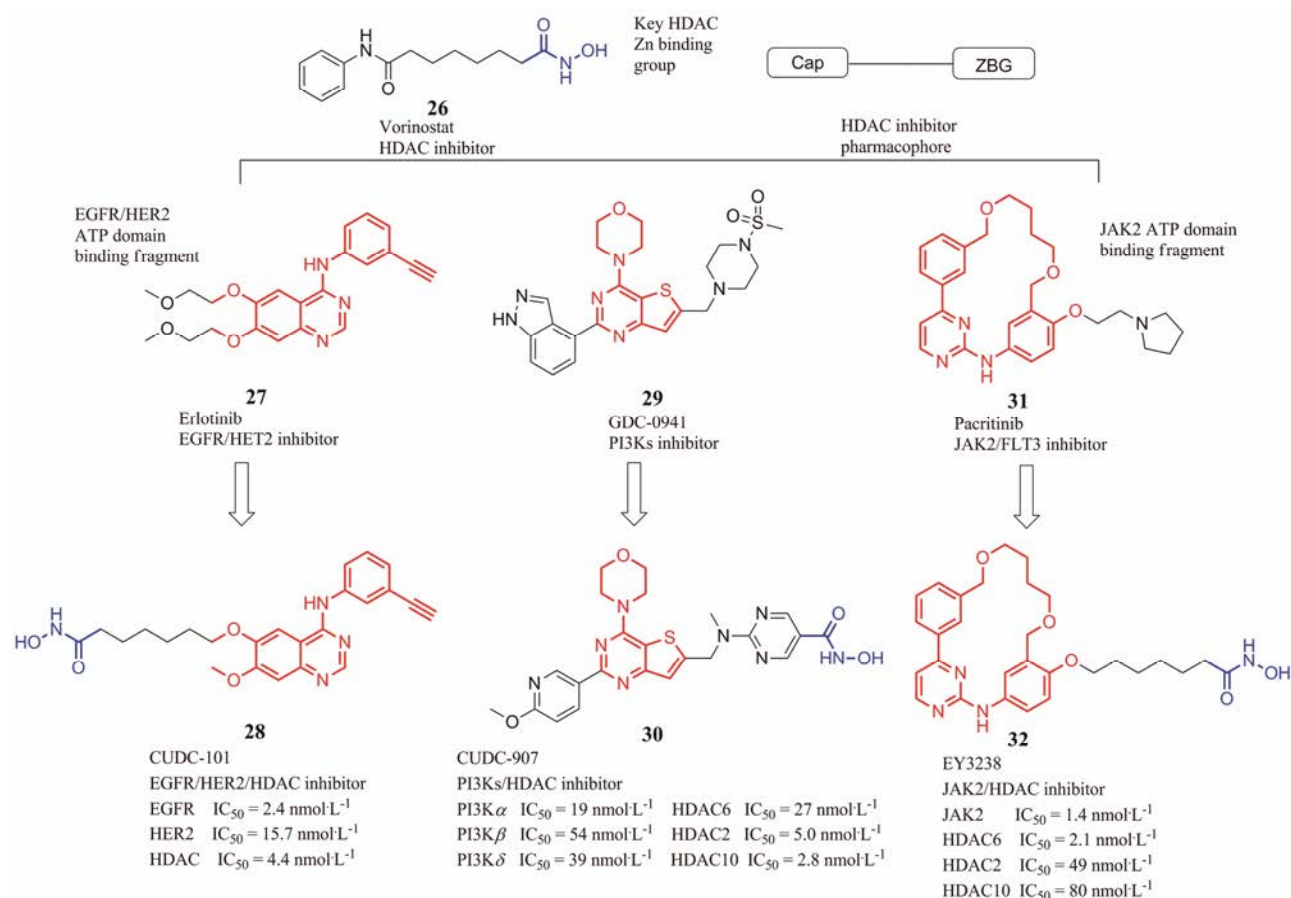


Figure 10 Design of multi-targeted agents targeting anti-estrogens and VEGFR-2

表现出对 HDAC、EGFR 和 HER2 较好的抑制活性， IC_{50} 分别为 4.4、2.4 和 $15.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。目前，化合物 **28** 已进入临床研究阶段。临床 I b 期试验证明了其安全性和有效性，及在肿瘤患者静脉注射给药时良好的药代动力学性质。

