

· 专家论坛 ·

从精准医学谈药物设计的微观结构

郭宗儒*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 精准医学应用“组学”和系统生物学在分子水平上分析患者的病因, 并以靶向治疗手段对患者做个体化处治。精准医学与药物密切相关。药物作为治疗手段和物质供给侧, 在精准医学中主要体现两个方面: 针对特定的靶标或机制进行新药研发; 针对疾病的分子特征对患者做个体化治疗的临床应用。基于特定靶标研发新分子实体是实施精准医疗的前提与保障; 而精准医疗的效果和发现的线索又反馈于新药深化研究, 二者相互依存和促进。在精准医学的框架下, 新药研究所涵盖的大都是熟知内容: 靶标的发现与确证; 靶标与适应证的关联(概念验证); 先导物的发现与优化; 临床前研究的药效、药代和不良反应与临床试验的关联; 药品设计、产业化和药物经济学的精益化等。从分子水平的视角看, 药物的疗效源于药物分子的特定原子或基团与生物大分子的互补性和在三维空间的相互结合, 这些原子基团或片段的严格排布映射了与效应靶标的精确结合。靶标蛋白即使发生微小的残基改变, 也会导致大分子的构象变化, 这时药物的分子结构必须做精细的微调以适应变化了的结构(构象)要求以避免脱靶作用。为了进行个体化治疗, 需要根据患者生物标示物的分子特征选择有针对性的药物, 因而需要研制多种新分子实体。本文列举一些实例试图解析在精准医学时代药物分子设计的某些趋势。

关键词: 精准医学; 药物设计; 概念验证; 微观结构; 结合动力学

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0071-09

On the molecular drug design from viewpoint of precision medicine

GUO Zong-ru*

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

Abstract: Precision medicine (PM) involves the application of “omics” analysis and system biology to analyze the cause of disease at the molecular level for targeted treatments of individual patient. Based on the targeted treatment PM is closely related to pharmaceuticals, which, as a therapeutic means and supply front, mainly embody the two aspects: drug discovery/development, and clinical administration. Innovation of new molecular entities with safety and specific efficacy is the prerequisite and guarantee for the PM practice; on the other hand, the outcome and clues in clinical PM feedback to new drug research. PM and drug research/application are interdependent and promote each other. Aimed at precision medicine, drug discovery and development involve well-known contents: the discovery and validation of targets, the association between target functions and indications (proof of concept), lead discovery and optimization, the association between preclinical investigations and clinical trials, the lean of industrialization and pharmacoeconomics. At the molecular level the therapeutic efficacy originates from the interactive binding between specific atoms or groups of the drug molecule and the complementary atoms or groups of the macromolecular target in three-dimensional space. The strict arrangement of such critical atoms, groups, or fragments reflect specific features for a precise binding

收稿日期: 2016-08-23; 修回日期: 2016-09-18.

*通讯作者 Tel: 86-10-83155752, E-mail: zrguo@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0830

to the corresponding target. An alteration of amino acid residues in mutational targets leads to the change in conformation of the target protein, and an accurate structure of drug is necessary for binding to the mutant species and avoiding off-targeting effect. For the tailoring of clinical treatment to the individual patient design and development of various new molecular entities are critical for treatment choice according to the molecular features of biological markers of patients. This article provides some examples and methods of drug design and development in the new period.

Key words: precision medicine; drug design; proof of concept; microscopic structure; binding kinetics

1 引言

医药科技的发展不断提出新的治疗策略和概念,近年来出现的精准医学 (precision medicine) 的概念,其核心是通过基因组和蛋白质组学等技术,对于大样本人群与特定疾病类型从分子水平进行分析与鉴定、验证与应用,从而精确寻找到疾病的原因和治疗的靶标,最终实现对于疾病和特定患者进行个体化的精细和准确的治疗。

精准医学与药物密切相关,药物是疾病治疗的手段和物质保障,在精准医学的框架下体现在两个方面:一是针对特定的靶标或机制进行新药研发,提供安全有效特异和经济的药物;二是临床应用,根据患者疾病类型和病情进行个体化的准确治疗。创制安全有效乃至特效的药物是实现精确治疗的前提与保障;按精准原则治疗的结果以及发现的线索或问题又反馈于深化新药研究,二者相互依存和促进。

笔者不拟使用“精准药学”一语,盖因见仁见智。就新药研发而言,在精准的目标下所涵盖的大都是熟知的内容:靶标的发现与确证;靶标与适应证的关联(概念验证);先导物的发现与优化;临床前研究的药效、药代和不良反应与临床试验的关联;药品设计、产业化和药物经济学的精益化等等,通过全价值链的实施与监管,提供给精准治疗以安全有效药物。本文拟从药物分子设计的一角,特别是从成功药物与靶标结合的微观特征,讨论研发中的一些细节问题。

2 基于基因差异——伊马替尼的研制

治疗慢性粒细胞白血病的伊马替尼是基于

染色体基因变异,“量体裁衣”研制出的。细胞和分子生物学研究发现染色体 22 号与 9 号的相互易位,导致 22 号染色体变短,称作费城短染色体,它携带有 *Bcr-Abl* 癌基因,表达的 *Bcr-Abl* 融合蛋白,含有功能高度激活的酪氨酸激酶,导致细胞内信号转导的失控,引起慢性粒细胞白血病 (CML) 的发生。CML 具有 *Abl* 激酶高表达的遗传特征,作为分子靶标,诺华成功研制口服治疗 CML 的药物伊马替尼 (1, imatinib),经概念验证和临床研究,成为首个治疗 CML 的有效药物,也因此开创了分子靶向药物治疗的新领域。

