

赖氨酸特异性去甲基酶 1 反苯环丙胺类不可逆抑制剂的研究进展

高琦冰, 刘超亿, 孙旭东, 马超亚, 王志正, 郑甲信, 丁丽娜*

(郑州大学药学院 药物关键制备技术教育部重点实验室, 河南 郑州 450001)

[摘要] 组蛋白赖氨酸特异性去甲基酶 1 (LSD1) 在调节组蛋白 H3K4、H3K9 的甲基化状态中起重要作用, 在多种肿瘤细胞中高表达, 已成为一种新型抗肿瘤靶点。目前为止, 已报道的 LSD1 抑制剂中对反苯环丙胺 (TCP) 类抑制剂的研究相对更为深入。综述 TCP 类抑制剂的作用机制、与辅酶黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 结合模式及设计优化的研究进展。

[关键词] 组蛋白赖氨酸特异性去甲基酶 1; 反苯环丙胺类抑制剂; 抑制机制; 结合模式

[中图分类号] R979.1; R918 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-5094 (2020) 04-0313-10

Advances in Research on Tranylcypromine-based Covalent Inhibitors of Lysine-Specific Demethylase 1

GAO Qibing, LIU Chaoyi, SUN Xudong, MA Chaoya, WANG Zhizheng, ZHENG Jiaxin, DING Lina

(College of Pharmacy, Key Laboratory of Advanced Drug Preparation Technologies of the Ministry of Education, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

[Abstract] Histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1), which is highly expressed in various tumor cells, plays an important role in functionally regulating methylation degrees of H3K4 and H3K9. Therefore, it has already been known as a new anti-tumor target. Up to now, deeper researches have been focused on tranylcypromine (TCP)-based inhibitors in all kinds of LSD1 inhibitors. This review aims at TCP's mechanism of inhibition, the modes of combination with coenzyme flavin adenine dinucleotide (FAD) and optimization of its design.

[Key words] histone lysine-specific demethylase 1; tranylcypromine-based inhibitor; inhibition mechanism; binding mode

组蛋白修饰是指组蛋白在相关酶作用下发生甲基化、乙酰化、磷酸化、腺苷酸化、泛素化等修饰的过程。一直以来, 组蛋白修饰中的大多数修饰都被认为是可逆过程, 但甲基化修饰却是一个不可逆过程。直到 2004 年, 随着组蛋白赖氨酸特异性去甲基酶 1 (lysine specific demethylase1, LSD1) 的发现, 甲基化修饰的可逆性才被公布于世^[1]。LSD1 是一种黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 依赖性胺氧酶, LSD1 对甲基化状态的调控会影响相关基因的表达, 从而调节相应的生理学过程——LSD1 能特异

性催化去除组蛋白 H3K4 和 H3K9 的单、双甲基, 调节组蛋白和其他蛋白间的相互作用, 进而影响基因转录的激活、抑制与染色体失活等过程, 被称为细胞深处的基因“开关”。另外, LSD1 还能去除 P53、DNA 甲基转移酶、E2F 转录因子 1、信号转导和转录激活因子 3 等蛋白的甲基, 进而调节下游细胞的生理功能^[2-5]。研究显示, LSD1 在多种肿瘤细胞中高表达^[6-7], 如胃癌、肺癌、前列腺癌、神经细胞瘤、乳腺癌、膀胱癌等, 因此开发有效的 LSD1 抑制剂已成为肿瘤预防和治疗的新方向。目前已有多种 LSD1 抑制剂被报道, 根据其作用方式的不同可分为两大类, 一类是与 LSD1 中辅酶 FAD 共价结合来发挥抑制作用的不可逆抑制剂, 另一类是非共价地结合在 LSD1 的底物结合位点或 FAD 结合位点来发挥抑制作用的可逆抑制剂。不可逆抑制剂较可逆抑制剂结合更稳定、特异性高且化合物不易脱靶, 因此不可逆抑制剂成为 LSD1 抑制剂研究

接受日期: 2019-04-11

项目资助: 国家自然科学基金青年项目 (No. 21403200); 国家自然科学基金重点项目 (No. 81430085)

*** 通讯作者:** 丁丽娜, 副教授;

研究方向: 计算机辅助药物设计;

Tel: 0371-67739546; **E-mail:** dinglina123@126.com

的更优方向。目前已有数个 LSD1 不可逆抑制剂进入临床试验, 进一步证实了 LSD1 不可逆抑制剂的研究价值与成药性。

LSD1 与单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 在催化区域具有 45% 的相同序列, 在序列结构上具有高度同源性^[8], 因此针对二者催化区域以及结构上的相似性, 研究人员开始研究 MAO 抑制剂对 LSD1 的抑制作用。2006 年 Lee 等^[9]报道了 MAO 抑制剂对 LSD1 的抑制活性测试结果, 发现反苯环丙胺类 (tranylcypromine, TCP) 不可逆 MAO 抑制剂对 LSD1 的抑制效果最好。但相比对 MAO 的抑制效果, TCP 对 LSD1 的活性和选择性均很差, 因此众多课题组纷纷投入到对 TCP 的结构改造工作中, 试图得到 LSD1 的特异性强效抑制剂。各课题组从不同层面对此类抑制剂展开探索, 主要包括: 1)

TCP 类化合物的抑制机制以及与 FAD 结合模式; 2) TCP 类抑制剂的设计优化。本文将针对上述两方面逐一概述。

1 TCP 类化合物的抑制机制以及与 FAD 结合模式

2007 年 Schmidt 等^[10]报道了 TCP 对 LSD1 的抑制机制, 经实验以及对 TCP-FAD 复合物的质谱分析证实了 TCP 对 LSD1 的不可逆抑制作用是通过与 FAD 共价结合实现的。推测其反应机制为: TCP 中环丙烷经单电子转移开环进而共价结合至 FAD-C4 位, 生成亚胺中间体, 然后经水解得到 TCP-FAD 复合物。由于 TCP 中环丙烷结构的不对称性, 导致开环位置也相应不同, 故存在 2 种 C4 位加成机制 (路径 1、2, 见图 1)。

