

人中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂的研究进展

王中伟, 文 辉, 王雨辰, 崔华清*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 活性物质发现与适药化研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 人中性粒细胞弹性蛋白酶 (human neutrophil elastase, hNE) 是一种丝氨酸蛋白水解酶, 主要分布于中性粒细胞中。当体内抗 hNE 蛋白与 hNE 的平衡被打破, 过量释放的 hNE 会导致相关疾病的发生, 因此抑制 hNE 是一种很有前途的疾病治疗策略。本文简要介绍了 hNE 的结构、作用机制、生理功能及 hNE 抑制剂的研发现状, 以期能为相关研究提供参考。

关键词: 中性粒细胞弹性蛋白酶; 中性粒细胞弹性蛋白酶作用机制; 中性粒细胞弹性蛋白酶生理功能; 中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2023)04-0909-10

Research progress on the development of human neutrophil elastase inhibitors

WANG Zhong-wei, WEN Hui, WANG Yu-chen, CUI Hua-qing*

(Beijing Key Laboratory of Active Substance Discovery and Druggability Evaluation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Human neutrophil elastase (hNE) is a serine proteolytic enzyme mainly distributed in neutrophils. When the balance between anti-hNE protein and hNE is broken, excessive release of hNE can cause the occurrence of various diseases. Therefore, inhibition of hNE is a promising therapeutic strategy. In this paper, the structure, action mechanism, physiological function of hNE and the development of hNE inhibitors were briefly summarized, in order to provide information for the related research.

Key words: human neutrophil elastase; human neutrophil elastase mechanism; human neutrophil elastase physiological effect; human neutrophil elastase inhibitor

2019年末全球暴发由新型冠状病毒 COVID-19 引起的肺炎, 新冠肺炎给全球的经济生产和社会生活造成严重影响^[1-3]。新冠肺炎重症患者最具典型的症状为小气道黏液增多, 呼吸困难, 30% 以上的重症患者出现急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的临床并发症^[1-3]。值得一提的是, 研究发现人中性粒细胞弹性蛋白酶 (human neutrophil elastase, hNE) 小分子抑制剂能够有效缓解各类 ARDS 动物模型的症状^[4-6]。在过去的 30 多

年里, 不同研究机构报道了不同的 hNE 抑制剂。虽然多个 hNE 抑制剂进入临床研究, 但仅西维来司他 (sivelestat) 于 2002 年在日本被批准用于临床治疗 ARDS。新冠肺炎期间, 国家药监局也应急批准了注射用西维来司他钠作为新冠治疗药物。

1 hNE 分布与蛋白结构

hNE (EC 3.4.21.37) 是一种丝氨酸蛋白酶, 主要分布在中性粒细胞的嗜天青颗粒中, 在肥大细胞、成纤维细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞和角质形成细胞中也有分布^[7,8]。hNE 在中性粒细胞中的浓度超过 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 单个细胞中的 hNE 总量大约为 $3 \text{ pg}^{[9]}$ 。正常生理条件下, 这些高浓度的 hNE 在嗜天青颗粒中被严格调控^[10]。

收稿日期: 2022-10-17; 修回日期: 2022-12-09.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-028).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165248, E-mail: hcui@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1116

hNE 是一种含有 218 个氨基酸残基的多肽链糖蛋白, 包括两条由天冬酰胺连接的糖侧链和四对二硫键^[11]。hNE 含有 19 个精氨酸残基, 其中 18 个在蛋白质表面形成精氨酸簇^[12], 使蛋白质等电点偏碱性, pI 约为 10~11^[10]。一级结构与组织蛋白酶 G (cathepsin G, CG) 和蛋白酶 3 (proteinase 3, PR3) 具有同源性, 3 种蛋白酶都属于丝氨酸蛋白酶家族^[10]。

1986 年文献^[13]已经报道了 hNE 的晶体结构, 由两个同源 β -桶组成, 每个桶由 6 个反平行的 β -折叠和一个位于 C-端的 α -螺旋构成^[14]。hNE 的活性位点由两部分构成: 催化位点与结合位点^[15]。催化位点由 His57、Asp102 和 Ser195 构成, 这三个氨基酸残基位于两个 β -桶的交界处^[14]。而结合位点是在催化位点以外 hNE 与底物发生非共价相互作用的位点, 在 hNE 结构上对应的位点被称为 S_1 、 S_2 等, 而在底物上相对应的残基被称为 P_1 、 P_2 等^[15] (图 1)。 S_1 和 S_2 位点是两个较深的结合口袋, 位于 hNE 活性位点的结合裂缝处。相较于 S_2 位点, S_1 位点和 P_1 残基之间的相互作用更为重要, 通过修饰 S_1 位点的结合基团, 可以改变底物或抑制剂对 hNE 的选择性^[15]。

2 hNE 的活性作用机制

hNE 的 His57、Asp102 和 Ser195 通过氢键相互作用形成催化三联体, 然后通过酰化和去酰化过程对底物肽段进行水解^[11]。首先, 在酰化反应中, Asp102 羧基上的电子通过 His57 传递给 Ser195, 致使 Ser195 羟基上的氧原子具有很强的亲核性^[12], 这种具有强亲核作用的氧原子可以进攻底物肽键中的羰基碳, 与底物形成第一个四面体中间体。这个四面体中间体的氧负离子通过与主链 Gly193 和 Ser195 的 NH 相互作用而稳定^[16]。然后, 在酸性介质 His57-H⁺ 的辅助下, 该四面体中间体脱去 R_2 -NH₂, 生成酰基酶中间体^[16]。接着, 酰基酶中间体发生去酰化反应。该过程与酰化反应过程

相似, Asp102 羧基上的电子通过 His57 传递给水的氧原子, 致使氧原子带有一定的亲核性, 并进攻酰基酶中间体的羰基碳, 形成第二个四面体中间体^[16]。该中间体进一步分解, 产生羧酸产物 R_1 COOH, hNE 的催化三联体也得以恢复, 整个 hNE 催化水解过程结束。hNE 中的关键催化基团是 Ser195 的羟基^[15]。从 hNE 的活性作用机制来看, 如果设计的化合物能与 Ser195 形成四面体加合物, 可以竞争性地抑制 hNE 对底物肽段的水解活性。hNE 的水解机制见图 2^[17]。

3 hNE 生理与病理作用

hNE 能降解多种细胞外基质蛋白, 如弹性蛋白、蛋白聚糖、层粘连蛋白和纤连蛋白等^[18-20]。在正常生理过程中, hNE 可以通过降解这些组织结构蛋白, 来降解或修复受损组织, 以维持组织稳态。

