

# 靶向特定氨基酸的共价抑制剂研究进展

王傲雪, 裴俊平, 王贯\*, 欧阳亮\*\*

(四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 共价抑制剂通过共价键与靶蛋白结合并对其产生抑制作用。虽然在很长一段时间内因为潜在的脱靶可能性使研究者们望而却步, 但随着近年来对共价抑制剂作用机制、亲电弹头与亲核氨基酸性质的深入研究与探索以及有效开发策略的提出与改进, 众多共价抑制剂成功上市。其在疾病治疗中的优势也逐渐显现, 这使得共价抑制剂成为药物研发的热点。通过对共价抑制剂的结合机制、研究进展、开发策略、优势与挑战进行综述, 并对其发展前景与方向进行讨论, 以期新型共价抑制剂的开发提供参考。

**[关键词]** 共价抑制剂; 亲电试剂; 靶向亲核氨基酸残基

**[中图分类号]** R914

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1001-5094 (2022) 01-0033-14

## Research Progress of Covalent Inhibitor Targeting Specific Amino Acid

WANG Aoxue, PEI Junping, WANG Guan, OUYANG Liang

(State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** Covalent inhibitors bind to target proteins through covalent bonds, and further inhibit them. Researchers have been discouraged by covalent inhibitors because of their potential long-term off-target effect. However, with the in-depth study and exploration of the mechanism of covalent inhibitors, the character of electrophilic warhead and nucleophilic amino acids as well as the implementation and improvement of effective development strategies in recent years, many covalent inhibitors have been successfully approved. Their advantages in the treatment of diseases have gradually emerged, making covalent inhibitors a hot spot in drug development. This review focuses on the binding mechanism, research progress, development strategies, advantages and challenges of covalent inhibitors, and discusses their development prospect and direction, in the hope of providing some reference for the development of novel covalent inhibitors.

**[Key words]** covalent inhibitor; electrophilic reagent; targeting nucleophilic amino acid residue

共价抑制剂是通过共价键与靶蛋白氨基酸残基产生更牢固的结合作用, 从而更好地发挥靶蛋白抑制活性的一类小分子化合物。传统的抑制剂通过氢键与范德华力等非共价相互作用实现对靶蛋白的结合与抑制, 较小的作用强度往往使得此类药物具有较低的选择性与抑制能力。考虑到共价键的强度远高于非共价相互作用, 共价抑制剂显然具有更强的抑制潜力。并且与非共价抑制剂相比, 共价结合的药物不符合标准平衡动力学, 药物被排出体外后仍

能保持抑制效果, 这意味着系统的药物暴露和非靶药物结合减少, 从而使得毒性降低<sup>[1]</sup>。然而, 共价抑制剂的脱靶效应以及对蛋白质的非特异性修饰等现象仍然是研究人员担忧的问题, 因此, 长期以来很少有药物被有意设计为共价抑制剂。

尽管如此, 仍有许多小分子共价抑制剂上市。最早的共价抑制剂可以追溯到阿司匹林。早在 19 世纪初, 其已经被用来治疗疼痛和发热, 而直到 20 世纪 70 年代经研究才发现阿司匹林以与丝氨酸残基共价结合的方式不可逆抑制乙酰化环氧合酶<sup>[2]</sup>。英国医生于 20 世纪偶然发现的抗生素青霉素也是共价抑制剂, 其通过  $\beta$ -内酰胺环不可逆地与青霉素结合蛋白的丝氨酸残基形成共价键, 阻止细胞壁合成<sup>[3]</sup>。阿法替尼被美国 FDA 批准用于治疗相应转移性非小细胞肺癌, 其能够不可逆地与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的半胱氨酸形成共价键<sup>[4]</sup>。硼替佐米通过硼化作用可逆地

**接受日期:** 2021-09-24

**项目资助:** 国家自然科学基金项目 (No. 81922064,

No. 22177083, No. 81874290)

**\* 通信作者:** 王贯, 副研究员;

**研究方向:** 药物化学与化学生物学;

**Tel:** 028-85503817; **E-mail:** guan8079@153.com

**\*\* 通信作者:** 欧阳亮, 研究员;

**研究方向:** 药物化学与药物发现的化学生物学;

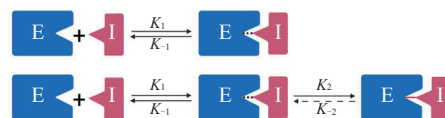
**Tel:** 028-85503817; **E-mail:** ouyangliang@scu.edu.cn

与 26S 蛋白酶体活性位点的  $\beta 5$  与  $\beta 5i$  亚基中的苏氨酸共价结合, 并于 2003 年被美国 FDA 批准用于治疗复发或难治性骨髓瘤<sup>[5]</sup>。这些药物都是医药界不可或缺的重要组成部分。对共价抑制剂的研究, 证明了其具有降低给药浓度、延长有效治疗时间、减少耐药性、增加不可成药靶点的开发可能性等明确优势<sup>[6-8]</sup>。随着人们对共价抑制剂机制的研究以及对亲电弹头与亲核氨基酸的探索, 越来越多的共价抑制剂得到开发。根据文献调研, 已有至少 50 种共价抑制剂获批上市用于治疗各类疾病<sup>[9]</sup>。本文将重点介绍已经被美国 FDA 批准上市或进入临床的共价抑制剂以及具有临床应用潜力的共价抑制剂的研究近况, 以期新型共价抑制剂的开发提供依据与线索。

## 1 共价抑制剂的作用机制

共价抑制剂通常具有导引头和弹头 2 个结构, 其通过 2 个相关却不连续的步骤完成与靶蛋白的共价结合: 1) 小分子配体会通过导引头与靶蛋白特定的结合口袋可逆地发生非共价相互作用, 形成中间体  $E \cdot I$ ; 2) 中间体复合物中小分子配体的亲电弹头会与靶蛋白的亲核氨基酸残基通过加成、取代、氧化等反应发生共价相互作用, 生成共价复合物  $E-I$ , 这一步反应通常比第 1 步慢。根据第 2 步反应是否可逆, 可将共价抑制剂分为不可逆共价抑制剂和可逆共价抑制剂, 其作用模式如图 1 所示。在第 2 步中,  $K_2$ ,  $K_{-2}$  分别代表生成速率常数与解离速率