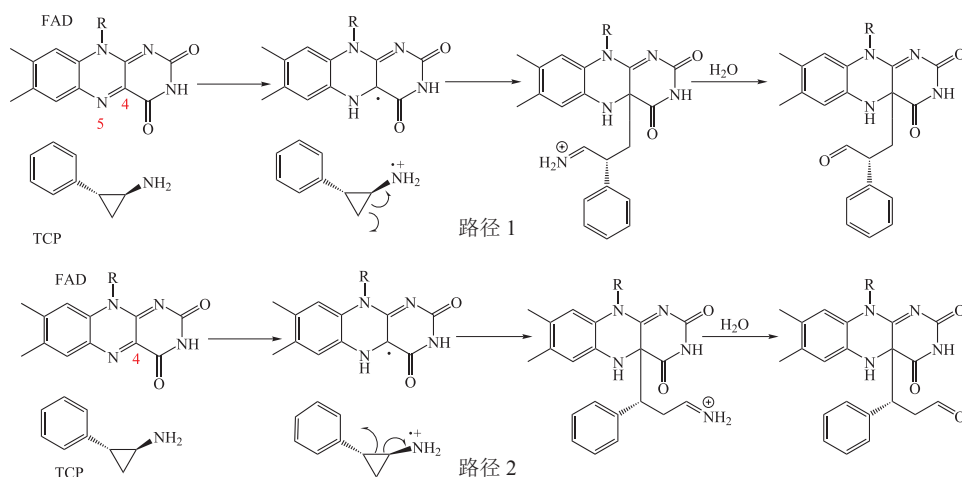


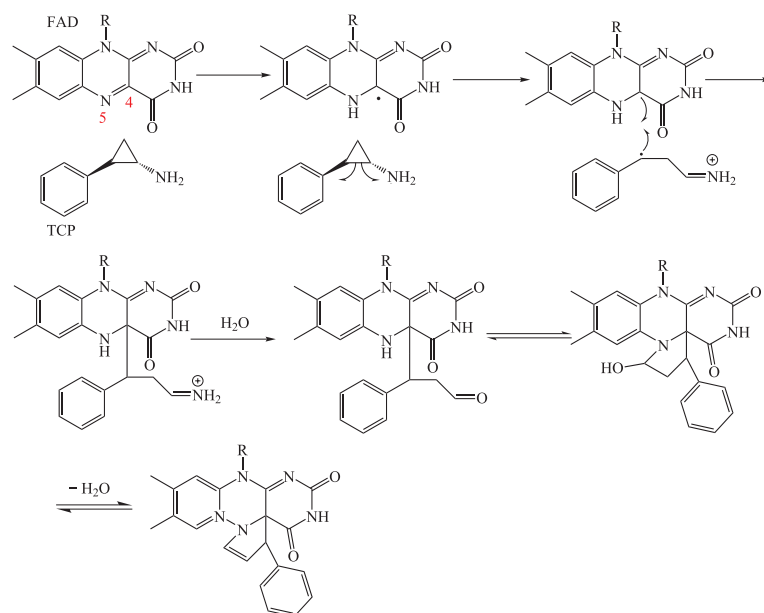
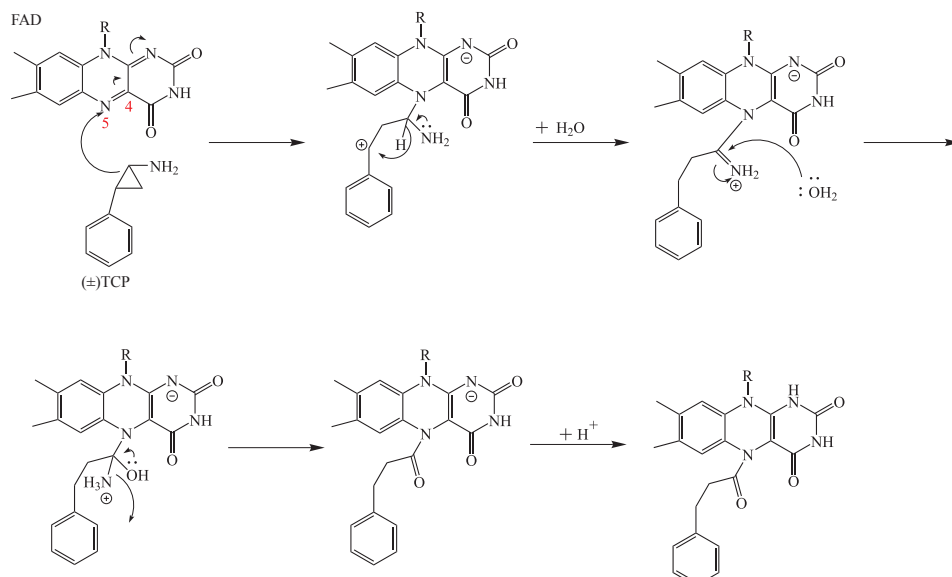
图 1 TCP 与 FAD-C4 位的 2 种加成机制^[9]

Figure 1 Two addition mechanisms of TCP and FAD-C4 site^[9]

同年, Yang 等^[11]解析得到 TCP-FAD 晶体, 分析确证了 TCP 连接至 FAD-C4 位复合物的存在, 但电子密度图显示 FAD 的 N5、C4 原子位置均发生了结构修饰, 即这 2 个原子均与 TCP 成键。由此推测 TCP-FAD 的结晶中还存在 TCP 共价结合至 FAD 的 N5、C4 位原子的五元环结构, 随后结合质谱、紫外可见光谱的分析结果证实了五元环晶体模型的存在, 且为主要存在形式。推测五元环结构形成机制为: 同样先经由单电子转移机制致使环丙烷开环, 生成苄基自由基与亚胺中间体, 随后经自由基反应结合至 FAD, 同时亚胺水解进而与 FAD 成环形成 TCP-

FAD 五元环结构 (见图 2)。

随后 Mimasu 等^[12]在提高结晶解析度的条件下得到更精细的 TCP 与 LSD1 的复合晶体结构。然而经过分析发现 TCP 与 LSD1 中 FAD 结构的五元环结合模式、C4 结合模式均无法完全匹配 Fo-Fc 电子密度图, 鉴于此, 他们推测结晶中可能还同时存在 TCP 仅进攻 FAD-N5 位的结合模式。推测其机制为: TCP 在环丙烷开环同时对 FAD 亲核加成, 之后经氢转移、亚胺水解得到加成产物 (见图 3)。但吸收光谱显示五元环结构仍是 TCP-FAD 复合物的主要存在形式。

