

提高小分子药物的活性和选择性

郭颖, 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: 小分子药物目前仍是治疗的主流, 特异性治疗的生物药日益显示其优势, 构成了对小分子药物创制和应用的挑战。小分子药物的优势是方便口服, 患者依从性好。构建小分子药物的难点, 是将药效、药代、选择性和安全性都融于化学结构之中。由于尺寸小, 表面积不大, 小分子药物就会对众多蛋白有不同程度的适配性结合, 导致脱靶引起不良反应, 在这个意义上选择性作用是首要的。在以靶标为核心构建和优化分子结构, 又需要全盘顾及各个属性的要求, 往往顾此失彼, 达到全维度的优化实在勉为其难。本世纪的药物创制, 广泛注入了分子生物学和结构生物学元素, 涌现了新的策略和技术, 并获得了成功, 满足了患者的需求。例如共价结合药物, 是在结构生物学指引下, 将适度的“亲电弹头”连接在分子的恰当位置, 在分子互补性的结合中, 加以共价键不可逆锁定。分子生物学直接应用于抗体偶联药物 (ADC) 的研制中, 抗体 (A) 作为载体和导向 (药代), 将毒性分子 (D) 传输到癌性细胞内, 发挥杀伤作用 (药效)。隔离的药效和药代分子实体靠连接基偶联 (C) 成 ADC 分子。PROTAC 也是双功能分子, 招募靶蛋白和泛素连接酶 E3, 形成三元复合物, 犹如催化剂, 使靶蛋白发生泛素化, 导致被蛋白酶体降解。此外, 近年来药物固定的配伍应用, 在提高选择性、安全性、长效性和治疗效果方面也有长足进步, 可视作不拘一格的物理合用的创新策略。本文列举一些成功实例, 从药物化学和治疗应用的视角, 简要讨论上述内容。

关键词: 选择性; 共价结合药物; 抗体偶联药物; PROTAC; 药物组合

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2016-19

On improving the activity and selectivity of small molecule drugs

GUO Ying, GUO Zong-ru*

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

Abstract: Although small molecule drugs (SMD) are still mainstream for the treatment of diseases, large molecule biologics of many advantages, pose a challenge to the further discovery and use of SMD. The advantages of SMD are the convenience of oral administration and good patient compliance. However, the challenge with SMD is to integrate the PD, PK, selectivity and safety into a chemical structure. Because of their small size and surface area they often bind to various proteins, and off-target actions can cause adverse reactions. In this sense, selectivity is critical. Based upon target as the core to construct a chemical structure, it is necessary to consider the requirements of all the attributes, but achievement of the full-dimensional optimization is difficult. Modern drug discovery has been greatly enhanced by molecular biology and structural biology, and new strategies and technologies have emerged, which have created many successful medicines. For example, under the guidance of structural biology, covalent binding drugs connect moderate "electrophilic warheads" to the appropriate positions of molecules, and upon binding to their targets the electrophiles are irreversibly linked to the target by covalent bonds. Molecular biology can be directly applied to the development of antibody-coupled drugs (ADC). The antibody (A) acts as a carrier and a guide (for PK), and carries toxic molecules (D) into cancer cells, thus playing a

killing role (for PD). The separate pharmacodynamic and pharmacokinetic entities are coupled (C) by linkers. PROTACs are also bifunctional molecules, which recruit a target protein and ubiquitin ligase E3 to form a ternary complex, which then acts as a catalyst to ubiquitinate the target protein and lead to degradation by the proteasome. In addition, in recent years, the combination of two fixed-dose drugs has improved selectivity, safety, and long-term benefit with many severe diseases, and can be regarded as an innovative strategy of physical combination. This review discusses some successful examples to briefly present the principles from the perspective of medicinal chemistry and therapeutic application.

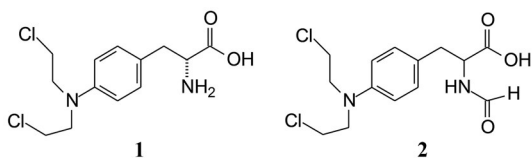
Key words: selectivity; covalent binding drug; antibody-coupled drug; PROTAC; drug combination

在药物治疗领域里, 现今虽然仍以小分子药物为主流, 但以特异性治疗为特征的生物大分子药物之崛起, 日益显示其优势所在, 构成了对小分子药物创制和应用的挑战。以方便口服而应用的小分子药物, 集药效、药代、选择性和依从性等多种属性于化学结构之中, 是其特点, 也是创制难点。在以靶标为核心构建分子结构, 需全盘顾及各个属性的要求, 但往往顾此失彼, 达到全维度的优化状态实在勉为其难。这其中最难驾驭的是由于脱靶作用而引起的不良反应, 限制了治疗窗口, 因此选择性作用显得尤为重要。

其实, 过分拘泥于传统新药物分子实体 (NME) 的整合性创制理念, 往往会削足适履而达不到目的, 也延误患者之急需, 在 COVID-19 的 3 年疫情中尤显迫切。本世纪出现的一些平台技术就是突破了传统的创制理念, 将整合于一个结构之中的诸多属性, 从结构或组成上加以分割或分散处理, 整合为一个高分子或组方, 已成为行之有效的策略。本文就某些成功上市的新药为例, 简述为提高小分子药物的活性和选择性而采用的一些方法。

1 精准调节的共价结合基团

既往的共价结合药物, 大多是在小分子上连接亲电性较强的原子或基团, 例如氮芥连接在 *L*-苯丙氨酸的美法仑 (1, melphalan), 以提高肿瘤组织摄入药物, 其实并未达到对肿瘤组织的选择性摄入。至于至今应用的治疗睾丸精原细胞瘤的氮甲, 即 *N*-甲酰溶肉瘤素 (2, *N*-formylsarcosine), 只是偶然幸运发现而已。

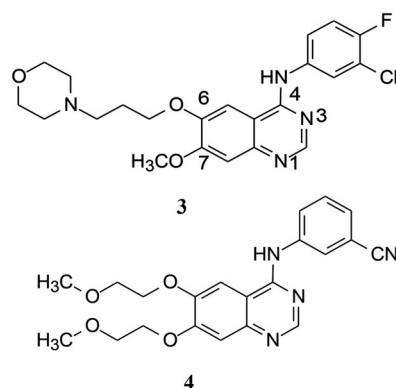


从生化上讲, 人体布满了亲核性基团, 不允许有强亲电的“虎狼基因”存在, 避免受到共价键结合的化学侵害。因而长时间来, 药物学家除抗肿瘤药物外避开共价结合药物的研究。分子和结构生物学的发展, 为研制特异性共价键结合药物提供了结构依据, 近些年

来上市了不少高选择性共价结合药物。这类药物的共同特点是, 基于设定靶标的结合腔或裂隙, 设计或筛选出形状互补、电性 (静电、氢键) 互补、发生疏水-疏水结合的分子或片段, 形成较强结合, 在此基础上基于结构生物学提供的结合腔中重要亲核性基团的空间位置和性质, 在配体分子的适当位置连接足以形成共价结合的相匹配基团, 选择的亲电性无过无不及, 是精准设计提高选择性的关键。

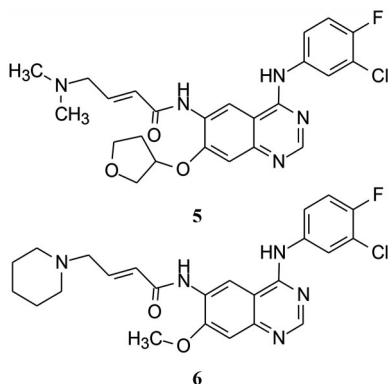
1.1 EGFR 激酶抑制剂共价结合药物的研制特征

非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体 (EGFR) 酪氨酸激酶发生变异, 位点是 L858R, 导致癌细胞对这个信号通路的依赖而发展。对此单变异型激酶, 第一代 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂如吉非替尼 (3, gefitinib) 和厄洛替尼 (4, erlotinib) 成为治疗 NSCLC 一线治疗药。N1 和 N3 分别与激酶发生氢键结合, C4 连接的苯氨基结合于疏水腔, 喹啉的 6/7 位处于酶开口处, 用来修饰溶解性。但用药一段时间后 60% 患者出现耐药, 是由于激酶的 ATP 结合位点的门户残基 (gatekeeper) 发生了 T790M 突变, 突变逃逸了 3 和 4 的抑制作用。还由于 3 和 4 对野生型的 EGFR 激酶也有抑制作用, 不能加大剂量。



为克服耐药性研制了第二代“替尼”, 是共价结合药物, 为不可逆抑制剂, 例如阿法替尼 (5, afatinib)^[1] 和达可替尼 (6, dacomitinib)^[2]。化学结构类型基本不变, 以适配于 ATP 结合腔, 但在 6 位引入了有弱亲电性的

不饱和酰胺,后者由于靠近激酶开口处的残基 Cys797,从而在烯碳与巯基间发生迈克尔加成,共价键结合导致不可逆抑制。**5**和**6**提高了抑制双突变激酶的活性,因而对第一代药物发生耐药的患者有效。然而由于包括野生型在内的所有 EGFR 激酶开口处都有 Cys797,降低了选择性作用,呈现不良反应。



AstraZeneca 公司为克服上两代“替尼”的耐药性,设定的目标是①对 L858R 和 T790M 双突变型的 EGFR 激酶 (DM) 选择性抑制;②不抑制野生型 (WT) EGFR 激酶;③不抑制胰岛素生长因子 1 受体 (IGF1R)。为此,必须针对突变后生成的 Met790 的结构特征,使化合物强效结合 ATP 结构域,“超过”因 T790M 变异提高的与 ATP 结合力,所以目标的本质是提高选择性:对双突变激酶高活性,对野生型激酶和 IGF1R 无或低活性。

该公司完全摆脱了上两代的结构类型,普筛出化合物**7**对双突变激酶活性强于野生型近百倍 ($IC_{50(DM酶)} = 0.009 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),然而对双突变细胞的活性降低了 90 倍 ($IC_{50(DM细胞)} = 0.77 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),可能难以摄入细胞内,进而优化对 DM 细胞的活性,而且**7**中加入亲电性基团,

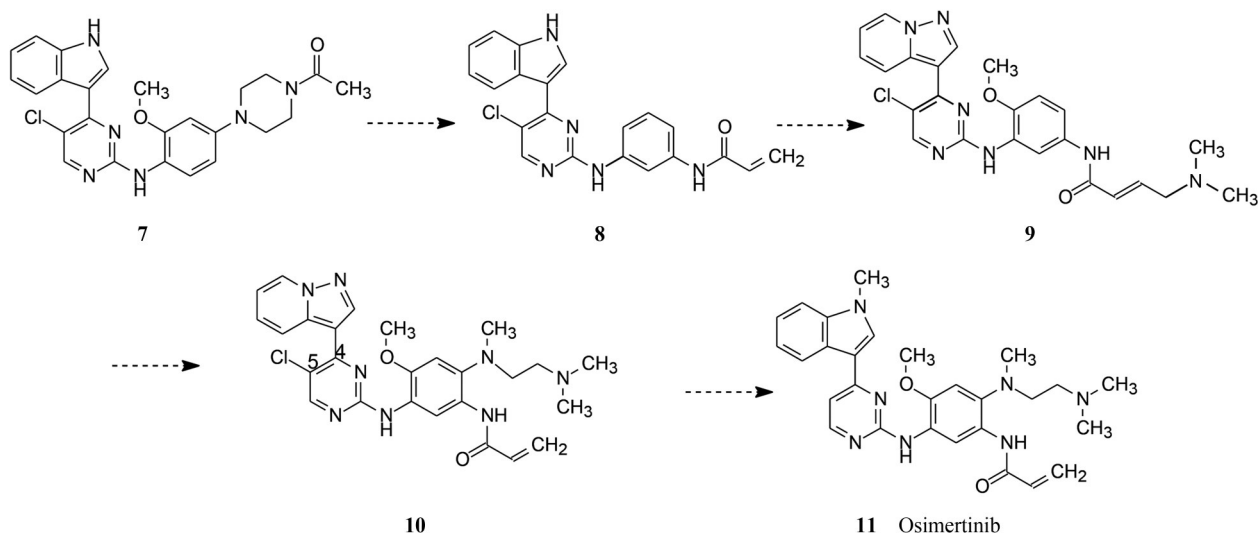
以期与酶开口处的 Cys797 发生共价结合(相当于第二代抑制剂)。经分子模拟,将亲电性基团丙烯酰胺连接在苯胺的间位,这是易于同 Cys797 的巯基发生共价结合的位置。合成的化合物**8**在细胞水平上对单突变 (AM) 和双突变 (DM) 的活性都强于野生型 (WT)。化合物**8**与 EGFR 激酶结合的复合物晶体证明丙烯酰胺确实与 Cys797 形成了共价键结合^[3]。