在正常生理状态下, hNE 蛋白的水解活性受到多种内源性抑制剂的严格调控, 如 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶、elafin 和分泌性白细胞蛋白酶抑制剂等^[21]。然而, 在病理状态下, 内源性抗蛋白酶与 hNE 的平衡被打破, hNE 活性不受控制, 导致体内氧化剂暴露量增加, 抗氧化能力降低^[22,23]。hNE 的过度释放与富集, 可破坏正常的肺组织结构^[24], 导致肺气肿。同时也会诱导微血管通透性增加, 黏液分泌过多^[25,26], 导致慢性支气管炎。此外, 过量释放的 hNE 也会导致一些严重的心肺系统疾病^[5], 如慢性阻塞性肺疾病 (COPD)^[27]、囊性纤维化 (CF)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、支气管扩张 (BE)、急性肺损伤 (ALI)、特发性肺纤维化 (IPF) 和肺动脉高血压 (PAH) 等^[28,29]。

正常生理条件下, hNE 还可以通过降解细菌的结构蛋白^[30], 帮助中性粒细胞在炎症部位募集, 降低细菌感染, 参与炎症调节^[31]。有研究报道, hNE 还可以选择性地杀死癌细胞^[32], 并且 hNE 可以抑制多种原发性肿瘤的生长, 还可以增加细胞毒性 CD8⁺ T 细胞, 从而减

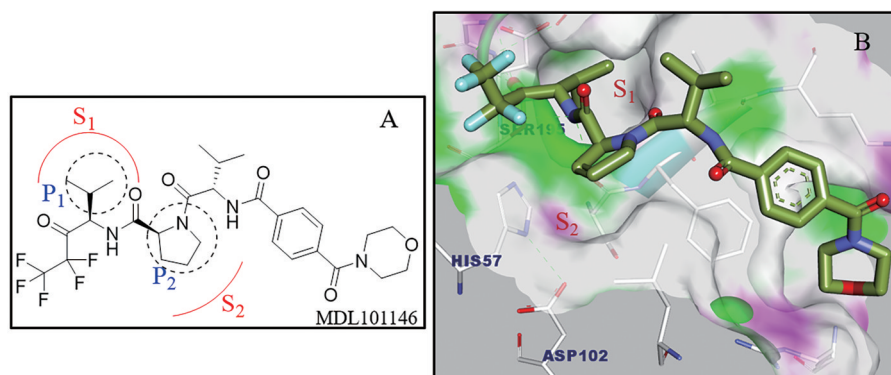


Figure 1 (A) The structure of MDL101146 (peptide hNE inhibitor). P_1 , P_2 are substrate residues that interact with S_1 and S_2 of human neutrophil elastase (hNE). (B) The binding mode of MDL101146 with hNE (PDB code: 1B0F). His57, Asp102 and Ser195 are the catalytic sites of the hNE

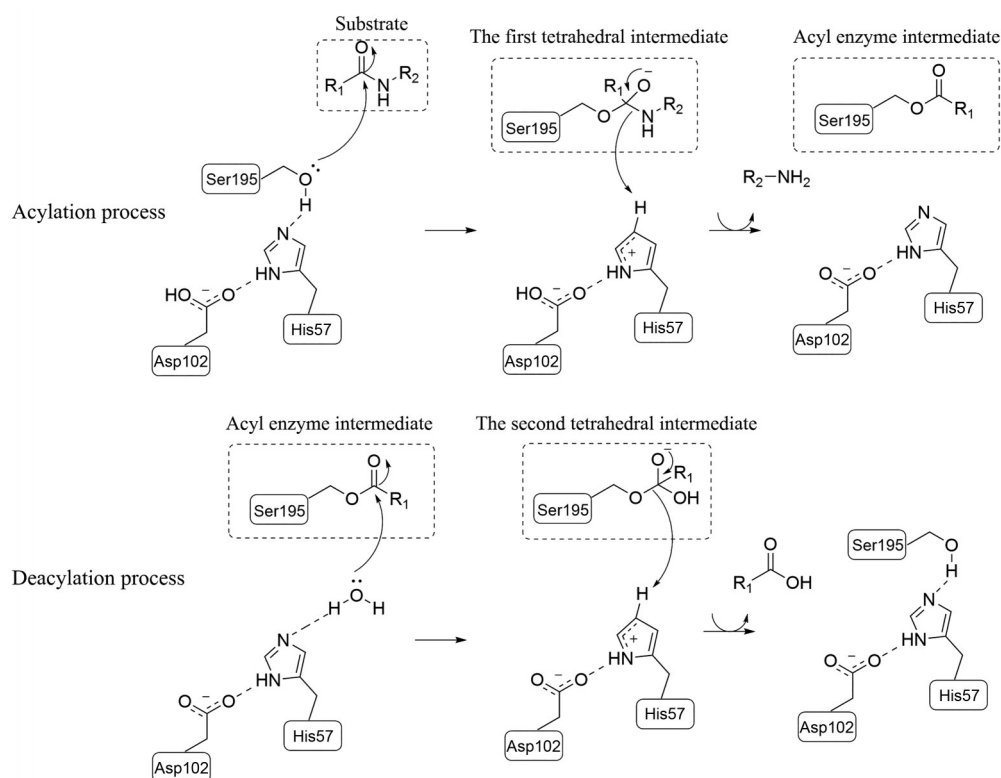


Figure 2 The hydrolytic mechanism of hNE

弱转移性肿瘤的生长^[32]。相关研究表明,对hNE的进一步研究可能有助于开发新的抗癌疗法。鉴于hNE作为疾病治疗靶标的广泛适用性,许多制药公司和科研单位正在研发有潜力的hNE抑制剂,来治疗相关疾病。

4 hNE抑制剂研究进展

过去的30多年里,研究者报道了多种不同结构类型的hNE抑制剂^[33]。通过查阅现有的文献和专利,本文将这些hNE抑制剂分为大分子和小分子hNE抑制剂分别进行介绍。大分子hNE抑制剂以内源性抑制剂为主,小分子hNE抑制剂则多是通过理性设计得到的一些化合物。

4.1 内源性大分子hNE抑制剂

大分子hNE抑制剂主要是一类内源性hNE抑制剂,与hNE具有互补的三级结构。它们在调节免疫应答中发挥重要作用。大分子hNE抑制剂包括 $\alpha 1$ 蛋白酶抑制剂($\alpha 1$ -proteinase inhibitor, $\alpha 1$ -PI)、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶($\alpha 1$ -anti-trypsin, AAT)、分泌性白细胞蛋白酶抑制剂(secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)、elafin、 $\alpha 1$ -抗胰凝乳蛋白酶($\alpha 1$ -anti-chymotrypsin, ACT)、 $\alpha 2$ -巨球蛋白和单核细胞中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂(MNEI或Serpain B1)^[21]等。