常数。当  $K_{-2}$  不等于 0 时, 该化合物为可逆共价抑制剂; 当  $K_{-2}$  等于或趋近于 0 时, 该化合物为不可逆共价抑制剂<sup>[1,10-12]</sup>。



E: 含有亲核氨基酸残基的靶蛋白; I: 共价抑制剂;  $K_1$ : 生成速率常数;  $K_{-1}$ : 解离速率常数;  $K_2$ : 生成速率常数;  $K_{-2}$ : 解离速率常数

图 1 共价抑制剂与靶蛋白相互作用机制

Figure 1 Mechanism of the interaction between covalent inhibitor and target protein

不可逆共价抑制剂包含的亲电弹头有丙烯酰胺、 $\alpha$ -卤酮、环氧化物、氮丙环、乙烯基砜、活化乙炔等, 大多用于激酶类抑制剂的设计。只有在机体形成新的蛋白或原蛋白复合物降解时才能解除此类化合物的抑制作用, 这也使得不可逆共价抑制剂能够产生持久又强大的效力, 从而降低服用剂量与次数, 提高患者的依从性。

可逆共价抑制剂包含的亲电弹头通常有醛类、活化酮类、 $\alpha$ -酮基酰胺类、腈类和硼酸衍生物等, 多用于蛋白酶体、丝氨酸水解酶、组织蛋白酶等靶标的可逆共价抑制剂的设计。这类抑制剂与靶标产生可逆的共价结合, 药动学性质在不可逆抑制剂与非共价抑制剂之间, 使其不仅兼备了不可逆抑制剂的优点, 也减少了因脱靶效应导致的潜在风险。常见靶向特定氨基酸的共价基团分类如表 1 所示。

表 1 靶向特定氨基酸的共价基团分类

Table 1 Classification of covalent groups targeting specific amino acids

| 靶向氨基酸 | 共价基团 |
|-------|------|
| 半胱氨酸  |      |
| 甲硫氨酸  |      |
| 赖氨酸   |      |
| 组氨酸   |      |
| 丝氨酸   |      |
| 苏氨酸   |      |
| 酪氨酸   |      |

## 2 靶向亲核基团含硫元素氨基酸的共价抑制剂

### 2.1 靶向半胱氨酸的共价抑制剂

半胱氨酸 (cysteine, Cys) 的硫醇基团亲核性并不高, 而当其侧链中的硫醇基团以巯基形式存在时, 亲核能力会大大提升, 并使其一跃成为 20 种常见氨基酸亲核性之首, 这也使得半胱氨酸成为最为普遍靶向的共价氨基酸残基<sup>[13-14]</sup>。强亲核能力意味着弱亲电弹头的小分子同样能够作为共价抑制剂被开发, 降低了脱靶的风险。目前靶向半胱氨酸的抑制剂有 EGFR、布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK)、成纤维细胞生长因子受体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR)、Kirsten 肉瘤病毒致癌基因同源物 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、核输出蛋白 1 (exportin 1, XPO1)、p90 核糖体 S6 激酶 (p90 ribosomal S6 kinase, RKS)、含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLR family pyrin domain containing protein 3, NLRP3)、中心体相关激酶 2 (NIMA related kinase 2, NEK2)、Janus 激酶 3 (Janus kinase 3, JAK3) 抑制剂等<sup>[11, 15-22]</sup>, 本文将选取其中部分经典共价抑制剂进行介绍。

**2.1.1 表皮生长因子受体共价抑制剂** EGFR 是多种癌症的关键治疗靶点, 研究人员致力于开发 EGFR 抑制剂或双靶抑制剂进行相关疾病的治疗<sup>[23-24]</sup>。但其激酶结构域经常发生突变而对多种 EGFR 抑制剂产生耐药。共价 EGFR 抑制剂能够很好地降低耐药可能性, 且目前已有许多策略被用于减少其脱靶的风险。

**2.1.1.1 不可逆共价抑制剂** 这类 EGFR 共价抑制剂通常将迈克尔受体基团作为亲电弹头, 其中心杂环支架的 N 原子能够与 EGFR 形成氢键, 增加小分子的停留时间。阿法替尼 (afatinib, **1**) 是首个上市的第 2 代 EGFR 共价抑制剂, 被 FDA 批准用于治疗 EGFR 19 外显子缺失或 21 外显子 (L858R) 突变的转移性非小细胞肺癌<sup>[4]</sup>。阿法替尼的迈克尔受体基团为丙烯酰胺基团, 其与靶蛋白结构中的氨基酸残基 Cys797 通过 1, 4 共轭加成反应形成共价键 (见图 2)。临床前数据表明, 阿法替尼对

EGFR<sup>L858R/T790M</sup> 突变体激酶的 IC<sub>50</sub> 为 10 nmol·L<sup>-1</sup>, 约为非共价抑制剂吉非替尼抑制效力的 100 倍, 并在 EGFR<sup>L858R/T790M</sup> 突变体以及 19 外显子缺失的小鼠模型中能显著抑制肿瘤生长<sup>[15]</sup>。这主要归因于共价抑制剂效率的提高和共价复合物形成的持久性, 因为突变能够增强 EGFR 对腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 的亲合力而导致非共价抑制剂耐药, 而共价键的形成能够降低 EGFR 对 ATP 浓度的敏感性。作为第 3 代 EGFR 抑制剂, 奥希替尼 (osimertinib, **2**) 于 2015 年被美国 FDA 批准治疗转移性 EGFR<sup>T790M</sup> 突变阳性的非小细胞肺癌<sup>[25]</sup>。研究表明, 奥希替尼对 L858R/T790M EGFR 突变体激酶的 IC<sub>50</sub> 为 1 nmol·L<sup>-1</sup>, 抑制效力约为野生型的 200 倍。奥希替尼显著下调多种肿瘤细胞中的 EGFR 磷酸化水平并在相应小鼠模型中抑制肿瘤的生长。其结构中的丙烯酰胺亲电靶头指向 Cys797 并与其共价结合, 以此发挥强效治疗作用<sup>[26]</sup>。然而临床数据显示, 许多 EGFR<sup>T790M</sup> 突变的患者会在治疗中产生 C797S 突变, 诱导奥希替尼耐药性的产生<sup>[27]</sup>。