2012 年，同一课题组报道了另一个多靶点分子 **30**^[51]。他们通过抑制剂 **26** 与化合物 GDC-0941^[51] 骨架进行叠合，设计了磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3Ks)、HDAC 双靶点抑制剂。**30** 对 HDAC 的抑制活性与帕比司他相近，优于伏立诺他。同时，**30** 对 PI3K α 、PI3K β 、PI3K δ 抑制的 IC_{50} 分别为 19、54 和 $39 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。临床 I 期试验证明了其安全性、耐受性及在淋巴瘤、多发性骨髓瘤患者体内良好的 PK 性质^[52]。2016 年，Yang 等^[53] 采用药效团连接法，将 **26** 与 pacritinib (**31**) 相连，设计了 Janus kinase 2 (JAK2) 和 HDAC 双靶点抑制剂^[54]。他们对链长及锌离子结合区进行了构效关系讨论。化合物 **32** 对 JAK2 和 HDACs 表现出较好的抑制活性，其对 HDAC6、2 和 10 的 IC_{50} 分别为 2.1、49 和 $80 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时，在激酶选择性测试中，**32** 表现出对 JAK2 较好

的选择性 (>50 倍)。

3.2 多靶点阿尔茨海默病药物

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种典型的多因素疾病，其发病机制涉及多系统结构和功能的异常^[55]。因此，单靶点药物常常效果不佳，研究人员因此转变研究理念，设计开发多靶点药物，使一个药物与多个靶点特异结合，以保证临床有效性的同时降低毒性。

3.2.1 靶向 β -分泌酶和金属离子螯合 针对 A β 学说，淀粉蛋白前 β -分解酶 1 (β -amyloid precursor protein 1, BACE1) 与 γ 分泌酶能促进 β 淀粉样肽 (β -amyloid protein, A β) 分泌酶到细胞外。因此，抑制 BACE1 可以减少 A β 的产生。氧化应激可导致神经元损伤并释放出金属离子，金属离子可以进一步与 A β 作用，产生神经损害的过氧化氢^[56]。Huang 等^[57] 采用药效团叠合法，设计了 BACE1 和金属螯合双靶点抑制剂。他们将金属离子螯合剂 **33** 与 BACE1 抑制剂 **34**^[58] 进行药效团叠合 (图 11)。通过对 R₁ 和 R₂ 取代基的结构修饰，最优化合物 **35** 对 BACE1 抑制的 IC_{50} 为 $27.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，同时保留了较好的金属离子螯合能力。

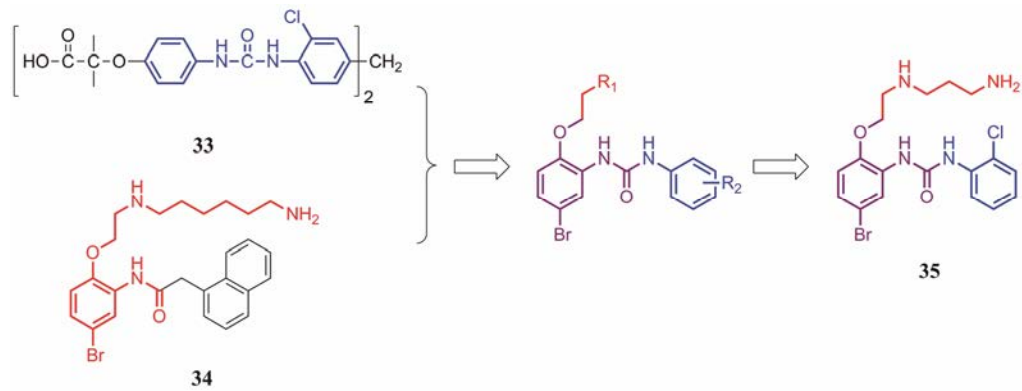


Figure 11 Design of multi-targeted agents targeting BACE1 and metal chelation

3.2.2 靶向胆碱酯酶和其他靶点 AD 患者基底前脑区的胆碱能神经元丢失, 导致胆碱的合成、储存、释放和摄取减少, 进而导致痴呆症状。基于胆碱能学说, 可以通过抑制负责降解神经递质的胆碱酯酶 (cholinesterase, ChE) 的活性来改善胆碱能功能, 使突触间隙神经递质浓度增加, 胆碱能传递增强。目前, 已有 4 个美国 FDA 批准的乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 抑制剂: 他克林 (tacrine, **36**)、加兰他敏 (galantamine)、多奈哌齐 (donepezil) 和利斯的明 (rivastigmine)。其中, 他克林因其严重的肝毒性, 临床上现已停用。目前, 针对改善他克林肝毒性, 并基于他克林母核设计开发双靶点抗 AD 药物的研

究十分热门。

临床病理研究发现, AD 患者的痴呆程度与脑组织中神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT) 数量呈正相关, NFT 的主要成分是过度磷酸化的 Tau 蛋白。糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β) 是 Tau 蛋白磷酸化过程中的限速酶, GSK-3 β 的上调会使 Tau 蛋白磷酸化的程度加深^[59]。2018 年, 本课题组通过药效团连接法, 设计了新型 GSK-3 β /AChE 双靶点抑制剂 (图 12)。通过分析 **37**^[60] 与 GSK-3 β 蛋白的共晶模式, 寻找结合位点的溶剂暴露区 (噻唑环上的酰胺键和酯键区域), 以此区域作为连接链的接入位点。同时, 对他克林片段进行结构

