

Keap1-Nrf2 蛋白相互作用小分子抑制剂及降解剂研究进展

闫健羽, 刘国栋, 缪震元, 庄春林*

(中国人民解放军海军军医大学药理学系, 上海 200433)

摘要: 氧化应激是机体内一种氧化还原失衡状态, 是导致组织损伤和疾病发生的重要因素之一。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)-Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch like ECH-associated protein 1, Keap1) 信号通路不仅是抵御氧化应激损伤的重要防御系统, 也是增强机体抗氧化能力的关键信号通路之一。大量研究表明, 靶向 Keap1-Nrf2 信号通路并激活 Nrf2 已经成为治疗氧化应激和相关疾病的有效策略。运用小分子直接阻断 Keap1-Nrf2 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 是激活 Nrf2 并且发挥保护作用的重要方向之一, 可以避免共价修饰激活 Nrf2 的潜在不良反应。另一方面, Keap1 作为新型 E3 泛素化酶工具, 已被用于蛋白水解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimeras, PROTACs) 的设计。本文综述了近年来 Keap1-Nrf2 蛋白相互作用抑制剂和基于 Keap1 E3 泛素化系统的降解剂的研究进展。

关键词: 氧化应激; 核因子 E2 相关因子 2; Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1; 蛋白-蛋白相互作用; 蛋白水解靶向嵌合体

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2022)10-2932-17

Advances on Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors and degraders

YAN Jian-yu, LIU Guo-dong, MIAO Zhen-yuan, ZHUANG Chun-lin*

(School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Oxidative stress is a redox imbalance in the body, which is one of the important factors leading to tissue damage and diseases. The nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-Kelch like ECH-associated protein 1 (Keap1) signaling pathway is not only an important defense system against oxidative damage, but also one of the key signaling pathways of the antioxidant capacity. Numerous studies have shown that targeting the Keap1-Nrf2 signaling pathway to activate Nrf2 has become an effective strategy for the treatment of oxidative stress and related diseases. Using small molecules to directly block the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction (PPI) is one of the important directions for activating Nrf2 and exerting the cytoprotective effect, which can avoid the potential side effects of covalent modification of Nrf2. On the other hand, the Keap1 is an efficient E3 ubiquitin ligase that has been used in the design of proteolysis targeting chimeras (PROTACs). This review summarizes the research progresses of Keap1-Nrf2 protein interaction inhibitors and degraders based on the Keap1 E3 ubiquitination system in recent years.

Key words: oxidative stress; nuclear factor E2-related factor 2; Kelch like ECH-associated protein 1; protein-protein interaction; proteolysis targeting chimeras

收稿日期: 2022-05-31; 修回日期: 2022-06-17.

基金项目: 国家自然科学基金“优秀青年基金”资助项目 (82022065); 上海市曙光学者计划资助项目 (21SG038).

*通讯作者 Tel: 86-21-81871204, E-mail: zelnathan@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0669

氧化应激是机体内一种氧化还原失衡状态,是导致组织损伤和疾病发生的重要因素之一,与多种疾病密切相关,如神经性疾病、慢性肾脏疾病、阻塞性肺疾病、动脉粥样硬化和癌症等^[1,2]。大量研究已经发现靶向 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch like ECH-associated protein 1, Keap1)-核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)-抗氧化反应元件 (antioxidant redox element, ARE) 信号通路激活 Nrf2 可以对各种应激和炎症相关疾病发挥保护作用^[3]。激活 Nrf2 主要有共价激活和非共价激活两种方式^[4]。Nrf2 共价激活剂主要是通过与其 Keap1 的半胱氨酸残基 (如: Cys151、Cys257、Cys273、Cys288、Cys297、Cys434、Cys613) 发生共价相互作用,致使 Keap1 构象发生改变,从而解离并激活 Nrf2 而发挥细胞保护作用^[5]。最为成功的 Nrf2 共价激活剂富马酸二甲酯 (dimethyl fumarate, DMF) 在临床实践中用于治疗银屑病和复发性多发性硬化症^[6]。然而, Nrf2 共价激活剂对 Keap1 及细胞中普遍存在的富含半胱氨酸的其他靶点没有选择性,这种非特异性结合可能增加临床开发中的风险^[7]。巴多索隆 (bardoxolone, CDDO) 类似物是一种典型的亲电性 Nrf2 激活剂,其甲基修饰物甲基巴多索隆 (bardoxolone methyl, CDDO-Me) 曾获美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 授予孤儿药资格,用于治疗亚伯氏症和常染色体显性遗传性多囊肾病;但该药物在 III 期临床试验中表现出致心衰的不良反应曾一度失败^[8]。一项新的 III 期临床试验剔除心衰的患者后,与安慰剂组相比, CDDO-Me 治疗亚伯氏症 (遗传性肾炎) 导致的慢性肾病患者在第 100 周和第 104 周通过估算的肾小球滤过率 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) 观察到肾功能有统计学上的显著改善^[9],上市申请已于 2021 年被 FDA 受理。另一种激活 Nrf2 的方式是非共价阻断 Keap1-Nrf2 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI),释放 Nrf2 而达到激活 Nrf2 的效果,这种激活方式有别于共价激活,因此,具有更高安全性和有效性,引起了药物化学工作者极大的关注^[10-12]。各种类型 Keap1-Nrf2 抑制剂被陆续报道,并且探索了 Keap1-Nrf2 抑制剂的治疗潜力^[13,14]。另一方面,Keap1 Cullin 3 E3 连接酶复合物是一种非常有效的 E3 泛素化系统,已被用于蛋白水解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimeras, PROTACs) 的设计。本文综述了近几年 Keap1-Nrf2 蛋白相互作用抑制剂和基于 Keap1 E3 泛素化系统的降解剂的研究进展。

1 Keap1-Nrf2 蛋白相互作用小分子抑制剂

1.1 萘磺酰胺类 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂 Marcotte 等^[15]通过筛选 26 万多个化合物发现首个以萘环为母

核的 Keap1-Nrf2 抑制剂 **1**,其对蛋白相互作用的抑制活性 (荧光偏振法, fluorescence polarization, FP) $IC_{50} = 2.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。姜正羽课题组^[16]在化合物 **1** 的基础上进行分子对接决定因素分析,并基于此进一步结构优化,在其磺酰胺基的氮上引入亚甲基羧酸得到化合物 **2**。化合物 **2** 是更有效的 Keap1-Nrf2 抑制剂,相对于 **1** 抑制活性提高了约 200 倍 ($IC_{50} = 28.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),并且靶点亲和力也大幅提高 ($K_d = 3.59 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。根据分子动力学模拟和自由能计算^[16],Keap1 的结合腔可分为 P1、P2、P3、P4、P5 五个空腔口袋 (图 1),Nrf2 因子 ETGE 肽中,肽主链与 P3 口袋结合,残基 GLU-79 与 P1 形成氢键和盐桥,残基 GLU-82 与 P2 产生静电和极性相互作用,残基 ASP-77 与位于 P1、P2 的 ARG-415 同时与两个口袋结合,残基 LEU-76、GLU-78、THR-80 和 PHE-83 与疏水口袋 P4、P5 结合。抑制剂 **1** 中,萘环占据了 P3 口袋以稳定结合构象,与磺胺连接的两个甲氧基取代苯环以适当的构象占据 P4 和 P5 口袋,化合物 **1** 由于氨基上氢只能与口袋内水形成氢键,没有能够与 P1 和 P2 口袋结合的取代基而表现出较低的活性,而化合物 **2** 的两个氨基被羧基取代,占据 P1 和 P2 口袋,形成了较强的极性相互作用,因此表现出更强的活性。

由于化合物 **2** 较低的 pKa 及双侧羧基的存在,对于细胞膜通透性和药物吸收是不利的,其水溶性仅为 $388 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (pH = 7.4)。为了进一步改善化合物 **2** 的类药性质,利用对乙酰氨基替代对甲氧基得到的化合物 **3**^[17],进一步提升了蛋白相互作用的抑制活性 ($IC_{50} = 14.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),并且提高了其水溶性 ($5\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH = 7.4)。随后, Lu 等^[18]基于生物电子等排原理将羧酸用四氮唑取代得到化合物 **4**,使其在保持原抑制活性的基础上透膜性得到提升。2021 年, Abed 等^[19]通过构效关系研究获得了类似物 **5**, IC_{50} 值为 $7.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该团队对化合物的 3 个区域进行构效关系总结,磺酰胺基必须直接连接在萘环上才具有活性,化合物 **5-1** 和化合物 **5-2** 碳链的引入导致构象发生变化,影响了化合物与 Keap1 Kelch 结构域的结合;1,4-苯并二氧六环、2H-1-苯并吡喃、1,2-亚甲二氧基苯和 2,3-二氢苯并呋喃等环状基团连接在 P4、P5 的磺酰胺侧链上可增强抑制剂的耐受性;P1、P2 的羧酸用四氮唑取代或在 P4、P5 引入氯原子可以增强抑制剂的活性。该类化合物毒性较低,化合物 **5-3**~**5-7** 和化合物 **5** 在浓度高达 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,均对人肝癌 HepG2 细胞和小鼠脑 BV-2 小胶质细胞未表现出明显的细胞毒性 (图 2)。

Winkel 等^[20]报道了首个单侧萘磺酰胺类小分子抑制剂 **6** (图 3),该类化合物只有一个磺酰胺基团,另一个取代基是吡咯烷-3-羧酸,该化合物 **6** 不能完全占据

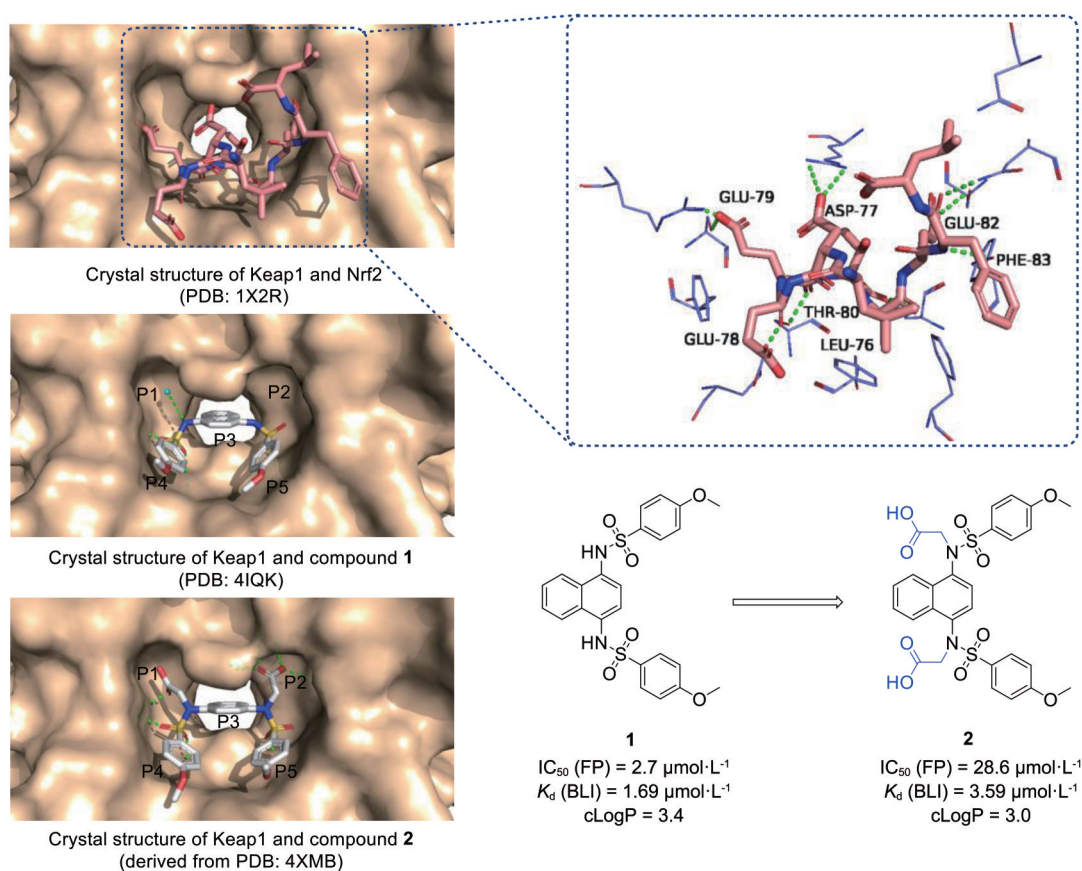


Figure 1 The crystal structures of Keap1 with Nrf2, compound 1 and compound 2. The structures of compounds 1 and 2