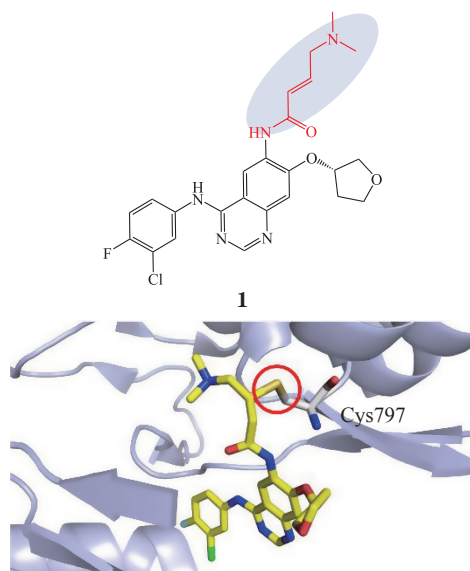


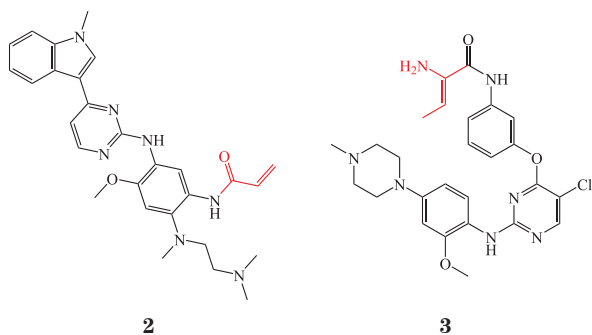
图 2 化合物 **1** 与表皮生长因子受体的共晶结构 (PDB ID: 4G5P)

Figure 2 Co-crystal structure of compound **1** with EGFR (PDB ID: 4G5P)

**2.1.1.2 可逆共价抑制** 目前仍未有可逆 EGFR 共价抑制剂上市, 但已有许多抑制剂对突变 EGFR



具有高度选择性及良好的抑制能力, 如化合物 **3**, 其能够与 EGFR 中的氨基酸残基 Cys797 共价结合, 并具有更高的选择性, 对 EGFR<sup>L858R</sup> 的  $IC_{50}$  为  $0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对 EGFR<sup>L858R/T790M</sup> 的  $IC_{50}$  为  $0.037 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  [25,28]。

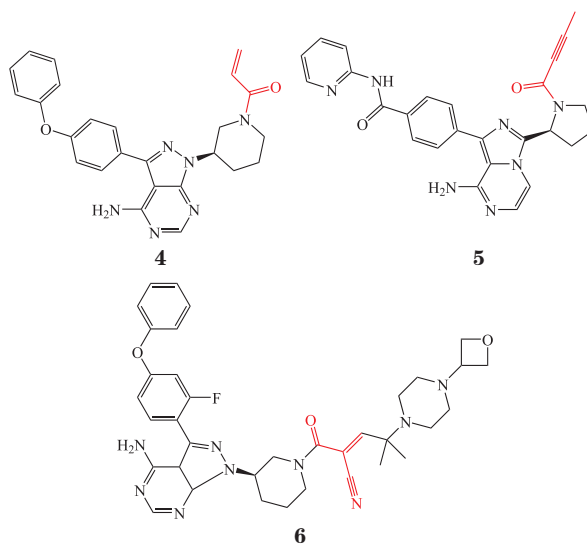


**2.1.2 布鲁顿酪氨酸激酶共价抑制剂** BTK 能够影响 B 淋巴细胞的发育和功能, 是血液系统恶性肿瘤的关键靶点, 并能够导致自身免疫性疾病的发生。近年来科研人员已经开发了大量小分子 BTK 共价抑制剂以及蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimera, PROTAC), 为相关疾病的治疗提供了新的策略 [16,29-32]。

**2.1.2.1 不可逆共价抑制剂** 2013 年, 伊布替尼 (ibrutinib, **4**) 被批准治疗 B 淋巴细胞恶性肿瘤。其对 BTK 具有较高选择性, 并对 BTK 有着较高的抑制效力 ( $IC_{50}=0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 临床前数据表明其在自身免疫性疾病和 B 淋巴细胞恶性肿瘤动物模型中十分有效 [29]。伊布替尼中的丙烯酰胺弹头与 BTK 蛋白 ATP 结合域中的氨基酸残基 Cys481 发生共价结合, 发挥对 BTK 的抑制作用, 然而该抑制剂能够以时间依赖的方式与非靶标蛋白发生反应。并且由于不能与丝氨酸的羟基形成共价键, 伊布替尼对 BTK C481S 突变的抑制效力大大下降 ( $IC_{50}=1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。作为第 2 代 BTK 抑制剂, 阿卡替尼 (acalabrutinib, **5**) 于 2017 年被美国 FDA 批准上市, 其对 BTK 具有更高的选择性、更强的抑制能力和更小的副作用。其同样靶向 BTK 的 Cys481, 对 BTK 的  $IC_{50}$  为  $3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 在人全血 CD69 B 淋巴细胞活化试验中, 其  $EC_{50}$  为  $8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  [30,33]。