图 2 TCP-FAD 五元环结构形成机制^[11]Figure 2 Formation of five-membered ring structure of TCP-FAD^[11]图 3 TCP 仅进攻 FAD-N5 位的结合模式的机制^[12]Figure 3 Binding mode of TCP attacking the FAD-N5 site only^[12]

TCP-FAD 的 3 种结合模式在 2014 年 Vianello 等^[13]改造得到的环丙胺 α 位取代的 TCP 衍生物与 LSD1 的复合物晶体结构中均被证实。但环丙胺 α 位被取代后无法经单电子转移机制生成亚胺中间体, 所以该课题组又提出此类抑制剂经自由基机制直接开环而共价结合至 FAD 的方案 (见图 4)。

截至目前, TCP 类抑制剂与 LSD1 辅酶 FAD 的 3 种结合模式在晶体结构中均已得到证实, 但

二者的结合机制尚无定论。晶体结构的解析在抑制剂特异性和活性的优化方面起到重要指导作用, 在研究者尚无法得到其所设计合成的化合物与 LSD1 复合物晶体的情况下, 通过分子模拟手段指导化合物进行改造就显现出优势。但化合物与 LSD1 结合机制的不确定性会给分子模拟带来很大的挑战, 因此仍需对 TCP 类抑制剂的结合机制进行深入研究。

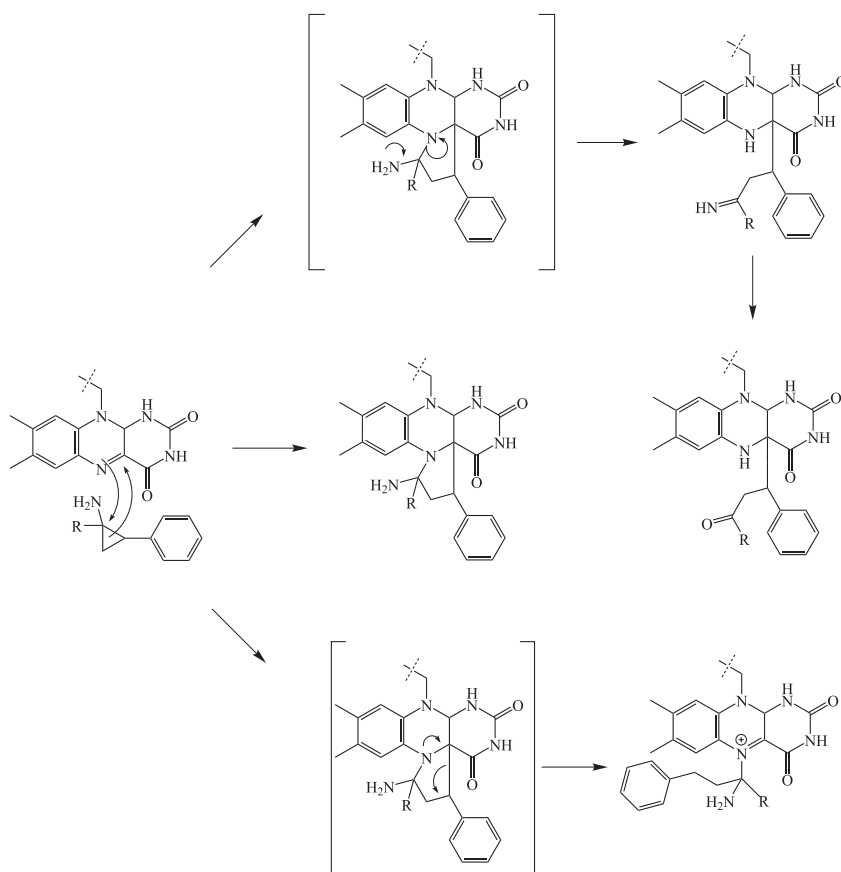


图 4 环丙胺 α 位取代的 TCP 衍生物结合 LSD1 的自由基机制^[13]

Figure 4 Free radical mechanism of cyclopropylamine α -substituted TCP derivative binding to LSD1^[13]

2 TCP 类抑制剂的设计优化

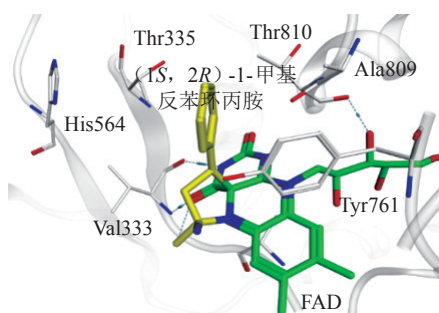
TCP 对 MAO 和 LSD1 的抑制作用均通过与其辅酶 FAD 共价结合而实现, 但与 FAD 的结合方式却不同。对比 2 种酶与 TCP 的复合物晶体结构可以看出^[11], TCP 在 LSD1 中同时结合至 FAD-C4/N5 位, 并以这种五元环方式为主要结合模式 (PDB ID:4UVB, 见图 5); 而 TCP 在 MAO 的 B 亚型中只能结合至 FAD-C4 位 (PDB ID:2XFU, 见图 6)。若 TCP 采取五元环的模式结合至 MAO-B 的 FAD-C4/N5 位, TCP 的苯环将与 Tyr435 残基存在严重的立体碰撞 (见图 7), 而结合至 FAD-C4 位不仅可以避免这种不利碰撞, 同时苯环与周围的疏水残基 Tyr435、Tyr398、Gln206、Tyr60、Phe343 等形成的疏水作用也有利于复合物保持稳定。