Keap1 结合腔, 等温滴定量热法 (isothermal titration calorimetry, ITC) 测定化合物对 Keap1 Kelch 结构域亲和力 K_d 仅为 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与化合物 6 类似, 化合物 7 是首个氨基酸取代的萘磺酰胺类小分子抑制剂^[21], 其 IC_{50} = 43 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并且对于对乙酰氨基酚诱导的肝损伤有明显的保护作用, 该类小分子的发现丰富了 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂化学结构类型。

Moore 课题组^[22]基于骨架跃迁策略, 将化合物 2 的萘环替换成异喹啉环得到全新抑制剂 8 (IC_{50} = 63 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图 4), 保持了其抑制活性。为了解决脂溶性和细胞膜通透性等问题, 基于生物电子等排将分子中一侧乙酰基替换成三氟乙基得到化合物 9^[23], 其 IC_{50} = 73 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{LogD}_{7.4}$ 由 -1.5 增大至 0.5, 半衰期 $t_{1/2}$ 由 104 min 增加至 136 min, 一定程度上增加了化合物的亲脂性及代谢稳定性, 从而改善了细胞膜通透性, 增强了细胞活性。为了进一步探索氟原子对化合物活性、亲脂性和代谢稳定性的影响, 将占据 P4、P5 口袋的甲氧基替换为一个或两个氟原子, 结果表明, 化合物 9-1 和 9-2 比 9 的代谢稳定性更好, 半衰期 $t_{1/2}$ 均大于 180 min, 但脂溶性变化不大, 且活性相比于 9 有所下降。

化合物 10 (图 5) 是基于前药修饰策略设计得到的一类小分子抑制剂^[24], 利用噻唑烷酮基团替代 Keap1-Nrf2 抑制剂中的关键羧基药效团开发得到过氧化氢响应性前药。ITC 实验测得化合物 10 与 Keap1 的结合力 K_d 值为 53.7 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 生物膜层干涉 (biolayer interferometry, BLI) 技术测得其与 Keap1 的结合力 K_d 值为 28.5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且解离曲线表明该化合物是长效化合物。通过前药修饰提高了母体药物的理化性质和细胞膜通透性, 并表现出合适的口服药代动力学特性, 生物利用度为 68.1%, 表现出较好的体内抗炎效率, 用过量的对乙酰氨基酚诱导小鼠急性肝损伤后, 当化合物 10 的剂量为 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 能够显著降低急性肝损伤及 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子水平。因此, 这种前药修饰方法不仅为改善化合物类药性质提供了新的解决方案, 也为治疗高水平过氧化氢引起的慢性炎症疾病提供了重要选择。

Hu 课题组^[25]考虑到该类分子的代谢稳定性问题, 他们基于骨架跃迁策略将化合物 2 的萘环简化为一个苯环, 并且在双侧亚甲基羧基取代上引入甲基, 得到 1,2-二取代二甲苯衍生物 11, 相比于化合物 2 活性略有下降, 其 IC_{50} = 150 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 该化合物在人肝微粒体

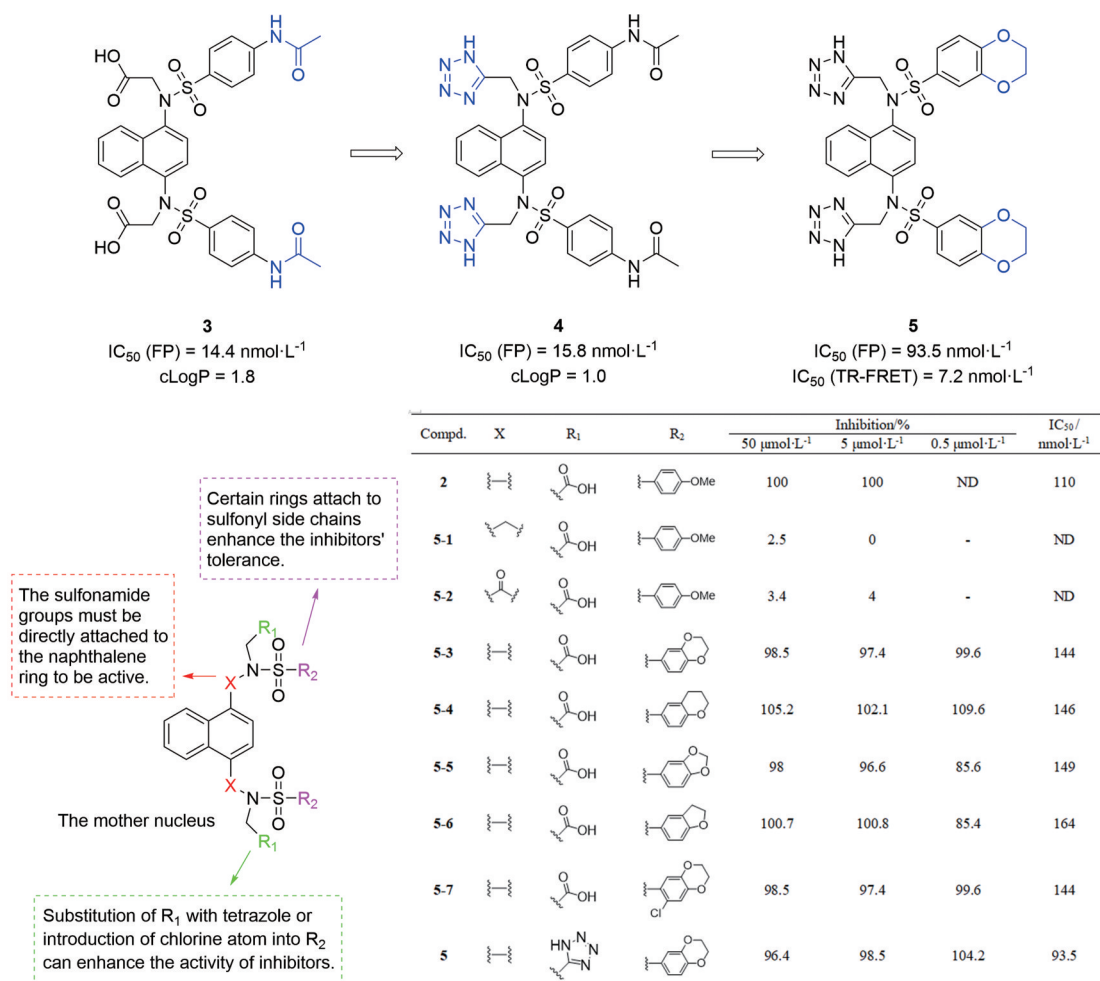


Figure 2 The structures of compounds 3–5 and the structure-activity relationship

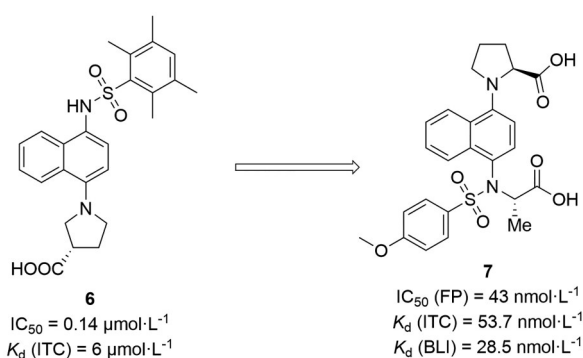


Figure 3 The structures of compounds 6 and 7

中表现出良好的代谢稳定性 (**2** 孵育 90 min 后剩余 56.9%; **11** 孵育 90 min 后剩余 98.2%), 为下一步该类抑制剂的成药性设计提供了一个新的方案。

分子对称性对化合物性能和溶解度有显著影响, 一般来说, 与结构相似但对称性较低的分子相比, 对称分子具有较高的熔点和较低的溶解度^[26]。本课题组将对称分子化合物 **2** 一侧的对甲氧基替换为氨基得到不对称化合物, 将不利于血脑屏障通透性的双羧酸基团

替换成酰胺得到抑制剂 NXPZ-2 (**12**), 并首次证明了该类抑制剂对小鼠学习记忆、空间记忆等认知功能有明显的改善作用^[27]。通过分子杂交策略, 将天然 Nrf2 共价激活剂莱菔硫烷^[28,29], 引入到萘磺酰胺类小分子中, 得到了一类全新的双功能不对称小分子抑制剂 **13**^[30], 在体内外均表现出优异的抗炎、抗急性肺损伤活性及较低的体内毒性。最近, 本课题组获得了 Keap1 Kelch 结构域与化合物 **12** 的晶体复合物结构 (PDB: 7XM2), 并通过基于结构的基团添加策略在溶剂暴露区域引入溶解性哌嗪基团, 获得不对称萘磺酰胺抑制剂 **14**, 该化合物可显著抑制脂多糖诱导的腹腔巨噬细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的产生, 以及促炎细胞因子 TNF- α 的表达。在体内, 化合物 **14** 通过触发 Nrf2 核易位来减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤模型炎症^[31]。与 **12** 相比水溶性有所改善, 在酸性条件下溶解性大幅度提高, 特别是, 在保持活性的基础上化合物 **14** 的生物利用度 (bioavailability, *F*) 达到 19.86%, 是已经报道的同类抑