肝脏中产生的内源性 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶(AAT)是一种重要的中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂。AAT抑制

hNE的活性,从而保护组织免受hNE的损伤^[34]。在COPD患者体内,AAT水平升高以平衡hNE活性的增加,减少炎症^[29]。Elafin和SLPI也是在炎症部位产生的内源性hNE抑制剂^[35]。Elafin通过竞争性结合机制抑制hNE,从而发挥组织保护作用^[36]。hNE和elafin水平之间的失衡与ARDS死亡率相关^[37]。SLPI是一种由中性粒细胞、肥大细胞、上皮细胞和巨噬细胞产生的hNE抑制剂^[38]。SLPI通过抑制丝氨酸蛋白酶,减弱单核细胞/巨噬细胞对LPS的反应,从而预防细菌、真菌和病毒感染来控制炎症^[34,38]。Serpain B1是一种最有效的hNE抑制剂,由中性粒细胞和巨噬细胞产生。Serpain B1一般不分泌到细胞外,而是主要保留在细胞质和初级颗粒中^[39]。有研究表明,缺乏Serpain B1的中性粒细胞出现加速死亡的过程^[39]。

4.2 设计合成的小分子hNE抑制剂

与大分子hNE抑制剂相比,小分子抑制剂具有多种优势,包括较好的口服生物利用度、降低的免疫原性^[40]。此外,通过修饰小分子抑制剂的结构能够改善其药代动力学特性,从而得到更可靠的临床候选药物^[41]。下面总结了一些典型的小分子hNE抑制剂,主要包括以下几类。

4.2.1 小分子多肽类 多肽是一类研究较早的hNE抑制剂,同时为后来的小分子抑制剂的设计与合成奠

定了重要的基础^[42]。这类抑制剂具有类似的骨架结构(图3),结构修饰主要集中在R₁和R₂两部分^[42,43]。多肽类抑制剂在体外酶水平上的抑制活性较好,但体内药代动力学特性不佳^[43,44],导致其难以进入临床研究,主要原因是多肽类抑制剂的结构上含有多个肽键,进入体内后会被水解代谢,而不能发挥相应的抑制作用。

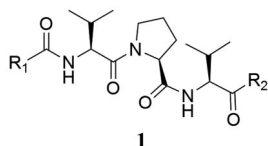


Figure 3 The general structure of peptide hNE inhibitor

研究进展较好的是POL6014(图4),它是由苏黎世大学与Polyphor公司利用蛋白质表位模拟物(protein epitope mimetics, PEM)研发的一种大环肽模拟物^[45]。POL6014是一种选择性好、具有口服活性的hNE小分子肽类抑制剂。POL6014目前处于临床II期试验,用于治疗囊性纤维化^[46,47]。

4.2.2 Sivelestat Sivelestat(ONO-5046, Elaspol[®]100)由日本小野制药公司研发,是一种已经上市的hNE小分子抑制剂,在日本等国家批准用于治疗ALI和ARDS^[48,49]。Sivelestat具有高度的hNE抑制特异性,不会影响体内其他蛋白酶的功能^[50],其中抑制hNE的IC₅₀为44 nmol·L⁻¹,K_i为200 nmol·L⁻¹^[48]。2002年,Sivelestat与hNE之间的相互作用通过LC/ESI-MS技术确定,sivelestat抑制hNE的作用机制见图5^[51]。Sivelestat在ALI/ARDS中的保护作用已在多种肺损伤模型中验证^[52]。相关研究报道,基于sivelestat对新冠肺炎并发症的有利作用,sivelestat有望治疗COVID-19引发的ALI/ARDS^[52]。

4.2.3 苯并噁嗪酮类 苯并噁嗪酮类^[53](图6)hNE小分子抑制剂在hNE酶催化过程中形成酰基酶中间体。

Allen Krantz和Robin W. Spencert的研究团队合成并筛选了大量苯并噁嗪酮类化合物对hNE的抑制活性^[53],他们总结了苯并噁嗪酮类化合物抑制hNE的构效关系:在R₂位有吸电子基团和R₅有烷基取代,对hNE的抑制作用显著增强,但在R₆位有取代基对活性不利^[53]。

苯并噁嗪酮类化合物KRP-109^[54](图7)是一个活性较突出的hNE特异性抑制剂。研究发现,在肺炎链球菌诱导的重症肺炎小鼠模型中,使用KRP-109治疗的小鼠比对照组小鼠具有更高的存活率^[54]。研究结果也表明,KRP-109可减少小鼠模型中的肺部炎症,KRP-109有望用于治疗重症肺炎^[54]。

4.2.4 N-苯甲酰基吡唑类 Letizia Crocetti和Maria Paola Giovannoni的团队发现了一类含有N-benzoylindazole(N-苯甲酰基吡唑类)母核结构的高效hNE抑制剂^[55,56](图8),这些化合物对于hNE抑制的IC₅₀值在低纳摩尔范围内。这些化合物对hNE的选择性比其他丝氨酸蛋白酶更强,且在缓冲溶液中具有良好的化学稳定性^[56]。在N-苯甲酰基吡唑的R₁位引入各种取代基,筛选得到了有效的抑制剂7(IC₅₀为12 nmol·L⁻¹)(图9)。对R基团进行修饰,得到了该系列中最有效的化合物3-CN取代衍生物8(IC₅₀为7 nmol·L⁻¹)(图9)。这类化合物构效关系表明,在N-1位保持苯甲酰取代基是活性所必需的,并且可以通过在吡唑环上引入取代基来提高药效^[56]。

4.2.5 重氮硼烷化合物类 硼酸boronicacids(BAs)广泛用于设计生物活性化合物和功能性生物材料。20世纪80年代初,重氮硼烷化合物作为一类很有发展前景的抗菌剂出现,其通过在烟酰胺核糖羟基和硼原子之间形成共价键来靶向烯酰还原酶^[57,58]。