为改善物化性质对吡啶和对麦可尔基团作构效关系变换,优化出化合物**9**,后者对双突变细胞的活性为 $IC_{50(DM细胞)} = 0.096 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对野生细胞活性很弱 $IC_{50(WT细胞)} = 23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,选择性高达 240 倍。为了提高共价结合的效率,将碱性和麦可尔基团分散在苯环的不同位置,化合物**10**对双突变细胞的活性为 $IC_{50(DM细胞)} = 0.0006 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对野生细胞活性 $IC_{50(WT细胞)} = 0.145 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,溶解性为 $222 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。然而**10**对胰岛素生长因子受体 1 有较高抑制活性,有潜在引起高胰岛素血症等不良反应。该脱靶作用的原因是 IGF1R 激酶的 ATP 结合域的门户氨基酸是甲硫氨酸,与耐药 (双突变) EGFR 激酶的门户氨基酸相同。这个脱靶作用对治疗剂量是个限制因素。从而对吡啶环的 4 和 5 位取代基作进一步 SAR 优化,最终得到化合物**11**,对双突变细胞的活性为 $IC_{50(DM细胞)} = 0.015 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对野生细胞活性 $IC_{50(WT细胞)} = 0.480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对 IGF1R 激酶 $IC_{50} = 2.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对 hERGs 钾通道的抑制作用很弱, $IC_{50} = 16.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

化合物**11**确定为候选化合物,定名奥希替尼 (osimertinib),经临床前和临床研究,证明对晚期非小细胞肺癌特别是用一线替尼类药物治疗后疾病恶化的患者有效,于 2015 年 11 月美国 FDA 批准上市^[4]。

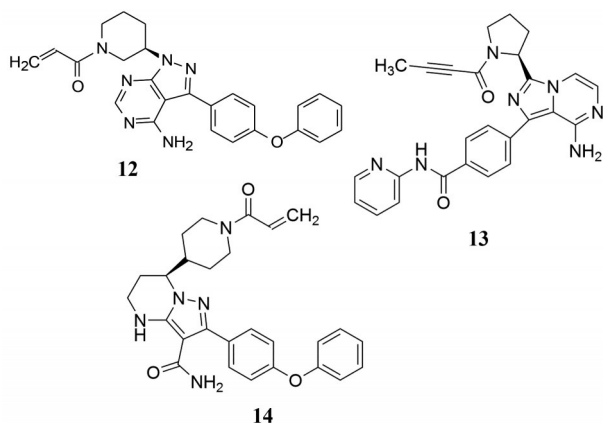
1.2 BTK 激酶抑制剂共价结合药物的研制特征

在 B 细胞抗原受体的信号通路中,Bruton 酪氨酸



激酶 (BTK) 起着重要作用。BTK 是 Tec 激酶家族的成员, 为非受体型胞浆酪氨酸激酶, 主要表达于造血细胞。与 BTK 同属于 Src 激酶家族的另一激酶, 称作淋巴瘤细胞特异性蛋白激酶 (LCK), 主要表达于 T 淋巴细胞, 功能是调节免疫应答。BTK 和 LCK 激酶的 ATP 结合域具有相似性, 分子模拟表明结合位点大同小异, 但 BTK 的残基为 Cys481, LCK 为 Ser481, 半胱氨酸巯基的亲核性强于丝氨酸的羟基, 研制者基于这个差异用于设计并研制出 BTK 选择性不可逆抑制剂伊布替尼 (**12**, ibrutinib), 于 2013 年经 FDA 批准上市^[5,6]。分子的主要骨架异嘌呤二苯醚定位于 BTK 激酶的 ATP 结合腔中, 弱亲电性基团丙烯酰胺靠近 Cys481, 与巯基发生迈克尔加成反应。伊布替尼是治疗与 B 淋巴细胞相关的套细胞白血病的一线用药。

AstraZeneca 于 2017 年上市阿可替尼 (**13**, acalabrutinib)^[7]是第二代 BTK 不可逆抑制剂。



与伊布替尼相比, 阿可替尼更具有选择性作用, 是在结构优化中注重了降低对野生型 EGFR、Tec 的结合, 避免了对正常激酶的脱靶, 提高了靶标特异性并增强了 BTK 的效力, 从而减少不良反应。阿可替尼用了丁炔酰胺作为共价结合基团与 Cys481 的反应具有更高的选择性和体内靶标覆盖率, 包括抑制 ERK、IKB 和 AKT 下游靶标的酪氨酸磷酸化, 但不抑制正常 EGFR、ITK 和 Tec 活性。

我国百济神州公司针对伊布替尼的口服生物利用度低 ($F < 10\%$), 剂量大, 治疗窗口较窄的缺点, 而且对野生型 EGFR 呈现抑制, 引起皮疹和腹泻等不良反应。研制高选择性抑制剂, 理念也是以竞争激酶 ATP 结合腔为作用模式, 抑制剂模拟 ATP 腺嘌呤环, 并变换杂环的结构骨架, 设计了氨基吡唑酰胺类化合物, 酰胺是为了形成分子内氢键, 用假杂环模拟平面性稠合的嘧啶环^[8]。在适宜的位置连接迈克尔加成基团, 以实现不可逆抑制。经过数轮的 SAR 研究, 研制出 BTK 新一代

不可逆抑制剂泽布替尼 (**14**, zanubrutinib), 于 2019 年经 FDA 批准在美国上市, 成为治疗套细胞淋巴瘤和慢性淋巴性白血病/小淋巴细胞淋巴瘤的第三个有效药物。

泽布替尼与 BTK 激酶共晶结构显示, 分子定位于 ATP 结合腔, 酰胺基与铰链上 Glu475 和 Met477 形成氢键网络, 哌啶的氮原子也与 Met477 发生氢键结合, 吡唑的氮原子经水分子 (氢键) 介导与 Lys430 的侧链氨基形成氢键, 二苯醚的末端苯环与 Phe540 发生 T-型 π - π 相互作用, 麦尔基团与 Cys481 巯基的距离 2.9 Å, 处于有利发生共价结合的范围。此外, 酰胺基与哌啶氮的分子内氢键 (图 1 中未示) 也验证了最初模拟嘧啶酮结构的设想^[9]。

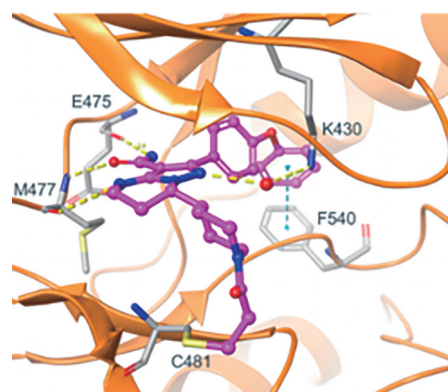


Figure 1 Binding mode of zanubrutinib and BTK from cocrystal structure

1.3 含共价结合基团酮基酰胺的 NS3 蛋白酶抑制剂

丙肝病毒 (HCV) 是正链单链 RNA 病毒, 其中 NS3 蛋白酶对丙肝病毒的生长和增殖具有重要作用, 成为研制丙肝药物的靶标。NS3 酶的水解机制是由三元体构成: N 端的 His57 和 Asp81, 以及 C 端的 Ser139。图 2 是 Asp-His-Ser 三元体经广义酸/碱催化水解肽键过程的示意图。三元体与底物形成氢键, 提高了肽键羰基的亲电性, 丝氨酸的羟基向羰基作亲核进攻, 促进了肽键水解。设想抑制 NS3 蛋白酶的一个重要反应位点, 是与该三元体结合, 尤其希望与 Ser139 发生共价键结合。

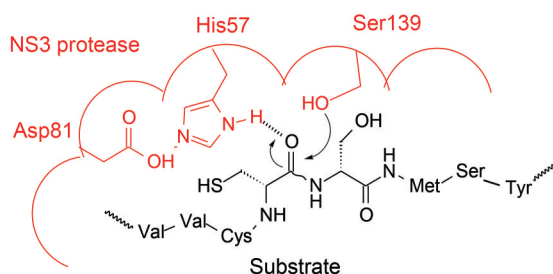


Figure 2 Diagrammatic sketch of NS3 protease to hydrolyze a peptide bond

由于NS3水解多肽的活性中心表浅而无特征,为寻找先导化合物,将某些亲电性基团连接到长肽链中,例如醛、酮、三氟甲基酮和 α 酮基酰胺等,以得到有较强结合作用拟肽类先导物,然后简化和修饰成小分子化合物。发现十一肽化合物**15**的活性 $K_i = 1.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,亲电性基团酮基酰胺在十一肽的P1和P1'之间,这个位置很重要^[10]。**15**的相对分子质量为1265,距离口服吸收的物化和药代要求甚远,结构需要简化。

化合物**15**的高活性,在于它与NS3活性中心的结构匹配,以及酮基酰胺的亲电性和所处的适宜位置并与丝氨酸残基发生形成共价结合而使复合物稳定化,如图3所示^[11]。

将化合物**15**的C端4个氨基酸Met-Ser-Tyr-Ser-NH₂切除,得到临近端点含有酮基酰胺的七肽酰胺(**16**),活性 $K_i = 43 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,虽然下降25倍,但相对分子质量降低到796^[12]。**16**作结构简化,于P1'处引入一个

苯基甘氨酸以增加P2'的疏水性,删除P4~P6的三个氨基酸残基,成为五肽的化合物**17**, $K_i = 98 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,活性低于**16**一倍,但相对分子质量又减少了100余。X-射线晶体学分析表明,P2的侧链接近酶的Arg155,后者应带有正电荷。但在抑制剂中引入羧基并未形成盐键,没有提高活性。设想P2可能与Arg155的亚烷基链发生疏水性结合。变换不同的烷基发现P2为较小的环丙基有利于结合,进而将P1'的烷基也变换成环丙基,得到化合物**18**,活性明显提高, $K_i = 15 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,但对感染细胞未见活性, $\text{EC}_{50} > 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,原因可能是游离羧基的存在不利于进入细胞膜^[13]。

进一步经过多位点变换,发现P2为二甲基环丙基并脯氨酸、P3为叔丁基甘氨酸并且氨基用叔丁氧羰基修饰,P2'的羧基制备成二甲酰胺以消除负离子和有利于穿越细胞膜,得到化合物**19**,活性为 $K_i = 5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,对感染细胞的 $\text{EC}_{50} = 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。**19**活性有明显提高,

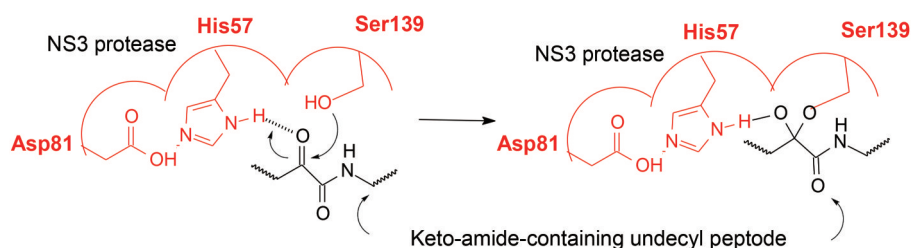
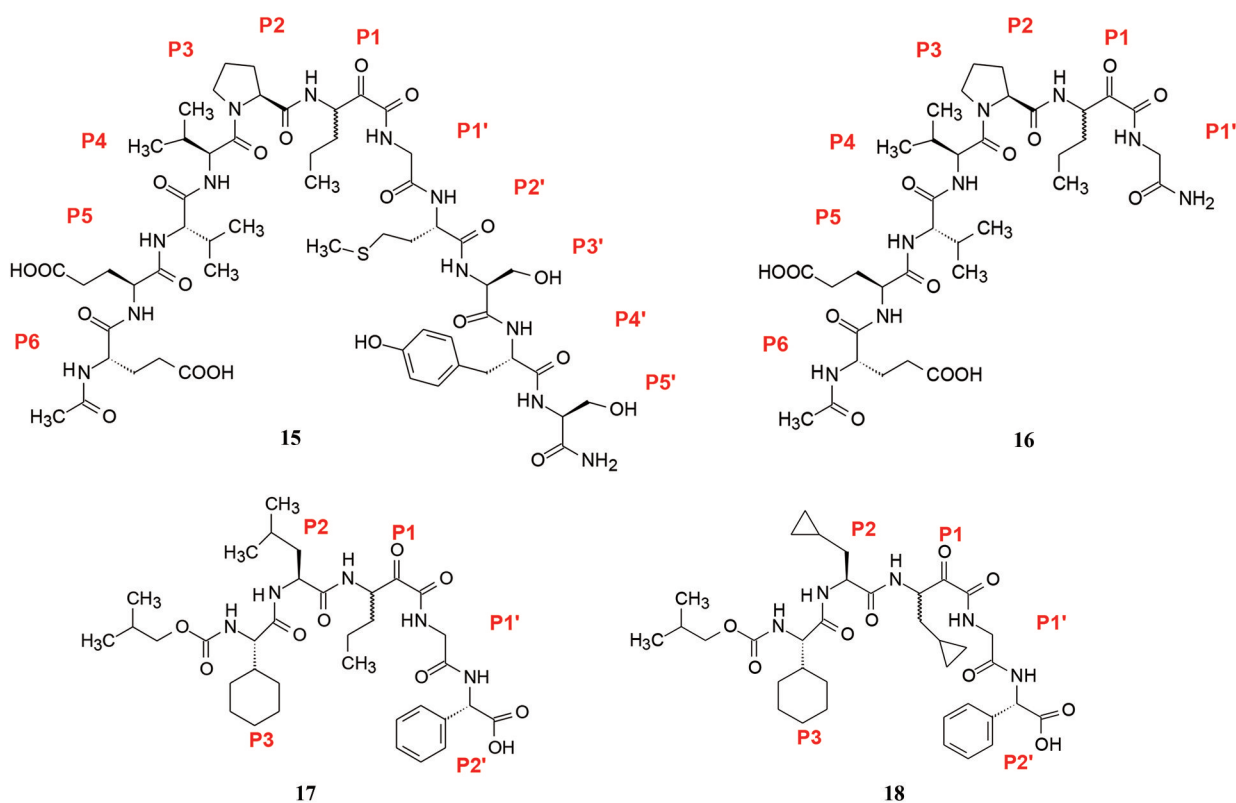