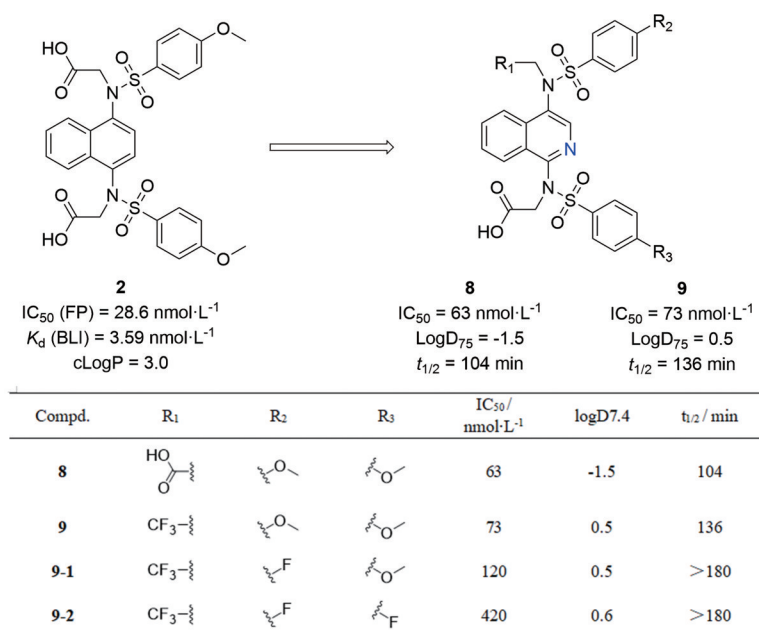


Figure 4 The structures of compounds **2**, **8** and **9**

制剂中生物利用度最高的小分子。

化合物 **15** 是 Moore 课题组^[32] 基于化合物 **2** 发展的新型单萘磺酰胺衍生物, 其一侧的氮原子被取代为碳原子, 羧基侧链也被去除, 这类新分子仍然保持了较好的结合亲和力和活性 ($IC_{50} = 151 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。2020 年, 姜正羽课题组^[33] 报道了一系列 2-氧代-2-苯乙酸取代萘磺酰胺衍生物, 活性最优的抑制剂 **16** 对 Keap1 的 K_d 为 $24 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Keap1-Nrf2 相互作用抑制活性 IC_{50} 为 $75 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本课题组通过分级虚拟筛选得到一类萘磺酰胺 Keap1-Nrf2 抑制剂 **17**, 荧光各向异性实验 (fluorescence anisotropy, FA) 测得其 $K_d = 2.9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并研究了其初步的构效关系。通过在磺酰胺的氮原子上引入羧酸基团, 进一步提高了 Keap1 结合亲和力, 可以更好地激活 Nrf2。表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 实验测得化合物 **18** 的靶点亲和力 $K_d = 453 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[34,35], 该类分子具有较好体内抗炎活性。

Lee 等^[36] 通过对 Keap1 Kelch 结构域与抑制剂共晶结构的分析, 设计合成了一系列位于苯或萘核 C-2 位置不同取代的 1,4-双(芳基磺酰胺)苯或萘-*N,N'*-乙酰乙酸类衍生物。其中, 化合物 **19** 是最有效的抑制剂, FP 实验 IC_{50} 为 $64.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 荧光共振能量转移 (time-resolved fluorescence resonance energy transfer, TR-FRET) 实验 IC_{50} 为 $14.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分子对接研究解释了其抑制活性, 4-氟苯基与萘核心部分处于对侧位置, 由于 P3 核心口袋与萘母核的强相互作用, 导致 C-2 取代基被迫向 P5 口袋投射, 使得 4-氟苯基片段对非极性 P5 口袋的疏水作用得到了增强。新的 2-*O*-萘结构

的研究为结构多样性优化提供了额外的位点。类似地, Wells 课题组^[37] 基于配体结构的药物设计获得了新型取代苯基双磺酰胺结构, 该类化合物在 Keap1 Kelch 结构域表现出亚微摩尔的亲和力, 其中, 化合物 **20** ($IC_{50} = 575 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 活性最优。与其他 Keap1 PPI 小分子抑制剂不同的是, 化合物 **20** 的氧代苯基与相邻磺酰胺侧链的 4-甲氧基苯基形成较强的 π - π 堆积作用, 稳定了 **20** 的构象, 占据了 Kelch 中心通道, 为进一步优化提供了结构基础。2017 年, Yasuda 等^[38] 在 15.5 万多种小分子化合物库中筛选发现了苯并咪唑类化合物 **21** 具有明显抑制 Keap1-Nrf2 的活性, $IC_{50} = 0.2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在人肝微粒体中的代谢稳定性是化合物 **1** 的 8 倍以上 (**1** 孵育 30 min 后剩余 9.3%; **21** 孵育 30 min 后剩余 81%)。

1.2 异喹啉类 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂 Hu 等^[39,40] 通过高通量筛选首次报道了 1,2,3,4-四氢异喹啉类的 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂 **22** (消旋体) (图 6), 其 IC_{50} (FP) = $3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_d (SPR) = $1.9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。手性拆分得到化合物 **23** (LH601A), 其 IC_{50} (FP) = $1.3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_d = 1.0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比其他异构体至少高 100 倍。在化合物 **23** 的苯环 5 位引入甲基得到化合物 **24**^[41], 对 Keap1-Nrf2 抑制活性略有提升 ($IC_{50} = 0.75 \text{ vs } 1.3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。Ontoria 等^[42] 对四氢异喹啉类分子进行了进一步结构优化, 主要对其环己基酸及苯环 5 位进行优化, 利用天然配体的肽库获得了非酸性化合物 **25**, FP 测得其 $IC_{50} = 2.5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与 Keap1 复合物的共晶结构显示, 环丁基上的甲酰基与 P2 口袋的范德华力增强, 提示该

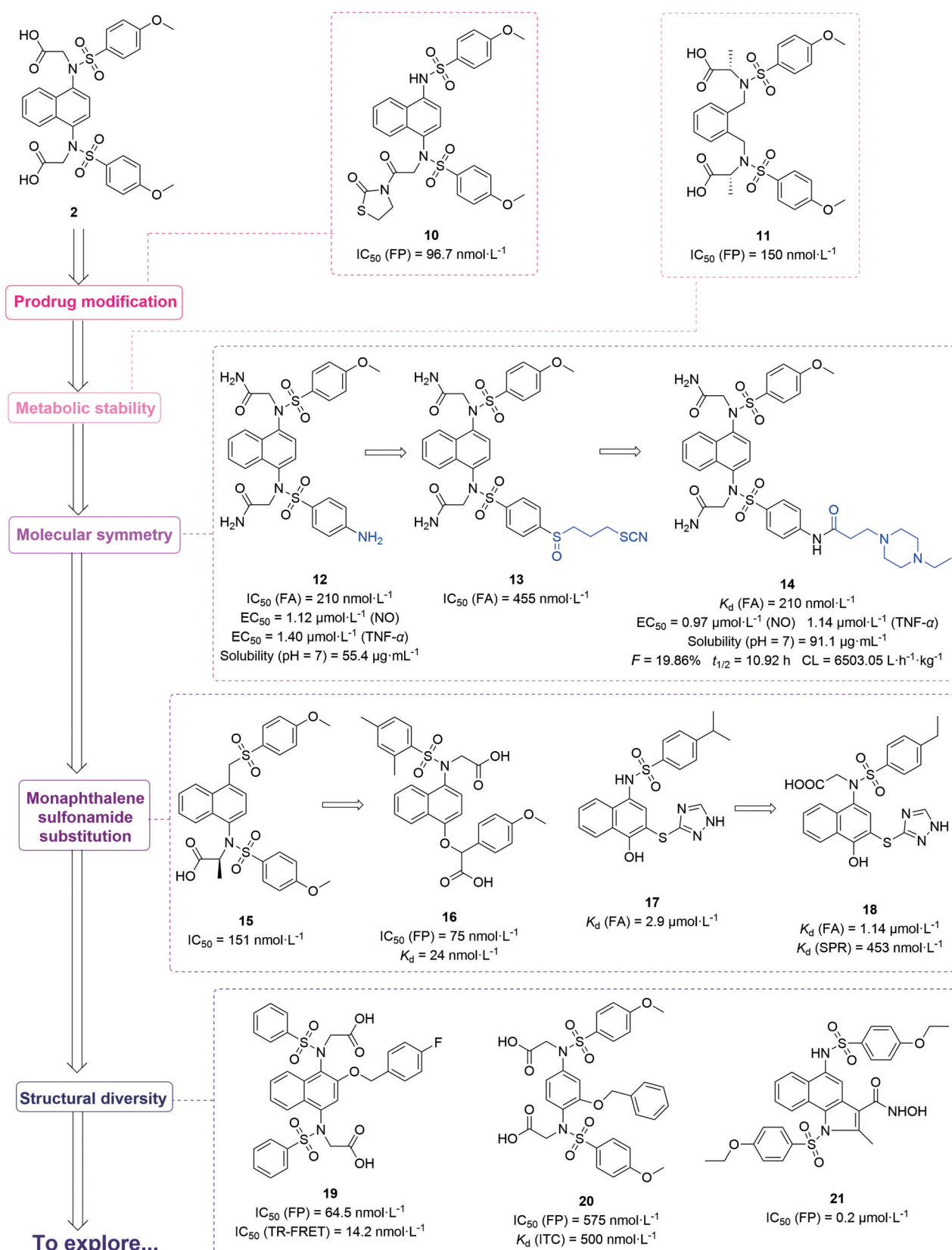


Figure 5 Development of naphthalene sulfonamide inhibitors 10-21

部位也可能改善抑制剂和蛋白质结合能力。

2020年, Ma等^[43]结合虚拟筛选技术和U2OS细胞

中Nrf2核易位筛选得活性化合物**26**(图7),与Keap1蛋白的结合力K_d(SPR) = 56 nmol·L⁻¹,可较好诱导Nrf2

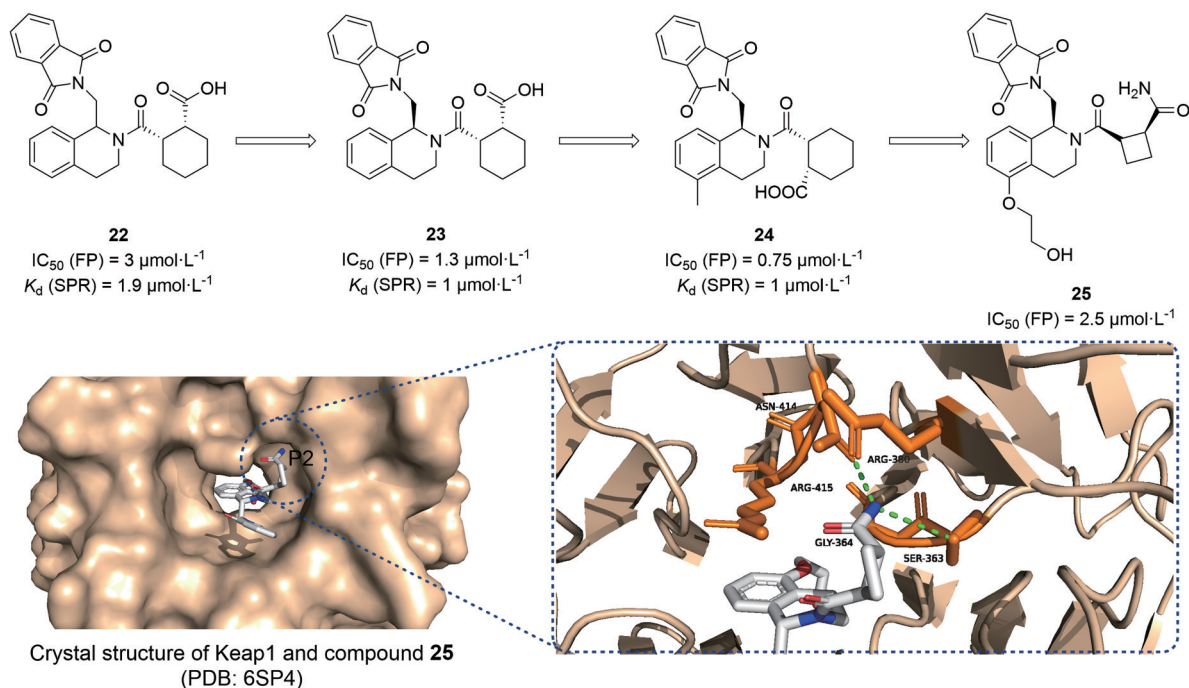


Figure 6 The structures of compounds 22–25 and the crystal structure of Keap1 with compound 25