**2.1.2.2 可逆共价抑制剂** 由于伊布替尼带来的非靶效应相关的毒性作用, FDA 并未批准其治疗自身免疫性疾病, 因此, 研究人员深入研究了 BTK 可

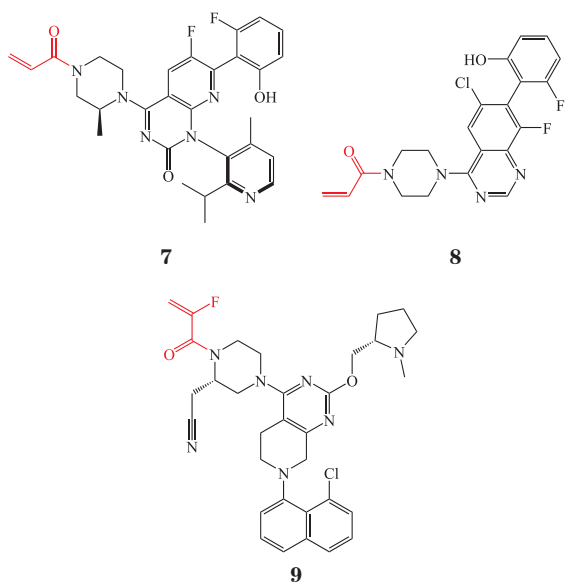
逆共价抑制剂, 以期对相关疾病的治疗做出贡献。2017 年, PRN1008 (**6**) 用于健康志愿者的 I 期临床试验表明, 该药具有较高的安全性与良好的耐受性 [34]。研究结果显示, PRN1008 在外周血单核细胞中缓慢持续结合 BTK 蛋白, 而不形成永久性共价键。PRN1008 对 BTK 有较高抑制能力 ( $IC_{50}=1.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 对人 B 淋巴细胞瘤细胞的  $IC_{50}$  为  $7.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  [35]。PRN1008 在临床前药效学研究中表现出逆时针滞后的现象, 能够减少药物的长期体循环, 从而降低潜在的脱靶副作用。



**2.1.3 KRAS 共价抑制剂** KRAS 是原癌基因 RAS 中突变频率最高的亚型, 多年来一直被认为是一个不可成药的靶标。KRAS<sup>G12C</sup> 是最常见的一种突变体, 半胱氨酸的存在使得突变 KRAS 的选择性共价靶向成为可能 [17,36-38]。

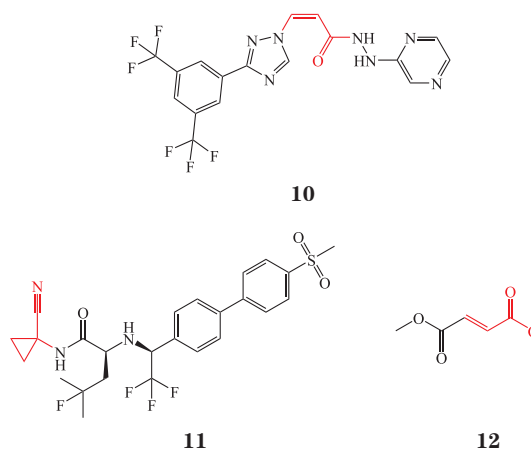
2018 年, 美国安进公司通过基于具有半胱氨酸反应功能的片段筛选与结构设计开发得到高效、高选择性、耐受性良好的共价抑制剂 AMG510 (**7**), 这是 FDA 批准的首个 KRAS<sup>G12C</sup> 不可逆共价抑制剂。临床前研究表明, AMG510 对 MIA PaCa-2 细胞中的细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 的  $IC_{50}$  为  $68 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对 MIA PaCa-2 细胞也具有显著的抑制增殖作用,  $IC_{50}$  为  $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 KRAS<sup>G12C</sup> 突变肿瘤模型中, 发现其能够持续抑制 MAPK 信号通路。当经口给药剂量大于  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 观察到小鼠体内 ERK 磷酸化被显著抑制。在长

达 24 d 的治疗时间里, AMG510 显著持续抑制小鼠肿瘤的生长。尽管 AMG510 半衰期相对较短, 但由于 KRAS 蛋白半衰期长达 22 h, AMG510 的快速共价灭活也能够产生持久的药理学效应<sup>[39]</sup>。除此之外, 威尔斯普林公司与米拉提治疗公司开发的 ARS-1620 (**8**) 及 MRTX849 (**9**) 同样也进入 I 期临床试验<sup>[38,40]</sup>。礼来公司研发的 LY3537982 在临床前研究中显示出极佳的抗肿瘤活性, 对具有 KRAS<sup>G12C</sup> 突变的 H23 肺癌细胞系展现出较高的抑制效力 ( $IC_{50} = 1.04 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 并能诱导异种移植模型中肿瘤的完全消退。



**2.1.4 其他靶点的共价抑制剂** XPO1 对维持细胞内稳态十分重要, 在许多肿瘤细胞中都观察到 XPO1 的过表达, 并与包括血液恶性肿瘤在内的多种肿瘤的发生发展相关联。目前已经有许多选择性 XPO1 抑制剂得到开发, 但仅有抑制剂 selinexor (**10**) 通过临床试验, 并于 2019 年被美国 FDA 批准与地塞米松联用治疗患有复发或难治性多发性骨髓瘤的成年患者<sup>[41]</sup>。Selinexor 能够选择性靶向 XPO1, 并与 XPO1 的氨基酸残基 Cys528 发生缓慢可逆的共价结合<sup>[42]</sup>。目前针对骨质疏松已有许多药物上市, 组织蛋白酶 K (Cathepsin K, Cat K) 是治疗骨质疏松的关键靶点, 其可逆性共价抑制剂奥当卡替 (odanacatib, **11**) 正在进行临床研究, 用以减少老年妇女的骨折发生<sup>[14,43]</sup>。其结构中的脞基与 Cat K

活性口袋中半胱氨酸的共价结合是可逆的, 这可能降低其在人体内的潜在副作用。富马酸二甲酯 (**12**) 早已被应用于治疗银屑病和多发性硬化病。2018 年, Andersen 等<sup>[18]</sup> 发现其能够作为迈克尔受体与核糖体 S6 激酶 2 (ribosomal S6 kinase 2, RSK2) 中的 Cys599 共价结合, 这使得其能够高效抑制 RSK/有丝分裂原和应激活化型蛋白激酶 (mitogen-and stress-activated protein kinase, MSK)。



## 2.2 靶向甲硫氨酸的共价抑制剂

甲硫氨酸 (methionine, Met) 在脊椎动物中十分稀有, 其同样含有硫原子, 但其硫醚基团仅具有中等亲核能力, 且甲硫氨酸因其疏水性通常并不存在于蛋白表面, 这也使得靶向甲硫氨酸的共价抑制剂开发并不常见。

溴结构域蛋白 4 (bromodomain-containing protein 4, BRD4) 是一种关键的表观遗传调控因子, 能够影响细胞增殖、迁移与周期等, 这也使得其表达失调与多种肿瘤的发生发展密切相关。2018 年, Kharenko 等<sup>[44]</sup> 开发出了一系列选择性 BRD4 共价抑制剂, 如化合物 **13**, 其能够选择性地与 BRD4 的 Met149 形成不可逆共价键 (见图 3), 其  $IC_{50}$  为  $0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 并在 MV4-11 细胞中表现出比可逆抑制剂更加持久的抗肿瘤细胞增殖的能力。

