

IRE1 α 抑制剂的研究进展

冯 伟, 谢亚非, 华东东, 石 慧*, 刘 磊*

(天津药物研究院有限公司, 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300301)

摘要: 肌醇需求酶 1 α (inositol requiring enzyme 1 alpha, IRE1 α) 是一种内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ER stress) 感受器, 广泛表达于哺乳动物中。IRE1 α 通路在未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 的 3 条信号通路中是最保守的。研究表明, IRE1 α 过表达与肿瘤的发生、发展有着密切的联系, 因此, IRE1 α 抑制剂的研究对新型抗肿瘤药物的发现有着重要的意义。本文综述了具有抗肿瘤活性的 IRE1 α 抑制剂, 并从作用机制、结构特点、抑制活性等方面进行了总结, 希望为靶向 IRE1 α 治疗肿瘤的研究提供思路。

关键词: 内质网应激感受器; 未折叠蛋白反应; IRE1 α ; IRE1 α 抑制剂; 抗肿瘤

中图分类号: R914 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2023)10-2970-09

Research progress of IRE1 α inhibitors

FENG Wei, XIE Ya-fei, HUA Dong-dong, SHI Hui*, LIU Lei*

(Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China)

Abstract: Inositol requiring enzyme 1 alpha (IRE1 α), a widespread transmembrane protein in mammals, is an endoplasmic reticulum stress (ER stress) receptor. Among the three signaling pathways of the unfolded protein response (UPR), the IRE1 α pathway is the most conservative. And there is a growing body of evidence that the occurrence and development of tumors is closely related to the over-expression of IRE1 α . Therefore, the study of the IRE1 α inhibitors is of great significance to the discovery of new anti-tumor drugs and has been attracting more and more attention. In the hope of providing ideas for the research of targeting IRE1 α for cancer therapy, this paper reviewed the data of representative IRE1 α inhibitors, including inhibitory activity, the mechanism of action, structural characteristics, and so on.

Key words: endoplasmic reticulum stress receptor; unfolded protein response; IRE1 α ; IRE1 α inhibitor; anti-tumor

癌症是全球疾病和死亡的主要原因之一, 严重危害了人类健康。为了克服传统化疗药物的局限性, 近几年发展了精准靶向肿瘤细胞研发药物治疗癌症的策略。有研究表明, 内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ER stress) 所产生的未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 与肿瘤的发生、发展和耐药性密切相关^[1]。肌醇需求酶 1 α (inositol requiring enzyme

1 alpha, IRE1 α) 信号通路是 UPR 中最保守的信号通路^[2]。因此, 针对该靶点的研究备受关注。

1 IRE1 α 信号通路

内质网是一种动态的“营养敏感”细胞器, 负责蛋白质的合成与修饰, 同时还参与葡萄糖代谢、钙的储存与调节和脂质稳态的维持。一些外源性或内源性的因素会导致不正确折叠的蛋白在内质网中累积, 从而引起内质网应激, 最终破坏内质网的正常生理功能^[3]。为了缓解内质网应激, 内质网触发了一种适应性反应—UPR^[4]。UPR 有 3 个主要的内质网压力应激感受器,

收稿日期: 2023-01-12; 修回日期: 2023-02-27.

*通讯作者 E-mail: shihui@tipr.com.cn; liul@tipr.com.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0042

分别是 IRE1 α 、双链 RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 和活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)^[2]。这 3 个内质网应激感受器的内质网管腔域通常与内质网伴侣蛋白 (binding immunoglobulin protein, Bip) 结合, 使其处于非活性状态, 当发生内质网应激时 Bip 解离, 从而引发 UPR (图 1)^[5]。

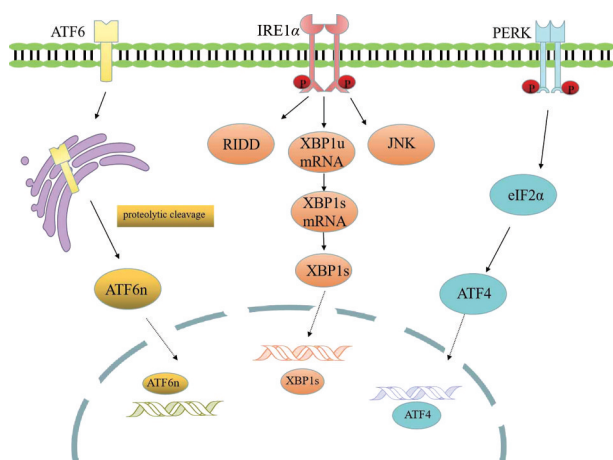


Figure 1 The three arms of the unfolded protein response (UPR)

IRE1 α 通路是 UPR 的 3 条通路中最保守的信号通路, 广泛表达于哺乳动物中。它是一种 I 型跨膜蛋白, 由 3 部分结构域组成: ① 内质网管腔域: 与内质网腔内的 BiP 结合, 可以感知未折叠蛋白; ② 胞质激酶结构域; ③ 胞质核糖核酸内切酶 (endoribonuclease, RNase) 结构域^[6]。当内质网应激发生时, 内质网内累积的未折叠或错误折叠蛋白质与 IRE1 α 竞争性结合 BiP, 导致 IRE1 α 和 BiP 解离, 解离后的 IRE1 α 发生磷酸化。磷酸化的 IRE1 α 通过 3 种途径发挥其功能^[2,7]: ① 促进剪接型 X 盒结合蛋白 1 (spliced X-box binding protein 1, XBP1s) 的表达。IRE1 α 在磷酸化之后诱导构象变化, 激活其 RNase 结构域, 以催化 XBP1 mRNA 中 26 个核酸的内含子的切除, 再通过连接酶重新连接, 转化为一种活性转录因子—XBP1s。XBP1s 能够通过上调内质网应激相关基因的表达, 增强内质网折叠和降解蛋白质的能力, 从而缓解内质网应激; ② 通过激活 RNase 结构域, 从而引发调节型 IRE1 α 依赖的衰减 (regulated IRE1 α -dependent decay, RIDD) 过程, 降解多种与内质网相关的 mRNA, 该过程也能够导致细胞凋亡的发生; ③ 结合 TNF 受体相关因子 2 (TRAF2), 激活凋亡信号调节激酶 1/c-Jnk 氨基末端激酶信号通路, 引发细胞凋亡 (图 2)。