发生核易位 ($EC_{50} = 0.95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 进而发挥保护作用。将抑制剂 **26** 的苯并三唑甲基替换为乙基得到化合物 **27**, Keap1 Kelch 与化合物 **27** 共晶表明, 其保持了 3 种重要的相互作用: 四氢异喹啉环与 ARG-415 的阳离子- π 相互作用、苯并三唑与 TYR-525 的 π - π 堆积作用、酰胺基与 SER602 的氢键相互作用。此外, 化合物 **27** 中的苯并三唑也与 SER-555 和 GLN-530 具有氢键相互作用。最重要的是, 化合物 **27** 中的羧酸取代了水分子占据了 P1 口袋, 与 ARG-483 形成了较强的相互作用。酰胺苯环不与 TYR-334 相互作用, 但具有向 PHE-557 和 TYR-552 扩展的空间, 因此在苯环上引入不同的取代基, 化合物 **28** 的活性及亲和力进一步提升, EC_{50} 和 K_d 分别为 $0.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物 **28** 具有可观的口服药代动力学性质, 给予大鼠 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药剂量后, 曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 $2720 \text{ ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, 血浆清除率 (plasma clearance, CL) 为 $958 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 血药浓度达峰时间 (time of maximum concentration, T_{max}) 为 0.92 h , 生物利用度为 20%。在体内实验中, 不论给予该化合物 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 还是 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量, 在给药 2 h 后, 肾脏中的 HMOX1、CBR3、NQO1 和 OSGIN1 表达增多, 脑组织中 OSGIN1 表达增多, 但并不会增加 NQO1 的表达。

1.3 三唑类 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂 2015 年, Bertrand 等^[44]报道了一系列 1,4-二苯基-1,2,3-三唑类化合物 (图 8)。当 R 为羧酸时, 化合物 **29** 在体外 FP 实验中最优, EC_{50} 为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 但基于细胞 NQO1 实验发

现 24 h 后诱导 NQO1 酶活性增加两倍所需的浓度 (CD 值) 大于 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当 R 为甲基或卤素 (**30**~**32**) 时, 表现出更好的细胞活性 ($CD < 2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。这类结构与 Keap1 可逆结合, 在体外和细胞中抑制 Keap1-Nrf2 蛋白-蛋白相互作用, 并上调 Nrf2 基因的表达。其中, 化合物 **30** 可明显抑制小鼠皮层神经中 A β 引起的神经毒性, 可以作为神经退行性疾病的潜在治疗药物^[45]。

2016 年, Davies 和 Heightman 等^[46,47]基于片段的药物设计方法报道了一种新型三唑苯丙酸类 Keap1-Nrf2 抑制剂。他们首先利用 X 射线晶体衍射筛选出关键片段, 通过进一步的片段生长策略得到了化合物 **33** ($IC_{50} = 61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在化合物 **33** 氯苯基的 3 位引入烷基苯磺酰胺片段, 以增强与氨基酸残基的 π - π 堆积相互作用, 化合物 **34** 的活性得到大幅度提升 ($IC_{50} = 0.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。最后, 为了使目标分子能够以稳定构象与靶点结合, 通过苯磺酰胺的环化反应形成了七元磺酰胺杂环, 其中, 化合物 **35** 活性最优, 其 IC_{50} (FP) = $15 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_d (SPR) = $1.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。体内活性方面, 化合物 **35** 可以激活慢性阻塞性肺病模型中支气管上皮细胞中的 Nrf2 通路, 从而诱导靶基因表达, 提高抗氧化活性, 减轻炎症反应, 但口服生物利用度不是很理想 ($F = 7\%$)。

2017 年, Kazantsev 等^[48]通过筛选发现具有 4-苯基-1,2,4-三唑骨架的化合物 **36** 能激活细胞 Nrf2-ARE 通路, 在后续 SAR 研究中发现另一含有三唑-3-硫醇骨架的化合物 **37** 也具有类似活性, 它们与 Keap1 Kelch

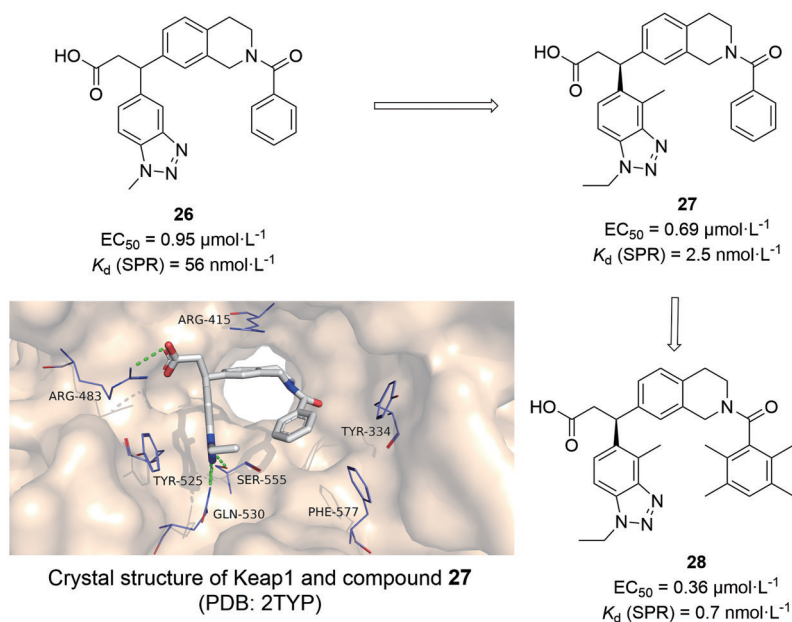


Figure 7 The structures of compounds **26–28** and the crystal structure of Keap1 with compound **27**

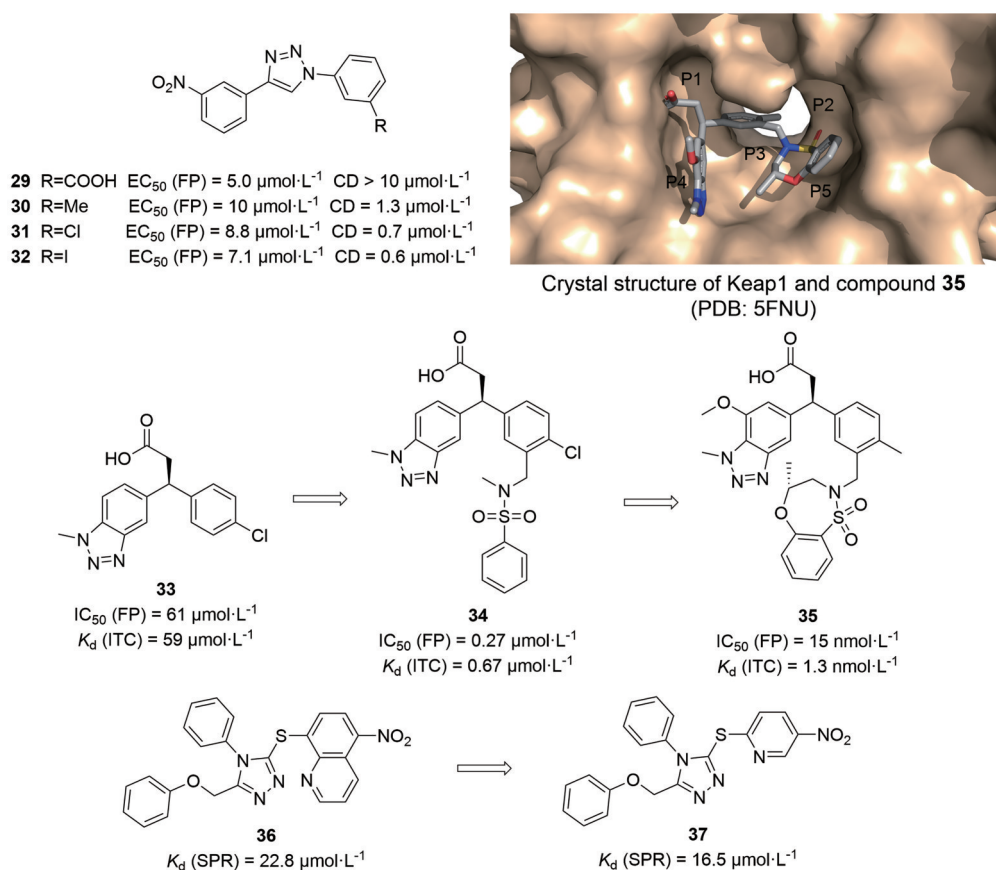


Figure 8 The structures of triazole small molecule inhibitors **29–37** and the crystal structure of Keap1 with compound **35**

结构域的 K_d 值分别为 22.8 和 16.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.4 吡唑羧酸类 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂 2019 年, Astex^[49]和葛兰素史克^[50]制药公司申请了两个系列的化合物专利, 都含有苯并吡唑骨架, 其中化合物 **38** 和 **39** 显示 Keap1-Nrf2 高抑制活性和较高的细胞效价 (图 9)。

FP 法测得两个化合物 IC_{50} 值介于 10 和 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, TR-FRET 法测得化合物 **38** 的 IC_{50} 值小于 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 在人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 中用四甲基偶氮唑盐比色法 (NQO1 MTT 实验) 测得化合物 **39** 的 EC_{50} 值为 79 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

最近, Norton 等^[51]基于片段药物设计获得了一类新的吡唑羧酸类化合物 **40**, 该化合物与 Keap1 具有高亲和力, 其 $K_d = 2.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并在 BEAS-2B 细胞模型中上调 Nrf2 依赖的基因表达, 细胞 NQO1 MTT 实验测得 EC_{50} 值为 $43 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Pallesen 等^[52]对现有抑制剂进行了片段的解构重建 (fragment-based deconstruction reconstruction, FBDR), 设计合成了一类吡唑羧酸类抑制剂。他们将 6 类已知的小分子 Keap1-Nrf2 PPI 抑制剂分解为 77 个片段, 并在 4 个正交分析实验中进行了测试, 最终得到活性最好的化合物 **41**, K_i 值为 $40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.5 其他类 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂 Marcotte 等^[15]用二维荧光强度分布分析 (two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis, 2D-FIDA) 进行

了高通量筛选获得化合物 **42** (表 1^[15,34,53-60]), 其活性较差, 仅为 $\text{IC}_{50} = 118 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。2014 年, Sun 等^[53]虚拟筛选发现了含脲衍生物 **43** 活性较好, EC_{50} (FP) 为 $9.8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本课题组通过分级虚拟筛选及荧光各向异性分析发现了两类 Nrf2-Keap1 PPI 抑制剂^[34], 化合物 **44**、**45**, 但其活性一般, 与 Keap1 蛋白结合的 IC_{50} 值处于亚微摩尔范围, 没有开展后续研究。Satoh 等^[54]公开了活性化合物 **46** 和 Keap1 Kelch 结构域共结晶, 但没有披露其后续的研究结果。Shimozono 等^[55]报道的化合物 **47** 是一种潜在的 Keap1-Nrf2 PPI 抑制剂, 在荧光素酶 NQO1 ARE 报告基因检测中, 其呈现剂量依赖性激活 Nrf2。SPR 实验中, 诱导荧光素酶活性提高至两倍的浓度 EC_2 为 $1.36 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