伊马替尼是通过基于结构的药物设计 (SBDD) 与药物化学构效关系 (SAR) 而实现结构优化的,研制过程漫长而曲折,本文不拟作全面介绍,只从晶体结构和结合特征对设计的关键问题加以说明。图 1a 和 b 分别是伊马替尼与 *Abl* 激酶的结合特征和疏水结合的内环境。其结合要点概述如下:① 苯环 A 的 6 位甲基 (又称作旗甲基, flag-methyl) 设计的重要性:甲基处于 -NH- 的邻位,邻位基团的阻转效应逼迫吡啶连同吡啶环发生一定角度的扭转,定向地采取了稳定的构象,将吡啶环“送到”酶的 Tyr253 残基处,发生 $\pi-\pi$ 结合作用;② 连接苯环 A 与咪唑环的 -NH- 作为氢键给体与酶的重要残基 Thr315 的侧链羟基 (接受体) 形成氢键, Thr315 是催化中心的门户氨基酸,守护和维持催化过程。由于羟基与伊马替尼的 -NH- 形成氢键, Thr315 失去了门户守卫的作用;③ A 环 4 位的连接基 -NH-CO- 将 B 环及其连接的片段引

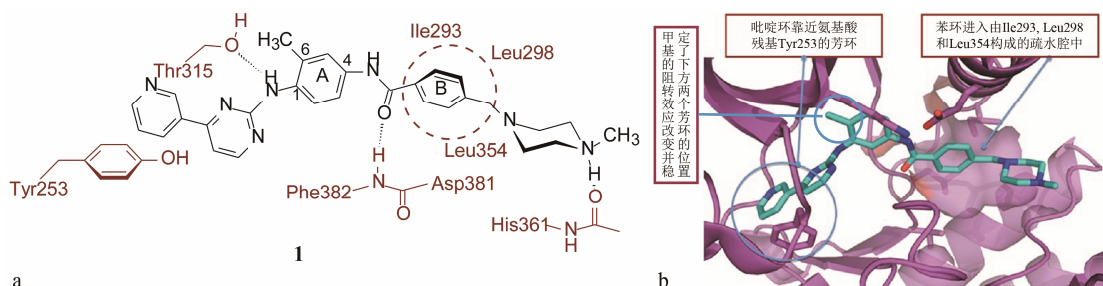


图 1 伊马替尼分子 (黑色) 与 *Abl* 激酶的结合特征 (a)、与 *Abl* 疏水结合示意图 (b)

导并插入到酶的裂隙之中, 苯环 B 进入由 Ile293、Leu298 和 Leu354 构成的疏水腔内, 将本来“埋入”其中的活性环套 (A-loop) 的 DFG 挤出, 使 DFG-in 变成 DFG-out 构象, 而 ATP 对酪氨酸的磷酸化须为 DFG-in 构象。这样, 伊马替尼通过影响变构位点阻断了激酶的催化功能。

这些关键性的微观特征保障了伊马替尼分子的分子形状 (构象) 从而发生特异性结合^[1]。

3 克服对伊马替尼耐药的帕那替尼

2001 年上市的伊马替尼作为治疗慢性粒细胞白血病的有效药物, 长期应用产生耐药性。分子生物学研究发现, 癌细胞为了逃逸伊马替尼的作用, 将门户氨基酸残基 (gatekeeper) 发生突变, The315 变异为 Ile315, 这样, 在结构上氨基酸侧链由 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 变成 $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, 不仅体积变大, 空间上阻碍了伊马替尼的进入, 而且侧链的羟基缺失, 失去与伊马替尼形成氢键的能力, 导致疗效减退。从变异后的结构特征如何克服耐药性呢?

ARIAD 公司为克服 $\text{Abl}^{\text{T315I}}$ 变异导致的耐药性, 研发的帕那替尼 (2, ponatinib) 于 2011 年上市, 帕那替尼对耐药的激酶和细胞有强效抑制活性 (IC_{50} 分别为 40 和 $8.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。研发者针对 $\text{Abl}^{\text{T315I}}$ 结构变异, 关键的设计有两点: ① 变换了伊马替尼苯环 A 与嘧啶环相连的 -NH- 基, 既然 $\text{Abl}^{\text{T315I}}$ 的门户残基无氢键形成能力, 而且扩大了空间障碍, 就没有必要保留 -NH- 片段, 而是用乙炔基连接苯环 A 与杂环。乙炔基是疏水性的线型小体积连接基, 它避开异亮氨酸侧链的阻挡, 使得咪唑并吡啶杂环得以进入疏水腔中。此处乙炔基为“光秃”的两个 sp^1 杂化的碳原子, 位阻最小, 长度适宜。相应的乙烯基或亚乙基化合物活性降低, 提示反式或顺式双键以及柔性的亚乙基不利于结合, 说明精确设计乙炔基之成功。② 将 A 环的 4-酰胺基变为 3-酰胺基, 位置的变迁和酰胺基的逆向, 增强了氢键的结合力, 并且有利于将苯环 B 输送入疏水腔中。图 2 是帕那替尼与 $\text{Abl}^{\text{T315I}}$ 晶体结构的简图, 标示出乙炔基与异亮氨酸侧链的相对位置以及酰胺片段的结合特征^[2]。

4 发掘和利用药物与靶标有利结合的微观特征

4.1 提高结合热力学的焓贡献——第二代 HIV 蛋白酶抑制剂地瑞那韦

药物的活性取决于同靶标的结合强度, 结合能 ΔG 越高, 活性越强。热力学告诉我们, 药物与靶标结合的自由能是由焓 (ΔH) 与熵 ($-\text{T}\Delta S$) 构成, 虽然焓与熵之间的贡献往往有补偿作