## 3 靶向亲核基团含氮元素氨基酸的共价抑制剂

### 3.1 靶向赖氨酸的共价抑制剂

与半胱氨酸相比, 赖氨酸 (lysine, Lys) 的丰度更高, 其残基中的伯胺带有潜在亲核性, 能够与

一些带有亲电弹头的小分子抑制剂发生不可逆共价结合作用。然而, 在生理条件下, 氨基往往以质子化形式存在, 这为靶向赖氨酸的共价抑制剂开发带来了挑战。为了成功靶向赖氨酸残基, 其解离常数需产生变化从而使其在生理环境下保持中性, 这意味着靶蛋白的赖氨酸残基需在生理环境中被干扰, 或与配体结合时被干扰<sup>[13]</sup>。

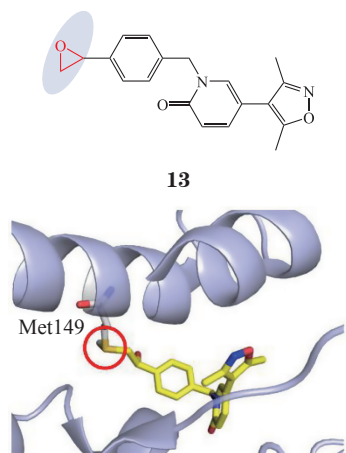
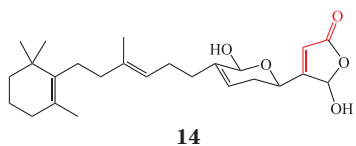


图3 化合物 13 与溴结构域蛋白 4 的共晶结构 (PDB ID: 6CZU)

Figure 3 Co-crystal structure of compound 13 with BRD4 (PDB ID: 6CZU)

**3.1.1 磷脂酶 A2 共价抑制剂** 首个靶向赖氨酸残基的共价抑制剂为 1977 年从帕劳的变异丝瓜菌中分离得到的天然二倍半类萜烯抗生素曼诺力得 (manoalide, 14)。其被认为能够与磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 中的氨基酸残基 Lys6 和 Lys79 发生不可逆共价结合, 并在体外表现出对金黄色葡萄球菌显著的增殖抑制作用,  $IC_{50}$  为  $2\sim 4\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[45]</sup>。



**3.1.2 磷脂酰肌醇-3 激酶共价抑制剂** 1957 年首次分离得到的甾体类天然产物曼晏青霉素 (wortmannin, 15) 是磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 的高效不可逆抑制剂<sup>[46]</sup>。化合物 15 通过氮杂迈克尔加成与配体咪唑环的开环对 PI3K 活性位点的 Lys833 进行共价修饰 (见图 4),

对 PI3K 的  $IC_{50}$  为  $2\sim 4\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但是其对 PI3K 具有较低的选择性, 并且稳定性不高。为了克服这些问题, 进一步开发得到其开环类似物, 其能够通过乙烯基酰胺转移反应与赖氨酸位点不可逆共价结合, 并已经进入非小细胞癌、去势抵抗性前列腺癌与胶质母细胞瘤的临床试验<sup>[47]</sup>。2018 年, Dalton 等<sup>[48]</sup> 开发了一系列选择性不可逆 PI3K $\delta$  共价抑制剂, 如化合物 16, 其对 PI3K $\delta$  的  $pIC_{50}$  为 4.8。研究表明其能够与 PI3K $\delta$  亚型的 Lys779 反应, 并在浓度低于  $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时对活细胞中的 PI3K $\delta$  具有高度选择性。同年, 提取自沙生盐藻 CNY-486 的化合物 neolymphostin A (17) 作为 PI3K 和雷帕霉素受体蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 双重选择性共价抑制剂得到开发, 其同样也是首个来自细菌的共价激酶抑制剂<sup>[49]</sup>。Neolymphostin A 能够通过结构中的亲电乙烯基酯共价靶向 Lys802, 并以  $3\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度阻断活细胞中的蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 磷酸化。

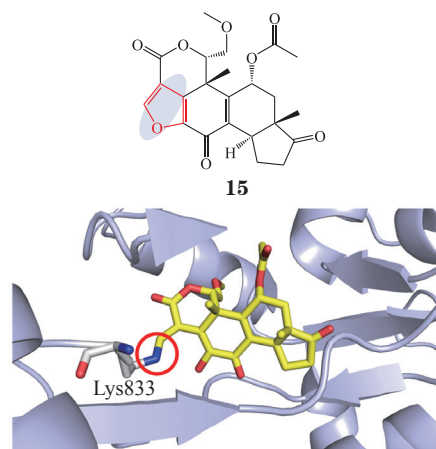
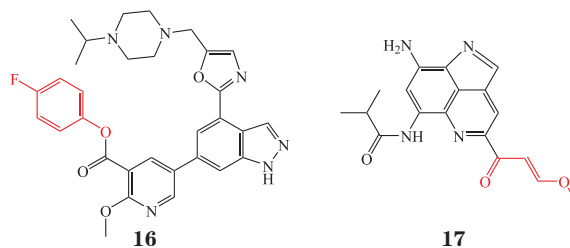


图4 化合物 15 与磷脂酰肌醇-3 激酶的共晶结构 (PDB ID: 1E7U)

Figure 4 Co-crystal structure of compound 15 with PI3K (PDB ID: 1E7U)

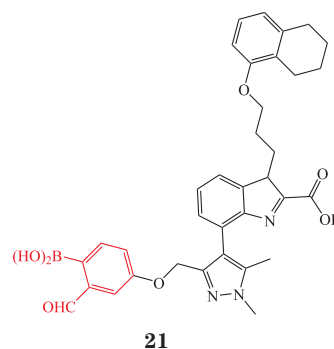
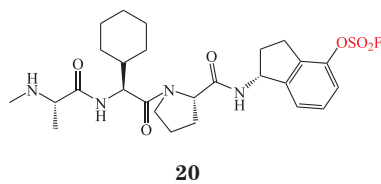
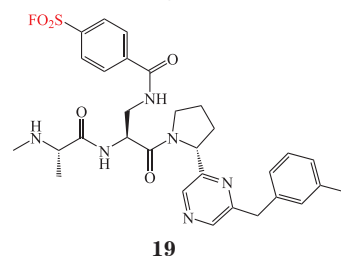
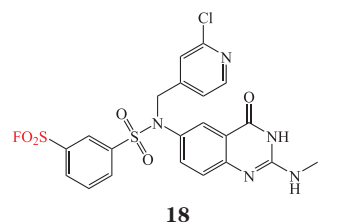