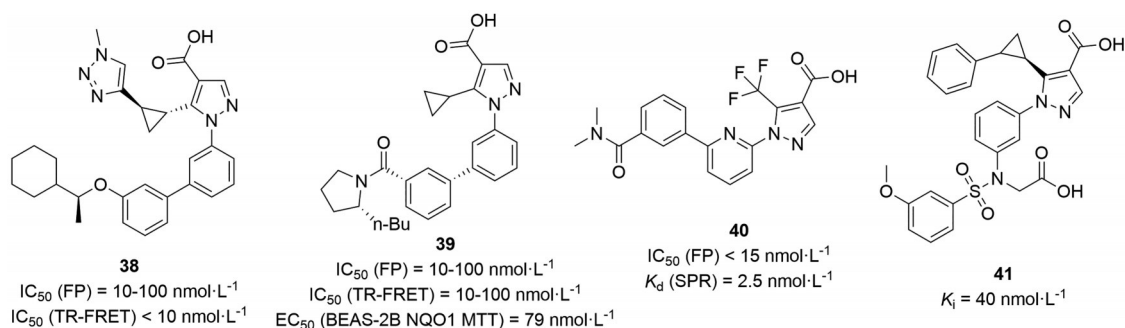
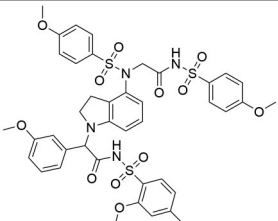
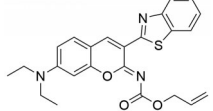
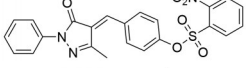
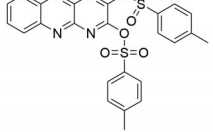
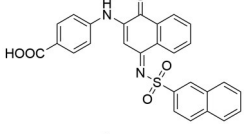
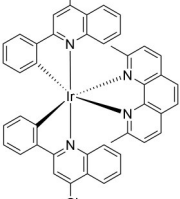


Figure 9 The structures of pyrazole carboxylic acid small molecule inhibitors **38-41**

Table 1 Other Keap1-Nrf2 protein-protein interaction small molecule inhibitors

Compd.	Structure	Activity	Ref.
42		IC_{50} (2D-FIDA) = 118 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[15]
43		EC_{50} (FP) = 9.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[53]
44		K_d (FA) = 2.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[34]
45		K_d (FA) = 10.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[34]
46		/	[54]
47		EC_2 (SPR) = 1.36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[55]

Compd.	Structure	Activity	Ref.
48		$IC_{50} = 22 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $K_d = 58.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[56]
49		$K_d \text{ (FP)} = 5.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $K_d \text{ (SPR)} = 48.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[57]
50		$EC_{50} = 1.46 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[58]
51		$IC_{50} \text{ (FP)} = 258 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $K_d \text{ (SPR)} = 114 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[59]
52		$IC_{50} \text{ (FP)} = 2.7 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $K_d \text{ (SPR)} = 158 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[59]
53		$IC_{50} \text{ (FP)} = 1.09 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $K_d \text{ (ITC)} = 0.71 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[60]

姜正羽课题组^[56]通过系统构效关系的研究发现一类以咪唑啉为母核的 Keap1-Nrf2 抑制剂, 化合物 **48** 是该系列中最有效的抑制剂, 体外 Keap1 抑制活性 $IC_{50} = 22 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 在 H9c2 心肌细胞中可有效激活 Nrf2, 并且呈剂量依赖性上调 Nrf2 相关基因和蛋白水平, 并且在体内外对脂多糖诱导的 H9c2 心肌细胞损伤均有保护作用。

本课题组从合成化合物文库中鉴定出了一种新的 Keap1-Nrf2 蛋白-蛋白相互作用抑制剂 **49**^[57]。该化合物通过 FP 实验测得靶点亲和力 K_d 为 $5.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SPR 实验测得 $K_d = 48.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在体外诱导 Nrf2 核易位, 进而导致 Nrf2 靶基因 HO-1 和 NQO1 的水平升高。同时, 该化合物抑制了 LPS 诱导的 H9c2 心肌细胞中 ROS 的产生和促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 水平, 体内可发挥较好的抗小鼠脓毒性心肌病的作用。

2020 年, Kim 等^[58]通过虚拟筛选的方法寻找能够干扰 Keap1-Nrf2 相互作用的新型抑制剂 **50**, $EC_{50} = 1.46 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其可以作为治疗帕金森病的一种有效方

法。Gorgulla 等^[59]利用 VirtualFlow 平台有效地筛选了超过 10 亿种化合物超大型库, 并识别了一组具有不同结构类型的分子, 以亚微摩尔亲和力与 Keap1 结合。其中, 化合物 **51** 具有纳摩尔的亲和力 ($K_d = 114 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 并破坏 Keap1 与 Nrf2 之间的相互作用; 化合物 **52** 的 $K_d = 158 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $IC_{50} = 2.7 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2021 年, Li 等^[60]设计并合成了一系列铱 (iridium, Ir) 和铑 (rhodium, Rh) 配合物作为 Keap1-Nrf2 抑制剂, 激活 Nrf2, 具有抗氧化应激的活性。其中, 活性最高的化合物 **53** 含有 2,9-二甲基-1,10-邻菲罗啉和 4-氯-2-苯基咪唑生物活性配体, 与 Keap1 蛋白结合 IC_{50} (FP) 值为 $1.09 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_d 值为 $0.71 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 可以促进人正常肝细胞 (LO2) 中 Nrf2 核转位并诱导 HO-1 和 NQO1 的上调表达, 体内可逆转对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 诱导的肝损伤, 不引起小鼠器官损伤和免疫毒性, 且具有良好的细胞通透性和体内药代动力学性质, 可以作为新型金属有机类 Keap1-Nrf2 PPI 相互作用抑制剂, 用于治疗 APAP 诱导的急性肝损伤。

1.6 天然产物类 Keap1-Nrf2 小分子抑制剂 LM49

是一种溴酚类似物, 此前报道其具有很强的抗氧化能力, 参与了 Keap1-Nrf2 途径。Feng 等^[61]将氮化杂环和氟原子引入到 LM49 中制备了 27 种含氟苯酚, 其中化合物 **54** (图 10) 的 $EC_{50} = 0.82 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 通过氢键与 Keap1 蛋白稳定结合发挥抗氧化作用, 具有较好的水溶性和成盐可能性, 是一类新型 Keap1-Nrf2 蛋白-蛋白相互作用抑制剂。

化合物 **55** 是 Zhang 等^[62]从吴茱萸中分离得到的吴茱萸次碱, 具有一定 Keap1-Nrf2 抑制活性, 该化合物可直接与 Keap1 的 Kelch 域结合, 从而抑制 Keap1 蛋白与 Nrf2 的相互作用, 其 $K_d = 19.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 HCT116 细胞中, 吴茱萸次碱可通过激活 Nrf2 减轻 H_2O_2 所造成的损伤, 并对 DSS 诱导的结肠炎模型有一定的保护作用。

2020 年, Yang 等^[63]合成了一种新型的胡椒碱衍生物能与 Keap1 结合, 并在体外激活 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路。研究表明, 化合物 **56** (HJ22) 通过抑制 Keap1 与 Nrf2 的相互作用而上调核 Nrf2 的表达, 从而抑制氧化应激和人硫氧还蛋白互作蛋白 (thioredoxin-interacting protein, TXNIP) 介导的核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体的激活。该衍生物可以显著减轻鹅膏蕈氨酸 (ibotenic acid, IBO) 诱导的大鼠认知功能障碍、细胞凋亡、神经炎症和氧化应激, 具有治疗阿尔茨海默症的潜力。

最近, Zhang 等^[64]将红枫中提取得到的多酚 ginnalin A (GA) 进行分子对接, 结果表明 GA 通过氢键和疏水相互作用, 很好地结合于 Keap1 Kelch 结构域的 3 个口袋 (P1、P2、P3)。课题组还通过敲除 Nrf2 证实了化合物 **57** 仅通过 Keap1/Nrf2-ARE 途径发挥生物效应, 可增强神经细胞抗氧化防御系统以抵消氧化应激。

2 大环类 Keap1-Nrf2 抑制剂

大环化合物 (macrocylic compounds, MCs) 在靶向蛋白质相互作用方面具有良好的发展潜力和挑战性。80% 的 MCs 相对分子质量大于 500, 不符合“类药五规则”, 但是其具有高度灵活性, 能与具有大而平坦或沟槽状结合位点的靶点结合, 实现高亲和性和高选择性^[65]。

2018 年, 姜正羽课题组^[66]设计了一种环肽, 序列为 c[GQLDPETGEFL] (**58**, 图 11), 与 Keap1 具有较高的结合力 (ITC 实验中 K_d 值为 $18.12 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; BLI 实验中 K_d 值为 $6.19 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), FP 实验中表现出对 Keap1-Nrf2 PPI 较强的抑制作用 (IC_{50} 为 $18.31 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。 **58** 在细胞水平上通过激活 Nrf2 调控的防御系统和抗氧化能力, 在小鼠 RAW 264.7 细胞中表现出良好的抗炎作用。2021 年, Whitty 课题组^[67]根据 Nrf2 序列 DxETGE 结合蛋白晶体结构合成了线性 7-mer 多肽 (Ac-GDEETGE-NH₂), 该多肽和 Keap1 Kelch 结构域结合力 K_i 仅为 $4.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其活性不高的原因可能是 LEU-84 和 N-端乙酰基之间的分子内氢键以及 LEU-84 的酰胺基团和 Keap1 ASN-387 的分子间极性相互作用的缺失。然后, 通过环化优化锁定多肽构象, 该环状 7-mer 多肽 **59** 序列为 c[(D)- β -homoAla-DPETGE], 与 Keap1 相互作用残基没有任何改变, 但稳定的结合构象将与 Keap1 Kelch 结合力 K_i 提高至 $20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Fasan 小组^[68]报道了一种新型非还原性硫醚桥约束的大环多肽组合库 (MOrPH-PhD) 的构建, 并评估了该平台用于发现大环肽化合物针对 Keap1-Nrf2 结合抑制功能性方面的高通量筛选应用研究。筛选发现了化合物 **60** (图 12) 表现出最低的纳摩尔级的亲和力, K_d 仅为 $40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

近期, Begnini 等^[69]进行天然产物的分子对接筛选, 发现了一种新的环状 Keap1-Nrf2 PPI 抑制剂 **61**, 该

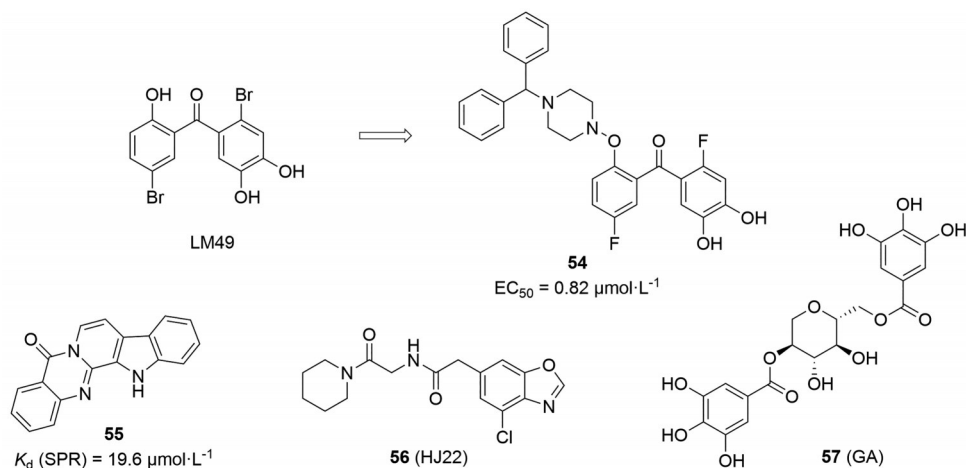


Figure 10 The structures of natural Keap1-Nrf2 protein-protein interaction small molecule inhibitors **54-57**