Figure 3 Sketch of covalent binding between keto-amide and hydroxy group of serine residue by nucleophilic attacking



但药代性质不佳, 生物利用度 $F = 4\%$, 达不到临床前最低要求 ($AUC \geq 1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, 生物利用度 $F \geq 10\%$), 这是因为分子仍然偏大, $MW = 725$, 仍需结构小型化。

根据前面述及的去除 P1' 和 P2' 的甘氨酸苯基甘氨酸仍保持活性, 将化合物 **19** 的这两个氨基酸删除, 使 α -酮基酰胺处于端点, 并将一个叔丁基改为环己基, 化合物 **20** 的活性 $K_i = 25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对感染细胞的 $EC_{90} = 0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 虽活性有所减弱, 但分子尺寸显著减小, $MW = 532$ 。

对 **20** 的环丙基用其他脂环替换, 发现环丁基活性最高, 再扩环活性下降, 提示对 P1 体积的恰当容纳度。P2 处的偕二甲基环丙基并脯氨酸片段已优化为最佳状态。P3 处的氨基变换为烷基、芳烷基、酰胺基、氨甲酰基、脲基、磺酰胺基或磺酰脲基, 发现用脲基代替氨甲酰氧连接基, 活性和其他性质最佳, 遂将这些优化因素综合成化合物 **21**。 **21** 的体外活性 $K_i = 14 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对感染细胞的 $EC_{90} = 0.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $MW = 519$, 对 HCV 的 NS3 抑制活性强于人嗜中性弹性酶 2 200 倍, 有很高的选择性。 **21** 与 NS3 复合物单晶结构表明, 两个叔丁基分别与 S4 与 S3 疏水腔发生疏水相互作用, P2 的二甲基环丙基并脯氨酸片段采取弯曲构象, 与酶的 Ala156、His57 和 Arg155 侧链发生最大程度的疏水性交盖, 环丁基占据了 S1 腔, 酮基酰胺的羰基与 Ser139 形成可逆的共价结合。定名化合物 **21** 为波普瑞韦 (boceprevir), 经 III 期临床研究证明对丙肝患者有显著治疗作用, 于 2011 年经 FDA 批准上市。

由 Vertex 和强生公司研制的替拉瑞韦 (**22**, telaprevir) 是与波普瑞韦同时研制的丙肝治疗药, 于波普瑞韦批准 10 天后被批准上市, 替拉瑞韦的作用靶标也是 NS3

蛋白酶, 其研发策略也是以酶底物 NS5A-5B 为出发点, 筛选出十肽类似物, 后以含醛基的四肽作为先导物, 由于醛基的亲电性过强, 后演变成酮基酰胺的拟肽, 作用机制与波普瑞韦相同, 同酶的催化中心 Asp139 也发生可逆性的共价键结合^[14]。

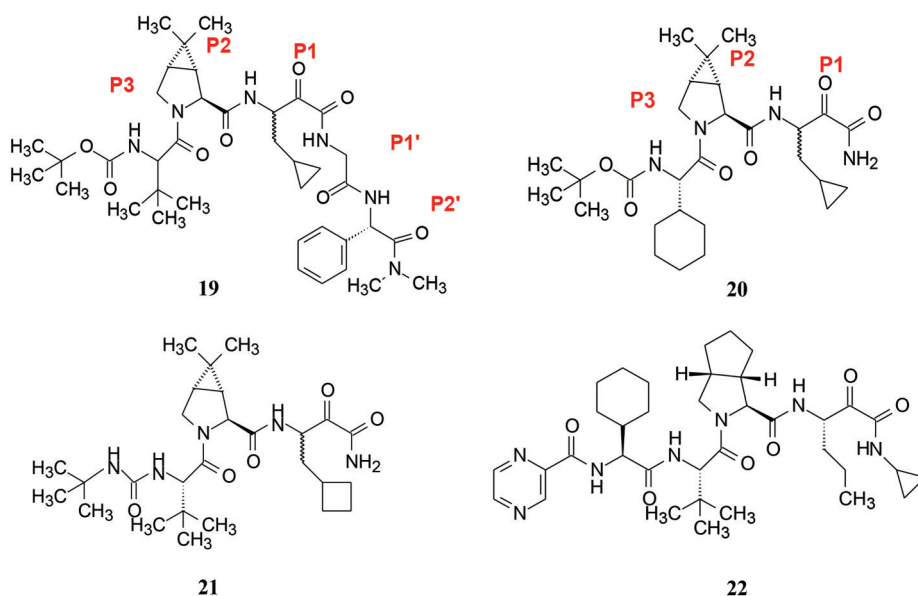
1.4 含有机硼酸基团的蛋白酶体抑制剂硼替佐米

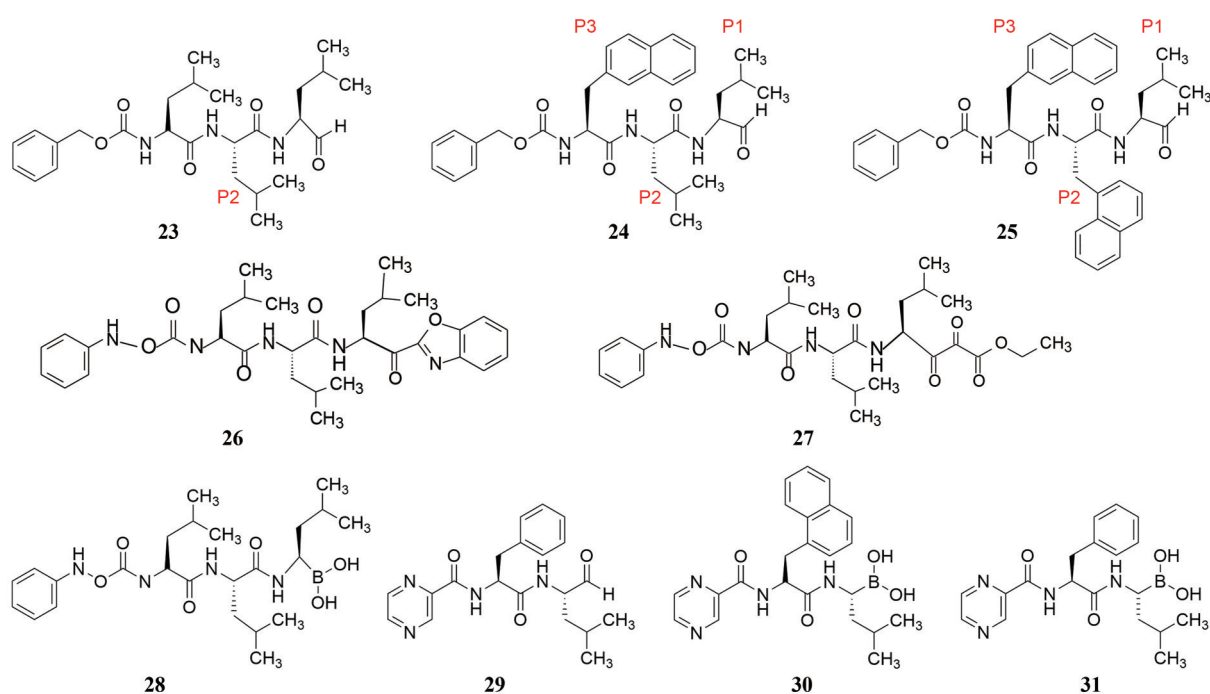
蛋白酶体 (proteasome) 与细胞内 NF- κ B 信号传导途径密切相关, 由于 NF- κ B 在炎症过程和肿瘤细胞的发生发展扮演重要角色, 干扰 NF- κ B 活化过程, 可间接或直接地阻断炎症和促成肿瘤细胞凋亡。所以蛋白酶体是研发抗炎和抗肿瘤药物的靶标。

哈佛大学的 Goldberg 在研究蛋白酶体抑制剂对细胞生长和增殖以确定其催化功能的过程中, 发现三肽化合物 苜氧羧酰-亮氨酸-亮氨酸-亮氨酸 (**23**, MG-132) 有抑制活性, $K_i = 4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[15]。化合物 **23** 与蛋白酶体的复合物单晶结构分析表明, 它连接在活性中心 β 亚基的 N 端^[16], 醛基与苏氨酸残基的羟基发生亲电加成, 生成具有共价键结合的半缩醛, 虽然是可逆性结合, 但酶的活性受到强效抑制。

化合物 **23** 的结构域 P1、P2 和 P3 都是异丁基, 变换这些疏水片段以优化活性, 发现 P1 位置仍以异丁基最佳, P2 和 P3 变换为萘基, 增强了活性, 例如化合物 **24** 的 $K_i = 0.24 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **25** 的 $K_i = 0.015 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示增加 P2 和 P3 的疏水性有利于提高活性。

然而醛基的化学性质活泼, 可与多种亲核基团发生加成反应, 选择性不高, 例如对组织蛋白 B (cathepsin B) 和钙蛋白酶 (calpain) 也有抑制作用。为此, 用其他亲电性基团, 例如氯甲基酮和三氟甲基酮替换醛基, 但未显示出活性。苯并噁唑酮 (**26**, $K_i = 214 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和





二酮酯 (**27**, $K_i = 45 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 活性显著低于化合物 **23**。

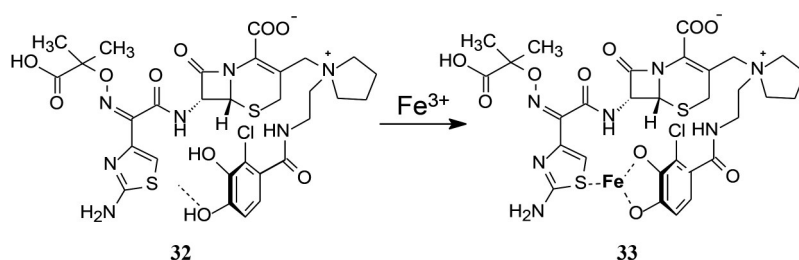
用硼酸置换醛基得到的化合物 **28**, 活性显著提高, $K_i = 0.03 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 强于先导物 **23** 大约 100 倍。硼元素处于周期表第 3 族, 外层电子有一 p 空轨道, 可与 O 和 N 的未偶电子对形成配位键。化合物 **27** 与蛋白酶体的活性中心 N 端的苏氨酸侧链的羟基发生特异性配位结合, 而抑制组织蛋白酶 B 的活性很低, $K_i = 6100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 弱于蛋白酶体 20 万倍。这是因为硼酸难于与半胱氨酸蛋白酶的巯基结合, 因为 $\text{B} \leftarrow \text{S}$ 配位键是不稳定的。

三肽硼酸 **28** 抑制蛋白酶体的活性达到 $1 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度, 这样高的活性意味着为改善成药性而变换结构有较大余地, 例如降低三肽的分子尺寸。其实, 减少一个氨基酸残基成二肽醛 (**29**) 仍有抑制蛋白酶体活性, $K_i = 1600 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而且对丝氨酸蛋白酶不显示活性, 提示二肽醛仍具有选择性作用, 尤其是当 P2 结构域为萘环时, 含硼烷基化合物 **30** 的活性提高, $K_i = 97 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 选择性显著提高, 化合物 **31** 的 K_i 值为 $0.62 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由三肽 **28** (MW = 491) 简化为二肽 **31** (MW = 384), 相对分子质量降低了 107, 活性虽然有所降低, 仍在高活

性范围, 而且对人的其他蛋白酶如白细胞弹性酶、凝血酶和组织蛋白酶等活性很低, 表明对蛋白酶体具有高选择性抑制作用。由于化合物 **31** 具有优良的活性和成药性, 确定为候选化合物, 定名为硼替佐米 (bortezomib), 经临床前和临床研究, 硼替佐米于 2003 年 FDA 批准上市治疗多发性骨髓瘤^[17,18]。