**3.1.3 真核翻译起始因子 4E 共价抑制剂** 真核翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 能够调节依赖性蛋白质翻译的起始阶段, 研究表明, eIF4E 在多种肿瘤中表达水平升高, 并与肿瘤的恶性进展有关。2020 年, Wan 等<sup>[50]</sup> 为了克服现有 eIF4E 抑制剂细胞渗透性低等问题, 利用共价对接的方法开发了首个具有细胞活性的 eIF4E 共价抑制剂。化合物 **18** 能够与 eIF4E 中的 Lys162 发生共价结合。尽管其稳定性不高, 但对赖氨酸残基的高亲和力能够使其尽快完成共价修饰。

**3.1.4 X 连锁凋亡抑制蛋白共价抑制剂** 2018 年, Baggio 等<sup>[51]</sup> 利用热力学方法开发了首个有效靶向赖氨酸的共价 X 连锁凋亡抑制蛋白 (X-linked inhibitor-of-apoptosis protein, XIAP) 抑制剂。其中, 化合物 **19** 能够与杆状病毒 IAP 重复序列 3 (baculovirus IAP repeat 3, BIR3) 结构域中的 Lys311 共价结合, 并对其产生显著的抑制作用 ( $IC_{50} = 16.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。在对 LCL161 耐药的 L363 细胞中, 化合物 **19** 显示出极强的肿瘤细胞抑制能力, 在浓度为  $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  条件下处理 48 h 能够抑制 70% 以上的细胞的生长。在研究中发现化合物 **19** 与 BIR3 结构域的共价结合过程十分缓慢, 为了克服这一问题, Baggio 等<sup>[52]</sup> 于 2019 年开发了新的具有细胞抑制效力的芳基氟硫酸盐类共价抑制剂化合物 **20**。化合物 **20** 能够与 BIR3 结构域中的 Lys297 残基毗邻, 这也使得其在激酶以及细胞层面更容易发生共价反应。化合物 **20** 在 6 h 处理条件下对 XIAP 的  $IC_{50}$  为  $12 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 在水性缓冲溶液中溶解度为  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 并在血浆中能保持稳定 [半衰期 ( $t_{1/2}$ ) > 2 h]。在化合物 **21** 与肿瘤坏死因子  $\alpha$  同时存在的条件下, 能够高度诱导 SK-MEL-28 细胞系与 A549 细胞系的凋亡, 这表明化合物 **20** 与临床候选药物 LCL161 具有相当的细胞药理学特性。

**3.1.5 骨髓细胞白血病蛋白 1 共价抑制剂** 2016 年, Akcay 等<sup>[53]</sup> 首次开发了靶向骨髓细胞白血病蛋白 1 (myeloid cell leukemia 1, Mcl-1) 的可逆共价抑制剂, 其能够通过芳基硼酸羰基弹头共价修饰 Lys234, 并显示出比非共价同源物更强的抑制能力。化合物 **21** 对 Mcl-1 的  $IC_{50}$  为  $3.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其通过对 Mcl-1

的抑制作用在 MOLP-8 细胞中激活半胱天冬酶-3/7 来促进细胞凋亡 ( $EC_{50} = 0.46 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 这比其他非共价抑制剂活性提高了 24 倍以上。2021 年, Gambini 等<sup>[54]</sup> 开发了首个共价靶向 Mcl-1 的 Lys 残基的 BH3 肽, 该肽对 hMcl-1 具有显著的亲和力和选择性。

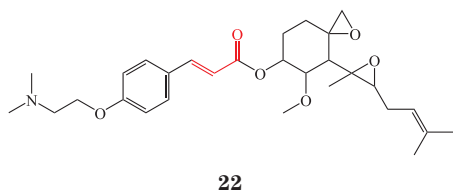


### 3.2 靶向组氨酸的共价抑制剂

组氨酸 (histidine, His) 中的咪唑基团带有亲核性, 其能够与磺酰氟、螺环氧化物、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和酮或醛等发生反应形成共价键。研究证明, 相比于其他亲核试剂, 组氨酸残基能够与亲电性相对较弱的试剂特异性结合, 使得这些试剂具有被开发为共价抑制剂的可能性。尽管如此, 目前对于靶向 His 氨基酸残基的共价抑制剂的开发并不多。



**3.2.1 甲硫氨酸氨基肽酶 2 共价抑制剂** 从烟曲霉中提取得到的天然产物烟曲霉素的类似物 beloranib (**22**) 是甲硫氨酸氨基肽酶 2 (methionine aminopeptidase 2, MetAP2) 的共价抑制剂, 与其结构中阻碍较小的螺环氧化物能够与 MetAP2 活性位点上的 His231 产生共价结合, 尽管化合物 **22** 在治疗癌症方面效果不明显, 但在研究中发现其具有降低体质量的作用, 并且耐受性良好。目前 **22** 已经作为肥胖症治疗的候选药物进入 III 期临床研究, 在临床试验中没有发现与治疗相关的明显副作用<sup>[55-57]</sup>。



## 4 靶向亲核基团含碳和氧元素的氨基酸共价抑制剂

### 4.1 靶向丝氨酸的共价抑制剂

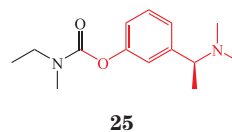
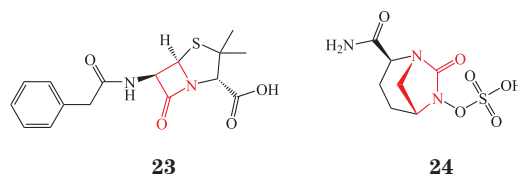
丝氨酸 (serine, Ser) 是蛋白酶和其他水解酶活性位点的关键催化残基, 其侧链上的羟基能够被邻近残基激活, 从而和带有亲电弹头的小分子产生共价结合。