肿瘤细胞在缺氧、缺乏营养或致癌因子表达等因素的作用下通过 IRE1 α 信号通路的 XBP1 mRNA 的剪

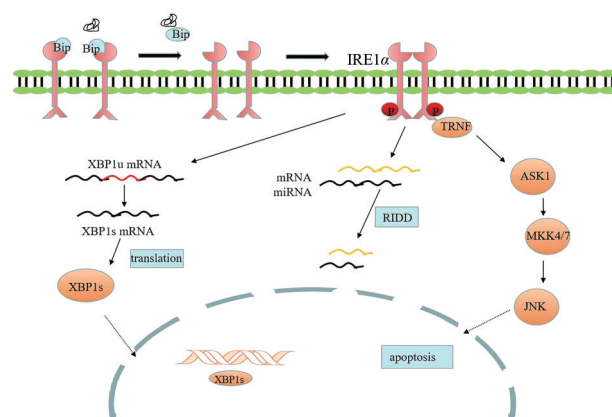


Figure 2 Pharmacologic targeting of the inositol requiring enzyme 1 alpha (IRE1 α) of UPR signaling pathway

接或者 RIDD, 从而促进肿瘤的发生、发展和产生耐药性^[1], 同时 IRE1 α 也在肿瘤免疫中发挥重要作用^[8]。目前, 多种策略已被用来开发有效的 IRE1 α 抑制剂以达到抗肿瘤的作用。IRE1 α RNase 活性对于细胞在应激条件下的适应能力至关重要。在 IRE1 α 信号通路中 XBP1 mRNA 的剪接和 RIDD 的发生均与 RNase 结构域的激活有关, 因此可通过抑制 IRE1 α RNase 的活性以达到抗肿瘤的作用。在已报道的 IRE1 α 抑制剂中, 根据结合于不同结合位点可分为: ① 作用于 RNase 结构域的共价抑制剂; ② 作用于激酶结构域的变构抑制剂; ③ 作用于 RNase 区域的二聚体界面的抑制剂。

2 作用于 RNase 结构域的共价抑制剂

目前直接作用于 RNase 结构域的抑制剂研究较多的是共价抑制剂, 该类共价抑制剂均含有一个共同的羟基芳基醛 (hydroxy-aryl-aldehyde, HAA) 片段。该片段与 IRE1 α RNase 结构域内特定的亲核残基 (Lys907) 通过 Schiff 反应形成稳定的亚胺键。HAA 类抑制剂能有效地抑制 IRE1 α RNase 活性, 从而防止内质网应激诱导的 XBP1 mRNA 的裂解。

水杨醛类似物是最早发现的 HAA 抑制剂 (图 3)^[9]。水杨醛类似物是选择性的 IRE1 α RNase 抑制剂, 在体内和体外均具有活性。在使用毒胡萝卜素 (thapsigargin, Tg) 作为应激源的情况下, 在 HEK293 细胞中测试了化合物 3-乙氧基-5,6-二溴-水杨醛 (1) 和 3-甲氧基-6-溴-水杨醛 (2) 的活性, 发现呈剂量依赖性抑制 XBP1 的形成。同时, 将化合物 1 和 2 与其他的应激源 [二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DDT) 和衣霉素 (tunicamycin, Tm)] 同时加入到骨髓瘤细胞系人多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 1 中, 发现化合物均可抑制 XBP1 的剪接, 并且发现在内质网应激剂处理前、期间或之后添加化合物均可以抑制 XBP1 的剪接。此外, 通过体内研究发现, 小鼠在注射化合物 2 之后, 肝脏和肾脏中

XBP1的剪接受到80%的强烈抑制。

通过高通量筛选, Cross等^[10]发现了双环的IRE1 α RNase抑制剂**3** (4 μ 8c, 图3)。该抑制剂可以阻断底物进入IRE1 α 的活性位点, 并选择性地抑制XBP1的剪接和IRE1 α 介导的mRNA降解 ($IC_{50} = 4.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在细胞实验中发现, 与IRE1-4 μ 8c复合物在体外的稳定性相比, 在交换培养基后, 化合物**3**介导的XBP1的剪接的抑制作用迅速恢复, 同时结合对hIRE1 α 蛋白进行的分子动力学研究证实了化合物**3**对IRE1 α RNase活性的抑制作用是可逆的。

MKC8866 (**4**) 是选择性IRE1 α RNase抑制剂 (图3), 在RNase催化位点内与IRE1 α 结合, 并抑制XBP1的剪接和RIDD活性。在乳腺癌细胞中化合物**4**通过抑制IRE1 α RNase活性从而减少致癌因子 [IL-6、IL-8和colony-stimulating-factor (GM-CSF)] 的生成, 从而抑制乳腺癌细胞的增殖^[9,11]。目前化合物**4**已进入临床I/II期阶段, 拟用于晚期实体瘤、特发性肺纤维化治疗和乳腺癌 (临床编码: ORIN1001)。

Xiao等^[12]报道了化合物**4**和AZD1775在TP53突变的卵巢癌细胞中具有协同作用。AZD1775是WEE1激酶的选择性小分子抑制剂, 在TP53突变的卵巢癌患者中显示出了良好的抗肿瘤活性。他们通过使用AZD1775处理的OVCAR8细胞进行了RNA测序 (RNA-seq) 分析和蛋白质印迹分析技术发现了AZD1775在TP53突变的卵巢癌细胞中会触发UPR。基于这一结果, 评估了抑制IRE1-XBP1通路是否会增强AZD1775对TP53突变的卵巢癌细胞的抗肿瘤作用。用固定比例的AZD1775和化合物**4** (1:2.5) 以一系列浓度处理细胞。在OVCAR8和HOC7细胞中, AZD1775和化合物**4**联合给药比单独使用任何一种药物表现出更强的细胞活性抑制作用。