Pedro M. P. Gois团队研究了B-N杂环家族对于丝氨酸蛋白酶的抑制活性。具体设计中,以芳香硼基杂

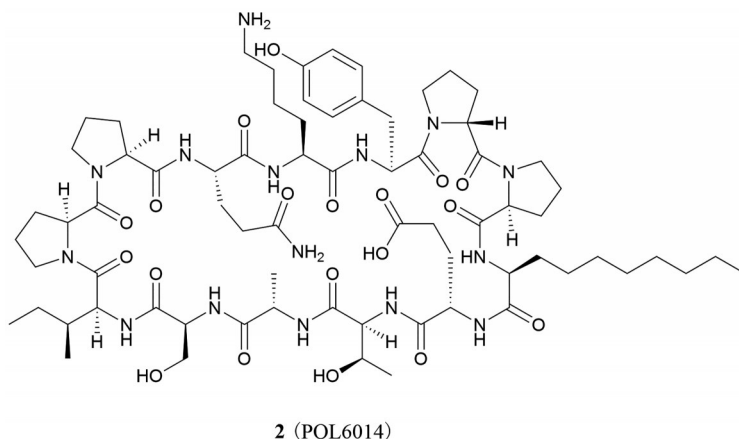


Figure 4 The chemical structure of POL6014

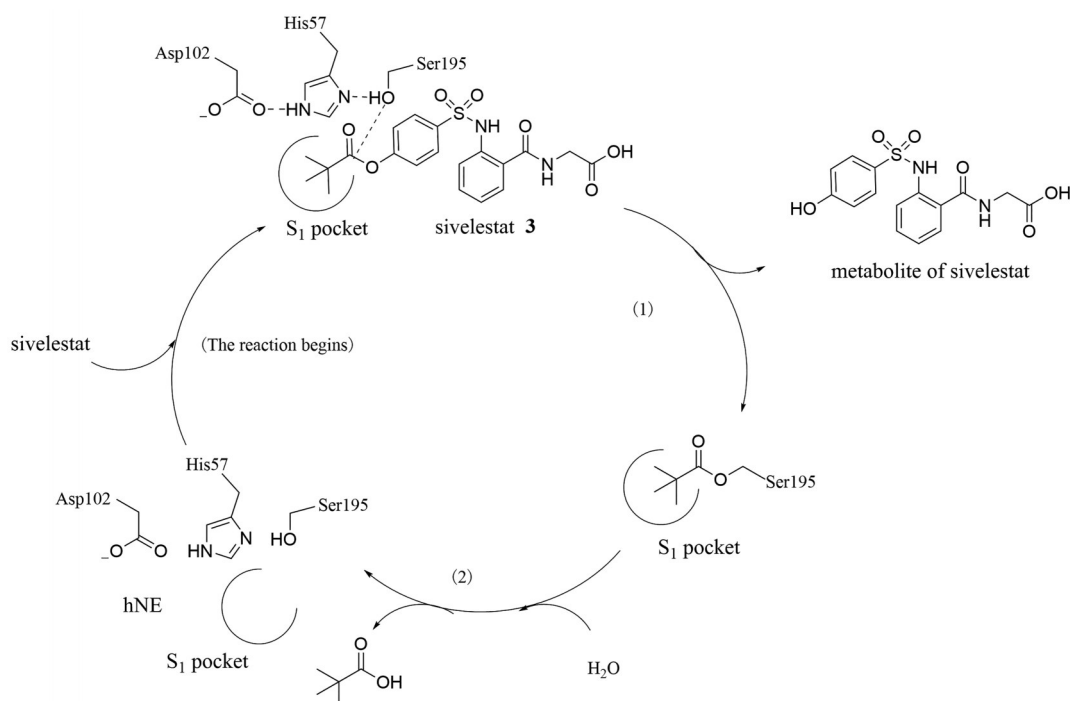


Figure 5 The proposed mechanism of hNE inhibition by sivelestat^[51]. (1) Sivelestat acetylates Ser195; (2) Concomitant hydrolysis again frees up Ser195

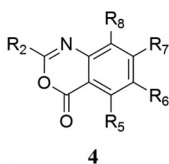


Figure 6 The general structure of 4H-3,1-benzoxazin-4-ones^[53]

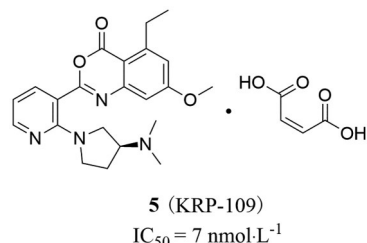


Figure 7 The structure of KRP-109^[54]

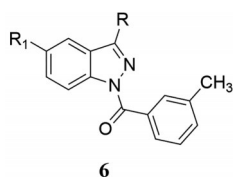


Figure 8 The general structure of N-benzoylindazole^[56]

环形式稳定重氮硼烷化合物^[59]。通过体外活性筛选发现一系列的重氮硼烷化合物在低微摩尔范围内可以有效地抑制 hNE (图 10)^[59]。研究发现这类化合物对 hNE 具有良好的选择性, 对其他 5 种密切相关的丝氨酸蛋

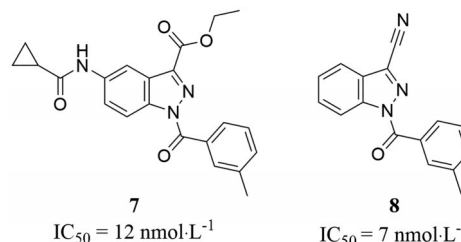


Figure 9 The structures of N-benzoylindazole hNE inhibitors^[56]

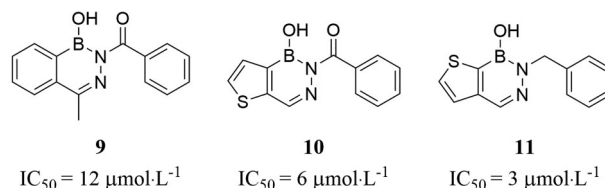


Figure 10 The structures of diazaborines hNE inhibitors^[59]

白酶没有抑制效果^[59]。这类重氮硼烷化合物在 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液和人血浆中非常稳定^[59]。这有利于进一步开发重氮硼烷化合物作为选择性的 hNE 抑制剂。

4.2.6 异噁唑酮类 Claudia Vergelli 团队报道了一类异噁唑酮的 hNE 抑制剂 (图 11)^[60]。具体研究中, 他们设计合成了不同系列的小分子化合物: 一类是 R₃ 位和 R₄ 位均带有烷基基团; 另一类是 R₃ 位带有烷基基团、R₄ 位无取代的衍生物 (图 11)^[60]。研究团队^[55,56,61]也探讨了不同取代基对于抑制活性的影响, 其中活性最好的

化合物 **13** (图 12) 的 hNE 抑制活性 IC_{50} 为 $20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 化合物 **13** 在缓冲液的化学稳定性 $t_{1/2}$ 为 8.9 h ^[60]。化学稳定性研究表明, 异噁唑酮类化合物比 *N*-苯甲酰基吡唑类化合物^[56]更稳定, $t_{1/2}$ 值从 3.1 h 延长到 19.3 h , 这两类化合物都属于竞争性的 hNE 抑制剂^[60]。