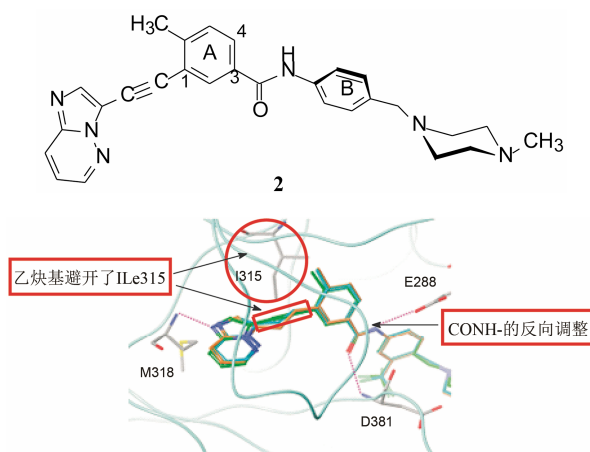
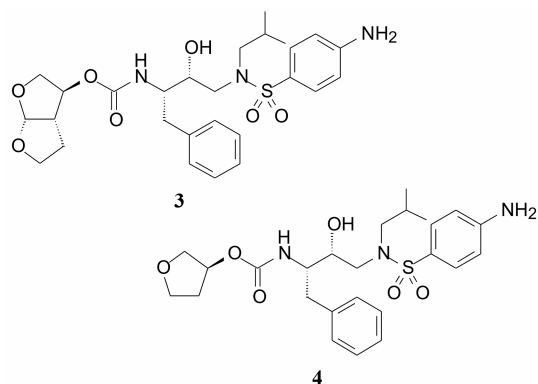


图 2 帕那替尼与 $\text{Abl}^{\text{T315I}}$ 晶体结构简图

用 (enthalpy-entropy compensation, 即焓强熵弱或熵强焓弱), 但精细的分子设计可以实现焓-熵同向正贡献, 并且使焓贡献最大化, 降低仍属正贡献的熵份额, 成为优质药物。疏水性药物与靶标的结合往往是熵因素占优, 结合能大都来源于疏水结合, 这种结合的特异性不如焓因素 (例如氢键, 盐键等) 高, 而且高疏水性药物的代谢作用也比较复杂。

Tibotec 公司研制的地瑞那韦 (3, darunavir) 经美国 FDA 批准于 2006 年上市, 治疗艾滋病。地瑞那韦是模拟水解反应过渡态的 HIV 蛋白酶抑制剂, 属于第二代产品。从化学结构看, 地瑞那韦类似于 GSK 公司研制的安普那韦 (4, amprenavir), 只是在四氢咪喃环上又并合了一个四氢呋喃环。



地瑞那韦与上市前的“那韦”类药物的结构虽然不同, 但与 HIV 蛋白酶活性部位的结合模式大同小异, 都是蛋白酶底物的过渡态类似物, 呈现抑制活性的结合力包括疏水作用和氢键结合, 以疏水作用为主, 因而是熵驱动占优的结合。而地瑞那韦则是以焓为主要贡献。表 1 列出了有代表性的沙奎那韦、替拉那韦、安普那韦和地瑞那韦的活性和热力学特征。

表 1 地瑞那韦与其他那韦药物的热力学特征

药物	K_i /nmol·L ⁻¹	ΔG /kJ·mol ⁻¹	ΔH /kJ·mol ⁻¹	$-T\Delta S$ /kJ·mol ⁻¹
沙奎那韦	2.0	-53.5	-13.0	-66.5
茚地那韦	0.049	-51.8	-7.6	-59.4
安普那韦	0.39	-55.2	-28.8	-26.4
地瑞那韦	0.0045	-62.7	-53.1	-9.6

表 1 的数据表明, 地瑞那韦的活性强于既往的药物十倍至数百倍。比安普那韦强 85 倍。更重要的是地瑞那韦结合能的焓贡献是熵的 5 倍, 而其他那韦多数是熵大于焓, 即使安普那韦也只是焓熵持平。地瑞那韦的用药剂量低, 有效剂量低是高选择性和低脱靶性的表现。此外, 地瑞那韦对多种耐药株也有抑制活性。分析地瑞那韦结构和结合特征, 表明与活性中心发生了广泛的氢键结合^[3]。图 3 是地瑞那韦与 HIV 蛋白酶复合物晶体结构的简约图, 图中的 9 条虚线表示形成的氢键网络结构, 将药物分子牢固地结合于催化中心。特别是并合的四氢呋喃环, 氧原子与 Asp29' 和 Asp30' 又形成两个氢键, 增加的结合能来源于焓贡献, 大大提高了抑酶活性。所以, 地瑞那韦是在结构生物学和分子模拟的指引下, 利用了活性中心“空余”的氢键给体, 在安普那韦的基础上设计出有质性飞跃的蛋白酶抑制剂^[4]。

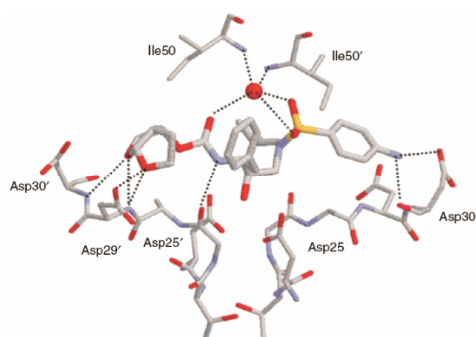
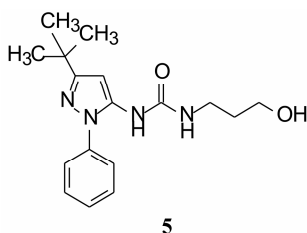
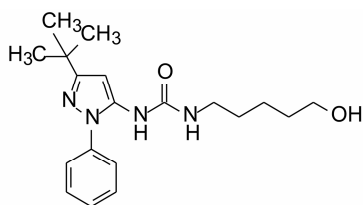


图 3 地瑞那韦与 HIV 蛋白酶复合物的结合模式。虚线代表氢键结合, 圆点为参与复合物生成的结构水

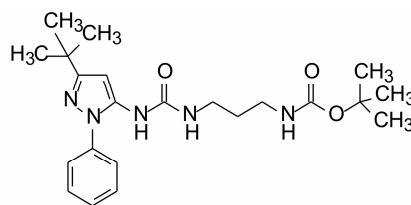
4.2 利用结合动力学特征研制高选择性、低脱靶性和长效型药物 初始的先导物优化, 往往以对靶标的离解常数或 IC₅₀ 作为活性判断、研究构效关系和化