由于 TCP 类抑制剂是由 LSD1 的同源蛋白抑制剂发展而来, 对其结构改造和优化主要集中在对 LSD1 的特异性和作用强度方面。如前所述, TCP

类抑制剂在 MAO 和 LSD1 中采取了不同的结合方式, 这一差异也成为 TCP 类抑制剂特异性改造方面的一个重要突破口, 可基于 2 种酶活性位点的结构差异, 通过在苯环上引入较大基团等方式以增强对 LSD1 的特异性。另外 TCP-LSD1 类复合物晶体结构表明 TCP 苯环位于由 Val333、His564、Thr335、Thr810、Ala809、Tyr761 等残基形成的较大疏水性空腔中 (见图 5), 抑制剂上的苯环仅与 Thr335 和 Thr810 上的甲基存在很弱的范德华作用, 且与周围残基没有形成广泛相互作用, 这提示在苯环上引入疏水取代基, 可能通过增强与周围残基的疏水作用从而提升抑制剂活性。

2.1 TCP 苯环的结构修饰

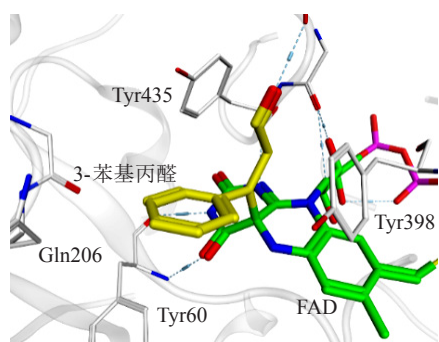
2.1.1 基于活性位点空间结构差异进行的结构修饰
基于 LSD1 和 MAO 活性位点的空间结构差异, 在 TCP 苯环上引入较大基团, 可以增加与 MAO 活性位点残基的立体碰撞, 从而增强对 LSD1 的特异性。



注: (1*S*, 2*R*)-1-甲基反苯环丙胺表示为黄色, FAD 表示为绿色, 蛋白氨基酸残基表示为白色

图 5 (1*S*, 2*R*)-1-甲基反苯环丙胺与 LSD1 的 FAD-C4/N5 位结合模式图

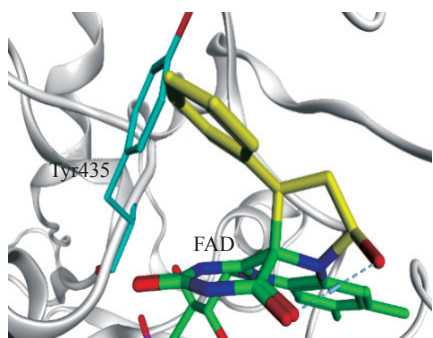
Figure 5 Binding mode of (1*S*, 2*R*)-1-methyl-tranylcypromine in the FAD-C4/N5 sites of LSD1



注: 3-苯基丙醛表示为黄色, FAD 表示为绿色, 蛋白氨基酸残基表示为白色

图 6 3-苯基丙醛与 MAO-B 的 FAD-C4 位结合模式图

Figure 6 Binding mode of 3-phenylpropanal in FAD-C4 site of MAO-B



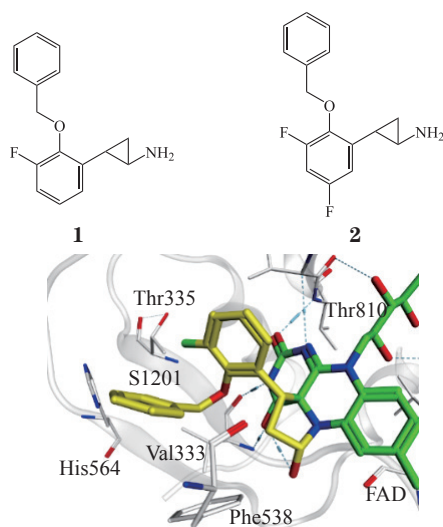
注: TCP 表示为黄色, FAD 表示为绿色, 蛋白氨基酸残基表示为湖蓝色

图 7 TCP 与 MAO-B 的 FAD-C4/N5 位结合模式图

Figure 7 Binding mode of TCP in FAD-C4/N5 sites of MAO-B

考虑到 TCP 中环丙胺 β 位苯环的邻位取代对选择性的影响, 2010 年 Mimasu 等^[14] 设计合成得到邻位体积较大的苄氧基取代的化合物 S1201 (**1**), 其对 LSD1 的活性和选择性 ($IC_{50}=8.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比 TCP

均有提高, 晶体结构 (PDB ID: 3ABU) 显示活性提高是由于引入的邻位苄氧基与 Val333、Phe538、Thr335、His564 等疏水残基的疏水作用稳定了复合物构象 (见图 8), 选择性提高则是 MAO 活性位点残基与化合物 **1** 立体碰撞的结果。在晶体结构指导下, 向化合物 **1** 苯环间位引入疏水 F 原子得到化合物 S2101 (**2**), 其因与周围残基的疏水作用进一步增强, 活性和选择性更好 ($IC_{50}=0.99 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

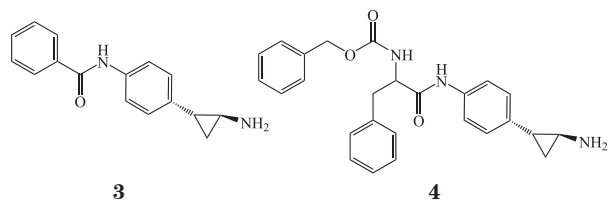


注: 化合物 S1201 表示为黄色, FAD 表示为绿色, 蛋白氨基酸残基表示为白色

图 8 化合物 1-LSD1 复合物构象图

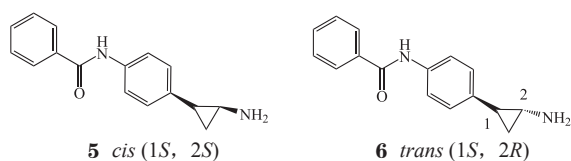
Figure 8 Complex conformation of compound 1-LSD1

同时, Binda 等^[15] 也采取在 TCP 苯环上引入不同性质的大体积取代基的方法以期增强对 LSD1 的选择性和活性, 经过筛选获得 2 个活性最好的化合物 **3** ($IC_{50}=0.0192 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 **4** ($IC_{50}=0.0227 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 相对于 TCP 活性明显提高。化合物 **4** 中由于支链的存在, 导致其对活性位点狭窄的 MAO-B 无抑制活性, 但同时作者推测由于缺乏氢键等特异性相互作用而使化合物 **4** 对 LSD1 和 MAO-A 缺乏选择性。