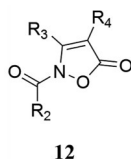


Figure 11 The general structure of isoxazolones

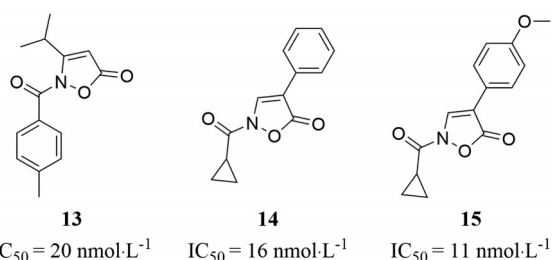
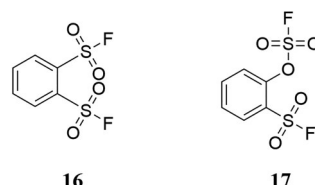


Figure 12 The structures of isoxazolones hNE inhibitors^[60, 62]

基于以上报道进一步设计优化, 合成了一系列基于异噁唑酮类母核结构 **12** 的 R_3 位非取代且在 R_4 位苯环上具有不同取代基的衍生物。其中, 抑制活性最强的是化合物 **14** (IC_{50} 为 $16 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和化合物 **15** (IC_{50} 为 $11 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图 12)^[62]。

4.2.7 SuFEx 类和磺化非糖肝素类 硫氟交换 (sulfur fluoride exchange, SuFEx) 反应是 2014 年首次引入的点击化学^[63], 应用于化学生物学^[64, 65]和药物化学^[66, 67]等领域。2022 年的诺贝尔化学奖得主 Sharpless 研究团队^[68]曾经报道了一类硫氟交换 SuFEx 的化合物可以作为 hNE 的共价抑制剂。研究团队筛选 SuFEx 化合物库, 发现了选择性的 hNE 抑制剂: 1,2-苯二磺酰氟^[68] (化合物 **16**, 图 13)。然后对化合物 **16** 进行优化, 得到了活性更好的化合物 **17** (图 13), IC_{50} 为 $0.24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。相比于同源性蛋白酶 CG, 化合物 **17** 对 hNE 具有更高的选择性^[68]。硫氟交换衍生物也有望成为一类高选择性的 hNE 共价抑制剂^[68]。



16 $IC_{50} = 3.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ **17** $IC_{50} = 0.24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Figure 13 The structures of SuFEx hNE inhibitors^[68]

2021 年, Rami A. Al-Horani 研究团队报道了一类磺化非糖肝素模拟物可以作为 hNE 的抑制剂^[69]。研究中得到多个化合物可以抑制 hNE, 其中抑制活性最佳的是化合物 **18** (图 14), IC_{50} 为 $220 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[69]。化合物 **18** 作为一种有效的、选择性的 hNE 抑制剂, 有望成为治疗 hNE 相关疾病的潜在药物, 其原因有以下几点^[69]: ① 它是一种均相分子, 不具有易被硫酸酯酶、脱氧核糖核酸酶或肝素酶酶解的官能团; ② 可采用一些策略将其设计为前体药物, 以提高其口服生物利用度; ③ 磺酸根离子 (阴离子性质) 的存在, 使得它不太可能透过血脑屏障或胎盘, 提高了它的安全性; ④ 该分子没有显示出类似肝素对人类血浆凝血时间的影响, 故无出血并发症; ⑤ 它不影响多种细胞系的增殖, 提示有较高的安全性; ⑥ 化合物 **18** 也能抑制组织蛋白酶 G, 提示其具有双重抗炎作用^[69]。

4.2.8 二氢嘧啶酮衍生物类 拜耳公司研发了以二氢嘧啶酮为母核的 hNE 小分子抑制剂 BAY 85-8501 (图 15), 目前正在进行治疗肺部疾病的 II 期临床试验^[28, 70]。BAY 85-8501 对 hNE 具有极佳的抑制活性 (IC_{50} 为 $0.065 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且对 hNE 具有高度的选择性和特异性。BAY 85-8501 与其他小分子抑制剂相比, 显示出较长的半衰期, 低清除率和较好的代谢稳定性^[70]。二氢嘧啶酮结构与 hNE 的结合是基于诱导契合的结合模式 (图 16), 其与 hNE 的 S_1 和 S_2 口袋紧密作用。BAY 85-8501 上对氨基苯环上的甲磺酰基 (图 15), 在关键氨基苯基-嘧啶酮轴处提高旋转势垒, 将结合构象锁定在理想的生物活性构象中, 从而提高抑制活性、选择性和稳定性^[70]。

拜耳公司以临床候选化合物 BAY 85-8501 为基

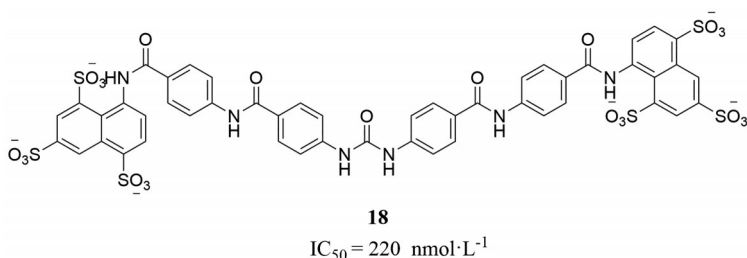
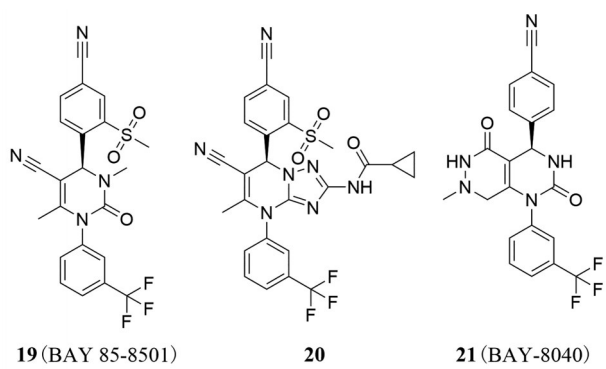


Figure 14 The structure of sulfonated hNE inhibitor^[69]



19 (BAY 85-8501) $IC_{50} = 0.065 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ **20** $IC_{50} = 0.03 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ **21** (BAY-8040) $IC_{50} = 28 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Figure 15 The structures of pyrimidinones-derived hNE inhibitors^[70, 71]