**4.1.1 青霉素结合蛋白共价抑制剂** 1928 年发现的青霉素 (penicillin, **23**) 作为抗生素早已应用于临床治疗多年。研究发现化合物 **23** 的  $\beta$ -内酰胺环能够通过酰化作用共价靶向青霉素结合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 活性位点 Ser36, 通过这种方式青霉素能够抑制细菌合成细胞壁从而发挥对应的抗菌作用<sup>[3]</sup>。

**4.1.2  $\beta$ -内酰胺酶共价抑制剂**  $\beta$ -内酰胺类抗生素在治疗过程中出现了耐药现象, 这是由于细菌能够通过表达  $\beta$ -内酰胺酶使得这类抗生素中的  $\beta$ -内酰胺水解从而失去对细菌的抑制能力。为了克服这种耐药性, 靶向  $\beta$ -内酰胺酶的抑制剂应运而生。阿维巴坦 (avibactam, **24**) 是一种可逆共价抑制剂, 其五元环脲中的羰基能够与靶蛋白活性部位的 Ser 残基产生共价相互作用并使其乙酰化<sup>[58]</sup>。阿维巴坦与头孢噻林的联用在针对革兰阴性菌感染患者的 II 期临床试验中表现出良好的疗效, 并于 2015 年被美国

FDA 批准上市。

**4.1.3 乙酰胆碱酯酶共价抑制剂** 阿尔茨海默病仍是难以攻克的神经退行性疾病, 除抑制  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集外, 靶向乙酰胆碱酯酶 (acetylcholine esterase, AchE) 同样能够对这种疾病进行一定程度的治疗<sup>[59]</sup>。天然产物硬豆碱的类似物卡巴拉汀 (rivastigmine, **25**) 是一种共价靶向 AchE 的抑制剂, 其能够选择性地作用于中枢神经系统中的 AchE<sup>[60]</sup>。卡巴拉汀已经被批准用于阿尔茨海默病的治疗, 其能够通过结构中的酚类氨基甲酸酯酰化 AchE 活性位点的氨基酸残基 Ser203, 抑制时间可达 10 h<sup>[61]</sup>。



**4.1.4 丙型肝炎病毒蛋白酶共价抑制剂** 丙型肝炎病毒蛋白酶 (hepatitis C virus, HCV) 能够诱导丙型肝炎病毒的复制以及病毒复合物的形成, 通过抑制 HCV 能够治疗相关的感染。

2006 年, Perni 等<sup>[62]</sup>开发了特拉匹韦 (telaprevir, **26**) 作为 HCV 的可逆共价抑制剂, 特别是选择性靶向 HCV NS3-4A。在临床前研究中, 化合物 **26** 能够在 1b 型 HCV 复制子细胞中表现出显著的抗病毒活性 ( $IC_{50} = 354 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 并在动物模型中显示良好的药动学特性。化合物 **26** 结构中的  $\alpha$ -酮酰胺弹头通过 1, 2 加成到  $Sp^2$  原子共价靶向 HCV 中的 Ser1139, 并且已经被批准上市。同年, Venkatraman 等<sup>[63]</sup>通过筛选小分子化合物库得到先导化合物, 对其进行结构优化后得到 HCV NS3 选择性抑制剂波普瑞韦 (boceprevir, **27**)。研究发现其具有较高的口服生物利用度, 其结构中的亲电酮酰胺可逆地共价靶向 Ser139, 对人中性粒细胞弹性蛋白酶 (human neutrophil elastase, HNE) /HCV 选择性较高, 并在复制子分析中显示出较高的细胞效力 ( $EC_{90} = 0.35 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。波普瑞韦已于 2011



年被批准上市。那拉匹韦 (narlaprevir, **28**) 同样具有酰胺结构, 其在反应过程中被重排与活性位点的 Ser139 形成可逆共价键 (见图 5)。那拉匹韦抑制复制子 RNA 的  $EC_{90}$  为  $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该药于 2016 年被 FDA 批准上市<sup>[64]</sup>。

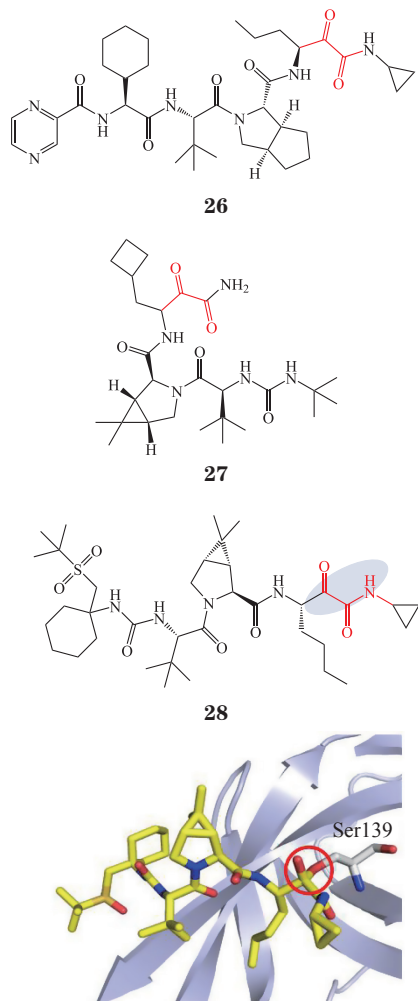


图 5 化合物 **28** 与丙型肝炎病毒 NS3-4a 蛋白酶的共晶结构 (PDB ID: 3LON)

Figure 5 Co-crystal structure of compound **28** with HCV NS3-4a protease (PDB ID: 3LON)