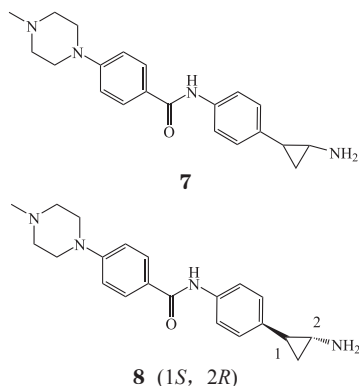


随后 Valente^[16] 和 Vianello^[17] 课题组分别在化合物 **3** (反式结构) 的基础上进行了结构改造。2015

年 Valente 等^[16] 合成了化合物 **3** 的异构体, 经活性测试发现顺式化合物 **5**、反式化合物 **6** 均有较强的 LSD1 抑制活性 (IC_{50} 分别为 0.021 和 $0.022 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 而且能诱导白血病 NB₄ 细胞中独立生长因子 1B (growth factor independence-1B, *gfi1b*) 和整合素 αM (including integrin αM , *itgam*) 基因的高表达, 强烈抑制小鼠急性早幼粒细胞性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 细胞的克隆形成能力。

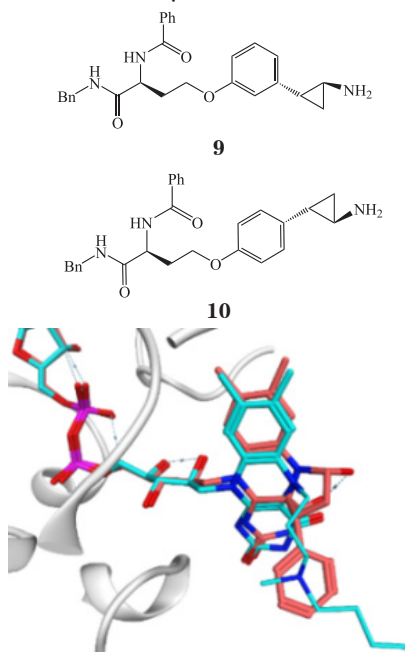


Vianello 等^[17] 对化合物 **3** 的结构修饰主要是在与羰基相连的苯环上引入各种环状体系, 苯环上的取代基可以在不改变化合物类药性的前提下, 充分占据活性位点, 进而提高化合物选择性和活性。最终得到的外消旋体 **7** ($IC_{50}=0.1885 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 虽然抑制活性弱于化合物 **3**, 但经小鼠体内试验及小鼠 APL 模型中生物、细胞活性测试和初步药动学研究证实, 其具有较高的 LSD1 选择性和良好的口服生物利用度, 当浓度为 $250 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其对 APL 细胞的抑制率为 85%, 浓度为 $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对人类白血病单核细胞系的抑制率为 60%。随后合成得到化合物 **7** 的光学单体 **8** (1*S*, 2*R*), 相比化合物 **7**, 其对 LSD1 的抑制活性 ($IC_{50}=0.084 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 增强, 而其他生物测试结果均与化合物 **7** 类似。化合物 **8** 的各项生物评价数据都为其进入临床前研究提供了一定依据。



2.1.2 基于晶体叠合进行的结构修饰 2009 年, Ueda 等^[18] 将 TCP-LSD1 和 *N*-炔丙基赖氨酸肽-LSD1 晶

体^[19] 进行了叠合, 叠合显示 TCP 苯环与赖氨酸 N 原子重合 (见图 9), 所以考虑用 TCP 代替 *N*-炔丙基赖氨酸肽结构中与之重合的部分, 并以醚键将二者相连, 同时在赖氨酸 N 端引入疏水侧链以增强对 LSD1 的选择性。从而得到 2 个具有细胞活性的 LSD1 选择性抑制剂——化合物 **9** ($IC_{50}=2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 **10** ($IC_{50}=1.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。



注: *N*-炔丙基赖氨酸肽-LSD1 晶体复合物构象表示为湖蓝色, TCP-LSD1 复合物构象表示为皮粉色, 蛋白残基表示为白色

图 9 TCP-LSD1 和 *N*-炔丙基赖氨酸肽-LSD1 晶体叠合图
Figure 9 Superimposed image of TCP-LSD1 and *N*-pro-pargyl lysine peptide-LSD1 crystals

2.1.3 基于分子拼接原理进行的结构修饰 目前有两类去甲基酶被报道, 分别是 LSD 家族和含 JmjC 结构域的去甲基化酶家族。在前列腺癌中 LSD1 和 JmjC 的 JMJD2 亚型与雄激素受体共表达、共定位。但单独 JMJD2 抑制剂不能抑制前列腺癌和结肠癌细胞的生长, 当其与 LSD1 抑制剂 NCL-2 联合使用时则显示出抗增殖作用, 表明 LSD 和 JmjC 抑制具有协同作用, 因此基于分子拼接原理对 LSD 和 JmjC 抑制剂进行结构修饰, 有望获得对二者均有抑制作用的高效抑制剂。2014 年, Rotili 等^[20] 利用分子拼接原理将 LSD1 抑制剂 TCP 与 2 个竞争 JmjC 酶辅因子 α -酮戊二酸的抑制剂 4-羧基-4'-甲酯基-2, 2'-联吡啶 (**11**)^[21]、5-羧基-8-羟基喹啉 (**12**)^[22] 拼

接得到 2 个泛-去甲基酶抑制剂 **13** 和 **14**。活性测试结果显示, 这 2 个化合物对 LSD1 和 JmjC 酶均有较好的抑制活性和特异性: 化合物 **13** 和 **14** 对 LSD1 的 IC_{50} 均低于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 JmjC 的 JMJD2 亚型的 IC_{50} 分别为 2.7 和 $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对其他亚型的 IC_{50} 则分别为 $8.5 \sim 76$ 和 $3.9 \sim 31 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分子模拟推测此类化合物在 LSD1 蛋白和 JmjC 家族蛋白中发挥抑制作用的机制不同, TCP 通过与 FAD 的共价结合来抑制 LSD1 活性, TCP 对 JmjC 的抑制作用则通过喹啉或吡啶部分可逆地结合至其活性位点而实现。