5



6



7

合物取舍的标准, 然而, 离解常数或 IC₅₀ 是在封闭的平衡状态下测定的热力学特征, 是在受试化合物浓度不变的状态下测定的。其实, 从深层次上挖掘, 还有药物与靶标的结合动力学行为。

机体是个开放系统, 药物在体内是个动态过程, 在血浆和细胞中的药物水平处于不断地变化中。在体内药物与靶标形成复合物, 其离解作用不受游离药物浓度的影响, 复合物的离解速率 k_{off} 决定了药物占据靶标和与之结合的时程, 结合的半衰期 ($t_{1/2}$ 结合, 与药代的 $t_{1/2}$ 不同) 越长, 在靶标处驻留时间 (residence time, RT) 越久, 作用时程越长, 因而有效剂量低, 选择性高, 脱靶性低。用放射性标记测定酶抑制剂的结合 (k_{on}) 与离解速率常数 (k_{off}), 非标记方法如用电生理方法 (如膜片钳技术) 或表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 和核磁共振技术。测定受试物的 k_{on} 与 k_{off} 值 (并由此计算出离解常数 K_d 值), 依此可分析化学结构与结合动力学关系 (SKR)。SKR 是深层次的 SAR, 在一定意义上更接近体内的状态。当然, 用细胞测定受试物动态物质重分布^[5] (dynamic mass redistribution) 或整体动物用正电子发射断层显影技术^[6] (PET), 所测定的药物结合动力学数据更加实用。

药物分子与靶标的结合速率 k_{on} 大, 离解速率 k_{off} 小, 是由于结合过程伴随构象的变化, 尤其是靶标蛋白构象的改变, 提高了离解过程的能垒, 复原成游离状态须越过较高的能垒, 以至于 k_{off} 变小, 造成“来之容易去之难”的后果。由于蛋白质的柔性和构象复杂性, 还不能从微观结构预测结合动力学性质, 但药物化学的 SKR 分析和复合物晶体结构特征, 可有助于理解动力学的某些过程。例如研究周期蛋白依赖性激酶 8/周期蛋白 C 抑制剂, 化合物 5 的侧链增加两个亚甲基为化合物 6, 进而变换为叔丁氧羰化合物 7, 动力学性质乃至热力学的参数都发生显著改变, 表 2 列出了这些数据。

表 2 的数据表明, 化合物 5~7 的骨架结构相同, 影响热力学和动力学变化的主要因素是脲基连接的侧链不同。化合物 5 活性弱, K_d 3 500 nmol·L⁻¹, $t_{1/2}$ 结合

表2 化合物5~7与周期蛋白依赖性激酶8/周期蛋白C的结合动力学与热力学特征

化合物	$K_d/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$k_{\text{on}}/\text{s}^{-1}\cdot(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}$	$k_{\text{off}}/\text{s}^{-1}$	$t_{1/2\text{结合}}/\text{min}$
5	3 500	太快测不出	1.0×10^{-2}	1.2
6	80	3.7×10^3	2.9×10^{-4}	40
7	10	5.7×10^2	8.6×10^{-6}	1 400

只有 1.2 min, 晶体结构表明末端羟基作为氢键给体与活化环套 DMG 的 Met174 的羰基形成氢键 (图 4a)。化合物 6 的侧链增加了两个亚甲基, 结合活性提高了 40 多倍, 离解速率变慢, $t_{1/2\text{结合}}=40\text{ min}$, 晶体学提示侧链呈伸展型构象, 6 的末端 OH 与 Asp98 的羰基形成氢键 (图 4b)。化合物 7 的侧链进一步增长, 并以叔丁基为终端, 结合作用增强 7 倍, 离解速率很小, $t_{1/2\text{结合}}=1\ 400\text{ min}$, 虽然没有形成氢键的羟基, 但化合物 7 在活性中心占据的空间和形状加大 (图 4c 灰色部分), 活化环套的构象发生显著变化, 离解复原成游离态需要越过较高的能垒, 因而 7 不仅活性强, 而且在活性部位的驻留时间也长, 预示 7 的作用时间持久, 选择性高^[7]。

另一个实例是治疗慢性阻塞性肺病药物噻托溴铵 (8, tiotropium bromide), 于 2012 年在美国上市。噻托溴铵是毒蕈碱 M3 受体阻断剂, 可扩张支气管治疗哮喘和慢阻肺。其实, 噻托溴铵对 M2 受体也有抑制作用, 但并未显示出对心脏的不良反应, 原因是结合动力学提高了选择性作用。表 3 列出了噻托溴铵对

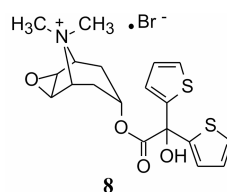


表3 噻托溴铵对毒蕈碱 M3 和 M2 受体的离解常数和结合动力学性质

受体	$K_d/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$k_{\text{on}}/\text{s}^{-1}\cdot(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}$	$k_{\text{off}}/\text{s}^{-1}$	$t_{1/2\text{结合}}/\text{h}$
M3	0.01	3.1×10^7	3.2×10^{-4}	37.4
M2	0.02	1.6×10^8	3.1×10^{-3}	3.5

M3 和 M2 受体的活性参数^[8]。

如果只从 K_d 值分析, 由于对 M3 和 M2 受体活性相近, 预示着脱靶作用会引起心脏的不良反应。然而结合动力学的 k_{off} 值相差很大, 对 M3 受体有很长的 $t_{1/2(\text{DR})}$, 比 M2 长 10 倍, 在动力学的层面上体现出选择性作用。噻托溴铵作为日服一次的长效喷雾剂, 未显示对心脏的副作用。此外, 由于 $t_{1/2(\text{DR})}$ 长, 即使血药浓度的谷值降到 $\text{pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 仍然维持有舒张气管作用。分子动力学模拟显示, 当噻托溴铵从 M3 受体的结合部位解离出去时, 要经历如图 5a 箭头所示的路径, 图中的黑点代表了噻托溴铵的莨菪烷上的 C3 原子的踪迹, 最终停留在胞外受体的门庭处 (虚线圈附近); 若将噻托溴铵放到溶剂中 (图 5b), 分子所处的位置大致与图 5a 的门庭处相同。用 M2 受体作动