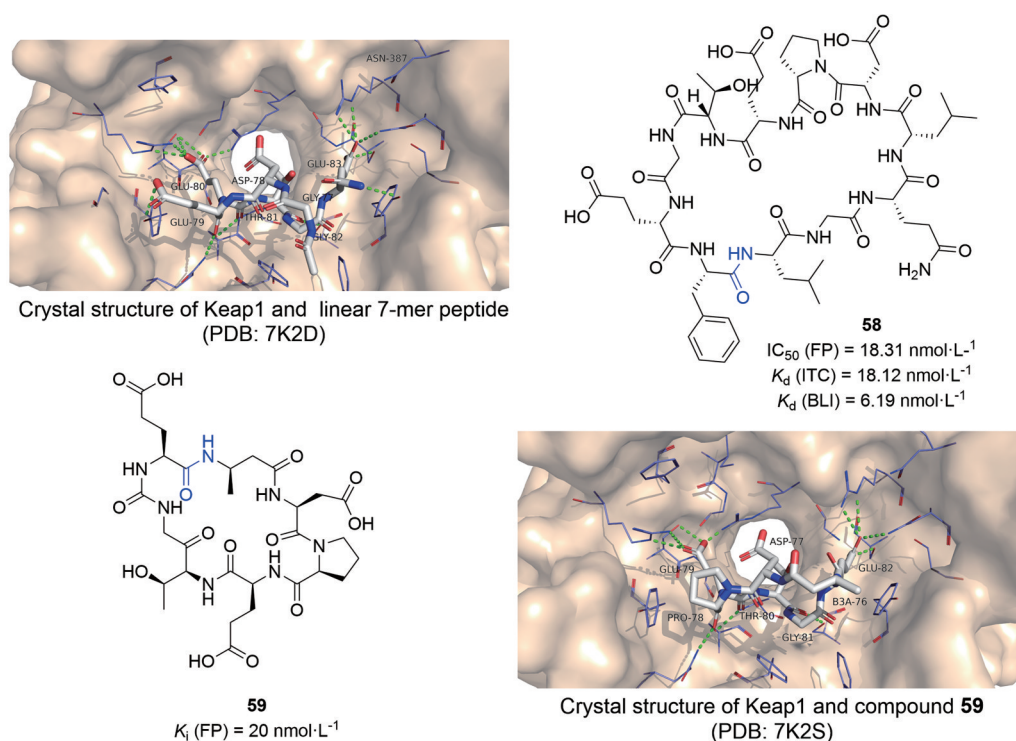


Figure 11 The crystal structures of Keap1 with linear 7-mer peptide and compound **59** and the chemical structures of compounds **58** and **59**

化合物与 Keap1 结合能力 $K_d = 4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。共晶显示, 该环状抑制剂和 Keap1 蛋白上 3 个精氨酸残基 ARG-380、ARG-415 和 ARG-483 侧链高度结合, 苯环嵌入 ALA-556 和 ARG-415 之间形成阳离子- π 相互作用, C-端的二甲酰胺与 TYR-572 相互叠加, 对苯甲酸部分与 ARG-483 形成双盐桥。构效关系研究发现, **61** 的脯氨酸酰基和邻硫亚甲基苯环适合进一步优化, 脯氨酸上引入不同取代基后亲和力略有增加 (微摩尔范围); 而在邻硫亚甲基苯环上引入苯环取代, 增强与 ARG-483 相互作用, 亲和力比 **61** 提高了近 100 倍。其中, 化合物 **62**~**64** 与 Keap1 结合能力最优, 在 ITC 实验中 K_d 值分别为 68、29、29 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该类化合物具有较高的水溶性, 在体外人肝微粒体中稳定性较好。

3 Keap1-PROTACs

PROTACs 是一种异双功能分子, 作用机制是招募 E3 泛素连接酶于靶蛋白 (protein of interest, POI) 上, 泛素化靶蛋白进而将靶蛋白降解, 逐渐成为新药开发的热点之一^[70]。目前研究表明人体内有将近 600 种 E3 连接酶, 其中人小脑蛋白 (cereblon, CRBN) 和肿瘤抑制蛋白 (von hippel-lindau, VHL) 已经较为广泛地被用作 PROTAC 的研究。Keap1 是 cullin 3 E3 连接酶复合物的的重要组成部分, 在生物体内起着调控 Nrf2 蛋白水平的作用。通常情况下, Keap1 和 cullin 3 骨架蛋白、RBX1 蛋白结合成复合物, 随后结合 Nrf2 蛋白并介导其泛素化, 最后使其降解, 维持正常的生理功能^[71]。因

此, Keap1-cullin 3 E3 连接酶复合物是一种非常有效的 E3 泛素化系统, 可能被用于 PROTAC 的设计, 招募 Keap1 蛋白实现关键靶点的降解。

姜正羽课题组^[72]报道了一种依赖于 Keap1 泛素化-蛋白酶体降解途径来降解 Tau 蛋白的肽类 PROTAC (peptide 1, **65**, 图 13)。**65** 在体外与 Keap1 和 Tau 具有很强的结合能力, 与两个蛋白结合的 K_d 值分别为 22.8 和 763 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。流式细胞术和蛋白印迹分析结果显示, **65** 能进入野生型人骨髓神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y, 并以时间和浓度依赖性下调细胞内 Tau 蛋白水平。通过 Keap1 敲除和应用蛋白酶体抑制剂 MG132 等方式证实了 **65** 可以诱导 Tau 蛋白降解是依赖于 Keap1 泛素化蛋白酶体体系的。但值得注意的是, 这类肽类 PROTAC 的膜渗透性和药代动力学性质仍不理想, 有待进一步优化。该研究提示, 利用 PROTACs 招募 Keap1 诱导 Tau 蛋白降解可能在神经退行性疾病的治疗中具有良好的应用前景。

茛菪酰胺 (piperlongumine, PL) 可诱导 ROS 的表达, 可以与 Keap1 E3 连接酶发生共价结合, 抑制肿瘤细胞的生长^[73]。基于这个 Keap1 E3 配体 PL, Pei 等^[74]将周期素依赖性激酶 9 (cell division protein kinase 9, CDK9) 选择性抑制剂 SNS-032 以不同连接方式与 PL 相连, 获得一系列 PROTACs, 其中化合物 **66** 可以共价结合的方式与 Keap1 E3 连接酶结合, 以泛素-蛋白酶体依赖的方式有效地降解 CDK9。在体外 MOLT4 细

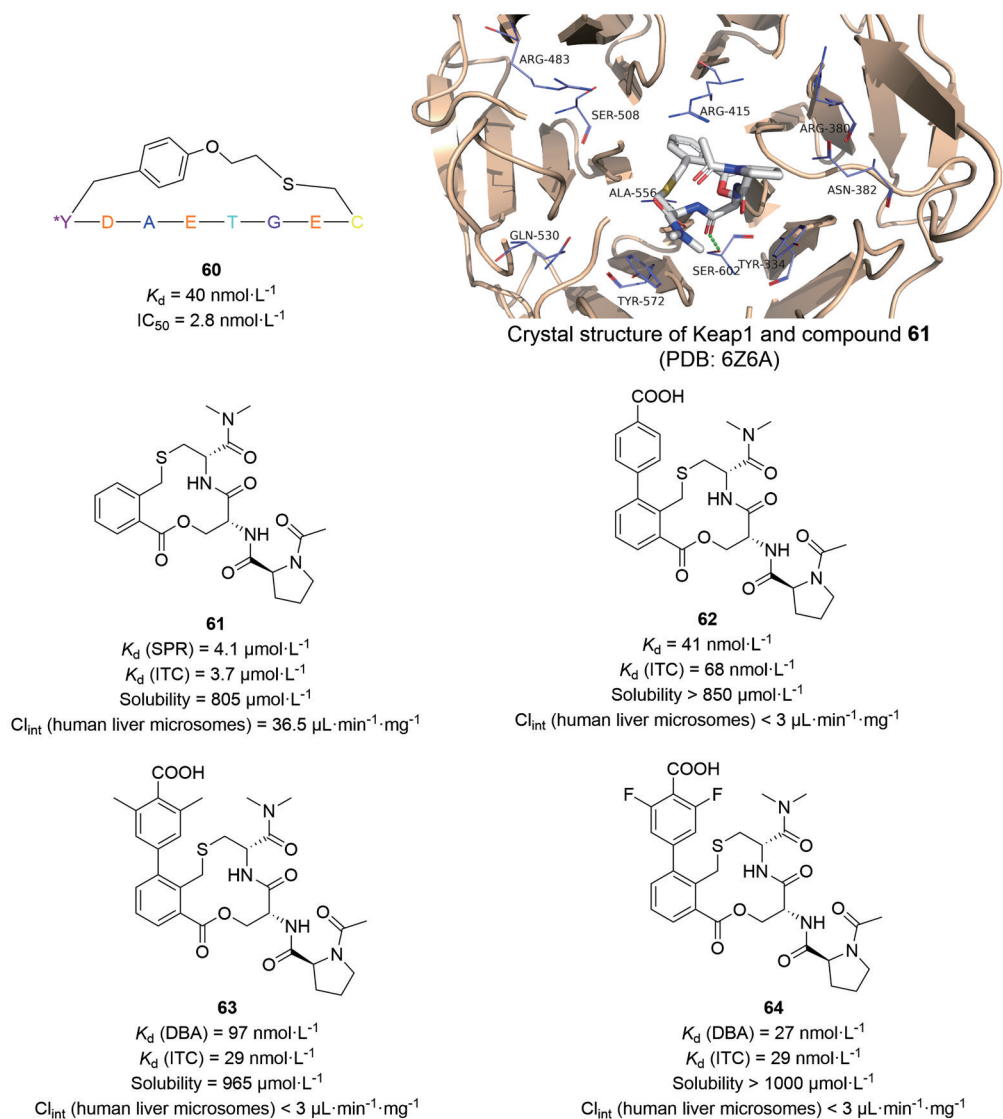


Figure 12 The crystal structures of Keap1 with compound **61**. The structures of compounds **60–64**

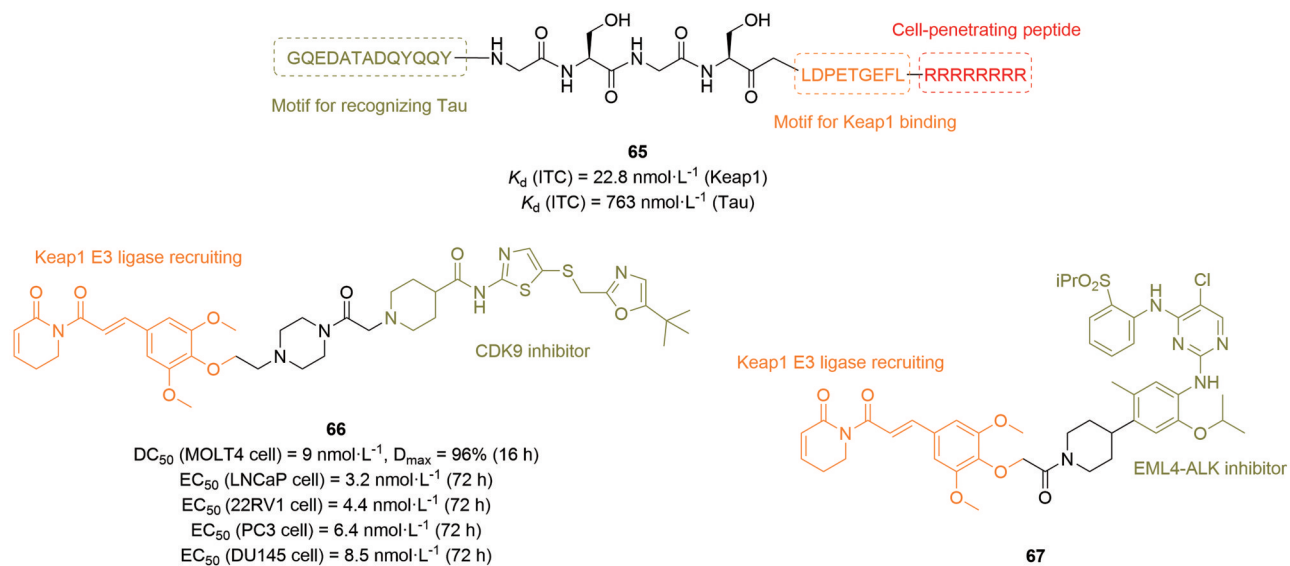


Figure 13 The structures of compounds **65–67**

胞中处理 16 h 后, **66** 能对 CDK9 进行有效降解 ($D_{\max} = 96\%$, $DC_{50} = 9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 即使短期 (6 h) 处理, **66** 仍能对 CDK9 进行有效降解, 而抑制剂 SNS-032 不能降解靶蛋白。为进一步评价 PL 能否作为一种新的 Keap1 E3 连接酶配体来降解肿瘤蛋白, 该课题组设计合成了另一种 PROTAC **67**, 结果表明, 在 NCI-H2228 NSCLC 细胞中 **67** 也可通过招募 Keap1 来介导 EML4-ALK 以浓度依赖性的方式降解。