2.1.4 基于筛选实验进行的结构修饰 2013 年, Liang 等^[23]以纯化的 LSD1 蛋白经体内 LSD1 去甲基化实验筛选得到高活性的 TCP 类抑制剂 OG-L002 (**15**, $IC_{50} = 0.02 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。研究报道^[24-25]LSD1 作为一种转录调控复合物的重要组分, 能激活单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV)、人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 的基因表达, 随后经细胞实验证实化合物 **15** 对 LSD1 的活性抑制确实能强烈抑制 HSV 即刻早期基因 (immediate-early genes, IEGs) 表达和体内病毒裂解性感染, 即 LSD1 的活性抑制致使 HSV、HIV 表达受阻, 因此 LSD1 不仅是一种抗肿瘤靶标, 同时可作为一种新型抗病毒靶标。

2.2 TCP 氨基的结构修饰

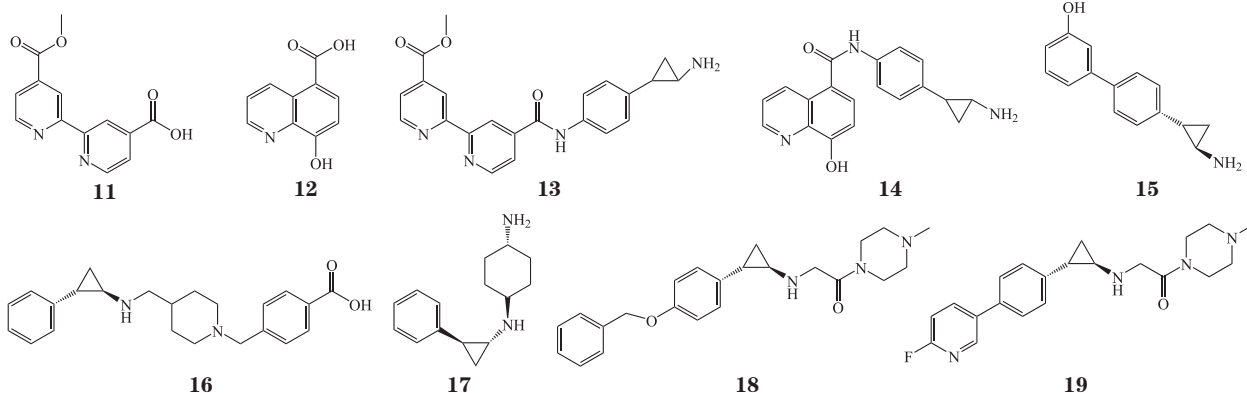
结合上述已报道的抑制剂和相关文章可以发现, 对于 TCP 的结构修饰主要集中于苯环, 而目前进入临床研究且已知结构的 2 个 TCP 类抑制剂均为

氨基被修饰的化合物^[25-26]。TCP 氨基的结构修饰, 通过在氨基位置引入取代基合成新的 TCP 衍生物, 获得了高选择性和高抑制活性的抑制剂, 但是合成方法存在一定难度且收率较低。

2007 年, 葛兰素史克公司经高通量筛选、结构优化得到具有高度选择性和抗肿瘤活性的化合物 GSK2879552 (**16**)^[27-29], 目前作为 LSD1 不可逆抑制剂进入临床试验, 其口服用于治疗复发或难治性小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 和骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS) 的研究分别处于 I 期和 II 期临床阶段^[30]。

Oryzon 公司开发的化合物 ORY-1001 (**17**)^[31-33]于 2013 年获得欧洲药品管理局孤儿药资格, 其对 LSD1 具有高选择性和抑制活性, 是目前已进入临床试验的 LSD1 不可逆抑制剂, 并于 2014 年被罗氏公司收购获得其研发及商业化权利。目前其口服用于治疗急性髓系白血病的研究处于 II 期临床阶段。

2012 年 Neelamegam 等^[34]设计合成了一系列取代氨基的 TCP 衍生物, 经多种实验测试确定了活性最高、选择性最好的 2 个化合物 RN-1 (**18**, $IC_{50} = 0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、RN-7 (**19**, $IC_{50} = 0.003 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。同时作者选用抑制剂 **18** 考察 LSD1 对长期记忆形成的影响, 经实验证实 RN 系列化合物具有良好的血脑屏障渗透作用, 会破坏长期记忆的形成, 但不影响短期记忆, 说明 LSD1 可能对长期记忆的形成起到正调节作用。



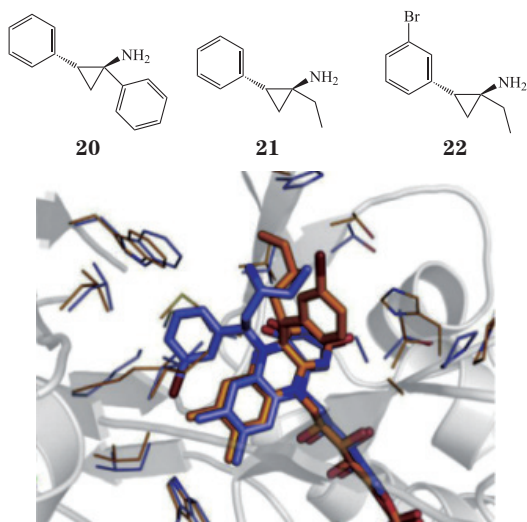
2.3 TCP 环丙基的结构修饰

目前对 TCP 苯环、氨基的结构改造已有相对深入的研究, 对环丙烷部分的修饰却鲜有报道。2014

年 Vianello 等^[13]合成得到了一系列环丙胺 α 位亲水、疏水基取代的 TCP 衍生物, 经测试得到活性最好的化合物 **20** ($IC_{50} = 0.161 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。构效关系

表明: 疏水基团更有利于活性提高, 化合物取代基体积适当增大可以有效提高 LSD1 的抑制活性和特异性。TCP 环丙烷上取代基的变化影响 LSD1 抑制活性及特异性的这一现象为衍生物的结构修饰提供了新思路。