础, 在嘧啶环右侧加上新的环状体系, 形成咪唑嘧啶、三唑嘧啶和四唑嘧啶等结构, 如化合物 **20** (图 15), 以确保化合物还有更多的结构部分与 hNE 蛋白接触^[71]。在嘧啶环左侧加上哒嗪环, 得到了化合物 BAY-8040 (IC_{50} 为 $28 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) (图 15), 具有较好的药效和体内药代动力学^[71]。在肺动脉高压大鼠模型中, BAY-8040 减少了慢性炎症, 从而减缓甚至逆转了肺动脉的组织重构^[71]。在使用 BAY-8040 干预后, 观察到心肺参数 (如

氧饱和度和心排量) 有统计学上显著的影响^[71]。

4.2.9 吡啶酮衍生物类 阿斯利康公司多年来一直进行 hNE 抑制剂的研究, 公司研发的代表性化合物 alvelestat (AZ9668) (图 17) 是一种可逆 hNE 抑制剂, 具有 2-吡啶酮骨架。吡啶酮 hNE 抑制剂与 hNE 的结合模式, 如图 16 所示。Alvelestat 在 COPD 患者和健康志愿者的临床 I 期试验中初步证实了 alvelestat 具有非常好的安全性和耐受性^[72]。目前 alvelestat 在囊性纤维化患者 (CF)、支气管扩张患者 (BE) 和慢性阻塞性肺疾病患者 (COPD) 中开展临床 II 期试验^[73-75]。

勃林格殷格翰公司也研发了多种 2-吡啶酮骨架结构的 hNE 抑制剂^[76], 用于预防和治疗胃肠道和肺部疾病、过敏性疾病和其他自身免疫疾病。这些化合物具有良好的代谢稳定性和口服渗透性。化合物 **23** (图 17)^[76] 是勃林格殷格翰公司研发的 hNE 抑制剂。

5 总结与展望

本文简单介绍了 hNE 的生物学活性, 对现有的 hNE 抑制剂及相关研究进展进行了综述。相较于大分子 hNE 抑制剂, 小分子 hNE 抑制剂可以通过结构修饰, 优化其物理和药代动力学特性, 成为成药性更佳临床候选药物。但现有的小分子抑制剂也存在一些不

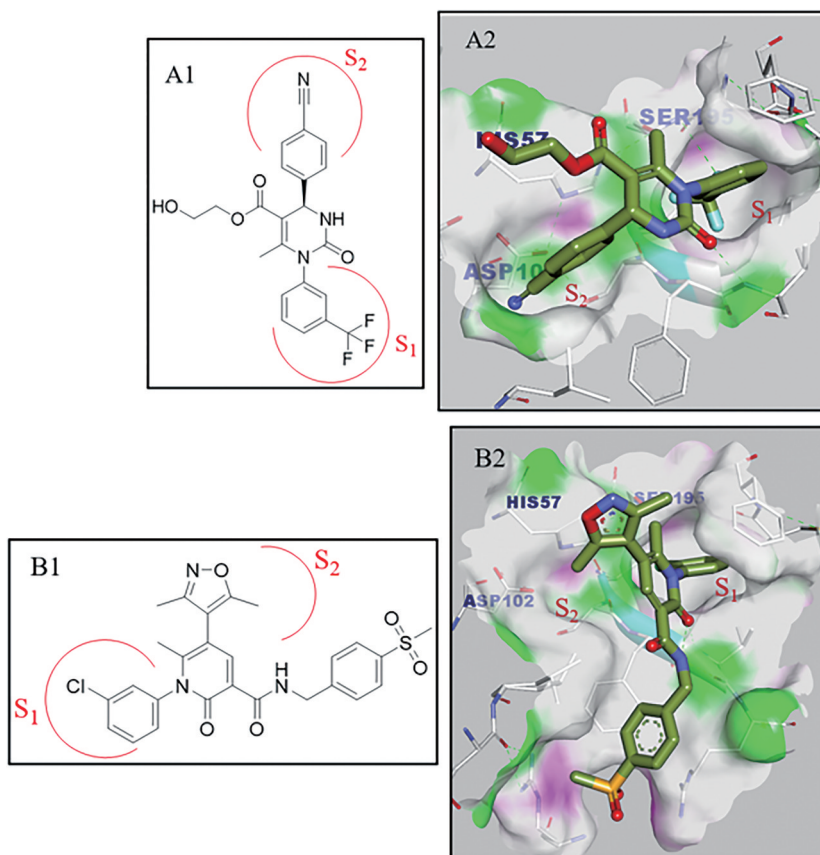


Figure 16 (A1) The structure of dihydropyrimidone (DHPI) hNE inhibitor; (A2) The binding mode of DHPI with hNE (PDB code: 3Q77). (B1) The structure of pyridines hNE inhibitor; (B2) The binding mode of pyridones inhibitor with hNE (PDB code: 5ABW)

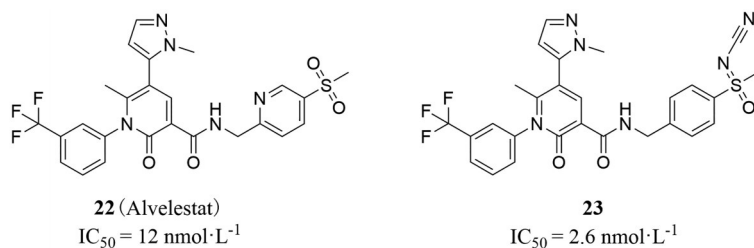


Figure 17 The structures of pyridones-derived hNE inhibitors^[28,76]

足之处,例如苯并噁嗪酮类抑制剂对其他种类丝氨酸蛋白酶未表现出较好的选择性。二氢嘧啶酮衍生物与吡啶酮衍生物类抑制剂的合成步骤复杂。一些抑制剂的生物利用度低,稳定性较差,化合物的半衰期较短,因此难以进入实际应用。目前处于临床试验的hNE抑制剂较少,且已经批准上市的sivelestat临床效果差强人意。hNE抑制剂的临床需求仍远未得到满足,因此值得深入研究和开发具有不同骨架结构的hNE抑制剂。