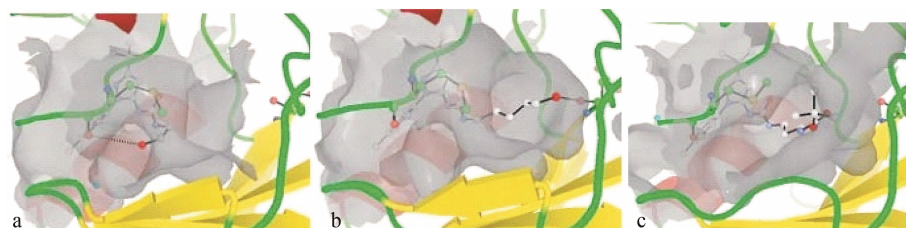


图4 化合物5~7与周期蛋白依赖性激酶8的晶体结构图

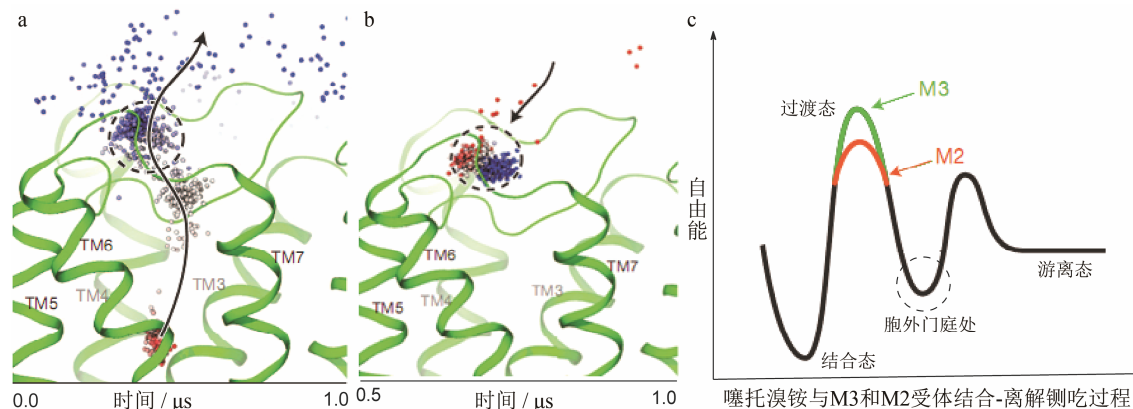


图5 噻托溴铵与 M3 受体动力学模拟 (a 和 b) 和复合物解离过程的自由能变化图 (c)

力学分子模拟, 由于跨膜蛋白的柔性和可移动性强于 M3 受体, 噻托溴铵在受体部位的驻留时间短, 较快地离开 M2 受体, 体现了动力学选择过程。图 5c 是噻托溴铵与 M3 和 M2 结合与离解过程的自由能变化图, 与 M3 的复合物过渡态自由能高于 M2, 显示出慢离解特征^[9]。

4.3 利用去水合位点的分子再设计 去水合位点 (dehydrons) 是蛋白质结构域中比较常见的现象, 它的发生是当可溶性蛋白在空间排布构成高级结构时, 在不相邻的氨基酸残基之间可形成氢键 $N-H\cdots O=C$, 如果由于所处的环境使该氢键一部分被水合、一部分被疏水性基团包围, 这样的氢键就不太稳定, 被认为是有缺陷的氢键, 这种氢键具有亲近疏水基团、“挤走”水分子的趋势, 因为氢键在疏水环境中更加稳定。去水合位点具有趋近、吸引和融合非极性基团的倾向, 易于接近配体的非极性基团, 因而利用存在的去水合位点在原有配体 (或药物) 的基础上可设计新的配体分子 (redesign), 从而提高选择性, 降低脱靶作用^[10]。

利用水合位点进行重新设计的一个实例, 是对抗肿瘤药物伊马替尼 (**1**) 结构的再优化。前已述及, 伊马替尼是抑制 Bcr-Abl 和 c-Kit 激酶的抗肿瘤药物, 但由于脱靶作用而抑制心脏 c-Kit 激酶, 导致心肌细胞的 ATP 枯竭, 引起心脏损伤。对伊马替尼分子的再设计, 是利用 Bcr-Abl 和 c-Kit 激酶的结合部位存在

多个去水合位点, 其中 Bcr-Abl 的 Met318 与 Gly321 之间形成了完全被疏水包裹的氢键, 而在 c-Kit 激酶结构域中的 Cys673 与 Gly676 生成的氢键是有缺陷的去水合位点, 因而, 如果在伊马替尼接近 Cys673-Gly676 的部位加入疏水性基团, 有可能提高和改变对 c-Kit 激酶的结合。图 6 是化合物 **9** (WBZ_4, 在伊马替尼的吡啶环上连接 4-甲基) 与 Bcr-Abl 和 c-Kit 激酶分子对接图, 甲基的引入干预了 c-Kit 去水合位点, 提高了肿瘤细胞 c-Kit 激酶氢键的稳定性和结合强度, 而对于心脏 c-Kit 的去水和位点影响小, 因而提高了抑制肿瘤的选择性作用^[11, 12]。