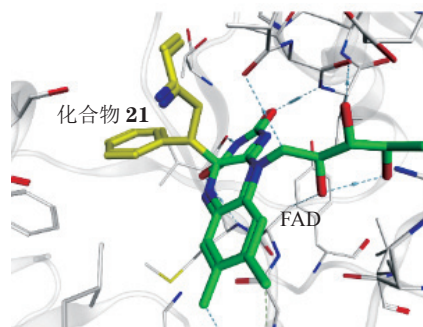
在 TCP 与 LSD1 的加成机制中涉及苄基自由基中间体的生成 (见图 4), 因此自由基的稳定性可能对化合物活性具有一定影响。2015 年 Pieroni 等^[35] 以 Vianello 等^[13] 设计合成的环丙胺 α 位取代的 TCP 化合物为骨架, 在其 α 和 β 位分别引入影响苄基自由基稳定性的吸、供电子基, 以考察对活性的影响。构效关系研究显示: 在 α 位引入乙基取代所得的化合物 **21** 的活性明显提高, 且同时在 β 位苯环间位上引入弱吸电子基的取代也有利于化合物活性增强, 如在化合物 **21** 基础上引入 β -苯环间位 Br 取代, 得到活性最好的化合物 **22** ($IC_{50}=0.031 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。对接结果表明: 化合物 **22** 与 LSD1 的 2 种结合模式 (见图 10) 均异于骨架 **21** (见图 11), 这种结合模式的变化可能更有利于化合物 **22** 与其周围残基的相互作用, 从而导致活性增强。同时化合物 HOMO-LUMO 轨道能量差值 ΔE 计算结果表明化合物 **22** 的 ΔE 最低, 可能更利于环丙烷的开环, 因此活性最佳。



注: 化合物 **22** 与 FAD 的 C4 位结合构象表示为紫色, 化合物 **22** 与 FAD 的 N5 位结合构象表示为棕色, 白色飘带表示 LSD1 蛋白

图 10 化合物 **22**-LSD1 复合物的 2 种构象

Figure 10 Two binding conformations of compound **22**-LSD1



注: 化合物 **21** 表示为黄色, FAD 表示为绿色, 蛋白氨基酸残基表示为白色

图 11 化合物 **21**-LSD1 复合物构象

Figure 11 Complex conformation of compound **21**-LSD1

3 结语

LSD1 作为一种新型抗肿瘤靶点, 其抑制剂的研发开发成为热点, 主要涉及三大类: 1) 基于底物的可逆性抑制剂; 2) 基于 FAD 的可逆性抑制剂; 3) 不可逆抑制剂。目前为止, TCP 类不可逆性抑制剂是研究最深入、最全面的一类, 以 TCP 为母体的结构改造得到了广泛研究。虽然 TCP 类抑制剂在多种癌症模型中表现良好, 但是其缺乏 LSD1 特异性, 会引发化合物脱靶效应, 降低 LSD1 抑制效果的同时影响体内其他同源酶, 引发副作用, 因此有很多课题组致力于研发基于 TCP 的高选择性抑制剂。

本文针对已发表的复合物晶体结构、抑制机制以及 TCP 类抑制剂的研究加以归纳总结。笔者发现 TCP 类抑制剂的苯环、氨基以及环丙基等基团均可进行结构修饰, 结构改造的多样化也说明了 TCP 类抑制剂具有较大的改造空间。目前在对 TCP 的结构改造上, 针对苯环进行改造的研究较多, 通过改造苯环引入疏水基团、与周围疏水残基相互作用来提高抑制剂活性, 或者引入大基团增加选择性, 可为后续进一步改造 LSD1 抑制剂提供指导。另外, 基于氨基和环丙基基团进行结构修饰的报道相对较少, 但已报道的结构也都表现出较好的抑制效果, 且目前进入临床研究的 2 个 TCP 类抑制剂均为氨基被修饰的化合物, 进一步证实了氨基修饰的可行性, 但这 2 处结构修饰可能存在一定合成难度、稳定性较差以及收率较低等问题, 这些问题也是 TCP 类抑制剂改造的难点所在。目前关于 TCP 类抑制剂的改造

大多局限于某一基团, 后续的结构设计可以考虑将 3 处结构修饰相结合, 最终获得的化合物对 LSD1 的抑制效果和生物活性可能表现更佳。

以上这些研究可以为这类抑制剂的进一步设计、优化提供重要指导作用, 相信随着对 LSD1 研究的不断深入, 将会有更多安全、有效的 LSD1 抑制剂得到开发。目前有 2 个 TCP 类不可逆抑制剂

GSK2879552 和 ORY-1001 已处于临床研究阶段, 并有数个化合物正进行临床前开发研究, 显示了 LSD1 是一个有潜力的靶标, 也表明了 TCP 是优势结构, 具有理想的开发前景, 其多样化的结构改造对 LSD1 靶点的认知以及抑制剂用于药物研发具有重要意义^[36-37]。