作者贡献: 王中伟撰写论文初稿,文辉、王雨辰、崔华清修改论文并定稿。

利益冲突: 本文无相关利益冲突。

References

- [1] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382: 727-733.
- [2] Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382: 1199-1207.
- [3] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395: 497-506.
- [4] Fujino N, Kubo H, Suzuki T, et al. Administration of a specific inhibitor of neutrophil elastase attenuates pulmonary fibrosis after acute lung injury in mice [J]. *Exp Lung Res*, 2012, 38: 28-36.
- [5] Polverino E, Rosales-Mayor E, Dale GE, et al. The role of neutrophil elastase inhibitors in lung diseases [J]. *Chest*, 2017, 152: 249-262.
- [6] Lee JM, Yeo CD, Lee HY, et al. Inhibition of neutrophil elastase contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury during neutropenia recovery in mice [J]. *J Anesth*, 2017, 31: 397-404.
- [7] Lungarella G, Menegazzi R, Gardi C, et al. Identification of elastase in human eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 292: 128-135.
- [8] Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, et al. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity [J]. *Photochem Photobiol*, 2001, 74: 283-290.
- [9] Liou TG, Campbell EJ. Nonisotropic enzyme-inhibitor interactions: a novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils [J]. *Biochemistry*, 1995, 34: 16171-16177.
- [10] Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions [J]. *Biochimie*, 2008, 90: 227-242.
- [11] Sinha S, Watorek W, Karr S, et al. Primary structure of human neutrophil elastase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84: 2228-2232.
- [12] Bode W, Meyer E Jr, Powers JC. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors [J]. *Biochemistry*, 1989, 28: 1951-1963.
- [13] Bode W, Wei AZ, Huber R, et al. X-ray crystal structure of the complex of human leukocyte elastase (PMN elastase) and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor [J]. *EMBO J*, 1986, 5: 2453-2458.
- [14] Groutas WC, Dou D, Alliston KR. Neutrophil elastase inhibitors [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2011, 21: 339-354.
- [15] Edwards PD, Bernstein PR. Synthetic inhibitors of elastase [J]. *Med Res Rev*, 1994, 14: 127-194.
- [16] Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity [J]. *Chem Rev*, 2002, 102: 4501-4524.
- [17] Ohbayashi H. Neutrophil elastase inhibitors as treatment for COPD [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2002, 11: 965-980.
- [18] McGowan SE, Murray JJ. Direct effects of neutrophil oxidants on elastase-induced extracellular matrix proteolysis [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1987, 135: 1286-1293.
- [19] McDonald JA, Kelley DG. Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments [J]. *J Biol Chem*, 1980, 255: 8848-8858.
- [20] Mainardi CL, Hasty DL, Seyer JM, et al. Specific cleavage of human type III collagen by human polymorphonuclear leukocyte elastase [J]. *J Biol Chem*, 1980, 255: 12006-12010.
- [21] Bronze-da-Rocha E, Santos-Silva A. Neutrophil elastase inhibitors and chronic kidney disease [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14: 1343-1360.

- [22] Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156: 341-357.
- [23] MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD [J]. *Chest*, 2000, 117: 303s-317s.
- [24] Snider GL, Lucey EC, Christensen TG, et al. Emphysema and bronchial secretory cell metaplasia induced in hamsters by human neutrophil products [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1984, 129: 155-160.
- [25] Nadel JA. Role of mast cell and neutrophil proteases in airway secretion [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1991, 144: S48-51.
- [26] Fahy JV, Schuster A, Ueki I, et al. Mucus hypersecretion in bronchiectasis. The role of neutrophil proteases [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 146: 1430-1433.
- [27] Zhou WM, Guo QR, Wang H, et al. Research advances in the transformation of chronic obstructive pulmonary disease to lung cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1410-1418.
- [28] von Nussbaum F, Li VM. Neutrophil elastase inhibitors for the treatment of (cardio)pulmonary diseases: into clinical testing with pre-adaptive pharmacophores [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 4370-4381.
- [29] van der Linden M, Meyaard L. Fine-tuning neutrophil activation: strategies and consequences [J]. *Immunol Lett*, 2016, 178: 3-9.
- [30] Janoff A, Blondin J. The effect of human granulocyte elastase on bacterial suspensions [J]. *Lab Invest*, 1973, 29: 454-457.
- [31] Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6: 541-550.
- [32] Cui C, Chakraborty K, Tang XA, et al. Neutrophil elastase selectively kills cancer cells and attenuates tumorigenesis [J]. *Cell*, 2021, 184: 3163-3177.e3121.
- [33] Crocetti L, Quinn MT, Schepetkin IA, et al. A patenting perspective on human neutrophil elastase (HNE) inhibitors (2014-2018) and their therapeutic applications [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2019, 29: 555-578.
- [34] Fitch PM, Roghanian A, Howie SE, et al. Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity [J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34: 279-282.
- [35] Alam SR, Newby DE, Henriksen PA. Role of the endogenous elastase inhibitor, elafin, in cardiovascular injury: from epithelium to endothelium [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83: 695-704.
- [36] Shaw L, Wiedow O. Therapeutic potential of human elafin [J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39: 1450-1454.
- [37] Wang T, Zhu Z, Liu Z, et al. Plasma neutrophil elastase and elafin as prognostic biomarker for acute respiratory distress syndrome: a multicenter survival and longitudinal prospective observation study [J]. *Shock*, 2017, 48: 168-174.
- [38] Majchrzak-Gorecka M, Majewski P, Grygier B, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a multifunctional protein in the host defense response [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 28: 79-93.
- [39] Majewski P, Majchrzak-Gorecka M, Grygier B, et al. Inhibitors of serine proteases in regulating the production and function of neutrophil extracellular traps [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 261.
- [40] Lucas SD, Costa E, Guedes RC, et al. Targeting COPD: advances on low-molecular-weight inhibitors of human neutrophil elastase [J]. *Med Res Rev*, 2013, 33Suppl 1: E73-101.
- [41] Bernstein PR, Edwards PD, Williams JC. Inhibitors of human leukocyte elastase [J]. *Prog Med Chem*, 1994, 31: 59-120.
- [42] Angelastro MR, Baugh LE, Bey P, et al. Inhibition of human neutrophil elastase with peptidyl electrophilic ketones. 2. Orally active PG-Val-Pro-Val pentafluoroethyl ketones [J]. *J Med Chem*, 1994, 37: 4538-4553.
- [43] Ohmoto K, Yamamoto T, Horiuchi T, et al. Design and synthesis of new orally active nonpeptidic inhibitors of human neutrophil elastase [J]. *J Med Chem*, 2000, 43: 4927-4929.
- [44] Ohmoto K, Yamamoto T, Okuma M, et al. Development of orally active nonpeptidic inhibitors of human neutrophil elastase [J]. *J Med Chem*, 2001, 44: 1268-1285.
- [45] Luther A, Moehle K, Chevalier E, et al. Protein epitope mimetic macrocycles as biopharmaceuticals [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 38: 45-51.
- [46] Barth P, Bruijnzeel P, Wach A, et al. Single dose escalation studies with inhaled POL6014, a potent novel selective reversible inhibitor of human neutrophil elastase, in healthy volunteers and subjects with cystic fibrosis [J]. *J Cyst Fibros*, 2020, 19: 299-304.
- [47] Girón Moreno RM, García-Clemente M, Diab-Cáceres L, et al. Treatment of pulmonary disease of cystic fibrosis: a comprehensive review [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10: 486.
- [48] Kawabata K, Suzuki M, Sugitani M, et al. ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 177: 814-820.
- [49] Toda Y, Takahashi T, Maeshima K, et al. A neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, ameliorates lung injury after hemorrhagic shock in rats [J]. *Int J Mol Med*, 2007, 19: 237-243.
- [50] Pu S, Wang D, Liu D, et al. Effect of sivelestat sodium in patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *BMC Pulm Med*, 2017, 17: 148.
- [51] Nakayama Y, Odagaki Y, Fujita S, et al. Clarification of mechanism of human sputum elastase inhibition by a new inhibitor, ONO-5046, using electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 2349-2353.
- [52] Sahebnasagh A, Saghafi F, Safdari M, et al. Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) may be a promising therapeutic option for management of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome or disseminated intravascular coagulation in COVID-19 [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2020, 45: 1515-1519.
- [53] Krantz A, Spencer RW, Tam TF, et al. Design and synthesis of 4*H*-3,1-benzoxazin-4-ones as potent alternate substrate inhibitors of human leukocyte elastase [J]. *J Med Chem*, 1990, 33: 464-