1.5 铁螯合物改变头孢药物的抗菌谱

革兰阳性致病菌由一层细胞膜构成, 而阴性菌由外膜和内膜双层结构构成, 阴性菌更难以摄入药物, 因而抗革兰阴性菌的药物较少。日本盐野义公司基于细菌增殖生长需要从宿主细胞摄取铁离子, 是靠细胞壁上的载铁蛋白转运摄入菌体内。Ito 等^[19]利用该蛋白的嗜铁属性, 合成了含有儿茶酚和噻唑结构的头孢菌素, 研发出头孢德罗 (**32**, cefiderocol)。分子低能构象儿茶酚和噻唑环在空间上的靠近容易螯合铁离子成 **33**, **33** 被载铁蛋白结合经主动转运摄入, 就这样携带着抗菌的头孢进入菌体内, 后者与青霉素结合蛋白作用, 阻断细胞壁的合成而杀死细菌。 **32** 对多种有氧阴性菌 (包括多药耐药菌) 抑制活性 $\text{MIC}_{50} < 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 具有可克服碳青霉烯类抗药性 3 种主要机制 (孔蛋白



通道改变、 β -内酰胺酶失活、外排泵高量产生) 的独特能力。临床显示对复杂尿路感染以及难治的肠道感染疗效显著, 头孢德罗于 2019 年经 FDA 批准上市。

2 变构抑制剂

2.1 变构调节

变构调节 (allosteric modulation) 是指小分子化合物与酶蛋白分子活性中心以外的某一部位特异结合, 引起酶蛋白分子构象变化, 从而改变酶的活性。经变构结合而激活酶活性的称为正向调节, 即激动剂, 比如酶的辅因子; 抑制酶活性的负向调节即变构抑制剂 (allosteric inhibitor)。变构位点与酶活性中心的位点相隔离, 之间没有竞争性结合, 所以变构抑制剂对活性中心发生变异的蛋白仍然有疗效, 也为联合用药提供了选择。

变构抑制剂作为药物的最大优势是提高选择性, 酶或受体多存在同工酶和亚型, 结构和功能的差异较小, 导致结合于活性中心的化合物 (正构药物) 缺乏选择性作用, 变构结合腔则各有不同, 避免了脱靶作用。

2.2 KRAS 突变在实体瘤的变构药物

RAS 基因家族编码的鸟苷三磷酸酶 (GTPase) 包括 NRAS、HRAS 和 KRAS, 对细胞生长和增殖扮演重要角色。KRAS 是最常见的肿瘤驱动基因之一, 在人癌的突变率占 30%, 最常发生的是 G12C-KRAS^{G12C} 变异。虽然以 RAS 为靶标的药物研究已 30 多年, 但因该蛋白缺乏适宜的结合腔穴而成效甚微, 被认为是非成药性靶标。该 KRAS^{G12C} 隐藏在变构腔穴中。

2.2.1 利用变异的半胱氨酸的亲核性垂钓先导化合物 Patricelli 等^[20] 用带有弱亲电基团的化合物探索与隐藏的 Cys12 发生共价结合, 以发现与变构位点有结合力的苗头和先导物, 发现 Cys12 隐藏于 H95/Y96/Q99 构成的结合腔内 (图 4)。苗头化合物经过优化得到化合物 ARS-1620 (**34**), p-ERK-IC₅₀ = 0.831 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (p-ERK 指细胞外调节蛋白激酶的磷酸化, 是将信号从表面受体传导至细胞核的关键步骤)。安进公司也以同样的策略优化出化合物 **35**^[21], p-ERK-IC₅₀ = 0.220 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.2 先导物优化和索托拉西布的成功 **35** 的口服生物利用度低, 而体内清除率很高, 安进公司比较了 **34** 和 **35** 的结合模式发现 **34** 的喹唑啉环结合于 H95 的隐性腔内, 从而设计了通式为 **36** 化合物系列, Y 处引入疏水性片段是 **34** 所没有的, 根据是利用结构生物学提供的信息。

用生化和细胞活性评价化合物的活性, 发现 **37** 活性最强, 酶-IC₅₀ = 0.101 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 细胞 p-ERK-IC₅₀ = 0.335 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

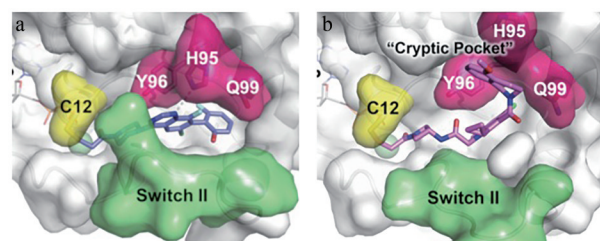
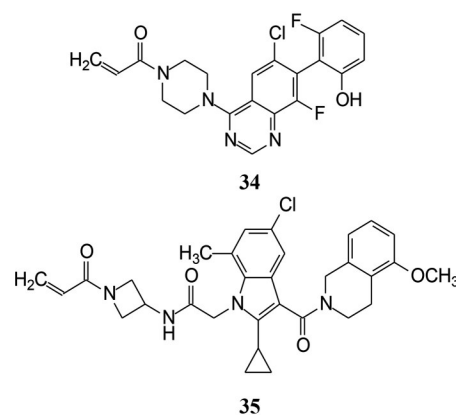
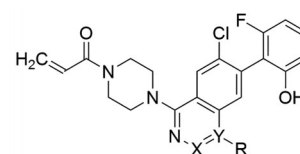


Figure 4 Comparison of the KRAS^{G12C} binding modes of **34** (a) and **35** (b). The tetrahydroisoquinoline portion of **34** and indole of **35** engages a "cryptic pocket" not exploited by prior inhibitors, which is induced by side chain rotation of H95 and comprises the residues Y96, H95, and Q99



36 X=CH, N, CO; Y=N, C; R=substituted-phenyl

分析 **37** 与 KRAS^{G12C} 复合物晶体结构 (图 5), 发现喹唑啉酮、7 位连接的取代苯和哌嗪的 2 位还有可优化的空间, 从而变换了这些位置的原子或基团, 例如 7 位连接不同取代基的苯环、萘环苯并咪唑杂环、喹唑啉酮 8 位的氮杂、哌嗪 2 位的甲基取代等, 在不同的组合中, 对化合物在酶、细胞、选择性、过膜性 (MDCK)、溶解性、小鼠的生物利用度、清除率、分布容积和半衰期等多参数进行比较, 优选出 **38** 的 *R*-异构体。 **38** 产生光学异构的原因是喹唑啉酮与异丙基苯的单键旋转受到阻碍, *R* 和 *S* 活性有较大差异。然而克服阻转的活化能并

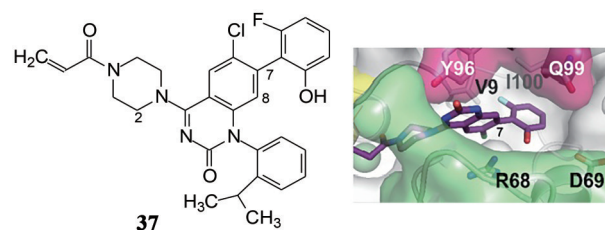
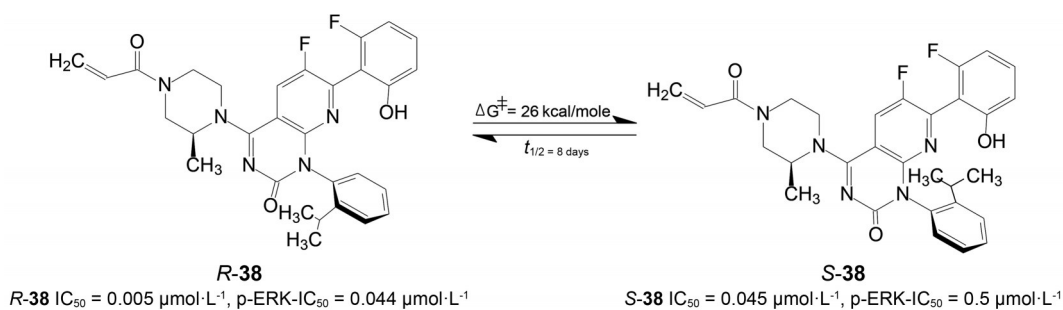


Figure 5 The crystallography of **37** binding to KRAS^{G12C}



不很高, $\Delta G^\ddagger = 26 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 25 °C半衰期 ($t_{1/2}$) = 8天, 说明不能得到稳定的纯优映体。

为解决这个阻转异构, 采用的策略是提高旋转异构的能垒, 使 $\Delta G^\ddagger > 30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 以得到稳定的立体异构体; 或降低旋转异构的能垒 $\Delta G^\ddagger < 20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 成为可以自由旋转的混合物, 或者设计没有手性轴分子。研制者设计了两种方法测定化合物的阻转异构问题: 用变温核磁 (VT-NMR) 测定快速旋转异构的化合物; 用时间过程 ¹H NMR 的变化测定慢速旋转异构的化合物。在系列变换异丙基苯中发现4个化合物有较强的活性和稳定的阻转异构体, 结构与数据列于表1中。

Table 1 Atropisomer stability and KRAS^{G12C} activity as a function of cryptic pocket arene identity and substitution pattern

Compd.	R	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	p-ERK-IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	Conversion barrier/ ΔG^\ddagger
39		0.025	0.028	>30
40		0.081	0.063	17.5
41		0.068	0.036	Not test
42		0.034	0.036	Not test
43		0.021	0.025	Not test

动物实验表明 *R-39* 的药效和药代性质优胜, 但在解决多晶性时发现晶型比原先用的无定形粉末的生物利用度降低了 10%, 这对于控制血药浓度是不利的。为解决 *R-39* 的这个问题, 再做结构优化: 通过降低喹唑啉酮环上亲脂性和提高 *R-39* 的极性表面积, 例如用

吡啶代替苯环等, 最终发现了化合物 **44**, 其 *R*-构型活性显著强于 *S*型, 二者的阻转异构的自由能垒 $\Delta G^\ddagger > 31 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 25 °C下 $t_{1/2} > 180$ 年, 提示 *R-44* 是非常稳定的优映体。图6是 *R-44* 与 KRAS^{G12C} 的结合图。*R-44* 定名为索托雷塞 (sotorasib), 临床研究表明治疗小细胞肺癌有很高的应答率。2021年FDA批准为首款治疗 KRAS 变异的靶向药物^[22,23]。

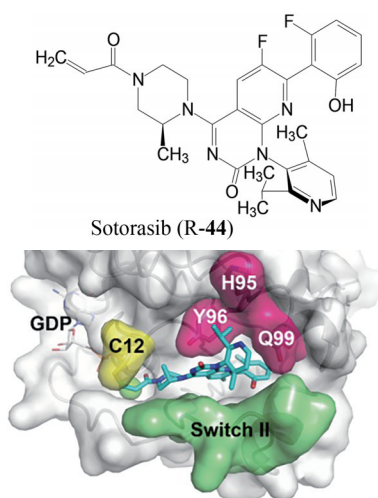


Figure 6 Binding diagram of *R-44* to GDP-KRAS^{G12C}

2.3 变构抑制剂阿思尼布的研制

慢性粒细胞白血病 (CML) 是血液干细胞过度增殖发生的, 由于第22号和第9号染色体交互易位, 导致22号染色体变短 (被称作费城染色体), 成为人类癌症与基因变异之间关系的最早的证据。染色体易位的分子基础是 Bcr-Abl 编码的蛋白酪氨酸激酶过于活化所致。所以, 抑制 Abl 酪氨酸激酶的活性, 阻止 ATP 对蛋白的磷酸化治疗 CML。伊马替尼成为最早以分子靶向为目标的抗癌药物。在这以后上市了不少针对 Bcr-Abl 发生变异的 CML 药物, 但都是以抑制 ATP 结合为特征, 因而发生普遍的耐药性问题。