Vieri等^[13]报道了靶向BCR-ABL1和IRE1 α 诱导费

城阳性急性淋巴细胞 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 白血病的合成致死。有研究表明BCR-ABL1会影响IRE1 α 的功能, 导致与正常B细胞前体相比, BCR-ABL1阳性的急性淋巴细胞白血病细胞中XBP1的表达和活性增加^[14]。基于这一研究, Vieri等^[13]研究了使用酪氨酸激酶抑制剂 (尼洛替尼) 和IRE1 α 抑制剂 (化合物**4**), 通过同时抑制BCR-ABL1和IRE1 α 来评估对费城阳性 (Ph⁺) ALL的疗效。首先通过人费城阳性的ALL细胞系SUP-B15和TOM-1进行了滴定试验确定化合物**4**和尼洛替尼的疗效范围, 分别为30和0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。之后以SUP-B15和TOM-1为模型, 检测了尼洛替尼和化合物**4**联合使用对细胞增殖的生物学效应。用羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 染色的细胞显示, 单药化合物**4**或尼洛替尼后增殖率没有显著降低, 联合靶向时增殖率显著降低。

Sanches等^[15]报道了化合物**5** (MKC9989)、化合物**6** (OICR464) 和化合物**7** (OICR573) 这三个化合物结合于IRE1 α 蛋白的晶体结构 (PDB ID: 4PL3、4PL4和4PL5)。它们能够抑制小鼠和人IRE1 α RNase活性, 但对酵母IRE1 α RNase的抑制活性较低。同时其抑制活性随着与IRE1 α 的预孵育时间增加而增强 (图3)。通过对3个晶体结构的分析总结出HAA类抑制剂的共有结合模式 (图4): ① HAA醛基和Lys907的胺基之间形成的Schiff碱共价键相互作用; ② HAA羟基与Tyr892侧链之间的氢键相互作用; ③ HAA芳香环与Phe889和His910侧链的 π - π 堆叠作用。同时, 以**8** (MKC3437) 为骨架进行了构效关系分析验证了该结合模式, 为该类可逆共价抑制剂的改造奠定了基础 (图5)。

Papandreou等^[16]基于表型筛选得到了抑制剂**15** (STF-083010, 图6)。在生理条件下, 化合物**15**发生水解使醛基暴露出来, 从而发挥活性。它能在内质网应

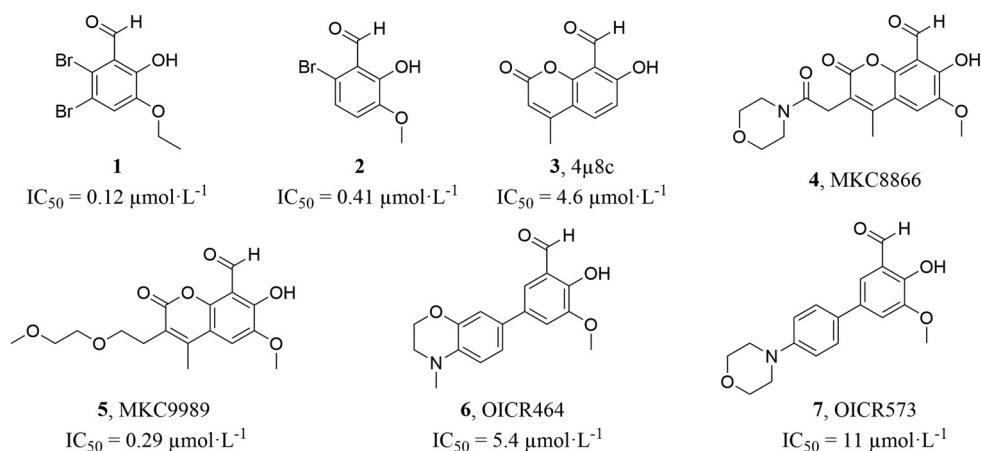


Figure 3 The structure of covalent inhibitors

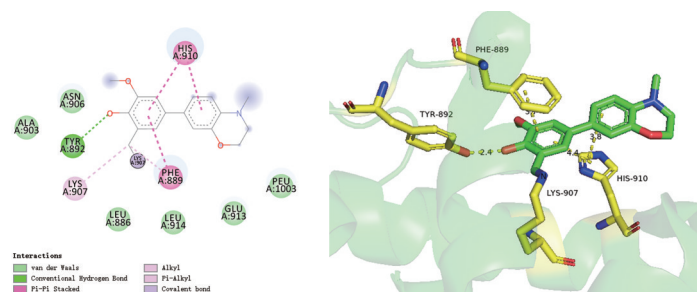


Figure 4 Notable interactions mediating OICR464 binding to IRE1 α

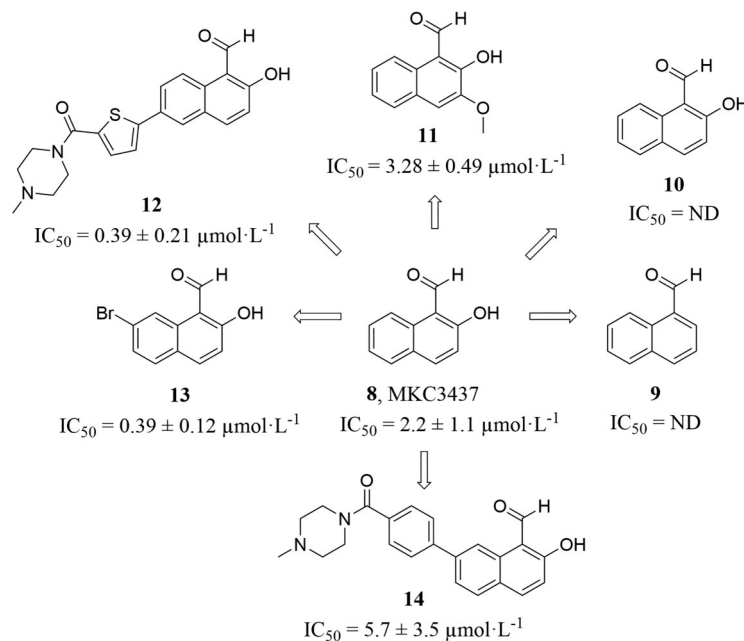


Figure 5 The structure-activity relationships of covalent inhibitors

激后抑制 IRE1 α RNase 活性, 而不影响其激酶活性。将 RPMI 8226 MM 细胞作为皮下肿瘤的异种移植体在 小鼠中造模。当肿瘤平均体积达到 150 mm³ 时, 2 组小鼠 (每组 5 只小鼠) 分别给予 30 mg·kg⁻¹ 化合物 **15** 或空白药物治疗, 每周 1 次, 连续 2 周。结果表明, 单独腹腔注射化合物 **15** (第 1 天, 第 8 天) 可显著抑制这些肿瘤的生长。