【参考文献】

- [1] Shi Y, Lan F, Matson C, *et al.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1[J]. *Cell*, 2004, 119(7): 941-953.
- [2] Shi Y J, Matson C, Lan F, *et al.* Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors[J]. *Mol Cell*, 2005, 19(6): 857-864.
- [3] Ooi SKT, Qiu C, Bernstein E, *et al.* DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to *de novo* methylation of DNA[J]. *Nature*, 2007, 448(7154): 714-717.
- [4] Kontaki H, Talianidis I. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death[J]. *Mol Cell*, 2010, 39(1): 152-160.
- [5] Yang J, Huang J, Dasgupta M, *et al.* Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50): 21499-21504.
- [6] Hosseini A, Minucci S. A comprehensive review of lysine-specific demethylase 1 and its roles in cancer[J]. *Epigenomics*, 2017, 9(8): 1123-1142.
- [7] Yang G J, Lei P M, Wong S Y, *et al.* Pharmacological inhibition of LSD1 for cancer treatment[J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 1420-3049
- [8] 吴丽明, 邹芳霞, 席佳越, 等. 组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶 1 抑制剂的研究进展 [J]. *药学进展*, 2016, 40(7): 518-526.
- [9] Lee M G, Wynder C, Schmidt D M, *et al.* Histone H3 lysine 4-demethylation is a target of nonselective antidepressive medications[J]. *Chem Biol*, 2006, 13(6): 563-567.
- [10] Schmidt D M Z, McCafferty D G. *trans*-2-Phenylcyclopropylamine is a mechanism-based inactivator of the histone demethylase LSD1[J]. *Biochem*, 2007, 46(14): 4408-4416.
- [11] Yang M J, Culhane J C, Szewczuk L M, *et al.* Structural basis for the inhibition of the LSD1 histone demethylase by the antidepressant *trans*-2-phenylcyclopropylamine[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(27): 8058-8065.
- [12] Mimasu S, Sengoku T, Fukuzawa S, *et al.* Crystal structure of histone demethylase LSD1 and tranlycypromine at 2.25 angstrom[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(1): 15-22.
- [13] Vianello P, Botrugno O A, Cappa A, *et al.* Synthesis, biological activity and mechanistic insights of 1-substituted cyclopropylamine derivatives: a novel class of irreversible inhibitors of histone demethylase KDM1A[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2014, 86: 352-363[2019-04-11]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523414008034>. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.068>.
- [14] Mimasu S, Umezawa N, Sato S, *et al.* Structurally designed *trans*-2-phenylcyclopropylamine derivatives potently inhibit histone demethylase LSD1/KDM1[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(30): 6494-6503.
- [15] Binda C, Valente S, Romanenghi M, *et al.* Biochemical, structural, and biological evaluation of tranlycypromine derivatives as inhibitors of histone demethylases LSD1 and LSD2[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(19): 6827-6833.
- [16] Valente S, Rodriguez V, Mercurio C, *et al.* Pure enantiomers of benzoylamino-tranlycypromine: LSD1 inhibition, gene modulation in human leukemia cells and effects on clonogenic potential of murine promyelocytic blasts[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2015, 94: 163-174[2018-10-11]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523415001567>. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.060>.
- [17] Vianello P, Botrugno O A, Cappa A, *et al.* Discovery of a novel

- inhibitor of histone lysine-specific demethylase 1A (KDM1A/ LSD1) as orally active antitumor agent[J]. *J Med Chem*, 2015, 59(4): 1501-1517.
- [18] Ueda R, Suzuki T, Mino K, *et al.* Identification of cell-active lysine specific demethylase 1-selective inhibitors[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(48): 17536-17537.
- [19] Yang M J, Culhane J C, Szewczuk L M, *et al.* Structural basis of histone demethylation by LSD1 revealed by suicide inactivation[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(6): 535-539.
- [20] Rotili D, Tomassi S, Conte M, *et al.* Pan-histone demethylase inhibitors simultaneously targeting Jumoni C and lysine-specific demethylases display high anticancer activities[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(1): 42-55.
- [21] Rose N R, Ng S S, Mecinovic J, *et al.* Inhibitor scaffolds for 2-oxoglutarate-dependent histone lysine demethylases[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(22): 7053-7056.
- [22] Hopkinson R J, Tumber A, Yapp C, *et al.* 5-Carboxy-8-hydroxyquinoline is a broad spectrum 2-oxoglutarate oxygenase inhibitor which causes iron translocation[J]. *Chem Sci*, 2013, 4(8): 3110-3117.
- [23] Liang Y, Quenelle D, Vogel J L, *et al.* A novel selective LSD1/ KDM1A inhibitor epigenetically blocks herpes simplex virus lytic replication and reactivation from latency[J/OL]. *mBio*, 2013, 4(1): e00558-12[2019-04-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3565832/>. DOI: 10.1128/mBio.00558-12.
- [24] Sakane N, Kwon H S, Pagans S, *et al.* Activation of HIV transcription by the viral tat protein requires a demethylation step mediated by lysine-specific demethylase 1 (LSD1/ KDM1)[J/OL]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(8): e1002184[2019-04-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876670/>. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002184.
- [25] Zheng Y C, Yu B, Chen Z S, *et al.* TCPs: privileged scaffolds for identifying potent LSD1 inhibitors for cancer therapy[J]. *Epigenomics*, 2016, 8(5): 651-666.
- [26] Fu X, Zhang P, Yu B. Advances toward LSD1 inhibitors for cancer therapy[J]. *Future Med Chem*, 2017, 9(11): 1227-1242.
- [27] Liang Y, Vogel J L, Narayanan A, *et al.* Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks alpha-herpesvirus lytic replication and reactivation from latency[J]. *Nat Med*, 2009, 15(11): 1312-1317.
- [28] Guibourt N, Munoz A O, Laria J C P. Phenylcyclopropylamine derivatives and their medical use: US8993808[P]. 2015-03-31.
- [29] Maes T, Mascaró C, Tirapu I, *et al.* ORY-1001, a potent and selective covalent KDM1A inhibitor, for the treatment of acute leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(3):495-511.
- [30] Mohammad H P, Smitheman K N, Kamat C D, *et al.* A DNA hypomethylation signature predicts antitumor activity of LSD1 inhibitors in SCLC[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(1): 57-69.
- [31] Glaxo Smith Kline. Investigation of GSK2879552 in subjects with relapsed/refractory small cell lung carcinoma[EB/OL]. (2018-04-05) [2018-11-05]. <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT02034123>.
- [32] Glaxo Smith Kline. A phase I dose escalation study of GSK2879552 in subjects with acute myeloid leukemia (AML) [EB/OL]. (2018-10-15) [2018-11-06]. <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT02177812>.
- [33] Glaxo Smith Kline. Investigation of GSK2879552 in subjects with relapsed/refractory small cell lung carcinoma[EB/OL]. [2016-01-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT02034123>.
- [34] Neelamegam R, Ricq E L, Malvaez M, *et al.* Brain-penetrant LSD1 inhibitors can block memory consolidation[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2012, 3(2): 120-128.
- [35] Pieroni M, Annunziato G, Azzali E, *et al.* Further insights into the SAR of alpha-substituted cyclopropylamine derivatives as inhibitors of histone demethylase KDM1A[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2015, 92: 377-386[2018-12-11]. <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.12.032.
- [36] 林森栋. 1, 1a, 6, 6a-四氢环丙并 [a] 茛-1-胺类 LSD1 抑制剂的合成与构效关系研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2018.
- [37] Mould D P, McGonagle A E, Wiseman D H, *et al.* Reversible inhibitors of LSD1 as therapeutic agents in acute myeloid leukemia: clinical significance and progress to date[J]. *Med Res Rev*, 2015, 35(3): 586-618.