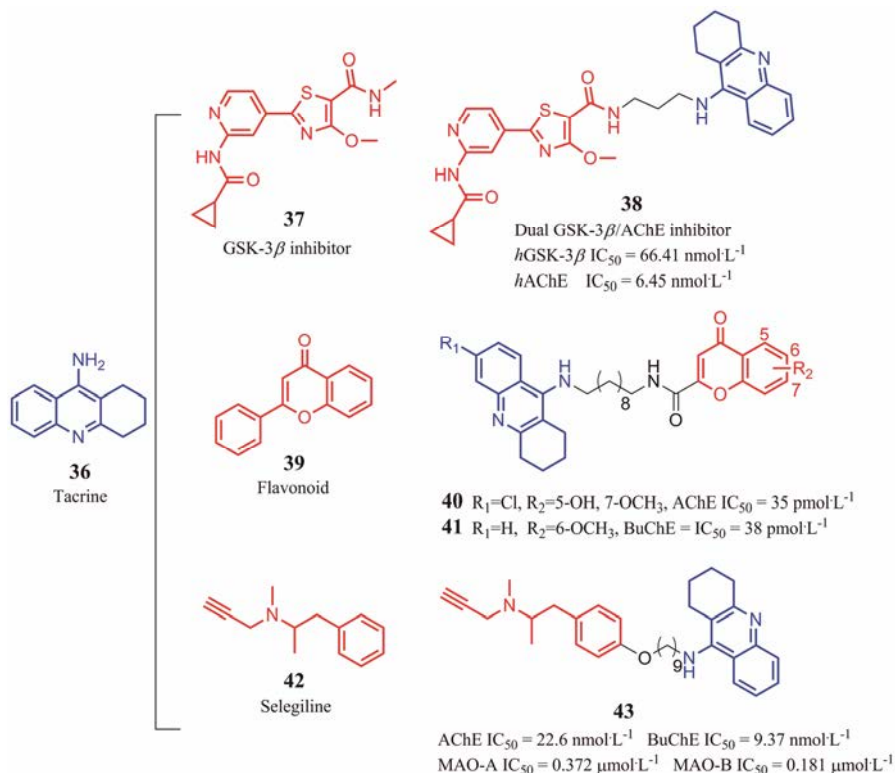


Figure 12 Design of multi-targeted agents targeting ChE and other targets

修饰, 并优化链长。优选化合物 **38** 能够同时抑制 AChE 和 GSK-3 β , IC₅₀ 分别为 6.45 和 66.41 nmol·L⁻¹。体内实验证明, **38** 能够明显改善 AD 模型小鼠的认知障碍, 而且对他克林的肝毒性有一定改善^[61]。

2012 年, Fernandez-Bachiller 等^[62]采用药效团连接法, 设计了他克林-4-氧-4H-苯并吡喃类双靶点化合物 (图 12), 具有 ChE 和 A β 双重抑制活性。研究发现, 黄酮类化合物 **39**^[63]可以通过抑制 BACE-1 来减少 A β 生成。他们将苯并吡喃片段和他克林片段用酰胺键连接, 引入不同取代基, 改变链长。化合物 **40** 具有最优的 AChE 抑制活性 (IC₅₀=35 pmol·L⁻¹), 化合物 **41** 具有最优的 BuChE 抑制活性 (IC₅₀=38 pmol·L⁻¹), 远高于原配体他克林的 ChE 抑制活性。

2013 年, Lu 等^[64]报道了 AChE 和单胺氧化酶 (mono amine oxidase, MAO) 的双靶点抑制剂 (图 12)。司来吉兰 (selegiline^[65], **42**) 是一种 MAO-B 选择性抑制剂。通过药效团连接法, 采用烷基链将他克林片段和司来吉兰片段相连, 对他克林片段引入卤素原子进行结构修饰, 并改变链长, 进行了构效关系研究。当链长为 9, 他克林片段无取代时, 化合物 **43** 展现出平衡的 AChE、BuChE、MAO-A、MAO-B 活性, 其 IC₅₀ 分别为 22.6 nmol·L⁻¹、9.37 nmol·L⁻¹、0.372 4 μ mol·L⁻¹ 和 0.181 0 μ mol·L⁻¹。