Tang 等^[17]合成了一类新的三环骨架的 HAA 抑制剂 **16** (图 6), 能够有效抑制 XBP1 的表达并诱导细胞凋亡。为了优化化合物 **16** 的细胞活性, 同时提高化合物的水溶性, 合成了化合物 **17**。化合物 **17** 抑制小鼠慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 细胞的生长的能力优于化合物 **16**。选择了携带肿瘤的小鼠 (CLL 细胞占外周血中淋巴细胞的大部分), 每周前 5 天给小鼠腹腔注射 50 mg·kg⁻¹ 的化合物 **17**, 持续治疗 3 周, 明显观察到外周血中 CLL 细胞衰退。通过免疫印迹分析, 证实了化合物 **17** 抑制了小鼠外周血中收集的 CLL 细胞中 XBP1s 的表达。同时发现注射化合物 **17** 对小鼠没有明显的

不良反应或毒性。通过液质分析, 证明了化合物 **17** 结构中的 1,3-二噁烷保护部分能够增强细胞对药物的摄取, 一旦进入细胞, 就会分解为具有生物活性的醛基, 从而发挥 IRE1 α RNase 抑制活性。

2019 年与 Tang 同实验室的 Shao 等^[18]报道了一种独特的前药策略, 可用于精确控制 IRE1 α 抑制剂的活性。首先通过先导化合物的优化发现了具有强荧光的化合物 D-F07, 同时在 D-F07 的羟基上引入光不稳定的片段, 最终得到了化合物 **18** (PC-D-F07, 图 6)。这种对羟基的化学修饰可以显著稳定 1,3-二噁烷缩醛保护基团, 从而允许特定刺激介导的抑制活性控制。在光激活后, D-F07 上暴露出的羟基触发 1,3-二噁烷缩醛的缓慢分解, 从而发挥抑制 IRE1 α RNase 的活性。

2022 年 Shao 等^[19]报道了同时具有内质网应激诱导和 XBP1s 抑制作用的 IRE1 α RNase 抑制剂 **19** (TC-D-F07, 图 6), 基于 D-F07 的结构基础在羟基上连接二硝基苯磺酰基 (Dns), 具有强吸电子性的 Dns 基团稳定了邻位的 1,3-二噁烷缩醛。相对于正常细胞, 含有硫

基片段的谷胱甘肽 (GSH) 和半胱氨酸 (Cys) 在癌细胞的表达水平更高, 而 Dns 基团容易与巯基发生反应, 因此在肿瘤细胞中化合物 **19** 能更容易转化为前药 D-F07。同时, 在细胞实验中发现了 Dns 与硫醇 (GSH 和 Cys) 的加合物可以诱导内质网应激, 导致肿瘤细胞中 XBP1s 的表达增加。但是, 随着 D-F07 逐渐分解为具有活性的 IRE1 α 抑制剂, 最终抑制了肿瘤细胞的 XBP1s 活性, 与其他未引入 Dns 片段的类似物相比, 化合物 **19** 可以导致更严重的细胞凋亡。正是由于 TC-D-F07 具有内质网应激诱导和 XBP1s 抑制的双重作用, 与单独或联合诱导内质网应激并抑制 XBP1s 活性的化合物相比, TC-D-F07 抑制剂在肿瘤细胞中表现出更高的细胞毒性。

3 作用于激酶结构域的变构抑制剂

该类变构抑制剂属于 Type II 激酶抑制剂, 结合于 ATP 结合位点, 选择性地稳定 ATP 结合位点的非活性构象。它们能够通过 ATP 结合位点和邻近的变构位点接触来阻断自磷酸化和 RNase 活性。

Wang 等^[20]首次报道了化合物 **20** (KIRA3)。即使是在内质网应激期间也可以抑制 XBP1 mRNA 的剪接 ($IC_{50} = 3.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 随后在化合物 **20** 的基础上发展了抑制激酶的核糖核酸内切酶衰减剂 (kinase-inhibiting RNase-attenuators, KIRAs)。为了确定哪些片段能够影响 KIRAs 的活性, Feldman 等^[21]以化合物 **20** 为基准, 进行了系统的构效关系研究 (图 7): ① R_1 代表烷基, 其中 R_1 为 1-甲基环丙基时活性最高 (kinase $IC_{50} = 1.3 \pm 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, RNase $IC_{50} = 1.8 \pm 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); ② R_2 代表含有取代基的芳环, 和萘环相比, R_2 为 3-氟苯基时, 化合物保持了亚微摩尔活性 (kinase $IC_{50} = 0.85 \pm 0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, RNase $IC_{50} = 0.39 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); ③ R_3 代表含有 3-或 4-取代的苯基氨基, 但只有当 R_3 为 3-氟苯基氨基时显示出与化合物 **17** 相同的活性

(kinase $IC_{50} = 0.11 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, RNase $IC_{50} = 0.22 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); ④ 对 R_4 进行结构研究, 当 R_4 为脲基团时, 表现出最佳的活性。

KIRAs 为 Type II 激酶抑制剂结合于 ATP 结合位点, 选择性地稳定 ATP 结合位点的非活性构象 (DFG-out 构象), 如图 8A 所示, 当这类 II 型抑制剂与蛋白激酶的 DFG-out 形式结合时, 芳基-脲部分的芳基占据了一个疏水口袋, 该口袋是在 DFG-基序的 Phe 侧链运动时形成的, 同时脲基团作为一个连接体与 DFG 基序的主链形成氢键^[20]。因此也验证了上述构效关系的研究。

Harrington 等^[22]基于高通量筛选出的先导化合物 (**25**) 进行结构优化, 最终得到了选择性和活性均较好的化合物 **26** (KIRA8, IRE1 Enz $IC_{50} = 0.013 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and XBP1 $IC_{50} = 0.099 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 7)。相比较于先导化合物, 化合物 **26** 对 JNK3 的选择性显著提高。如图 8B 所示, 化合物 **26** 与 hIRE1 复合物的晶体结构 (PDB ID: 6URC) 表明: 磺酰胺基团与 DFG 基序的 Asp711 和 Phe712 形成两个氢键, 与 Lys599 (3.0 Å) 接近表明磺酰胺 NH 在结合态脱质子化; 2-氨基嘧啶片段可以与 Cys645 形成氢键; 嘧啶基团具有立体选择性, 可以与 Glu651 形成盐桥^[23]。