CDDO 的 α -氰烯酮结构能够与 Keap1 蛋白上的半胱氨酸发生可逆共价结合。2020 年, Tong 等^[75]报道了 CDDO 作为 Keap1 E3 连接酶配体和含溴结构域蛋白 4 (bromodomain, BRD4) 抑制剂 JQ1 连接为异双功能分子 **68** (CDDO-JQ1, 图 14), 在人乳腺癌 231MFP 细胞中可有效降解 BRD4 蛋白, 当浓度低于 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 该分子呈现剂量依赖性降解, 当浓度较高 ($\geq 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 时, 可能是由于钩状效应 (Hook 效应) 导致 BRD4 蛋白降解的消失。由于 CDDO 与半胱氨酸相互作用具有高度可逆性, 直接检测 CDDO 的所有蛋白质组靶点具有挑战性, 因此目前不能排除 CDDO-JQ1 也可能共价修饰其他 E3 连接酶实现靶向蛋白质降解。

2021 年, Wei 等^[76]根据 Expression Atlas 数据库, 与 CRBN、VHL、RNF4、RNF114 等 E3 泛素酶相比, Keap1 蛋白表达水平在人的多种组织有明显的分布。因此, 以高活性化合物 **34** 为 Keap1 配体招募 E3 连接酶 Keap1 蛋白, 设计 Keap1-BRD4 PROTACs, 采用 BRD4 抑制剂 JQ1 作用于靶蛋白, 经过连接器筛选获得活性化合物 **69**, K_d 值为 $16 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为了增强化合物分子的膜渗透性, 将羧酸基团用乙酯基团替代。化合物 **69** 以浓度依赖、时间依赖、Keap1 依赖和泛素化蛋白酶体依赖的方式有效降低了细胞中 BRD4 的蛋白水平。这些研究进一步证明了 Keap1 作为 E3 泛素化系统设计降解剂的潜力, 进一步扩充了可靶向蛋白降解的 E3 泛素酶工具库。

4 总结与展望

近年来, 多种类型的 Keap1-Nrf2 蛋白相互作用小

分子抑制剂的发现取得了极大进展, 最有效的抑制剂活性已达到纳摩尔级别, 并且多个化合物在动物模型上已经被证实可以激活体内 Nrf2, 发挥多种氧化应激相关疾病治疗效果, 并鲜有发现其明显的毒性作用。因此, 通过直接抑制 Keap1-Nrf2 PPI 的策略来取代共价化合物修饰 Keap1 半胱氨酸残基, 是避免了共价抑制剂作用于其他细胞蛋白的半胱氨酸而发生“脱靶”效应的有效策略。目前已知 Keap1 和 Nrf2 蛋白与多种疾病的发生有密切关系, 包括炎症、糖尿病、癌症和中枢神经退行性疾病 (尤其是阿尔茨海默病和帕金森病) 等多种慢性疾病^[77,78], 不论是参与 Keap1-Nrf2 蛋白相互作用的抑制剂还是基于 Keap1 E3 泛素化系统的降解剂都为改善人类健康提供了新的思路。

这些 PPI 抑制剂获得突破性进展的同时, 靶向性、成药性以及生物学功能等方面也一直面临诸多挑战。首先, 如何让小分子抑制剂靶向作用于特定部位是当前需要用药物化学或其他药学手段解决的关键科学问题之一。大部分 Keap1-Nrf2 PPI 抑制剂含有羧酸等极性基团, 而这又是发挥 PPI 抑制活性的非常关键的药效团。在脑部疾病的治疗中, 这些极性基团导致化合物不易透过血脑屏障, 产生较差的药代动力学性质而不易产生明确药效。其次, 这类分子疏水性很强, 导致分子的性质不是非常理想, 溶解性不佳, 导致口服给药的生物利用度不佳, 至今只有几个分子报道了生物利用度, 但也不高; 因此, 通过药物化学策略, 如前药策略、基团添加策略、骨架跃迁策略等, 改善抑制剂的性质, 是这类分子需要重点关注的另一个关键科学问题。第三, Nrf2 在疾病中的作用机制及功能需要进一步研究。比如, 肿瘤中 Nrf2 一方面保护正常细胞免受 ROS 诱导 DNA 损伤的同时恶性肿瘤细胞也受到保护; 另一方面在正常组织中 Nrf2 可抑制肿瘤的形成, 而在肿瘤组织中 Nrf2 引发的保护性反应可为特定肿瘤组织提供生长优势^[79,80], 因此, 有必要深入研究分子的作用机制, 根据 Nrf2 的不同功能选择性地应用于肿瘤治疗。

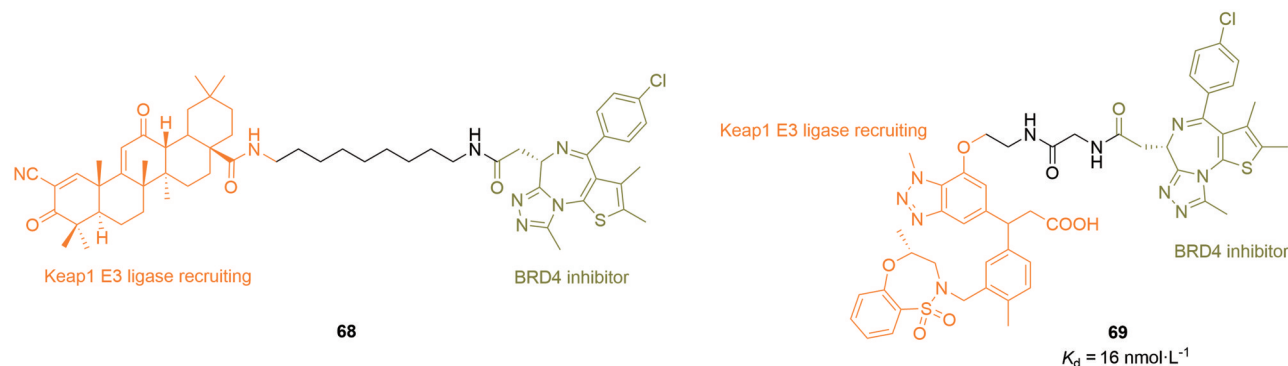


Figure 14 The structures of compounds **68** and **69**

PROTACs 技术是一种化学敲除方式, 虽然大量研究已经表明通过生物手段敲除 Nrf2 是可行的, 通过蛋白降解方式敲除 Keap1 或 Nrf2 可能为研究该通路提供新的工具; 此外, Keap1 作为一种新型的 E3 泛素连接酶为 PROTACs 的设计提供了新的方向和思路, 扩展了可用的 E3 工具库。总而言之, Keap1-Nrf2 PPI 抑制剂及降解剂研究在药物开发及生物学功能研究领域是非常值得期待的热点。

作者贡献: 闫健羽负责文献检索、图片制作、数据核对及综述撰写; 刘国栋参与综述初稿撰写; 缪震元、庄春林负责为综述撰写思路并对稿件进行修改和审校。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Boutten A, Goven D, Artaud-Macari E, et al. Nrf2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Trends Mol Med*, 2011, 17: 363-371.
- [2] Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34: 340-346.
- [3] Dodson M, de la Vega MR, Cholanians AB, et al. Modulating Nrf2 in disease: timing is everything [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2019, 59: 555-575.
- [4] Qu Z, Sun JC, Zhang WN, et al. Transcription factor Nrf2 as a promising therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 159: 87-102.
- [5] Wilson AJ, Kerns JK, Callahan JF, et al. Keap calm, and carry on covalently [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 7463-7476.
- [6] 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: 678-692.
- [7] Lee S, Hu LQ. Nrf2 activation through the inhibition of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction [J]. *Med Chem Res*, 2020, 29: 846-867.
- [8] Pergola PE, Raskin P, Toto RD, et al. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365: 327-336.
- [9] Chertow GM, Appel GB, Andreoli S, et al. Study design and baseline characteristics of the cardinal trial: a phase 3 study of bardoxolone methyl in patients with alport syndrome [J]. *Am J Nephrol*, 2021, 52: 180-189.
- [10] Magesh S, Chen Y, Hu LQ. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents [J]. *Med Res Rev*, 2012, 32: 687-726.
- [11] Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update [J]. *Med Res Rev*, 2016, 36: 924-963.
- [12] Zhuang CL, Wu ZL, Xing CG, et al. Small molecules inhibiting Keap1-Nrf2 protein-protein interactions: a novel approach to activate Nrf2 function [J]. *Medchemcomm*, 2017, 8: 286-294.
- [13] Mou Y, Wen S, Li YX, et al. Recent progress in Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 202: 112532.
- [14] Scott DE, Bayly AR, Abell C, et al. Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein-protein interaction challenge [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15: 533-550.
- [15] Marcotte D, Zeng WK, Hus JC, et al. Small molecules inhibit the interaction of Nrf2 and the Keap1 Kelch domain through a non-covalent mechanism [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 4011-4019.
- [16] Jiang ZY, Lu MC, Xu LL, et al. Discovery of potent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor based on molecular binding determinants analysis [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 2736-2745.
- [17] Jiang ZY, Xu LL, Lu MC, et al. Structure-activity and structure-property relationship and exploratory *in vivo* evaluation of the nanomolar Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 6410-6421.
- [18] Lu MC, Tan SJ, Ji JA, et al. Polar recognition group study of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2016, 7: 835-840.
- [19] Abed DA, Lee S, Wen X, et al. Optimization of 1,4-bis(arylsulfonamido) naphthalene-*N,N'*-diacetic acids as inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction to suppress neuroinflammation [J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, 44: 116300.
- [20] Winkel AF, Engel CK, Margerie D, et al. Characterization of RA839, a noncovalent small molecule binder to Keap1 and selective activator of Nrf2 signaling [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290: 28446-28455.
- [21] Lu MC, Zhang X, Wu F, et al. Discovery of a potent Kelch-like ECH-associated protein 1-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Keap1-Nrf2) protein-protein interaction inhibitor with natural proline structure as a cytoprotective agent against acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 6796-6813.
- [22] Richardson BG, Jain AD, Potteti HR, et al. Replacement of a naphthalene scaffold in Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 8029-8047.
- [23] Lazzara PR, David BP, Ankireddy A, et al. Isoquinoline Kelch-like ECH-associated protein 1-nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Keap1-Nrf2) inhibitors with high metabolic stability [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 6547-6560.
- [24] Lu MC, Zhang X, Zhao J, et al. A hydrogen peroxide responsive prodrug of Keap1-Nrf2 inhibitor for improving oral absorption and selective activation in inflammatory conditions [J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101565.
- [25] Abed DA, Lee S, Hu LQ, et al. Discovery of disubstituted xylylene derivatives as small molecule direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction [J]. *Bioorg Med Chem*,