5 受体相互作用蛋白 1 激酶抑制剂的研究

本节所叙述的例子还未达到成药上市阶段, 但从发现苗头和先导物、优化的理念和机制的论证, 所用的技术方法对于精准的药物研发有所借鉴^[13]。

5.1 常规性普筛未能获得苗头化合物 受体相互作用蛋白 1 激酶 (receptor interacting protein 1 kinase, RIP1) 是肿瘤坏死因子介导的炎症和病理过程的重要驱动剂, 例如, 调控前炎性细胞因子的产生, 引起细胞凋亡, 以及下调 TNF 受体 1 的表达等, 因而是最近发现的治疗多种炎症的药物靶标。

为了发现先导物, GSK 公司首先用既往研发激酶抑制剂所合成的化合物, 特别关注筛选结合于活性环套的 DFG-out 构象的 2 型抑制剂, 进行了广泛的筛选, 虽发现了活性化合物, 但由于分子尺寸大, 难以

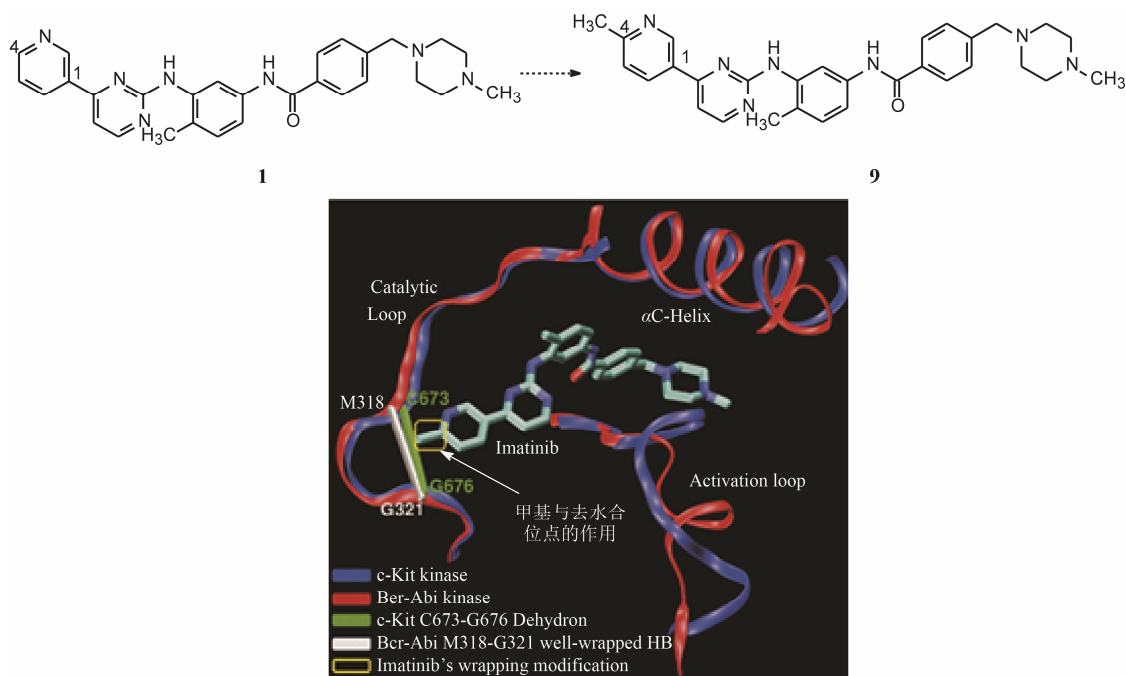


图 6 4-甲基伊马替尼与 c-Kit 去水合位点 (绿色) 的疏水相互作用

优化, 而且对其他激酶呈现泛抑制作用, 故而未作深入研究。

遂之用高通量方法筛选了 200 万个化合物, 得到的苗头化合物经优化结构, 化合物 **10** 有良好的体外活性与选择性, 然而对小鼠的口服利用度低, 成药的前景渺茫, 也终止了研究^[14]。

5.2 筛选超大型 DNA 编码化合物库获得了有研发前景的苗头化合物 为了发现新的结构类型, GSK 筛选了自己构建的超大型 DNA 编码化学库 (DEL), 大约有 77 亿个结构多样性分子 (关于用 DNA 片段作为条形码分别标注和识别小分子化合物的 DEL, 其原理与应用可参阅文献^[15])。从中只发现极少数具有苯并噁氮草酮为母核的分子, 与 RIP1 有特异性结合。由于结构类型与已知的激酶抑制剂完全不同, 分析其结构和成药性前景, 认为有必要深入研究, 遂合成了相关的化合物, 其中 **11**~**13** 有较好的抑制 RIP1 酶活性和细胞活性, **11** 的活性 ($IC_{50 \text{ 酶}} = 32 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $IC_{50 \text{ 细胞}} = 16 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 强于 **12** 和 **13**, 进而合成 **11** 的对映体 **14** (*R* 构型), 考察活性与构型的关系, 结果表明 **14** 的活性完全丧失 ($IC_{50 \text{ 酶}} > 10\,000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 提示化合物的 *S* 构型具有特异性。

5.3 优化 *S*-构型的化合物结构 化合物 **15** 是 **11** 的 *N*-甲基化合物, 进一步提高了活性 ($IC_{50 \text{ 酶}} = 1.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $IC_{50 \text{ 细胞}} = 10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。同时还测定了这些化合物的结合动力学性质, 提示化合物 **15** 的离解速率显著低于其他化合物, $t_{1/2 \text{ 结合}} = 11 \text{ min}$ ($k_{\text{off}} = 0.0015 \text{ s}^{-1}$), 进一步找到 **15** 高活性和高选择性的根据。

为了确定化合物 **15** 与 RIP1 结合的特征, 测定了化合物的光亲和标记作用 (photoaffinity label), 分别合成了在 **15** 的分子结构两端 (与 RIP1 结合的重要位置) 引入三氟甲基二氮杂环丙烷, 后者在光作用下, 开环形成活泼的亲电性基团, 对邻近氨基酸残基加以标记。经 LC-MS 分析表明与 RIP1 是 1:1 化学计量性结合, 被标记的位置分别是活化环套的 Ser161