3.3 多靶点心血管疾病药物

心血管疾病是导致人类死亡的最主要原因之一。其发病原因十分复杂。近年来, 多靶向药物在心血管疾病防治方面也开展了诸多研究。

3.3.1 靶向血管紧张素和内皮素 以肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 为靶向的抗高血压药物主要有血管紧张素 II (angiotensin 2, AT₂) 受体拮抗剂、血管紧张素转化酶抑制剂 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI) 和肾素拮抗剂 3 种。内皮素受体拮抗剂也是治疗心血管疾病的常用药物。内皮素受体 ET_A 和 ET_B 都属于 G-蛋白偶联受

体家族, ET_A 主要调节血管收缩; ET_B 受体通过促进释放 NO 调节短暂的舒张作用。研究表明, 当同时阻断 AT₁ 和 ET_A 受体时, 产生的降血压效果优于 AT₁ 或 ET_A 单独治疗效果^[66]。Murugesan 等^[67]将一种已知的 ET_A 拮抗剂 **44** 和临床上使用的 AT₁ 受体拮抗剂 (irbesartan, **45**), 通过药效团融合法设计了具有同时拮抗 AT₁ 和 ET_A 的双靶点分子 (图 13)。为了改善代谢稳定性, 他们将 5-异恶唑改变为 3-异恶唑。体内实验发现, 化合物 **46** 能有效降低血压, 相对于化合物 **44** 和 **45**, 其药物半衰期更长^[67]。

3.3.2 靶向血管紧张素和过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ) 是一种负责调控胰岛素和糖代谢的配体激活受体, 是预防治疗糖尿病的一个重要靶点。研究表明, 糖尿病和心血管疾病存在着很大相关性^[68]。2011 年, Casimiro-Garcia 等^[69]报道了一种 AT₁ 拮抗和 PPAR γ 激动的双靶点分子 (图 14)。通过虚拟筛选发现, 具有同时拮抗 AT₁ 和激动 PPAR γ 作用的化合物, 在结构上都由 3 个药效团组成: 头部的羧酸 (红色) 与 3 个固定的氨基酸残基 Tyr 327、His449 和 His323 结合; 一个非极性的苯基链 (蓝色); 一个疏水尾巴 (绿色)。替米沙坦 (telmisartan, **47**) 是一种临床上用于治疗高血压的 AT₁ 拮抗剂, 与 PPAR γ 激动剂 **48** 进行药效团叠合: **47** 中的羰基用电子等排体的四唑环进行替换, 采用 **47** 的联苯基作为连接链, 引入环戊基以降低化合物极性, 苯并咪唑改变为吡啶并咪唑以提高分子与受体的结合。最优化合物 **49** 表现出对两个靶点最优的活性^[69], 活性数据如图所示。

4 多靶点药物面临的问题与挑战

以多靶点为核心的新药研发模式给人们带来了很大的期望, 日益成熟的筛选手段为靶点的筛选提供了物质和技术基础, 但成功上市的多靶点药物却很少。原因可能是设计多靶点药物面临的挑战与问题

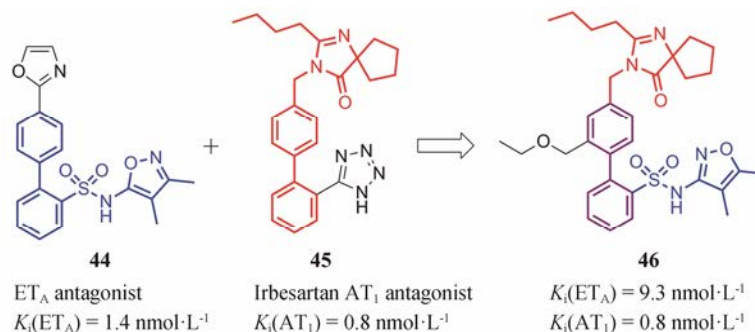


Figure 13 Design of multi-targeted agents targeting AT₁ and ET_A

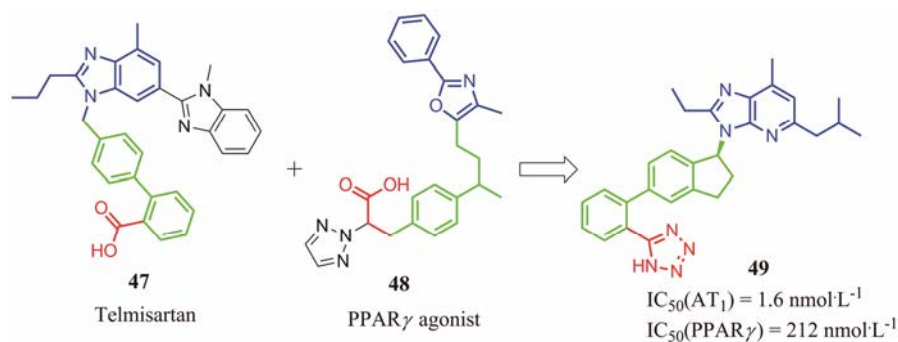


Figure 14 Design of multi-targeted agents targeting PPAR γ and AT₁

更大, 主要体现在以下两个方面:

4.1 多靶点药物活性的平衡

在得到一个多靶点先导物后, 最大的挑战在于优化药物 PD 和 PK 性质的同时平衡对于多靶点的活性。如果多靶点之间活性差别过大, 那么药物使用过程中会出现顾此失彼的情况: 假设化合物 P 对 A 靶点的活性明显强于 B 靶点, 则难以设定给药剂量, 如果给予对于 A 适宜的剂量, 那么该剂量未达到 B 的最低有效浓度; 而当给予对 B 有效的剂量时, 对 A 可能因超出最大耐受量而产生不良反应。另外, 如果靶点在组织器官中的分布密度差异较大, 则即使药物在体外具有相近的活性强度, 在体内的活性强度也会具有差异, 难以达到预期效果^[70]。目前, 很多研究假设体内靶点分布相同, 以获得同一数量级的体外活性 (针对不同靶点) 为目标。然而, 药物在各靶点的分布、各靶点的受体数目、靶点在不同组织的密度分布往往不同, 这些因素都影响着药物所需的最佳体外活性比值。

因此, 在对多靶点化合物进行优化前, 可以通过临床用药反馈来了解此类药物体内外的活性比值。如果缺乏此类临床信息, 则可以通过动物实验模型来寻找多靶点配体最优体外活性比值。在此基础上, 再对多靶点的活性强度进行调整, 这是结构优化中的难题, 可利用分子对接、药效团模拟、多靶点 QSAR 分析、骨架跃迁等方法对多靶点分子进行优化^[71]。活性优化过程中, 不应单纯追求体外靶点活性的提高, 还应注重体内药效的改变。

4.2 多靶点药物的物理化学性质

为了满足多靶点对于药效团的要求, 多靶点药物分子通常在分子尺寸和相对分子质量上比单靶点药物分子更大, 结构上更复杂。一般的多靶点药物分子的平均相对分子质量超过 500, clog P 大于 5, 高于临床使用的口服药物^[71]。随着双靶点药物相对分子质量的增大, 亲脂性和分子柔性的提高, 其口服吸收

度和溶解性将随着降低^[72]。因此, 设计多靶点药物不仅要保证多靶点药物对于多靶点的活性及选择性, 还要同时兼顾其 PD、PK 和物理化学性质, 这是研制多靶点药物的一大难题。

针对此问题, 多靶点分子的设计时需注意以下几点: 准确把握靶点的药效团, 寻找相同的药效团特征作为共享片段, 在不影响药效团的取向和空间距离的前提下, 去掉重复或者不必要的片段, 用化学键将原配体融合在一起, 以减小分子尺寸和相对分子质量; 柔性键和亲脂性不宜过大, 因为过高的柔性和亲脂性会对药物吸收分布等药代动力学问题造成影响; 在选择多靶点的配体时, 应尽量选择成药性较好的配体, 即原配体在保证体内外活性的同时, 还要具有良好的物理化学和药代动力学性质, 如果原配体的 PK 和 PD 性质不佳, 那么融合分子就更难具有良好的理化性质。

但是, 如果药物是通过静脉注射给药, 或者目的在于开发用于确证新靶点组合可行性等作用的药理学工具时, 药物口服利用率则不那么重要。

4.3 多靶点药物的安全性

相较于联合用药, 多靶点药物的一个重要优势在于减少给药种类和剂量, 避免多药联用给机体药物代谢所造成的额外负担, 以及难于控制的药物-药物相互作用。多靶点药物本质上为单一成分药物, 目前已经非常成熟的小分子药物的安评体系, 可以良好地用于多靶点药物的评价。其理化性质、药代性质、安全性质等成药性的重要因素, 相对更易在各类实验模型中进行全面分析, 从而发现问题并进行结构调整^[73]。

但多靶点药物也有其难点。首先, 复方药物可以通过调整组分的配比、剂量等方式以平衡药效, 应对不良反应, 在临床上这是相对比较容易实现的。而多靶点药物则必须在分子设计层面就对靶点活性的均衡性、协同性等问题进行深入考量, 进行大量的实验

论证。如果在临床阶段出现不良反应方面的问题，其调整的空间有限，因此，这对多靶点药物的基础研究提出了更高的要求。

其次，相较于传统小分子，多靶点药物的结构往往更为复杂，分子量更大，传统的类药性规则、经验参数等可能并不适合于判断多靶点药物的安全性，因此，研究者需要在大量的基础及临床实验中寻找规律，建立有针对性的指导原则，这无疑是有难度的，需要科研人员更多的投入与探索。