诺华公司基于 Abl 激酶 C 端半段处存在变构区域, 天然变构底物是正十四烷酸 (豆蔻酸), 为正向调节剂, 参与酶功能的自调节作用。诺华公司根据伊马替

尼-Abl1 晶体结构的特征, 用核磁共振 ^{15}N , ^1H -HSQC 分析了化合物与激酶变构区的信号, 测定 C 端螺旋-1 的构象, 特别是 Val525 的信号变化, 以评价化合物的结合状态, 通过基于片段的分子筛选发现了与豆蔻酸竞争结合变构位点的两个苗头物 **45** 和 **46**, 但都没有抑酶活性。去除影响 **45** 和 **46** 结合的酯基和正己基 (在变构腔中会与螺旋-1 发生碰撞), 通过基团的变换连接 **45** 和 **46**, 得到的化合物 **47** 虽然有结合作用但仍没有活性 (没有影响螺旋-1 中 Val525 的信号变化), 将二氯换成三氟甲氧基化合物 **48**, 根据是借用了化合物 GNF2 含有的 OCF_3 基团 (GNF2 对 Abl SH3/2/1 的活性很高, $\text{IC}_{50} = 0.009 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 拉电子的 OCF_3 基团将螺旋-1 诱导成非活性构象, **48** 呈现出细胞活性 ($\text{GI}_{50} = 8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 核磁共振的 Val525 信号明显降低。进而对中间的苯基取代基和哌嗪环变换, **49** 的结合与抑制细胞活性明显提高。**48** 的结合模式显示吗啉环电荷密度分散, 影响结合作用, 从而变换为芳香环提高疏水结合作用。化合物 **50** 通过嘧啶环和 3-羟基吡咯烷基的引入, 活性大幅提升 ($K_d = 0.023 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{GI}_{50} = 0.017 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。与变构区的晶体结构显示, CF_3 中的一个氟原子 (对称的三氟之一) 与变构区的亮氨酸 L359 的羰基发生不利的正交极性相互作用, 从而用氯原子取代 OCF_3 中的一个氟原子实现了活性的进一步提升, 再用吡啶环代替嘧啶环降低了与 hERG 钾通道的结合, 最终研制出 Abl1 变构抑制剂 **51**, 定名为阿思尼布 (asciminib)。**51** 对重组 Bcr-Abl1 的 Luc-Ba/F3 细胞生长半数抑制率 (IC_{50}) 野生型和 T315I 突变型分别为 1 和 $25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 临床结果表明对既往接受治疗费城染色体阳性慢性髓系白血病 (Ph+CML) 的耐药患者有治疗效果, 于 2021 年获 FDA 批准^[24,25]。

图 7 显示了变构药物阿思尼布和正构药物尼罗替尼 (nilotinib) 与 Bcr-Abl1 结合位点的区别, 前者结合于变构区, 后者占据 ATP 结合区。

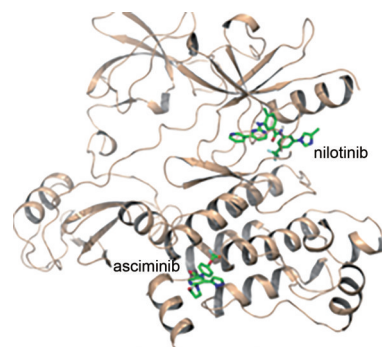


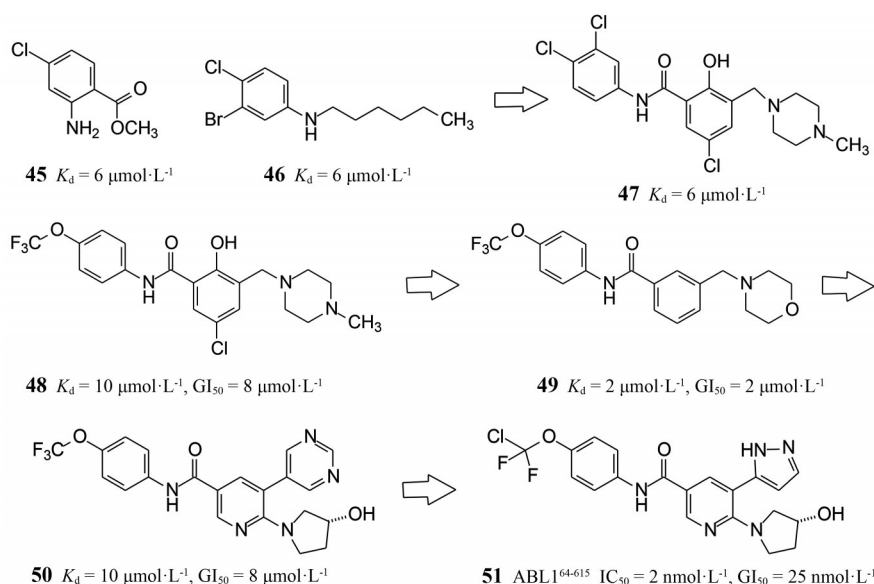
Figure 7 Asciminib binds to allosteric domain, different from nilotinib which binds to ATP binding site

2.4 氘可来昔替尼的研制

2.4.1 TYK-2 激酶的 JH2 结构域是变构位点

Janus 激酶家族是非受体酪氨酸激酶, 包含 JAK-1、JAK-2、JAK3 和 TYK-2 等 4 个亚型, 分别结合于膜上细胞因子受体的胞内域, 导致 Janus 激酶催化转录蛋白的信号转换因子和激活因子发生磷酸化, 再经二聚化转移至核内。其中 TYK-2 与 JAK-2 二聚化调节白介素 IL-12 和 IL-23 信号通路, 是炎症和免疫性疾病重要蛋白靶标。抑制 TYK-2 激酶对某些自身免疫性疾病有治疗作用, 例如多发性骨髓瘤、溃疡性结肠炎和牛皮癣等。该靶标重要之处还在于抑制 TYK-2 不影响免疫系统, 不增加真菌感染的风险, 这与 JAK-1 和 JAK-2 抑制剂因免疫力下降而发生真菌感染有明显区别。

由于 JAK 家族的催化结构域 (JH1) 的高同源性, 以此作靶标难以实现选择性作用。而 TYK2 存在有与



JH1 结构域相邻但无催化活性的假激酶结构域 (JH2), 成为实现选择性的突破口。Tyk2 JH2 与 Tyk2 JH1 非常相似, 但两个结合腔有差异。Tyk2 JH2 与 ATP 的结合非常弱, $K_d = 24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4.2 已上市的 Janus 激酶抑制剂药物 自 2011 年首创的泛 JAK 激酶抑制剂问世以来, 在本品之前已有 8 个药物上市, 表 2 列出的 52~59 都是 JAK-1/-2/-3 单一或组合靶标的抑制剂, 对 TYK-2 没有或弱活性。这些药物有引起免疫力下降的不良反应。

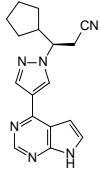
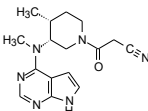
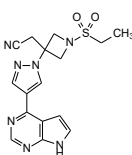
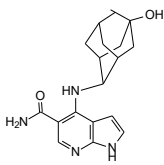
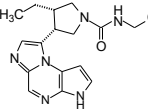
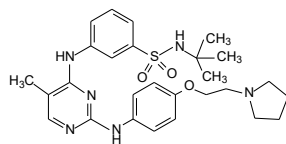
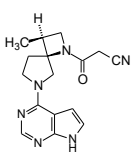
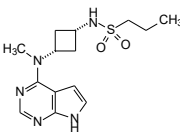
2.4.3 变构位点的抑制剂 TYK2 蛋白质具有多个结构域参与分子间和分子内的相互作用, 其功能是介导受体的催化结构域的激活。TYK2 中存在一个伪激酶

结构域 JH-2, 本身没有催化活性, 但通过自抑制作用, 在调节受体介导的邻近催化结构域 JH1 的激活中却发挥关键作用。此外, 自然杀伤 (NK) 细胞对肿瘤的监测也需要 TYK2, 但无需 TYK2 的激酶活性。

若小分子将 TYK2 伪激酶结构域 JH-2 的构象稳定在阻止与激酶结构域 JH-1 之间的自抑制相互作用, 就可阻断受体介导的激活和催化结构域的活性。这种稳定化作用导致下游信号转导被阻断^[26]。

2.4.4 研制过程 BMS 对公司化合物库做高通量筛选, 发现化合物 60 对 TYK-2 JH2 有一定的活性和选择性, 用人和小鼠肝微粒体温孵有较高的代谢稳定性, 作为苗头化合物, 首先对 C3 的酰胺基作变换。酰胺的单

Table 2 The marketed JAK-1/-2/-3 kinase inhibitors

No.	Generic name	Structure	Company	Target	Indication
52	Ruxolitinib		2011 Incyte/Novartis	JAK-1/-3	Myelofibrosis
53	Tofacitinib		2012 Pfizer	JAK-1/-2	Rheumatoid arthritis
54	Baricitinib		2017 Incyte/Lilly	JAK-1/-2	Rheumatoid arthritis, alopecia
55	Peficitinib		2018 Astellas	JAK-1/-2/-3, TYK-2	Ulcerative colitis
56	Upadacitinib		2019 Abbvie	JAK-1	Rheumatoid arthritis
57	Fedratinib		2019 Sanofi/Celgene	JAK-2	Myelofibrosis
58	Delgocitinib		2020 Japan Tobacco	JAK	Topical atopic dermatitis
59	Abrocitinib		2021 Pfizer	JAK-1	Atopic dermatitis

甲基化物 **61** 的活性虽然略有下降, 但对 TYK-2 JH2 选择性提高了。

61 与 TYK-2 JH2 复合物单晶结构显示经氢键网络固定在 JH2 铰链处, C3 酰胺上的甲基适配于邻近 Ala671 形成的“丙氨酸腔”。由于多数激酶此处的氨基酸尺寸都大于丙氨酸 (数百个激酶中只有 9 个是 Ala), 这就解释了为什么 **60** 对 JAK1/2 也呈现结合, 而 **61** 明显降低了。

下一步优化 **61**, 考察母核 C4 经 NH 连接的苯甲酰胺的变换对活性的影响, 化合物 **62** 对 TYK-2 JH2 和细胞活性, 都显著强于 **61**, **62** 的过膜性和对人和小鼠肝微粒体的稳定高于 **61**。**62** 曾作为高活性分子, 进行了深入研究, 发现肝微粒体对其有较强的代谢作用, 证明是母核 3-甲基酰胺基被氧化代谢失去甲基, 预示该代谢产物因选择性降低而脱靶。为证明这个推断, 合成 **62** 的 *N*-氘代甲基化合物提高代谢稳定性。这个同位素效应用在了以后的优化上。

在优化 **61** 时发现了 **63** 活性和选择性进一步提高, 一是 4'' 位引入甲基消除抑制 c-Kit 作用; 另一是 2'-甲氧基-3'-取代的酰胺基片段, 对 TYK-2 JH2 的 IC_{50} 为 $0.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物 **63** 与 TYK2 JH2 复合物单晶衍射分析表明, 3' 的酰胺氧原子与 Arg738 侧链的 H-N 形成氢键 (3.1 \AA), 酰胺的 N-H 与 2'-OCH₃ 的氧原子形成分子内氢键, 赋予 *N*-吡啶甲基处于开闭的腔穴中。

为了克服酰胺的代谢或化学的不稳定性或构象的易变性, **63** 的 C3' 连接的酰胺片段用芳杂环置换。在药物化学中, 常常用五元芳杂环对酰胺片段作骨架跨越, 并确保 N 或 O 或 NH 作为氢键的接受体或给体的存在。SAR 研究发现 1-甲基-1,2,4-三唑化合物 **64** 对

IFN α 细胞活性高 ($IC_{50} = 4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外对小鼠肝微粒体的代谢稳定性也很高, 选择性作用也很强, **64** 对 260 种激酶的抑制活性很低, 低于对 TYK-2 JH2 活性的 1 000 倍, 其中包括 JAK-1/-2/-3 酶的 JH-1 结构域的活性。然而 **64** 对 hERG 钾通道有一定的抑制作用, $IC_{50} = 31 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 仍需继续优化。

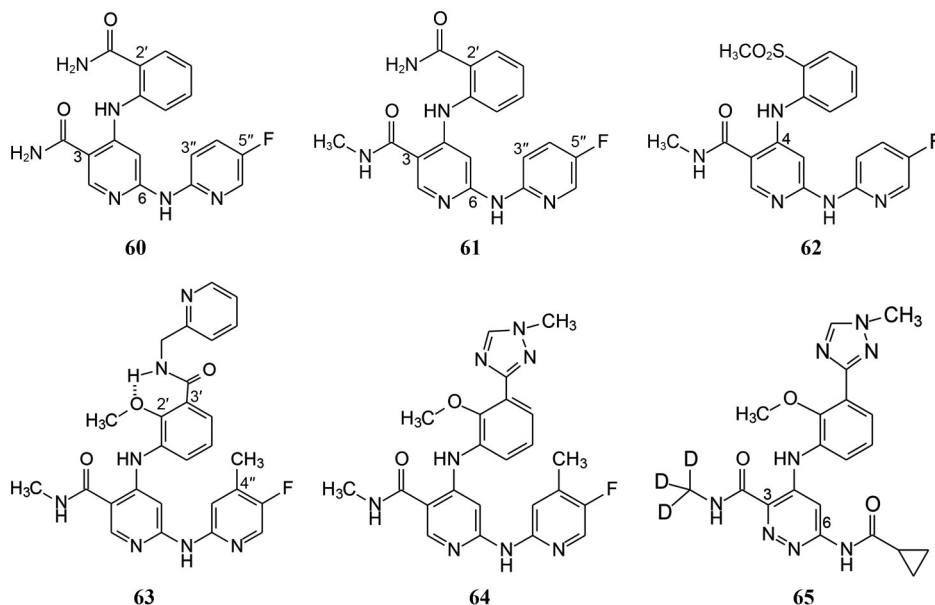
下一步的结构改造是保持活性和选择性, 改善过膜吸收和代谢稳定性, 经过多轮优化, 母核吡啶换成哒嗪环, 6 位的氨基芳杂环换成环丙基甲酰胺基, 3 位的甲酰胺基换成三氘代甲基, 得到的化合物 **65** 过膜性强, 保持了酶和细胞的高抑制活性, 代谢稳定性高, 半衰期可达 120 min, 对 hERG 钾通道没有抑制作用, **65** 作为候选物定名为氘可来昔替尼 (deucravacitinib), 经临床研究证明口服治疗中/重型斑块状银屑病, 于 2022 年 FDA 批准上市, 成为首创的作用于 TYK2 的口服治疗银屑病的新药^[27]。