和富含甘氨酸环套的 Phe28 残基, 从而定位了化合物 **15** 的结合模式。图 7 是基于光亲和标记的质谱分析对化合物 **15** 与 RIP1 的分子模拟图, 可以看出分子的两端苯并噁氮草酮和苄基分别与两个环套的 Ser161 与 Phe28 发生结合。

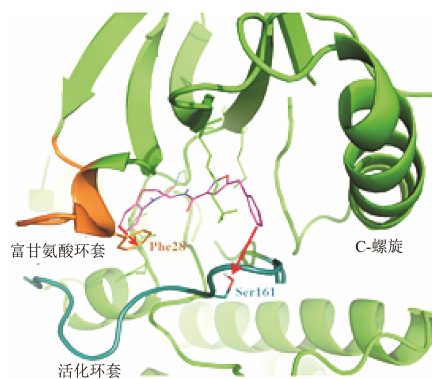


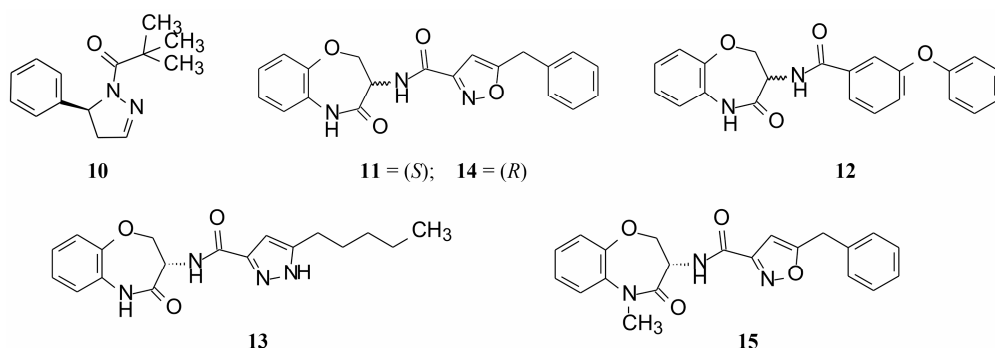
图 7 分子模拟显示的化合物 **15** 与 RIP1 的结合图

进而还用同位素方法揭示 **15** 的结合特征。首先, RIP1 经氢-氘交换将肽链上的 H-N 交换成 D-N 后, 质谱分析显示发生显著的变化区域有: 富含甘氨酸残基的环套、活化环套、C 螺旋和铰链。与化合物 **15** 低温温孵的质谱分析结果表明, 前 3 个区域的结合作用减退, 而铰链处质谱行为没有发生变化, 推论化合物 **15** 未同酶的铰链区结合。

5.4 化合物 **15 与 RIP1 的晶体结构** 图 8 是化合物 **15** 与 RIP1 复合物晶体结构图, 显示出化合物 **15** 埋藏在 C-端和 N-端结构域之间的腔穴内, 没有同铰链发生相互作用, 证实了上述氢-氘交换质谱分析的推论。苯并噁氮草酮环没有占据 ATP 的腺嘌呤位置, 而是处于 α 磷酸基的区域。因而 **15** 与 RIP1 的结合方式既不是 1 型抑制剂, 也不是纯粹作用于变构位点的 2 型抑制剂, 而属于激酶的 3 型抑制剂。

6 其他

基于靶标结构的分子设计结合药物化学的构效关系分析, 在研发激酶抑制剂领域得到广泛的应用,



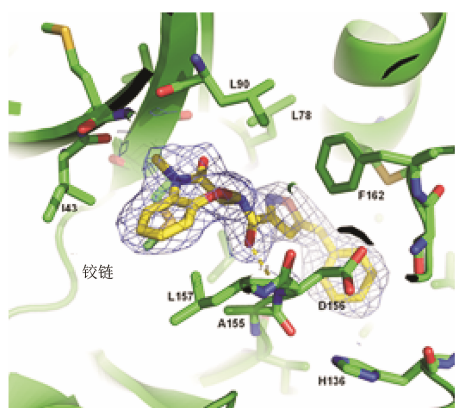
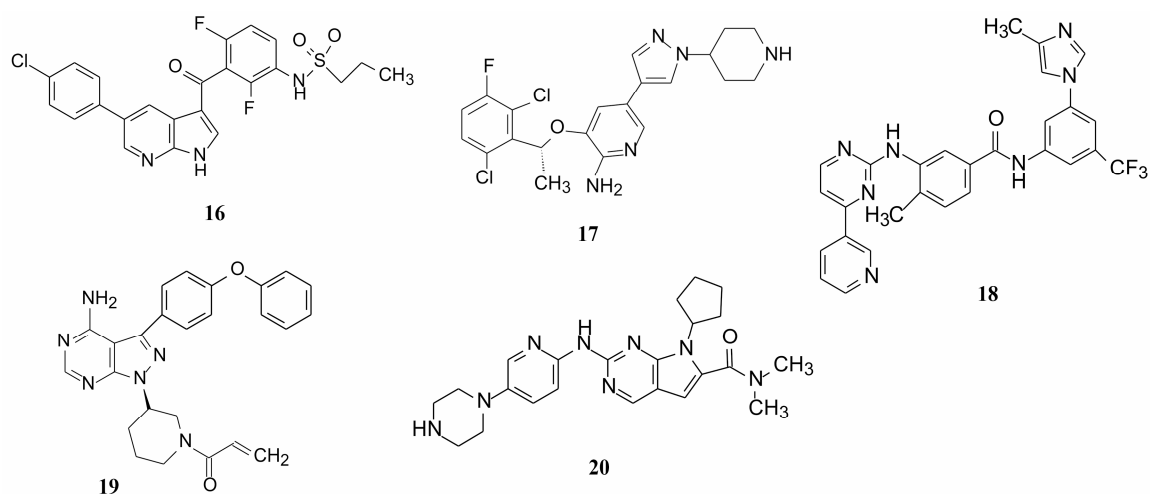