最后，多靶点药物在使用过程中，是否会因为靶点组合而产生新的机制性毒性，靶点协同如何影响给药剂量，药物代谢过程中是否会产生毒性代谢物，这些因素会随着药物结构的改变而变得更为复杂，需要在早期研究中开展有针对性的评估，在药效活性与安全性上求得最大程度的平衡^[74]。

5 结语

目前，单靶点药物在治疗多基因性疾病或影响多组织细胞的疾病如肿瘤、心血管疾病、炎症及内分泌疾病时，很难达到预期效果，如果用药不当，还可能产生毒性。多靶点药物可以一定程度上克服以上缺点，可以同时调节疾病网络中的多个环节，提高疗效，减少不良反应，目前已有一些多靶点药物在许多重大疾病中成功使用，成为一种非常重要的治疗手段。因此，笔者希望本文能给多靶点药物的研究提供一些参考，相信多靶点药物将在各类疾病中展现其优越性。

References

- [1] De CS, Camarasa MJ. Polypharmacology in HIV inhibition: can a drug with simultaneous action against two relevant targets be an alternative to combination therapy? [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 150: 206–227
- [2] Zimmermann GR, Lehar J, Keith CT. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts [J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12: 34–42.
- [3] Morphy R, Kay C, Rankovic Z. From magic bullets to designed multiple ligands [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9: 641–651.
- [4] Moore NA. The pharmacology of olanzapine and other new antipsychotic agents [J]. *Curr Opin Invest Drugs*, 1993, 2: 281–293.
- [5] Giordano S, Petrelli A. From single-to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage [J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15: 422–432.
- [6] Bajorath J. Molecular similarity concepts for informatics applications [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1526: 231–245.
- [7] Aubé J. Drug repurposing and the medicinal chemist [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3: 442–444.
- [8] Langedijk J, Mantel-Teeuwisse AK, Slijkerman DS, et al. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20: 1027–1034.
- [9] Wong EHF, Tarazi FI, Shahid M. The effectiveness of multi-target agents in schizophrenia and mood disorders: relevance of receptor signature to clinical action [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 126: 173–185.
- [10] Tuplin EW, Holahan MR. Aripiprazole, a drug that displays partial agonism and functional selectivity [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15: 1192–1207.
- [11] Naidu PS, Booker L, Cravatt BF, et al. Synergy between enzyme inhibitors of fatty acid amide hydrolase and cyclooxygenase in visceral nociception [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329: 48–56.
- [12] Lee JA, Uhlik MT, Moxham CM, et al. Modern phenotypic drug discovery is a viable, neoclassic pharma strategy [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 4527–4538.
- [13] Sonoshita M, Scopton AP, Ung PMU, et al. A whole-animal platform to advance a clinical kinase inhibitor into new disease space [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 291–298.
- [14] Sheng Z, Sun Y, Yin ZJ, et al. Advances in computational approaches in identifying synergistic drug combinations [J]. *Brief Bioinform*, 2017. DOI: 10.1093/bib/bbx047.
- [15] Bertinaria M, Shaikh MAAG, Buccellati C, et al. Designing multitarget anti-inflammatory agents: chemical modulation of the lumiracoxib structure toward dual thromboxane antagonists-COX-2 Inhibitors [J]. *Chem Med Chem*, 2012, 7: 1647–1660.
- [16] Proschak E, Heitel P, Kalinowsky L, et al. Opportunities and challenges for fatty acid mimetics in drug discovery [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 5235–5266.
- [17] Dolles D, Decker M. Design of Hybrid Molecules for Drug Development [M]. Oxford: Elsevier, 2017: 137–165.
- [18] Hopkins AL, Mason JS, Overington JP. Can we rationally design promiscuous drugs [J]. *Curr Opin Struc Biol*, 2006, 16: 127–136.
- [19] Peperidou A, Kapoukranidou D, Kontogiorgis C, et al. Multi-target molecular hybrids of cinnamic acids [J]. *Molecules*, 2014, 19: 20197–20226.
- [20] Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Litinas K, et al. Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: design, synthesis and modeling studies [J]. *Molecules*, 2014,