图 8 是氘可来昔替尼与 TYK2 JH2 蛋白复合物晶体结构, 哒嗪环连接的 C6 胺基和 C3 酰甲胺基与酶的 JH2 域的铰链区形成三重氢键结合, 环丙基在铰链区的延伸处, 氘代甲基结合于 TYK2 JH2 特有的丙氨酸腔穴中 (Ala671), 三唑与 Arg736 直接氢键结合。C2' 的甲氧基与 Lys642 氢键结合, 并处于蛋白 C 端的表浅的疏水槽内。

3 抗体偶联药物

3.1 组成

抗体偶联药物 (ADC) 是由单克隆抗体 (mAb) 和毒物 (payload, 本文称药物) 经连接基 (linker) 共价结合为单一分子。设计 ADC 策略是基于单抗的高特异性靶向能力并作为运载体, 将本来缺乏靶向能力的强效杀



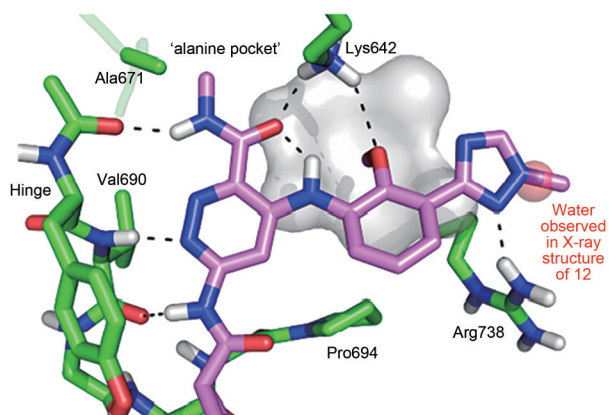


Figure 8 X-ray cocrystal structure of deucravacitinib (**65**) in TYK2 JH2

伤药物,经连接基成为单一分子。ADC靶向靶细胞,内化进入肿瘤细胞,溶酶体将药物释放,与靶标(蛋白或核酸)强效结合,实现了对癌细胞的高效精准杀伤。所以,ADC是利用单抗对携带有相应抗原的肿瘤细胞的选择性,利用药物对肿瘤靶标强效的杀伤性,在靶细胞内利用生化或化学反应释放出强效药物而杀伤,所以ADC也可认为是潜伏化的大尺寸前药(prodrug),实现选择性。自第一个ADC药物Mylotarg®(gemtuzumab ozogamicin,奥加米星吉妥组单抗)于2000年获得FDA批准以来,截至2022年全球共有11款ADC药物获批,用于血液系统恶性肿瘤和实体瘤,此外,目前还有100多个ADC候选物处于临床试验的不同阶段。图9^[28-30]是ADC作用机制的示意图。

表3中列出了经FDA批准上市的ADC药物,为了叙述药物的结构特征,将ADC“还原分解”成三部分:单抗(antibody)、连接基(linker)和药物(payload)。以

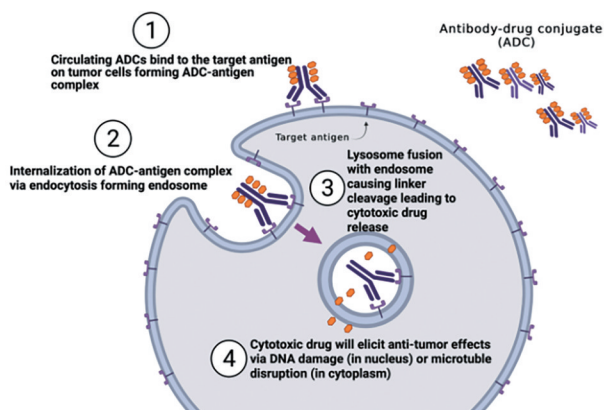


Figure 9 Sketch of step by step mechanism of action of antibody-coupled drugs (ADCs). Circulating ADCs bind to the target antigen forming an ADC-antigen complex (1). Then, the complex is internalized *via* endocytosis (2). Linker cleavage leads to cytotoxic drug release (3) and elicit anti-tumor effects (4)^[28-30]

示连接的方式,读者也容易连接成ADC。表中DAR (drug-antibody ratio) 代表每个单抗分子缀合药物分子的平均值,是ADC效率的一种量度。

奥加米星吉妥组单抗 (**66**): ADC内化后,腺键可以在内涵体酸性环境中水解,释放出卡奇霉素的前体,然后被谷胱甘肽还原为游离的活性卡奇霉素。后者与DNA小沟结合,并经过Bergman环化作用,从而产生高反应性双自由基,引起序列选择性的DNA双链断裂。维布妥昔单抗 (**67**): 连接基可裂解。ADC结合CD30后内化,转运到溶酶体。溶酶体中蛋白酶裂解出药物释放到胞浆中将细胞杀伤。恩特曲妥珠单抗 (**68**): 连接基是不可裂解的。4-(*N*-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(MCC)连接于单抗的Lys上。溶酶体内的蛋白酶只逐步将抗体水解,遗留下Lys-MCC-美坦新(Lys-MCC-DM),美坦新带着连接基与微管蛋白结合,抑制微管的正常组装。伊组单抗奥加米星 (**69**): 连接基含有腺片段,在偏酸性癌细胞中裂解,释放出卡奇霉素,后者在亲核基团作用下,烯二炔电荷转移环合,生成1,4失氢双自由基,与DNA共价嵌合,抑制细胞周期。维泊妥组单抗 (**70**): 蛋白酶可裂解二肽连接基缬氨酸-瓜氨酸,后者又分解出对氨基苄醇,与微管抑制剂单甲基auristatin E (MMAE) 共价结合的氨基甲酸酯对酸也敏感。维恩妥人单抗 (**71**): 连接基可酶解断裂。马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸(MC-Val-Cit)连接在抗体的半胱氨酸残基上,内吞后经溶酶体的蛋白酶水解,释放出药物MMAE。德曲妥珠单抗 (**72**): 连接基可裂解。四肽GGFG溶解性较好,与药物连接点为氮杂缩甲醛,在偏酸性的癌细胞中容易分解,释放出药物。戈沙妥珠单抗 (**73**): Trop2是肿瘤相关钙信号转导2受体,该受体在三阴性乳腺癌中高表达。药物是喜树碱类拓扑异构酶I抑制剂SN-38,与连接基结合位点是敏感的C16羟基,经碳酸酯连接,对酸性是敏感的。玛贝妥单抗 (**74**): BCMA单抗为无岩藻糖基化单克隆抗体,抗体的半胱氨酸残基连接马来酰亚胺己酰基,连接基与MMAF偶联。与抗原结合后在Fc区被岩藻糖基化,增强了内化后的细胞毒性。替朗妥昔单抗 (**75**): 连接基为酶可裂解的缬氨酸-丙氨酸和增加水溶性和稳定性的聚乙二醇,连接的药物是非对称的吡咯并苯并二氮杂草(PBD)二聚体。释放出的二聚体与DNA嵌合。维替索妥人单抗 (**76**): 组织因子(TF)是参与肿瘤信号传导和血管生成的蛋白质,多数实体肿瘤中TF高表达,所以是ADC药物的理想靶标。连接基可裂解,连接药物单甲基奥瑞他汀E (monomethyl auristatin E),本品用于治疗宫颈癌,有望治疗多种实体瘤。索米妥昔单抗 (**77**): FAα在卵巢中高表达,内化后连接基被裂

解, 释放出的药物美登素 (ravtansine, DM4) 阻断胞内微管网络形成, 抑制细胞增殖。

3.2 连接基的设计是药物化学的主要任务

研制ADC旨在满足临床需求。选定病种, 确定变异的抗原, 选择已经批准的相应单克隆抗体, 这是研制ADC的切入点。例如针对高表达叶酸 α 受体的卵巢癌, 公司确定了叶酸 α 受体单抗为载体, 研制成功了继PARP抑制剂奥拉帕尼等靶向药物后的首个治疗抗耐铂类药物的卵巢癌药物索米妥昔单抗 (77)。日本第

一/三共制药基于多种实体瘤高表达HER2蛋白, 因而选择HER2为靶标的单抗, 研制成功的德曲妥珠单抗 (72), 已经批准数个实体瘤适应症 (乳腺癌、胃癌、结直肠癌和非小细胞肺癌等)。选定靶标和单抗主要是临床医生和分子生物学家的任务。

在药物 (payload) 方面, 上市的ADC都是本身难以成药的细胞毒物, 在基因水平上摧毁细胞增殖的毒性分子, ADC的单抗赋予了这些毒物以选择性—主要对癌细胞的DNA/RNA的复制或表达, 终止了细胞周期。

Table 3 List of ADC and compositions approved by FDA. DAR: Drug-antibody ratio

No.	Name	Antibody	Linker	Payload	DAR	Target	Indication
66	Gemtuzumab ozogamicin	Anti-CD33 IgG4			2-3	CD33	AML
67	Brentuximab vedotin	Anti-CD30 IgG1			4	CD30	Hodgkin's lymphoma, ALCL
68	Trastuzumab emtansine	Anti-HER2 IgG1			3.5	HER2	Breast cancer
69	Inotuzumabozogamicin	Anti-CD22 IgG4			6	CD22	Lymphocytic leukemia
70	Polatuzumab vedotin	Anti-CD79b			3.8	CD79	Large B-cell lymphoma
71	Enfortumab vedotin	Anti-Actin4 IgG1			3.8	Nectin-4	Urothelial carcinoma
72	Trastuzumab deruxtecan	Anti-HER2			7.8	HER2	Breast cancer
73	Sacituzumab govitecan	Anti-Trop2 IgG1			7.6	TROP-2 receptor	Breast cancer
74	Belantamab mafodotin	Anti-BCMA IgG1			4	BCMA	Multiple myeloma
75	Loncastuximab tesitine	Anti-FD19 IgG1			?	CD-19	Recurrent refractory large B-cell lymphoma
76	Tisotumab vedotin	Anti-CD142			4.1	Tissue factor	
77	Mirvetuximab soravtansine	Anti-FA α IgG1			4	Folic acid receptor α (FR α)	FR α (+) epithelial ovarian carcinoma

因而, 构建连接基 (linker) 在一定意义上成为研制 ADC 的药物化学重点。内容包括: ① ADC 分子中药物-抗体比值 (DAR), 即每个单抗连接的药物分子数, 已上市的 DAR = 2~8。DAR 值过低作用强度不够, 过大有失稳定性风险; ② 稳定性, 是连接基的最重要使命。要求在到达靶组织之前的循环血中 ADC 保持化学结构稳定不变, 不得有游离药物的泄露, 避免毒副作用; ③ 释放性, 要求 ADC 内化癌细胞后连接基迅速裂解 (酶或化学分解), 癌细胞浆偏酸性, 是含有胺基 (66、67、69)、对氨基苄醇酯片段 (70、71、73、75、76) 和氮杂缩甲醛 (72) 容易裂解的位点, 蛋白酶可水解含有缬-瓜二肽 (70、71) 和甘-甘-苯丙-甘四肽 (72) 片段, 肽结构还有助于水溶性。含有聚乙二醇的 73 和 75 更有利于溶解性。68 的连接基是不可裂解的 4-(*N*-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (MCC) 与单抗的 Lys 连接, 溶酶体内的蛋白酶只逐步将抗体水解, 留下 Lys-MCC-美坦新 (Lys-MCC-DM), 后者与微管蛋白结合, 抑制微管的正常组装。

4 特异性降解靶标蛋白的蛋白水解靶向嵌合体

4.1 原理

上一节讨论的 ADC 是类双功能分子: 单抗是导向载体, 药物杀伤靶标和细胞。本节讨论的蛋白水解靶向嵌合体 (PROTAC) 也是双功能分子, 也是由三部分组成: 靶蛋白配体、E3 泛素连接酶配体和连接基组成, 但属于小分子范畴。PROTAC 能特异性结合靶蛋白, 同时募集并结合 E3 泛素连接酶, 后者催化靶蛋白多聚泛素化、被泛素化的靶蛋白通过被蛋白酶体系降解成氨基酸和寡肽。简言之, PROTAC 将靶蛋白和 E3 连接酶 (E3 ligase) 结合成三元复合物: 靶蛋白-PROTAC-E3 连接酶, 此时 E3 连接酶介导 E2 泛素结合酶将靶蛋白泛素化。三元复合物解离, PROTAC 复原, 被泛素化的靶蛋白被输送到蛋白酶体中降解, 降低了靶蛋白水平。复原的 PROTAC 分子作新一轮的催化结合, 循环多次, 理论上没有消耗^[31]。