化合物 **27** (GSK2850163, 图 9)^[24]是在高通量筛选中发现的一类新骨架。在骨髓瘤细胞系中, 能够呈剂量依赖性地抑制 RNase ($IC_{50} = 200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和激酶活性 ($IC_{50} = 20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。但其选择性不高, 对 PERK 激酶活性也具有抑制作用。通过对化合物 **27** 结合于 IRE1 α 蛋白的晶体结构 (PDB ID: 4YZ9, 图 10A) 分析发现其以一种不寻常的方式结合在激酶口袋中: 该配体采用 U 型构象, 并与氨基酸残基 Glu612 和 Lys599 的侧链发生相互作用; 并且只有 R 对映体符合配体的电子密度, 并显示出 RNase 的抑制活性。化合物 **27** 在激酶口袋的结合也被观察到诱导整个 IRE1 的构象变化,

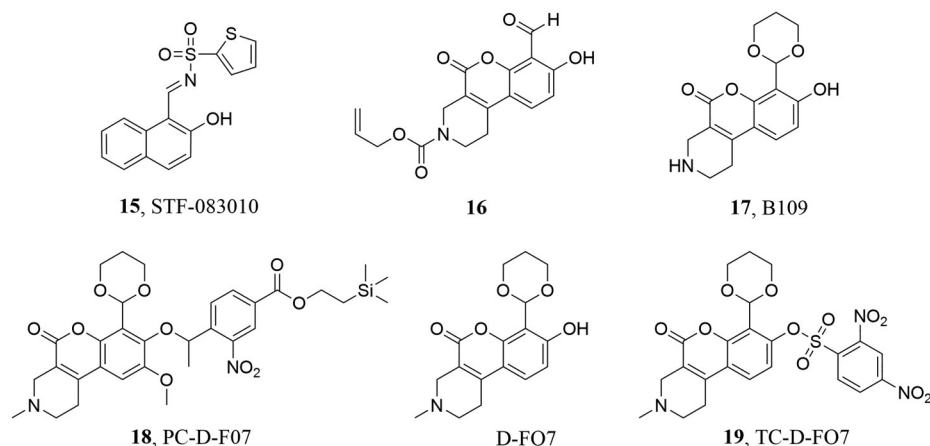


Figure 6 The structures of covalent inhibitors of prodrug

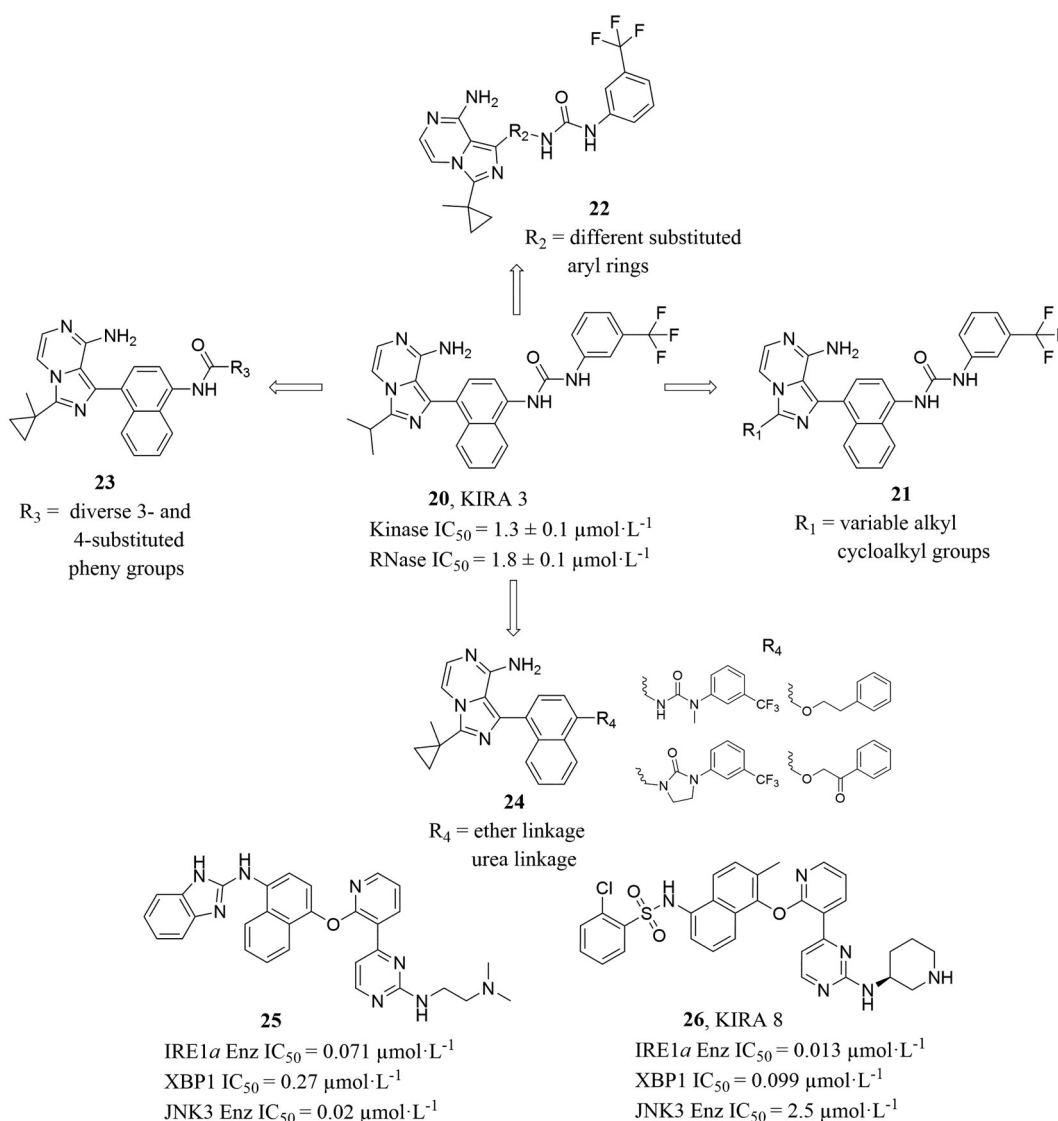


Figure 7 The structures of kinase-inhibiting RNase-attenuators (KIRAs)