- 19: 9655–9674.
- [21] Flower RJ, Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol) [J]. *Nature*, 1972, 240: 410–411.
- [22] Sadek B, Alisch R, Buschauer A, et al. Synthesis and dual histamine H1 and H2 receptor antagonist activity of cyanoguanidine derivatives [J]. *Molecules*, 2013, 18: 14186–14202.
- [23] Chang RS, Tran VT, Snyder SH. Heterogeneity of histamine H1-receptors: species variations in [3H] mepyramine binding of brain membranes [J]. *J Neurochem*, 1979, 32: 1653–1663.
- [24] Cho EJ, An HJ, Shin JS, et al. Roxatidine suppresses inflammatory responses *via* inhibition of NF- κ B and p38 MAPK activation in LPS-induced RAW 264.7 macrophages [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112: 3648–3659.
- [25] Chojnacki JE, Liu K, Yan X, et al. Discovery of 5-(4-hydroxyphenyl)-3-oxo-pentanoic acid [2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)-ethyl]-amide as a neuroprotectant for Alzheimer's disease by hybridization of curcumin and melatonin [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2014, 5: 690–699.
- [26] Yang FS, Lim GP, Begum AN, et al. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 5892–5901.
- [27] Wang X. The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2009, 15: 345–357.
- [28] Sheng R, Tang L, Jiang L, et al. Novel 1-phenyl-3-hydroxy-4-pyridinone derivatives as multifunctional agents for the therapy of Alzheimer's disease [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2015, 7: 69–81.
- [29] Li MR, Li T, Mo R, et al. Recent progress in targeted drug delivery nanosystems for pancreatic cancer treatment [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1090–1099.
- [30] Irby RB, Yeatman TJ. Role of Src expression and activation in human cancer [J]. *Oncogene*, 2000, 19: 5636–5642.
- [31] Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL, et al. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 1415–1420.
- [32] Aprile G, Mazzer M, Moroso S, et al. Pharmacology and therapeutic efficacy of capecitabine: focus on breast and colorectal cancer [J]. *Anticancer Drugs*, 2009, 20: 217–229.
- [33] Shindoh H, Kawashima A, Shishido N, et al. Relationship between AUC of 5'-DFUR and toxicity of capecitabine, fluoropyrimidine carbamate analogs, and 5'-DFUR in monkeys, mice, and rats [J]. *J Toxicol Sci*, 2006, 31: 265–285.
- [34] Barchéath S, Williams C, Saade K, et al. Rational design of multitargeted tyrosine kinase inhibitors: a novel approach [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2009, 73: 380–387.
- [35] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. *Nature*, 2000, 407: 249.
- [36] Cesca M, Bizzaro F, Zucchetti M, et al. Tumor delivery of chemotherapy combined with inhibitors of angiogenesis and vascular targeting agents [J]. *Front Oncol*, 2013, 3: 259.
- [37] Zhang X, Raghavan S, Ihnat M, et al. The design and discovery of water soluble 4-substituted-2,6-dimethylfuro [2,3-d] pyrimidines as multitargeted receptor tyrosine kinase and microtubule targeting antitumor agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22: 3753–3772.
- [38] Gangjee A, Zeng Y, Ihnat M, et al. Novel 5-substituted, 2,4-diaminofuro [2,3-d] pyrimidines as multireceptor tyrosine kinase and dihydrofolate reductase inhibitors with antiangiogenic and antitumor activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 5475–5491.
- [39] Gangjee A, Zhao Y, Lin L, et al. Synthesis and discovery of water-soluble microtubule targeting agents that bind to the colchicine site on tubulin and circumvent Pgp mediated resistance [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 8116–8128.
- [40] Sommer S, Fuqua SAW. Estrogen receptor and breast cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2001, 11: 339–352.
- [41] Patel RR, Sengupta S, Kim HR, et al. Experimental treatment of oestrogen receptor (ER) positive breast cancer with tamoxifen and brivanib alaninate, a VEGFR-2/FGFR-1 kinase inhibitor: a potential clinical application of angiogenesis inhibitors [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46: 1537–1553.
- [42] Tang Z, Wu C, Wang T, et al. Design, synthesis and evaluation of 6-aryl-indenoisoquinolone derivatives dual targeting ER α and VEGFR-2 as anti-breast cancer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 118: 328–339.
- [43] Reiter RJ, Tan D, Mayo JC, et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans [J]. *Acta Biochim Pol*, 2003, 50: 1129–1146.
- [44] Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97: 1652–1662.
- [45] Berger L, El-Alfy M, Martel C et al. Effects of dehydroepiandrosterone, premarin and acolbifene on histomorphology and sex steroid receptors in the rat vagina [J]. *J Steroid Biochem*, 2005, 96: 201–215.
- [46] Pandolfi P. Histone deacetylases and transcriptional therapy with their inhibitors [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001,