PROTAC 是小分子化合物, 可以口服是一大长处。而又不是一般药物靠占据/结合靶标活性 (或变构) 位点作“消耗性”起效, 而是在借助双配体的介导, 靠

蛋白酶体发生降解靶标蛋白的事件, 这个过程即使 PROTAC 结合靶蛋白/E3 酶的作用较弱, 或浓度较低也同样能够发挥作用, 加之其“催化”的特性, 是通常药物所不及的。当然, 活性强是获得最大降解水平 (D_{max}) (>90%) 和低半数降解浓度 (DC_{50})。为此, 两种配体对靶蛋白和 E3 酶的强效亲和力是产生高 D_{max} 结构基础。通过微调配体的结构、连接基的组成、长度和刚性以优化摄入细胞改善 DC_{50} ^[32]。

4.2 现状

PROTAC 在全球药企和大学研制得很多, 但迄今还没有被批准上市的药物。目前处于临床研究的共 24 个, 6 个在 II 期和 I/II 期的列于表 4。

本文仅以 PROTAC 技术发明人 Crews 创始的 Arvinas 公司研制的 ARV471 (78) 和 ARV110 (79) 为例简述 PROTAC 的化学特征, 这是目前已经完成 II 期临床研究处于领先的项目。两个候选物分别是雌激素受体降解剂 (SERD) 和雄激素受体降解剂 (SARD)。分子的左侧 (红色) 是结合雌/雄激素受体的配体。两个配体 (片段) 分别借鉴雌/雄受体调节剂 (SERM/SARM) 的结构优化或简化而来, 例如 78 与他莫昔芬 (84, tamoxifen) 骨架、79 与比卡鲁胺 (85, bicalutamide) 骨架具有结构相似性。目前研制 PROTAC 的靶蛋白配体的结构大都源自于已有的药物或活性物。

与 E3 连接酶结合的配体是免疫调节亚胺类药物 (IMiDs), 分别是泊马度胺和来那度胺的类似物。它们

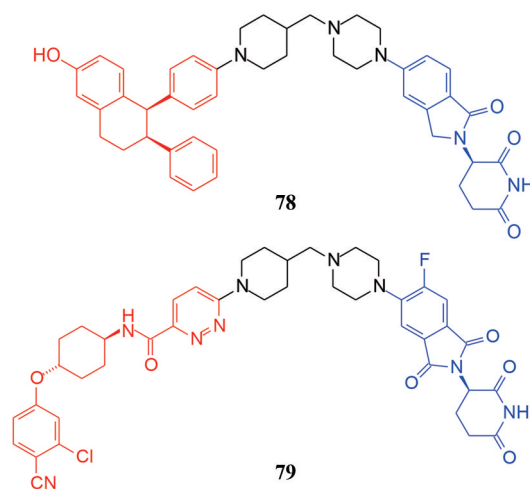
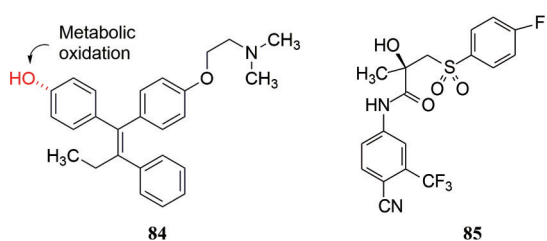


Table 4 The list of PROTACs under clinical study at phase II or I/II

No.	Name/code No.	Target	Indication	Company	Phase
78	ARV471	ER	ER+/HER2-breast cancer	Pfizer/Arvinas	II
79	Bavdegalutamide ARV110	AR	Castration-resistant prostate cancer	Arvinas	II
80	AVR766	AR	Castration-resistant prostate cancer	Arvinas	I/II
81	RNK05047	BRD4	Solid tumor and lymphoma	Ranok	I/II
82	CFT8634	BRD9	Synovial sarcoma and SMARCB1 deletion solid tumor	C4 Therapeutics	I/II
83	CG001419	Trk	Lung cancer and pancreatic carcinoma	Cullgen	I/II



高选择性地结合于 E3 连接酶 CRBN, 促进靶蛋白的多聚泛素化。

PROTAC 连接基与 ADC 不同, 是稳固的共价结合片段, 确保化合物的稳定性。为了保障良好的物理化学性质, 连接基多为亲水性片段, **78** 和 **79** 是哌啶甲基哌嗪。

ARV-471 的 II 期临床表明单药治疗 ER+/HER2-乳腺癌患者显示良好的耐受性和 38% 的临床获益率 (完全缓解率、部分缓解率或疾病稳定率 > 24 周), 优于氟维司群效果, 达到了试验的主要终点。

ARV110 (**79**) 的 I 期和 II 期临床试验结果显示, 在治疗携带 AR T878X/H875Y (T878X=T878A 或 T878S) 突变的转移性去势抵抗性前列腺癌 (mCRPC) 患者中表现出强力抗癌活性。在安全性上 II 期临床试验推荐剂量表现出可控的耐受性。

5 非药化途径提高药物选择性

小分子药物集活性、选择性、合理药代和安全性于化学结构之中, 实在勉为其难。即使多轮结构优化, 也未必体现了全优属性, 顾此失彼和退而求其次的通融倒是常态。但即便如此, 还存在难以消除的缺点, 在难以从结构层面上克服时, 用另一药物消除、缓解和抵消不利因素, 提升治疗效果也是一种策略^[33]。

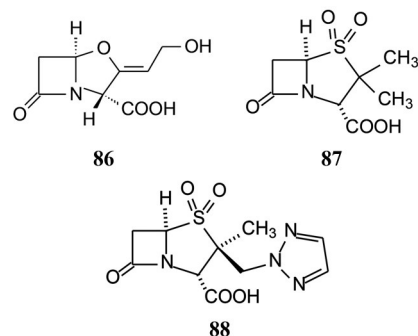
5.1 熟知的药物配伍

现已应用较少的磺胺类抗菌药主要从尿中排出, 但由于磺胺的偏酸性在尿液中溶解度低, 容易发生结晶尿和在肾脏沉积, 造成肾脏损伤, 因此磺胺药同时服用碳酸氢钠, 提高尿液 pH 值, 增加在尿液中的溶解, 这是改善药物排泄的历史悠久的例子。

另一与磺胺配伍应用的是磺胺增效剂, 例如甲氧苄啶 (trimethoprim) 是叶酸合成酶抑制剂。人体的叶酸是作为维生素从膳食中获得, 而细菌的叶酸需从蝶啶环对氨基苯甲酸 (PABA) 和谷氨酸合成, 磺胺的抑菌作用是 PABA 的抗代谢物; 甲氧苄啶抑制叶酸的合成, 所以同时服用磺胺和甲氧苄啶是从两个环节抗菌的。甲氧苄啶虽称作增效剂, 也可作为抗菌药单独应用。

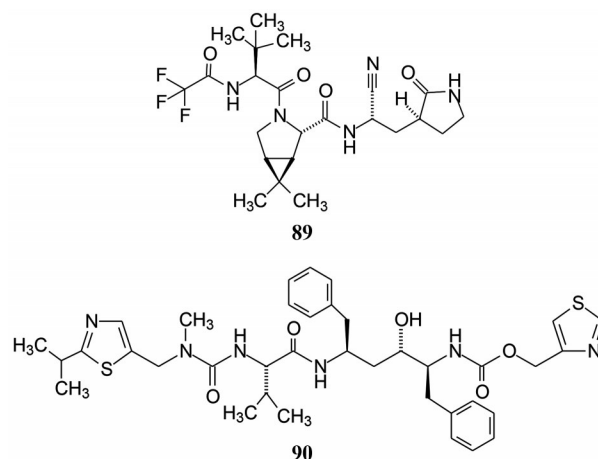
久用 β -内酰胺类抗生素引起的耐药菌的因素之一是细菌产生 β -内酰胺酶, 催化水解 β -内酰胺环使药物失效。同时服用 β -内酰胺酶抑制剂可维持抗生素的抗菌作用。克拉维酸 (**86**, clavulanic acid) 与阿莫西林或

替卡西林的复方、舒巴坦 (**87**, sulbactam) 与头孢哌酮的合用、他唑巴坦 (**88**, tazobactam) 与哌拉西林的配伍都是常用的抗菌复方。



5.2 新的范例

COVID-19 引发的全球 3 年疫情催生了辉瑞公司抗新冠病毒药物帕克洛维 (Paxlovid) 的研制, 美国 FDA 于 2021 年 12 月批准上市。帕克洛维是一款固定剂量组合的复方制剂, 它含有两种活性物质奈玛特韦 (**89**, nirmatrelvir) 和利托那韦 (**90**, ritonavir), 两药各司其职, 主药奈玛特韦抑制新冠病毒增殖 (药效), 辅药利托那韦延长主药的作用时间 (药代)。

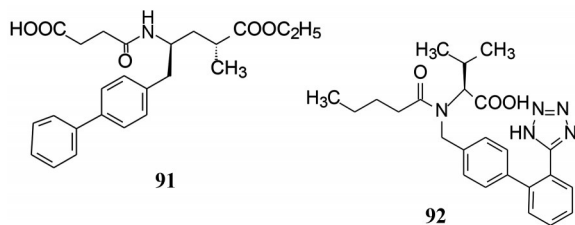


冠状病毒普遍存在 3C 样半胱氨酸蛋白酶 (3CL^{pro}), 功能是整合和处理众多的原蛋白, 是病毒增殖的重要酶系。辉瑞公司筛选出苗头化合物并改构得到含酮基的二肽, 酮基作为亲电基团可与 3CL^{pro} 的 Cys145 发生共价结合而抑制 3CL^{pro}。经多轮优化最终研制出 **89**, 是含有脂肪氨基的拟二肽, 氨基可与 Cys145 共价结合成硫代亚胺酸酯, 强效抑制酶活性和病毒复制。然而奈玛特韦在体内迅速被细胞色素 CYP 3A4 代谢失活, 研制者选用已上市的 CYP 3A4 强效抑制剂利托那韦辅助用药, 可将奈玛特韦的体内半衰期延长到 6 h, 因而规定帕克洛维每隔 12 h 服用一剂, 两药分别履行药效

与药代, 共同维持治疗效果^[34]。

5.3 治疗心衰的双分子结合药物 Entresto

2015年7月美国FDA批准诺华公司的复方制剂心衰药物 Entresto 上市(中文商品名诺欣妥), 治疗慢性心力衰竭, 这个复方制剂是以多种方式作用于心脏的神经内分泌系统, 治疗效果与标准疗法比较, 显著地降低心衰患者的死亡率, 被认为是20多年来心衰治疗药的重大突破。Entresto 是由沙库巴曲 (**91**, sacubitril, 49 mg) 和缬沙坦 (**92**, valsartan, 51 mg) 组成。



沙库巴曲的作用靶标是抑制一种中性内切酶(neprilysin), 后者是降解血浆中心房利钠肽(atrial natriuretic factor, ANF)的水解酶, 因而沙库巴曲使内源性 ANF 肽维持在一定的水平, 保护心脏的神经内分泌系统, 有利于心衰患者; 缬沙坦是血管紧张素 I 受体阻断剂, 抑制 Ang II 的升压作用, 阻断患者的过于活跃的肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)。复方制剂 Entresto 中的沙库巴曲是以新分子实体(NME)首次上市的, 就与1996年就已上市的缬沙坦配伍, 两个都是主成分, 不同药理作用的各司其职的互补性, 使得 Entresto 在治疗心衰患者成为划时代的突破^[35]。

Entresto 在剂量设计和分子结构上也很有特色: 两个成分的治疗剂量恰好是等分子量; 与钠离子形成配位键结合以及分子内和水分子间的氢键网络, 构成了稳定的超分子结合的共晶结构。图10是共晶复合物结构。每个共晶体由6个沙库巴曲负离子, 6个缬沙坦负离子, 18个钠离子和15个水分子构成, 分子式为 $C_{288}H_{330}N_{36}Na_{18}O_{48} \cdot 15H_2O$, 分子量为 5 748.03, 为白色六边形片状结晶形粉末, 熔点 138 °C。复合物在固态和 pH 5~7 的水溶液是稳定的^[36]。

5.4 治疗成人重度抑郁症的 Auvelity

2022年8月FDA批准了Axsome Therapeutics公司研制的复方缓释片剂 Auvelity, 用于治疗成人重度抑郁症, 这是60多年来首款具有新作用机制的抑郁症口服药, 提供了起效迅速的新疗法。在用药1周之后, 抑郁症状就得到显著改善; 2周以后, 每个阶段的缓解率都显著更高, 实现了快速、持久且显著改善抑郁症状。