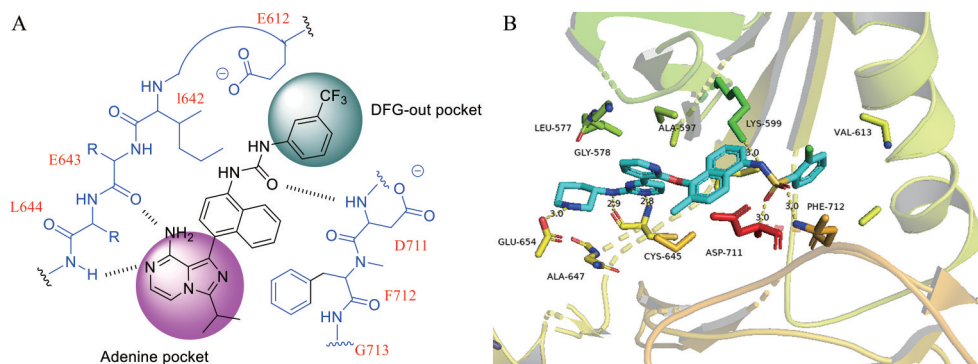


Figure 8 The view of KIRA3 (A) and KIRA8 (B) in the kinase site

导致二聚体界面的改变,特别是, RNase 结构域之间的距离增加 (~4 Å), 共同破坏其 mRNA 的剪接能力。

Colombano 等^[25]报道具有双重抑制作用的咪唑并吡嗪骨架 (**28**, 图9)。如图 10B 所示 (PDB ID:6HX1), 咪唑并吡嗪环与 Cy645、苯并吡嗪环上的 NH 与 Tyr628 发

生相互作用。结合化合物 **28** 与 IRE1 蛋白的结合示意图, 通过结构优化合成了活性最佳的化合物 **29**, 对 IRE1 α 激酶 (IC₅₀ = 160 nmol·L⁻¹) 和 RNase (IC₅₀ = 80 nmol·L⁻¹) 的抑制活性均具有纳摩尔水平。通过抑制剂探针与重组人蛋白和脂质激酶结构域的结合证实了化合物 **28**

和 **29** 具有广泛的激酶选择性 (在 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下测试了针对 455 种野生型和突变型重组人蛋白和脂质激酶), 相比较于最初筛选的化合物 **28**, 化合物 **29** 对激酶的选择性有了明显提高 (由 26/455 中达到 >70% 抑制提升为 4/455 中达到 >70% 抑制)。

Beveridge 等^[26] 通过高通量筛选得到了氨基喹啉骨架的 Braf 激酶抑制剂 (**30**), 能够靶向 IRE1 α 。在此基础上进行结构优化以期提高化合物的活性和选择性, 最终筛选出了化合物 **31** (图 9), 表现出良好的抑制 IRE1 α RNase 的活性 (提高了约 10 倍, IRE1 α RNase IC₅₀ 值由 $0.200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 变为 $0.022 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 并且对 Braf 的抑制活性降低了大约 50 倍 (Braf K_i 值由 $0.0023 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 变为 $0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。如图 10C 所示 (PDB ID: 6XDD), 与 KIRA8 类似, 磺酰胺基团与 DFG 基序的 Phe712 形成氢键, 与 Lys599 (4.0 Å) 接近; 氨基喹啉片段可以与 Cys645 形成氢键; 二氨基环己烷具有立体选择性, 可以与 Glu651 形成盐桥。值得注意的是, 二氨基环己烷 Glu651 形成盐桥的相互作用是提高 IRE1 α 的选择性的关键 (因为在 Braf 中此处为 His539, 不能形成该作用)。

4 作用于 IRE1 α RNase 结构域二聚体界面的抑制剂

Amarasinghe 等^[27] 针对 IRE1 α RNase 区域的二聚体界面进行了虚拟筛选, 从 FDA 批准药物的数据库中筛选出了 4 个具有抑制 IRE1 α RNase 活性的化合物 **32**~**35** (neomycin、pemetrexed、quercitrin 和 rutin)。这些化合物可以避免与靶向 IRE1 α 激酶结构域时发生的选择性相关的问题, 以及靶向 RNase 结构域的共价抑制剂所带来的脱靶效应。他们用 HEK293T 细胞测试活性化合物的 IRE1 磷酸化和用体外荧光测定 IRE1 α RNase 活性均显示亚微摩尔的活性 (图 11)。

5 结语

IRE1 α 信号通路的过度激活与肿瘤的发展和产生耐药性等密切相关, 靶向抑制 IRE1 α 可用于抗肿瘤药物的研发。近年来 IRE1 α 抑制剂的研发取得了较大的进展, 目前已有药物进入临床阶段 (ORIN1001)。IRE1 α 有 3 个主要的结合位点, 包括激酶结构域、RNase 结构域和二聚体界面, 对于结合于激酶结构域、RNase 结构域的抑制剂虽然具备抗肿瘤活性, 但仍有潜在的脱靶风险、选择性等问题。对于结合于二聚体界面的抑制剂可以避免与靶向 IRE1 α 激酶结构域时发生的选择性相