- 479.
- [54] Yamada K, Yanagihara K, Araki N, et al. *In vivo* efficacy of KRP-109, a novel elastase inhibitor, in a murine model of severe pneumococcal pneumonia [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2011, 24: 660-665.
- [55] Crocetti L, Giovannoni MP, Schepetkin IA, et al. Design, synthesis and evaluation of *N*-benzoylindazole derivatives and analogues as inhibitors of human neutrophil elastase [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19: 4460-4472.
- [56] Crocetti L, Schepetkin IA, Cilibrizzi A, et al. Optimization of *N*-benzoylindazole derivatives as inhibitors of human neutrophil elastase [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 6259-6272.
- [57] Baldock C, de Boer GJ, Rafferty JB, et al. Mechanism of action of diazaborines [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55: 1541-1549.
- [58] Baldock C, Rafferty JB, Sedelnikova SE, et al. A mechanism of drug action revealed by structural studies of enoyl reductase [J]. *Science*, 1996, 274: 2107-2110.
- [59] Antonio JPM, Goncalves LM, Guedes RC, et al. Diazaborines as new inhibitors of human neutrophil elastase [J]. *ACS Omega*, 2018, 3: 7418-7423.
- [60] Vergelli C, Schepetkin IA, Crocetti L, et al. Isoxazol-5(2*H*)-one: a new scaffold for potent human neutrophil elastase (HNE) inhibitors [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017, 32: 821-831.
- [61] Giovannoni MP, Schepetkin IA, Crocetti L, et al. Cinnoline derivatives as human neutrophil elastase inhibitors [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31: 628-639.
- [62] Giovannoni MP, Crocetti L, Cantini N, et al. New 3-unsubstituted isoxazolones as potent human neutrophil elastase inhibitors: synthesis and molecular dynamic simulation [J]. *Drug Dev Res*, 2020, 81: 338-349.
- [63] Dong J, Krasnova L, Finn MG, et al. Sulfur(VI) fluoride exchange (SuFEx): another good reaction for click chemistry [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53: 9430-9448.
- [64] Grimster NP, Connelly S, Baranczak A, et al. Aromatic sulfonyl fluorides covalently kinetically stabilize transthyretin to prevent amyloidogenesis while affording a fluorescent conjugate [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 5656-5668.
- [65] Yang B, Wang N, Schnier PD, et al. Genetically introducing biochemically reactive amino acids dehydroalanine and dehydrobutyrine in proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 7698-7703.
- [66] Mortenson DE, Brighty GJ, Plate L, et al. "Inverse Drug Discovery" strategy to identify proteins that are targeted by latent electrophiles as exemplified by aryl fluorosulfates [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 200-210.
- [67] Liu Z, Li J, Li S, et al. SuFEx click chemistry enabled late-stage drug functionalization [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 2919-2925.
- [68] Zheng Q, Woehl JL, Kitamura S, et al. SuFEx-enabled, agnostic discovery of covalent inhibitors of human neutrophil elastase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116: 18808-18814.
- [69] Al-Horani RA, Aliter KF, Kar S, et al. Sulfonated nonsaccharide heparin mimetics are potent and noncompetitive inhibitors of human neutrophil elastase [J]. *ACS Omega*, 2021, 6: 12699-12710.
- [70] von Nussbaum F, Li VM, Allerheiligen S, et al. Freezing the bioactive conformation to boost potency: the identification of BAY 85-8501, a selective and potent inhibitor of human neutrophil elastase for pulmonary diseases [J]. *ChemMedChem*, 2015, 10: 1163-1173.
- [71] von Nussbaum F, Li VM, Meibom D, et al. Potent and selective human neutrophil elastase inhibitors with novel equatorial ring topology: *in vivo* efficacy of the polar pyrimidopyridazine BAY-8040 in a pulmonary arterial hypertension rat model [J]. *ChemMedChem*, 2016, 11: 199-206.
- [72] Gunawardena KA, Gullstrand H, Perrett J. Pharmacokinetics and safety of AZD9668, an oral neutrophil elastase inhibitor, in healthy volunteers and patients with COPD [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2013, 51: 288-304.
- [73] Elborn JS, Perrett J, Forsman-Semb K, et al. Efficacy, safety and effect on biomarkers of AZD9668 in cystic fibrosis [J]. *Eur Respir J*, 2012, 40: 969-976.
- [74] Stockley R, De Soyza A, Gunawardena K, et al. Phase II study of a neutrophil elastase inhibitor (AZD9668) in patients with bronchiectasis [J]. *Respir Med*, 2013, 107: 524-533.
- [75] Vogelmeier C, Aquino TO, O'Brien CD, et al. A randomised, placebo-controlled, dose-finding study of AZD9668, an oral inhibitor of neutrophil elastase, in patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with tiotropium [J]. *COPD*, 2012, 9: 111-120.
- [76] Oost T, Fiegen D, Gnam C, et al. Substituted 4-pyridones and their use as inhibitors of neutrophil elastase activity: US, 9340507 B2 [P]. 2016-05-17.