- 48: S17–S19.
- [47] Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain [J]. *PLoS Med*, 2005, 2: 73.
- [48] Cai X, Zhai HX, Wang J, et al. Discovery of 7-(4-(3-ethynylphenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-yloxy)-*N*-hydroxyheptanamide (CUDC-101) as a potent multi-acting HDAC, EGFR, and HER2 inhibitor for the treatment of cancer [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 2000–2009.
- [49] Marks PA, Breslow R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 84–90.
- [50] Wakelee HA, Gettinger S, Engelman J, et al. A phase Ib/II study of cabozantinib (XL184) with or without erlotinib in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79: 923–932.
- [51] Qian C, Lai C J, Bao R, et al. Cancer network disruption by a single molecule inhibitor targeting both histone deacetylase activity and phosphatidylinositol 3-kinase signaling [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 4104–4113.
- [52] Younes A, Berdeja JG, Patel MR, et al. Safety, tolerability, and preliminary activity of CUDC-907, a first-in-class, oral, dual inhibitor of HDAC and PI3K, in patients with relapsed or refractory lymphoma or multiple myeloma: an open-label, dose-escalation, phase 1 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17: 622–631.
- [53] Yang EG, Mustafa N, Tan EC, et al. Design and synthesis of janus kinase 2 (JAK2) and histone deacetylase (HDAC) bispecific inhibitors based on pacritinib and evidence of dual pathway inhibition in hematological cell lines [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 8233–8262.
- [54] Novotny-Diermayr V, Hart S, Goh KC, et al. The oral HDAC inhibitor pracinostat (SB939) is efficacious and synergistic with the JAK2 inhibitor pacritinib (SB1518) in preclinical models of AML [J]. *Blood Cancer J*, 2012, 2: 1–69.
- [55] Peng Y, Li PP, Li L, et al. Progress of clinical trials in Alzheimer's disease drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1185–1195.
- [56] Bush AI, Tanzi RE. Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis [J]. *Neurotherapeutics*, 2008, 5: 421–432.
- [57] Huang W, Lv D, Yu H, et al. Dual-target-directed 1,3-diphenylurea derivatives: BACE 1 inhibitor and metal chelator against Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 5610–5615.
- [58] Huang W, Yu H, Sheng R, et al. Identification of pharmacophore model, synthesis and biological evaluation of *N*-phenyl-1-arylamide and *N*-phenylbenzenesulfonamide derivatives as BACE 1 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 10190–10197.
- [59] Llorens-Maritín M, Jurado J, Hernández F, et al. GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease [J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 7: 46.
- [60] Sivaprakasam P, Han XC, Rita L, et al. Discovery of new acylaminopyridines as GSK-3 inhibitors by a structure guided in-depth exploration of chemical space around a pyrrolopyridinone core [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 1856–1863.
- [61] Jiang XY, Chen TK, Zhou JT, et al. Dual GSK-3 β /AChE inhibitors as a new strategy for multitargeting anti-Alzheimer's disease drug discovery [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9: 171–176.
- [62] Fernández-Bachiller MI, Pérez C, Monjas L, et al. New tacrine-4-oxo-4 *H*-chromene hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and β -amyloid-reducing properties [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 1303–1317.
- [63] Spencer JPE. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain [J]. *Proc Nutr Soc*, 2010, 69: 244–260.
- [64] Lu C, Zhou Q, Yan J, et al. A novel series of tacrine-selegiline hybrids with cholinesterase and monoamine oxidase inhibition activities for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 62: 745–753.
- [65] Bar-Am O, Amit T, Weinreb O, et al. Propargylamine containing compounds as modulators of proteolytic cleavage of amyloid protein precursor: involvement of MAPK and PKC activation [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 21: 361–371.
- [66] Ikeda T, Ohta H, Okada M, et al. Antihypertensive effects of a mixed endothelin-A-and-B-receptor antagonist, J-104132, were augmented in the presence of an AT1-receptor antagonist, MK-954 [J]. *J Cardiovasc Pharm*, 2000, 36: S337–S341.
- [67] Murugesan N, Gu Z, Fadnis L, et al. Dual angiotensin II and endothelin A receptor antagonists: synthesis of 2'-substituted *N*-3-isoxazolyl biphenylsulfonamides with improved potency and pharmacokinetics [J]. *J Med Chem*, 2005, 48: 171–179.
- [68] Bisi A, Gobbi S, Belluti F, et al. Design of multifunctional compounds for cardiovascular disease: from natural scaffolds to “classical” multitarget approach [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20: 1759–1782.
- [69] Casimiro-García A, Filzen GF, Flynn D, et al. Discovery of a series of imidazo [4,5-*b*] pyridines with dual activity at angiotensin II type 1 receptor and peroxisome proliferator-

- activated receptor- γ [J]. *J Med Chem*, 2011, 54: 4219–4233.
- [70] Jiang FC. The multi-target drugs and their design [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 282–287.
- [71] Fu R, Sun Y, Sheng W, et al. Designing multi-targeted agents: an emerging anticancer drug discovery paradigm [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 136: 195–211.
- [72] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 1997, 23: 3–25.
- [73] Anighoro A, Bajorath J, Rastelli, G. Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 7874–7887.
- [74] Medina-Franco JL, Giulianotti MA, Welmaker GS, et al. Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2013, 18: 495–501.