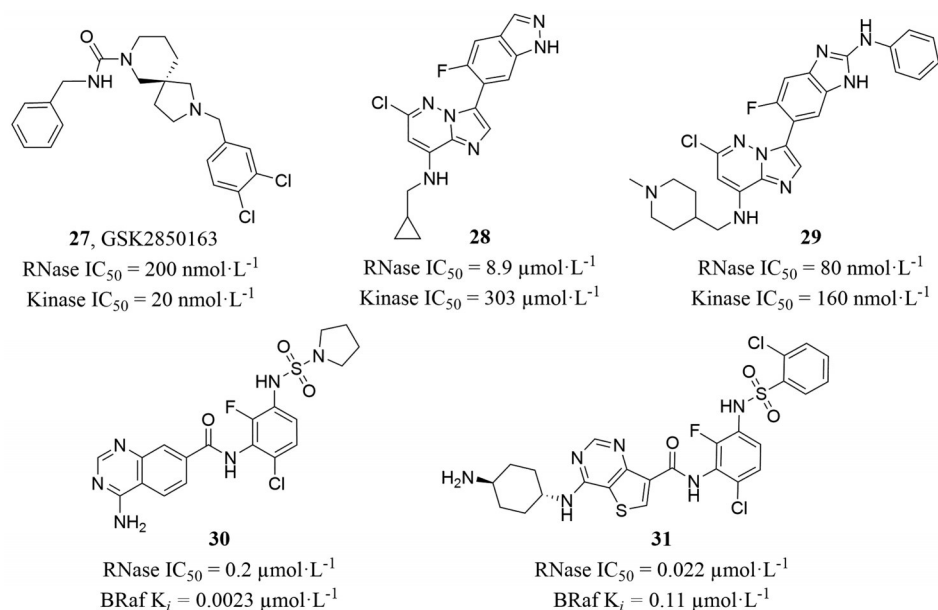


Figure 9 The structures of other allosteric inhibitors

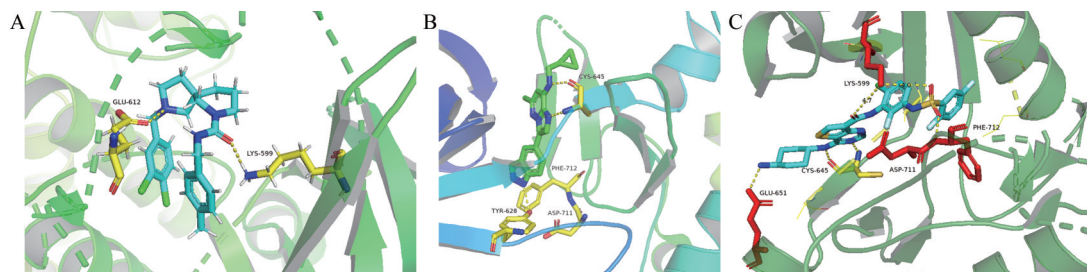


Figure 10 The view of compound **27** (A), **28** (B), **31** (C) in the kinase site

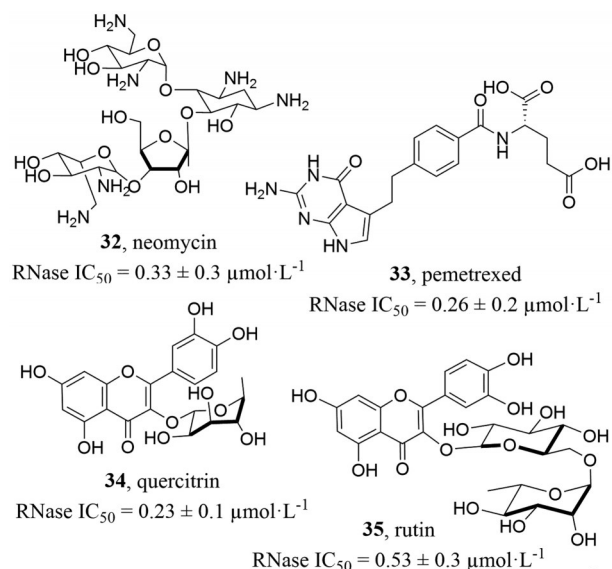


Figure 11 The structures of binding in the dimer interface of IRE1 α RNase domain

关的问题,但报道较少。对于UPR的3个感受器的选择性问题是研究IRE1 α 抑制剂过程中不可忽略的,比如化合物**24**在抑制IRE1 α 通路时也会抑制PERK,长期使用这种化合物会产生显著的不良反应,包括体重减轻和轻度糖尿病^[28];此外,对于其他激酶的选择性也是应该关注的问题,比如化合物**25**经过结构优化之后对于其他激酶的选择性有了显著的提高。IRE1 α 共价抑制剂能够通过与其RNase结构域内特定的亲核残基形成共价键从而有效地抑制IRE1 α RNase活性,与其他共价抑制剂相同,虽然能够减少药物给药剂量,但其可能发生脱靶作用,会带来不可逆转的伤害,因此在之后的研究中应关注其潜在脱靶风险。最后,目前大多数的研究都是通过抑制IRE1 α 的活性来达到抗肿瘤的目的,但也有研究表明,诱导IRE1 α 的过度激活将促进稳态转化为促进细胞死亡,因此可能是癌症治疗的一种替代策略^[29]。因此,对于抑制剂或激动剂的选择以及二者之间是否存在联系是之后应该关注的问题。

由于IRE1 α 信号通路调节多种肿瘤的发展和化疗耐药性有关,如乳腺癌、前列腺癌、MM、白血病和胶质母细胞瘤^[30,31],已经有许多尝试通过联合使用IRE1 α 抑制剂来改进现有的临床治疗,比如化合物**4**和尼洛替尼联合诱导费城阳性急性淋巴细胞白血病的合成致死;化合物**4**在体内外与临床前列腺癌药物(恩杂鲁胺)有协同作用^[31]。因此,对于IRE1 α 抑制剂与现有药物的联合治疗是之后研究的选择之一。

利用蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interactions, PPIs) 来进行药物设计是药物研发过程中使用的策略之一,比如运用小分子直接阻断Keap1-Nrf2蛋

白-蛋白相互作用来治疗氧化应激和相关疾病;干扰MDM2-p53蛋白与蛋白的相互作用以达到抗肿瘤的目的^[32,33]。在IRE1 α 信号通路中多处涉及PPIs,比如自身的寡聚化、与Bip的结合和IP3受体的PPIs,这些相互作用都可能用于开发PPI抑制剂或稳定剂^[34]。在之后的抑制剂研究中,研究者可以通过调节涉及IRE1 α 的PPIs来重新编程其功能。

蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTAC) 技术广泛应用于药物的研发中^[35,36]。其中就包括应用于与IRE1 α 酶活性相似的跨膜蛋白^[37],基于具有较高亲和力的IRE1 α 配体,因此,将PROTAC应用于IRE1 α 也是之后药物研发的选择之一。

作者贡献: 冯伟、谢亚非、华东东共同参与了文章的撰写;石慧提供了修改意见;刘磊提供了撰写思路,并参与了文章的修改。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