这个划时代成功制剂却是由两个已知药物组成

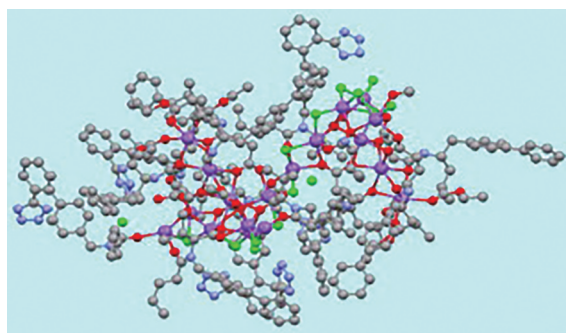
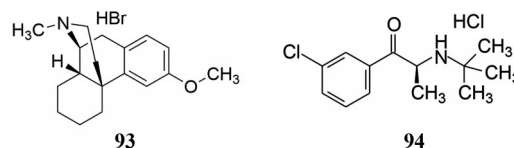


Figure 10 Crystallography of Entresto complex. The red dots stand for sodium ion, the green dots water molecules

的: 右美沙芬 (**93**, dextromethorphan HBr, 45 mg) 和安非他酮 (**94**, bupropion HCl, 105 mg), 竟成为唯一被批准用于重度抑郁症的口服速效 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂, 全新的作用机制。

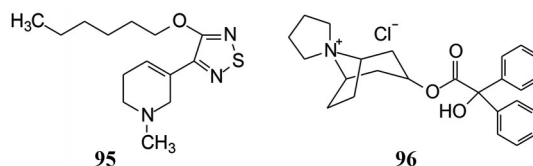


Auvelity 治疗作用的确切机制有待深入解析。这个组合中, 右美沙芬是非竞争性 NMDA 受体拮抗剂, 同时也是阿片 σ 受体激动剂, 可调节谷氨酸能神经传递。安非他酮是去甲肾上腺素和多巴胺再摄取抑制剂, 还竞争性抑制细胞色素 CYP2D6, 后者阻断了右美沙芬的体内代谢降解, 因而提高了生物利用度。研究表明 Auvelity 的血液水平是由两个药物之间独特的药代动力学相互作用决定的, 在稳态时发现这种相互作用是非线性的^[37]。

5.5 消除抗精神病药物的不良反应

现有抗精神病药最常见的不良反应为引发锥体外症状、代谢紊乱和增重等, 患者的依从性较差。Karuna Therapeutics 公司研制了口服新型组合药物 KarXT, 是由咕诺美林 (**95**, xanomeline) 和曲司氯铵 (**96**, trospium chloride) 组成, 咕诺美林是毒蕈碱受体激动剂, 曲司氯铵是毒蕈碱受体拮抗剂。这种配伍旨在激活大脑中的毒蕈碱型乙酰胆碱受体的同时, 减少对外周毒蕈碱型乙酰胆碱受体的作用。

咕诺美林是毒蕈碱 M1/M4 受体选择性激动剂, 对



M2、M3、M5受体作用较弱, 由于容易透过血脑屏障, 皮质和纹状体的摄取率较高, 是目前选择性很高的M1/M4受体激动剂。但因有外周作用引起胃肠和心血管系统不良反应^[38]。

曲司氯铵为毒蕈碱全M受体拮抗剂, 属于抗胆碱能类化合物, 可松弛膀胱平滑肌, 单独应用治疗膀胱过度活动症和急迫性尿失禁。由于结构中存在季铵离子难以穿越血脑屏障和进入中枢神经系统, 所以只是外周毒蕈碱受体拮抗剂, 因而服用KarXT不影响咕诺美林的药效, 反而降低了对外周的不良反应。III期临床表明, 口服KarXT可治疗精神和神经系统疾病, 包括精神分裂症和阿尔茨海默症中的精神症状, 由于减轻了不良反应, 患者对KarXT的依从性也较好, 有望成为50年来首个具有新颖且独特的双重机制的药物组合, 通过不依赖多巴胺能或血清素能途径来治疗严重精神疾病的症状的药物^[39]。

6 小结

提高创制药物的活性和选择性, 无论是首创性或跟随性创新, 都是以满足患者需求为前提、以靶标为核心的科技实践, 它是由众多环节构成的价值链组成, 这其中隐含着3个要素, 即确证致病的分子机制、把握疾病的微观特征、阐明药物作用的分子机制, 体现了生物学驱动研制的内涵。这3个要素的共同特征是把宏观的表象转化为微观的分子特征及其变化。始于设定并确定靶标分子是致病的根源, 终于药物呈现的疗效是干预致病靶标的结果。

靶标是致病分子机制的核心。然而将一种疾病“提炼”或归结成一个靶标蛋白或网络通路的关键节点, 这个由繁至简的过程需要反复的验证, 证明疾病与靶标不只有相关性, 更需要有因果关系的证据。

疾病的宏观表象和微观特征的关联, 在发病和实验治疗中从微观分子水平进行分析, 例如检测基因缺失与变异, 应用蛋白质组学、转录组学、表观遗传等技术, 分析患者的临床表现, 经数据挖掘, 归纳出基因-蛋白(酶、受体、通道、信号分子等)与疾病的关系, 从而为创制新药和治疗方法提供新的科学依据。人工智能(AI)晚近有巨足的进展^[40]。

阐明药物的作用机制是对致病分子机制的验证, 也是创制过程的终点与归宿, 这样, 在微观的分子层面上完整地阐明了药物剂量-疗效-不良反应的内在关系。阐明药物的作用机制得以深化对疾病和治疗的认知, 也有助于扩展和指导新一代药物的研制。本文是从实用角度例解提高药物活性和选择性的策略方法, 读者也可从生物学层面分析这3个要素的内涵。

作者贡献: 郭颖、郭宗儒负责论文的选题、文献调研与撰写。

利益冲突: 作者声明没有利益冲突。

References

- [1] Stopfer P, Marzin K, Narjes H, et al. Afatinib pharmacokinetics and metabolism after oral administration to healthy male volunteers [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69: 1051-1061.
- [2] Smail JB, Gonzales AJ, Spicer JA, et al. Tyrosine kinase inhibitors. 20. Optimization of substituted quinazoline and pyrido[3,4-d]pyrimidine derivatives as orally active, irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor family [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 8103-8124.
- [3] Ward RA, Anderton MJ, Ashton S, et al. Structure- and reactivity-based development of covalent inhibitors of the activating and gatekeeper mutant forms of the epidermal growth factor receptor (EGFR) [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 7025-7048.
- [4] Finlay MR, Anderton M, Ashton S, et al. Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild type form of the receptor [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 8249-8267.
- [5] Leproult E, Barluenga S, Moras D, et al. Cysteine mapping in conformationally distinct kinase nucleotide binding sites: application to the design of selective covalent inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2011, 54: 1347-1355.
- [6] Tjeerd B, Allard K. Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 6243-6262.
- [7] Wu J, Zhang M, Liu D. Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9: 21.
- [8] Wang ZW, Guo YH. Protein kinase inhibitors and uses thereof: US, 2015005277 [P]. 2015-01-01.
- [9] Guo YH, Liu Y, Hu N, et al. Discovery of zanubrutinib (BGB-3111), a novel, potent, and selective covalent inhibitor of Bruton's tyrosine kinase [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 7923-7940.
- [10] Llinas-Brunet M, Bailey M, Fazal G, et al. Peptide-based inhibitors of the hepatitis C virus serine protease [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8: 1713-1718.
- [11] Venkatraman S, Bogen SL, Arasappan A, et al. Discovery of (1R,5S)-N-[3-amino-1-(cyclobutylmethyl)-2,3-dioxopropyl]-3-[2(S)-[[[(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]amino]-3,3-dimethyl-1-oxobutyl]-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexan-2(S)-carboxamide (SCH 503034), a selective, potent, orally bioavailable hepatitis C virus NS3 protease inhibitor: a potential therapeutic agent for the treatment of hepatitis C infection [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 6074-6086.
- [12] Bogen SL, Ruan S, Liu R, et al. Depeptidization efforts on P3-P2' α -ketoamide inhibitors of HCV NS3-4A serine protease:

- effect on HCV replicon activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 1621-1627.
- [13] Arasappan A, Njoroge F, Chan TY, et al. Hepatitis C virus NS3-4A serine protease inhibitors: SAR of P2' moiety with improved potency [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15: 4180-4184.
- [14] Kwong AD, Kauffman RS, Hurter P, et al. Discovery and development of telaprevir: an NS3-4A protease inhibitor for treating genotype 1 chronic hepatitis C virus [J]. *Nat Biotech*, 2011, 29: 993-1003.
- [15] Tsubuki S, Kawasaki H, Saito Y, et al. Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 196: 1195-1201.
- [16] Lowe J, Stock D, Jap B, et al. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution [J]. *Science*, 1995, 268: 533-539.
- [17] Adams J, Behnke M, Chen S, et al. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8: 333-338.
- [18] Sánchez-Serrano I. Success in translational research: lessons from the development of bortezomib [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 107-114.
- [19] Ito A, Sato T, Ota M, et al. *In vitro* antibacterial properties of cefiderocol, a novel siderophore cephalosporin, against gram-negative bacteria [J]. *Antimicrob Agents Chemoth*, 2018, 62: e01454-17.
- [20] Patricelli MP, Janes MR, Li LS, et al. Selective inhibition of oncogenic KRAS output with small molecules targeting the inactive state [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6: 316-329.
- [21] Shin Y, Jeong JW, Wurz RP, et al. Discovery of *N*-(1-acryloylazetid-3-yl)-2-(1*H*-indol-1-yl)acetamides as a covalent inhibitor of KRAS^{G12C} [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 10: 1302-1308.
- [22] Canon J, Rex K, Saili AY, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2019, 575: 217-223.
- [23] Lanman BA, Allen JR, Allen JG, et al. Discovery of a covalent inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the treatment of solid tumors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 52-65.
- [24] Wylie AA, Schoepfer J, Jahnke W, et al. The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1 [J]. *Nature*, 2017, 543: 733-737.
- [25] Schoepfer J, Jahnke W, Berellini G, et al. Discovery of asciminib (ABL001), an allosteric inhibitor of the tyrosine kinase activity of BCR-ABL1 [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 8120-8135.
- [26] Nielsen OH, Boye TL, Chekravarti D, et al. Selective tyrosine kinase 2 inhibitors in inflammatory bowel disease [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43: 424-436.
- [27] Wroblewski ST, Moslin R, Lin S, et al. Highly selective inhibition of tyrosine kinase 2 (TYK2) for the treatment of autoimmune diseases: discovery of the allosteric inhibitor BMS-986165 [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 8973-8995.
- [28] Li F, Liu X, Sampson JH, et al. Intracellular released payload influences potency and bystander-killing effects of antibody-drug conjugates in preclinical models [J]. *Cancer Res*, 2016, 76: 2710-2719.
- [29] Abuhelwa Z, Alloghbi A, Nagasaka M. A comprehensive review on antibody-drug conjugates (ADCs) in the treatment landscape of non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Cancer Treatment Rev*, 2022, 106: 102393.
- [30] Chia CSB. A patent review on FDA-approved antibody-drug conjugates, their linkers and drug payloads [J]. *ChemMedChem* 2022, 17: e202200032.
- [31] Churcher I. PROTAC-induced protein degradation in drug discovery: breaking the rules or just making new ones? [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 444-452.
- [32] Li K, Crews CM. PROTACs: past, present and future [J]. *Chem Soc Rev*, 2022, 51: 5214-5236.
- [33] Zhao HY. FDA approved Ayvelity: when you can't put all properties in one molecule. <https://www.yypharm.com/?p=26321>.
- [34] Hoffman RL, Kania RS, Brothers MA, et al. Discovery of ketone-based covalent inhibitors of coronavirus 3CL proteases for the potential therapeutic treatment of COVID-19 [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 12725-12747.
- [35] Voors AA, Dorhout B, van der Meer P. The potential role of valsartan + AHU377 (LCZ696) in the treatment of heart failure [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2013, 22: 1041-1047.
- [36] Feng L, Karpinski PH, Sutton P, et al. LCZ696: a dual-acting sodium supramolecular complex [J]. *Tetrahedron Lett*, 2012, 53: 275-276.
- [37] Blair G, Wells C, Ko A, et al. Dextromethorphan and bupropion reduces high level remifentanyl self-administration in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2020, 193: 172919.
- [38] Shekhar A, Potter WZ, Lightfoot J, et al. Selective muscarinic receptor agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia [J]. *Am J Psychiatry*, 2008, 165: 1033-1039.
- [39] Brannan SK, Sawchak S, Miller AC, et al. Muscarinic cholinergic receptor agonist and peripheral antagonist for schizophrenia [J]. *New Eng J Med*, 2021, 384: 717-726.
- [40] Jayatunga MK, Xie W, Ruder L. AI in small-molecule drug discovery: a coming wave? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21: 175-176.