图8 化合物 15 与 RIP1 晶体衍射图

并有诸多的成功范例。例如针对黑色素瘤高表达的 B-Raf^{V600E} 变异激酶研发的维罗非尼 (16, vemurafenib)。靶标为间充质上皮转化因子激酶 (c-Met) 在肿瘤细胞中变异和高表达, 克唑替尼 (17, crizotinib) 不仅抑制 c-Met, 还抑制 ALK 蛋白激酶, 结合探针性试剂盒的应用对于 ALK 呈阳性表达的小细胞肺癌患者具有特异性治疗作用。诺华公司为克服伊马替尼治疗慢性粒细胞白血病而产生的耐药性, 针对变异的激酶 Bcr-Abl^{M315I}, 成功研制了第二代的抗耐药抑制剂尼洛替尼 (18, nilotinib)。针对在 B 细胞抗原受体的信号通路中起重要作用的 Bruton 酪氨酸激酶 (BTK), 成功设计的 BTK 激酶抑制剂依鲁替尼 (19, ibrutinib), 治疗 B 细胞恶性增生和风湿性关节炎, 该药物的分子结构中含有迈克尔加成基团, 接近于激酶开口处的 Cys481, 与亲核性基团巯基发生共价结合, 提高了选择性作用。诺华公司研制的另一个靶向药物 ribociclib (20) 是细胞周期蛋白依赖性激酶 4 和 6 (CDK4/6) 双重抑制剂, 对激素成阳性 (HR+) 和表皮生长因子受体 2 呈阴性 (HER2-) 的绝经期妇女

晚期乳腺癌疗效显著, 有望获得批准上市。靶向药物的研制为患者的个体化治疗提供了有针对性选择。

7 小结与展望

精准医学是在大数据网络时代和深化的分子医学相结合而产生的新的医疗理念, 药物作为治疗手段的供应侧, 对其品质提出了更高更精确的要求。在这方面最近出现的肿瘤免疫疗法可谓精准医疗的尝试, 把靶标蛋白的生理特征与抗原-抗体的结构高度互补性相结合, 克服了技术上一道道难关实现了某些肿瘤治疗的颠覆性的突破。尽管对抗原-抗体结合的三维结构尚不清晰, 但划时代的疗效引领了精准医学的实施和革新。

小分子药物的精准设计与此不同, 更依赖于对靶标的功能和三维结构的清晰了解, 通过基于结构的药物设计 (SBDD)、结构生物学、分子模拟和构效分析 (SAR 等, 对分子的微观结构做到“精雕细刻”的优化, 同时将微观结构完全融汇到分子的宏观性质中, 满足物理化学和药代动力学 (ADME) 性质的要求。其中药物对靶标组织或器官的特异性分布 (D) 仍属于药代的瓶颈, 是分子设计的盲区, 处于“打哪儿指哪儿”的宿命状态。以代谢组学为切入点, 也是精确药物设计和应用的重要领域。所以, 从更宽的视野考量药物, 最终体现在优于现有的标准治疗方法。新药研究任重道远。

References

- [1] Cowan-Jacob SW, Guez V, Fendrich G, et al. Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment [J]. Mini-Rev Med Chem, 2004, 4: 285–299.

- [2] Huang WS, Metcalf CA, Sundaramoorthi R, et al. Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-[(4-methylpiperazin-1-yl)-methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 4701–4719.
- [3] Tie YPI, Boross YF, Wang L, et al. High resolution crystal structures of HIV-1 protease with a potent non-peptide inhibitor (UIC-94017) active against multidrug-resistant clinical strains [J]. *J Mol Biol*, 2004, 338:341–352.
- [4] Leonis G, Czyznikowska Z, Megariotis G. Computational studies of darunavir into HIV-1 protease and DMPC bilayer: necessary conditions for effective binding and the role of the flaps [J]. *J Chem Inf Model*, 2012, 52: 1542–1558.
- [5] Deng H, Sun H, Fang Y. Label-free cell phenotypic assessment of the biased agonism and efficacy of agonists at the endogenous muscarinic M3 receptors [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2013, 68: 323–333.
- [6] Matthews PM, Rabiner EA, Passchier J, et al. Positron emission tomography molecular imaging or drug development [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2012, 73: 175–186.
- [7] Schneider EV, Böttcher J, Huber R, et al. Structure-kinetic relationship study of CDK8/CycC specific compounds [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 8081–8086.
- [8] Vauquelin G, Charlton SJ. Long-lasting target binding and rebinding as mechanisms to prolong *in vivo* drug action [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161: 488–508.
- [9] Kruse AC, Hu JX, Kobilka BK, et al. Muscarinic acetylcholine receptor X-ray structures: potential implications for drug development [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2014, 16: 24–30.
- [10] Fernandes A, Scott R. Dehydron: a structurally encoded signal for protein interaction [J]. *Biophys J*, 2003, 85: 1914–1928.
- [11] Demetri GD. Structural reengineering of imatinib to decrease cardiac risk in cancer therapy [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117: 3650–3653.
- [12] Fernández A, Sanguino A, Peng Z, et al. An anticancer c-Kit kinase inhibitor is reengineered to make it more active and less cardiotoxic [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117: 4044–4054.
- [13] Harris PA, King BW, Bandyopadhyay D, et al. DNA-encoded library screening identifies benzo[b][1,4]oxazepin-4-ones as highly potent and monoselective receptor interacting protein 1 kinase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 2163–2178.
- [14] Berger SB, Harris P, Nagilla R, et al. Characterization of GSK'963: a structurally distinct, potent and selective inhibitor of RIP1 kinase [J]. *Cell Death Discov*, 2015, 1: 15009.
- [15] Arico-Muendel CC. From haystack to needle: finding value with DNA encoded library technology at GSK [J]. *Med Chem Commun*, 2016. DOI: 10.1039/C6MD00341A.