References

- Urta H, Dufey E, Avril T, et al. Endoplasmic reticulum stress and the hallmarks of cancer [J]. *Trends Cancer*, 2016, 2: 252-262.
- Wu SY, Yi P, Liu JF. Inositol-requiring enzyme 1 pathway and tumor [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2019, 35: 708-715.
- Almanza A, Carlesso A, Chintha C, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications [J]. *FEBS J*, 2019, 286: 241-278.
- Raymundo DP, Doultinos D, Guillory X, et al. Pharmacological targeting of IRE1 in cancer [J]. *Trends Cancer*, 2020, 6: 1018-1030.
- Langlais T, Pelizzari-Raymundo D, Mahdizadeh SJ, et al. Structural and molecular bases to IRE1 activity modulation [J]. *Biochem J*, 2021, 478: 2953-2975.
- Grandjean JMD, Wiseman RL. Small molecule strategies to harness the unfolded protein response: where do we go from here? [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295: 15692-15711.
- Siwecka N, Rozpedek-Kaminska W, Wawrzynkiewicz A, et al. The structure, activation and signaling of IRE1 and its role in determining cell fate [J]. *Biomedicines*, 2021, 9: 156.
- Song M, Sandoval TA, Chae CS, et al. IRE1 α -XBP1 controls T cell function in ovarian cancer by regulating mitochondrial activity [J]. *Nature*, 2018, 562: 423-428.
- Volkman K, Lucas JL, Vuga D, et al. Potent and selective inhibitors of the inositol-requiring enzyme 1 endoribonuclease [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 12743-12755.
- Cross BC, Bond PJ, Sadowski PG, et al. The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

- 2012, 109: E869-E878.
- [11] Logue SE, Mcgrath EP, Cleary P, et al. Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 3267.
- [12] Xiao R, You L, Zhang L, et al. Inhibiting the IRE1alpha axis of the unfolded protein response enhances the antitumor effect of AZD1775 in TP53 mutant ovarian cancer [J]. *Adv Sci (Wein)*, 2022, 9: e2105469.
- [13] Vieri M, Preisinger C, Schemionek M, et al. Targeting of BCR-ABL1 and IRE1alpha induces synthetic lethality in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia [J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42: 272-284.
- [14] Kharabi Masouleh B, Geng H, Hurtz C, et al. Mechanistic rationale for targeting the unfolded protein response in pre-B acute lymphoblastic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: E2219-E2228.
- [15] Sanches M, Duffy NM, Talukdar M, et al. Structure and mechanism of action of the hydroxy-aryl-aldehyde class of IRE1 endoribonuclease inhibitors [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4202.
- [16] Papandreou I, Denko NC, Olson M, et al. Identification of an IRE1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma [J]. *Blood*, 2011, 117: 1311-1314.
- [17] Tang CH, Ranatunga S, Kriss CL, et al. Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124: 2585-2598.
- [18] Shao A, Kang CW, Tang CH, et al. Structural tailoring of a novel fluorescent IRE-1 RNase inhibitor to precisely control its activity [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 5404-5413.
- [19] Shao A, Xu Q, Kang CW, et al. IRE-1-targeting caged prodrug with endoplasmic reticulum stress-inducing and XBP1S-inhibiting activities for cancer therapy [J]. *Mol Pharm*, 2022, 19: 1059-1067.
- [20] Wang L, Perera BG, Hari SB, et al. Divergent allosteric control of the IRE1alpha endoribonuclease using kinase inhibitors [J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8: 982-989.
- [21] Feldman HC, Tong M, Wang L, et al. Structural and functional analysis of the allosteric inhibition of IRE1alpha with ATP-competitive ligands [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 2195-2205.
- [22] Harrington PE, Biswas K, Malwitz D, et al. Unfolded protein response in cancer: IRE1alpha inhibition by selective kinase ligands does not impair tumor cell viability [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 6: 68-72.
- [23] Ferri E, Le Thomas A, Wallweber HA, et al. Activation of the IRE1 RNase through remodeling of the kinase front pocket by ATP-competitive ligands [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 6387.
- [24] Concha NO, Smallwood A, Bonnette W, et al. Long-range inhibitor-induced conformational regulation of human IRE1alpha endoribonuclease activity [J]. *Mol Pharmacol*, 2015, 88: 1011-1023.
- [25] Colombano G, Caldwell JJ, Matthews TP, et al. Binding to an unusual inactive kinase conformation by highly selective inhibitors of inositol-requiring enzyme 1alpha kinase-endoribonuclease [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 2447-2465.
- [26] Beveridge RE, Wallweber HA, Ashkenazi A, et al. Identification of BRAf-sparing amino-thienopyrimidines with potent IRE1alpha inhibitory activity [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11: 2389-2396.
- [27] Amarasinghe KN, Pelizzari-Raymundo D, Carlesso A, et al. Sensor dimer disruption as a new mode of action to block the IRE1-mediated unfolded protein response [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 1584-1592.
- [28] Atkins C, Liu Q, Minthorn E, et al. Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity [J]. *Cancer Res*, 2013, 73: 1993-2002.
- [29] Ghosh R, Wang L, Wang ES, et al. Allosteric inhibition of the IRE1alpha RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress [J]. *Cell*, 2014, 158: 534-548.
- [30] Dastghaib S, Shojaei S, Mostafavi-Pour Z, et al. Simvastatin induces unfolded protein response and enhances temozolomide-induced cell death in glioblastoma cells [J]. *Cells*, 2020, 9: 2339.
- [31] Sheng X, Nenseth HZ, Qu S, et al. IRE1 α -XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 323.
- [32] Wang JC, Yang CB, Zhuo YL, et al. Recent advances of MDM2-p53 inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 983-995.
- [33] Yan JY, Liu GD, Miao ZY, et al. Advances on Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors and degraders [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 2932-2948.
- [34] 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.
- [35] Liu JH, Chen YM, Cai XQ. Research advances in new technologies in targeted protein degradation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 313-320.
- [36] You QD, Lu MC, Jiang ZY. Protein degradation as an innovative strategy in drug discovery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1777-1782.
- [37] Bondeson DP, Mares A, Smith IE, et al. Catalytic *in vivo* protein knockdown by small-molecule PROTACs [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 611-617.