- 2020, 28: 115343.
- [26] Pinal R. Effect of molecular symmetry on melting temperature and solubility [J]. *Org Biomol Chem*, 2004, 2: 2692-2699.
- [27] Sun Y, Huang JX, Chen YF, et al. Direct inhibition of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 103: 104172.
- [28] Kensler TW, Egner PA, Agyeman AS, et al. Keap1-nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane [J]. *Top Curr Chem*, 2013, 329: 163-177.
- [29] Singh K, Connors SL, Macklin EA, et al. Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 15550-15555.
- [30] Zhang L, Xu LJ, Chen HH, et al. Structure-based molecular hybridization design of Keap1-Nrf2 inhibitors as novel protective agents of acute lung injury [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 222: 113599.
- [31] Liu GD, Hou RL, Xu LJ, et al. Crystallography-guided optimizations of the Keap1-Nrf2 inhibitors on the solvent exposed region: from symmetric to asymmetric naphthalenesulfonamides [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 8289-8302.
- [32] Lazzara PR, Jain AD, Maldonado AC, et al. Synthesis and evaluation of noncovalent naphthalene-based Keap1-Nrf2 Inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11: 521-527.
- [33] Lu MC, Shao HL, Liu T, et al. Discovery of 2-oxy-2-phenylacetic acid substituted naphthalene sulfonamide derivatives as potent KEAP1-NRF2 protein-protein interaction inhibitors for inflammatory conditions [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 207: 112734.
- [34] Meng N, Tang H, Zhang H, et al. Fragment-growing guided design of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors for targeting myocarditis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 228-237.
- [35] Zhuang CL, Narayanapillai S, Zhang WN, et al. Rapid identification of Keap1-Nrf2 small-molecule inhibitors through structure-based virtual screening and hit-based substructure search [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 1121-1126.
- [36] Lee SM, Abed DA, Nguyen MU, et al. Structure-activity relationships of 1,4-bis(arylsulfonamido)-benzene or naphthalene-*N,N'*-diacetic acids with varying C2-substituents as inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 237: 114380.
- [37] Georgakopoulos N, Talapatra S, Dikovskaya D, et al. Phenyl bis-sulfonamide Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors with an alternative binding mode [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 7380-7398.
- [38] Yasuda D, Yuasa A, Obata R, et al. Discovery of benzo[g]indoles as a novel class of non-covalent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27: 5006-5009.
- [39] Hu LQ, Magesh S, Chen L, et al. Discovery of a small-molecule inhibitor and cellular probe of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 3039-3043.
- [40] Abed DA, Goldstein M, Albanyan H, et al. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 285-299.
- [41] Jnoff E, Albrecht C, Barker JJ, et al. Binding mode and structure-activity relationships around direct inhibitors of the Nrf2-Keap1 complex [J]. *ChemMedChem*, 2014, 9: 699-705.
- [42] Ontoria JM, Biancofiore I, Fezzardi P, et al. Combined peptide and small-molecule approach toward nonacidic THIQ inhibitors of the Keap1/Nrf2 interaction [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11: 740-746.
- [43] Ma B, Lucas B, Capacci A, et al. Design, synthesis and identification of novel, orally bioavailable non-covalent Nrf2 activators [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30: 126852.
- [44] Bertrand HC, Schaap M, Baird L, et al. Design, synthesis, and evaluation of triazole derivatives that induce Nrf2 dependent gene products and inhibit the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 7186-7194.
- [45] Kerr F, Sofola-Adesakin O, Ivanov DK, et al. Direct Keap1-Nrf2 disruption as a potential therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *PLoS Genet*, 2017, 13: e1006593.
- [46] Davies TG, Wixted WE, Coyle JE, et al. Monoacidic inhibitors of the Kelch-like ECH-associated protein 1: nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Keap1:Nrf2) protein protein interaction with high cell potency identified by fragment-based discovery [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 3991-4006.
- [47] Heightman TD, Callahan JF, Chiarparin E, et al. Structure-activity and structure-conformation relationships of aryl propionic acid inhibitors of the Kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Keap1/Nrf2) protein-protein interaction [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 4683-4702.
- [48] Kazantsev AG, Thompson LM, Abagyan R, et al. Small molecule activators of Nrf2 pathway: US, 9737525 B2 [P]. 2017-08-22.
- [49] Callahan J, Kerns JK, Li P, et al. Biaryl pyrazoles as Nrf2 regulators: US, 10364256 B2 [P]. 2019-07-30.
- [50] Callahan J, Kerns JK, Li T, et al. Arylcyclohexyl pyrazoles as Nrf2 regulators: US, 10351530 B2 [P]. 2019-07-16.
- [51] Norton D, Bonnette WG, Callahan JF, et al. Fragment-guided discovery of pyrazole carboxylic acid inhibitors of the Kelch-like ECH-associated protein 1: nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Keap1: Nrf2) protein-protein interaction [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 15949-15972.
- [52] Pallesen JS, Narayanan D, Tran KT, et al. Deconstructing noncovalent Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) inhibitors into fragments to reconstruct new potent compounds [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 4623-4661.
- [53] Sun HP, Jiang ZY, Zhang MY, et al. Novel protein-protein interaction inhibitor of Nrf2-Keap1 discovered by structure-based virtual screening [J]. *MedChemComm*, 2014, 5: 93-98.

- [54] Satoh M, Saburi H, Tanaka T, et al. Multiple binding modes of a small molecule to human Keap1 revealed by X-ray crystallography and molecular dynamics simulation [J]. FEBS Open Bio, 2015, 5: 557-570.
- [55] Shimozono R, Asaoka Y, Yoshizawa Y, et al. Nrf2 activators attenuate the progression of nonalcoholic steatohepatitis-related fibrosis in a dietary rat model [J]. Mol Pharmacol, 2013, 84: 62-70.
- [56] Zhou HS, Hu LB, Zhang H, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of indoline-based Kelch-like ECH-associated protein 1-nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Keap1-Nrf2) protein-protein interaction inhibitors [J]. J Med Chem, 2020, 63: 11149-11168.
- [57] Jiang CS, Zhuang CL, Zhu KK, et al. Identification of a novel small-molecule Keap1-Nrf2 PPI inhibitor with cytoprotective effects on LPS-induced cardiomyopathy [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2018, 33: 833-841.
- [58] Kim S, Indu Viswanath AN, Park JH, et al. Nrf2 activator *via* interference of Nrf2-Keap1 interaction has antioxidant and anti-inflammatory properties in Parkinson's disease animal model [J]. Neuropharmacology, 2020, 167: 107989.
- [59] Gorgulla C, Boeszoermenyi A, Wang ZF, et al. An open-source drug discovery platform enables ultra-large virtual screens [J]. Nature, 2020, 580: 663.
- [60] Li GD, Liu H, Feng RB, et al. A bioactive ligand-conjugated iridium (III) metal-based complex as a Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor against acetaminophen-induced acute liver injury [J]. Redox Biol, 2021, 48: 102129.
- [61] Feng XE, Kong DP, Ban SR, et al. Fluorophenols bearing nitrogenated heterocycle moieties, a class of novel Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors: synthesis, antioxidant stress screening and molecular docking [J]. Med Chem Res, 2019, 28: 1319-1337.
- [62] Zhang YB, Yan TT, Sun DX, et al. Rutaecarpine inhibits Keap1-Nrf2 interaction to activate Nrf2 and ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 148: 33-41.
- [63] Yang XP, Ji J, Liu CX, et al. HJ22, a novel derivative of piperine, attenuates ibotenic acid-induced cognitive impairment, oxidativestress, apoptosis and inflammation *via* inhibiting the protein-protein interaction of Keap1-Nrf2 [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 83: 106383.
- [64] Zhang Z, Peng LL, Fu Y, et al. Ginnalin A binds to the subpockets of Keap1 Kelch domain to activate the Nrf2-regulated antioxidant defense system in SH-SY5Y cells [J]. ACS Chem Neurosci, 2021, 12: 872-882.
- [65] Doak BC, Zheng J, Dobritzsch D, et al. How beyond rule of 5 drugs and clinical candidates bind to their targets [J]. J Med Chem, 2016, 59: 2312-2327.
- [66] Lu MC, Jiao Q, Liu T, et al. Discovery of a head-to-tail cyclic peptide as the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor with high cell potency [J]. Eur J Med Chem, 2018, 143: 1578-1589.
- [67] Ortet PC, Muellers SN, Viarengo-Baker LA, et al. Recapitulating the binding affinity of Nrf2 for Keap1 in a cyclic heptapeptide, guided by NMR, X-ray crystallography, and machine learning [J]. J Am Chem Soc, 2021, 143: 3779-3793.
- [68] Owens AE, Iannuzzelli JA, Gu Y, et al. MOrPH-PhD: an integrated phage display platform for the discovery of functional genetically encoded peptide macrocycles [J]. ACS Cent Sci, 2020, 6: 368-381.
- [69] Begnini F, Geschwindner S, Johansson P, et al. Importance of binding site hydration and flexibility revealed when optimizing a macrocyclic inhibitor of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction [J]. J Med Chem, 2022, 65: 3473-3517.
- [70] Wang Y, Jiang XY, Feng F, et al. Degradation of proteins by PROTACs and other strategies [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 207-238.
- [71] Genschik P, Sumara I, Lechner E. The emerging family of cullin3-ring ubiquitin ligases (CRL3s): cellular functions and disease implications [J]. EMBO J, 2013, 32: 2307-2320.
- [72] Lu MC, Liu T, Jiao Q, et al. Discovery of a Keap1-dependent peptide PROTAC to knockdown Tau by ubiquitination-proteasome degradation pathway [J]. Eur J Med Chem, 2018, 146: 251-259.
- [73] Ma H, Wu YL, Zhang WN, et al. Radiosensitization of human pancreatic cancer by piperlongumine analogues [J]. Chin Chem Lett, 2021, 32: 1197-1201.
- [74] Pei J, Xiao YF, Liu XG, et al. Identification of piperlongumine (PL) as a new E3 ligase ligand to induce targeted protein degradation [J]. bioRxiv, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.01.21.474712>.
- [75] Tong BQ, Luo M, Xie Y, et al. Bardoxolone conjugation enables targeted protein degradation of BRD4 [J]. Sci Rep, 2020, 10: 15543.
- [76] Wei JL, Meng FY, Park KS, et al. Harnessing the E3 ligase Keap1 for targeted protein degradation [J]. J Am Chem Soc, 2021, 143: 15073-15083.
- [77] Xie JL, Lin MB, Hou Q. Recent advances in the study of Nrf2 and inflammatory respiratory diseases [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 1080-1087.
- [78] Zhao CY, Wang XL, Peng Y. Role of Nrf2 in neurodegenerative diseases and recent progress of its activators [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 375-384.
- [79] Mou Y, Song Y, Wen S, et al. Research progress of Nrf2 inhibitor in tumor therapy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 321-330.
- [80] Jiang ZY, Lu MC, You QD. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) inhibition: an emerging strategy in cancer therapy [J]. J Med Chem, 2019, 62: 3840-3856.