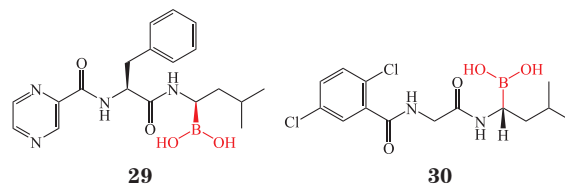
#### 4.2 靶向苏氨酸的共价抑制剂

苏氨酸 (threonine, Thr) 的侧链羟基同样能够被邻近的残基激活从而提高其亲核性, 这也使得其能够作为亲核氨基酸被带有亲电弹头的抑制剂共价靶向。

**4.2.1 蛋白酶体抑制剂** 蛋白酶体是在细胞内降解蛋白质的一类复合物, 在真核生物、古细菌以及某些

放线菌中普遍存在。其能够通过对其蛋白质的降解调控包括基因表达与细胞周期在内的多种细胞进程, 这也使得蛋白酶体的表达水平与许多疾病的发生发展相互关联。由于其活性位点具有亲核 Thr 残基, 设计共价结合 Thr 的抑制剂已经成为了靶向蛋白酶体从而治疗癌症等相关疾病的一种策略。

**4.2.2 可逆共价抑制剂** 2003 年, 硼替佐米 (bortezomib, **29**) 作为首个蛋白酶体共价抑制剂被美国 FDA 批准用于治疗复发或难治性骨髓瘤。作为一种二肽硼酸类化合物, 硼替佐米能够通过硼化作用可逆地与 26S 蛋白酶体活性位点的  $\beta 5$  与  $\beta 5i$  亚基中的苏氨酸共价结合, 通过对蛋白酶体的抑制发挥抗肿瘤活性<sup>[65-66]</sup>。其通过静脉注射或者皮下注射给药。临床前研究表明其对乳腺癌细胞 MCF-7 的  $IC_{90}$  为  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对非小细胞肺癌细胞 H460 的  $IC_{50}$  为  $0.1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 并展现出对骨髓瘤的良好疗效<sup>[5, 67]</sup>。然而, 在长期的治疗过后, 许多患者出现了对硼替佐米的耐药性, 这可能部分由于编码  $\beta 5$  亚基的 *PSMB5* 基因产生了突变。2015 年, 伊沙佐米 (ixazomib, **30**) 作为首个口服蛋白酶体抑制剂被美国 FDA 批准用于至少接受过 1 次既往治疗的多发性骨髓瘤患者的治疗<sup>[68]</sup>。伊沙佐米在血浆中能够水解为硼酸, 可逆地共价靶向 20S 蛋白酶体的  $\beta 5$  亚基, 从而发挥对蛋白酶体的抑制作用。其对 20S 蛋白酶体的  $\beta 5$  亚基的抑制能力较高 ( $IC_{50} = 3.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[69]</sup>。在临床前研究中发现其能够抑制核因子  $\kappa B$  (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa B$ ) 通路, 并诱导多发性骨髓瘤细胞的凋亡。



**4.2.3 不可逆共价抑制剂** 卡非佐米 (carfilzomib, **31**) 于 2012 年被批准通过静脉注射治疗多发性骨髓瘤。研究表明, 作为一种环氧酶素衍生物, 卡非佐米通过结构中的环氧酮与  $\beta 5$  亚基中的 Thr 催化残基发生不可逆的共价相互作用 (见图 6)。在临床前研究中, 卡非佐米体现出对硼替佐米耐药细胞更

强的抑制活性和更长的抑制时间, 并对蛋白酶体具有更高的选择性。其对 20S 蛋白酶体  $\beta 5$  的  $IC_{50}$  为  $3.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在临床试验中, 卡非佐米具有良好的疗效以及耐受性<sup>[70]</sup>。

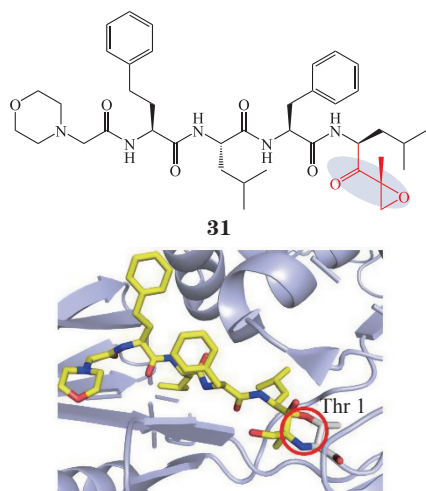


图 6 化合物 31 与 20S 蛋白酶体的共晶结构 (PDB ID: 4R67)

Figure 6 Co-crystal structure of compound 31 with 20S proteasome (PDB ID: 4R67)

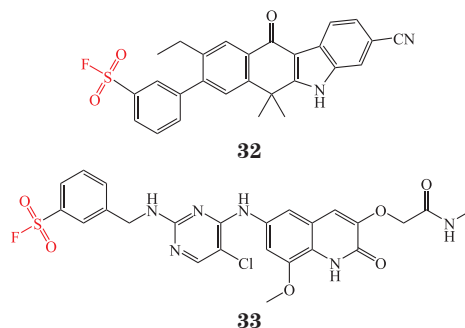
### 4.3 靶向酪氨酸的共价抑制剂

酪氨酸 (tyrosine, Tyr) 中同样含有羟基, 亲核性相对较低。但酪氨酸残基存在于蛋白质中时, 容易形成高度亲核性的苯氧基阴离子, 使得其能够被多种路易斯酸共价靶向。

**4.3.1 SR-蛋白特异性激酶 1/2 抑制剂** Hatcher 等<sup>[71]</sup> 于 2018 年开发了首个共价靶向 SR-蛋白特异性激酶 1/2 (SRSF protein kinase 1/2, SPRK1/2) 的不可逆抑制剂 SRPKIN-1 (**32**), 其对 SRPK1 的  $IC_{50}$  为  $11 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。SRPKIN-1 能够与 SPRK1/2 的 ATP 结合口袋中酪氨酸的酚羟基共价结合, 从而发挥对 SPRK1/2 的抑制作用。研究表明, SRPKIN-1 能有效地将血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 从促血管生成亚型 VEGF-A165a 转化为抗血管生成亚型 VEGF-A165b, 并在年龄相关性黄斑变性小鼠模型中以剂量依赖的方式抑制血管的形成。

**4.3.2 B 细胞淋巴瘤 6 共价抑制剂** 2020 年, Teng 等<sup>[72]</sup> 通过将磺酰氟引入已有的可逆 B 细胞淋巴瘤 6 (B-cell lymphoma 6, BCL6) 抑制剂, 开发出

BCL6 共价抑制剂 TMX-2164 (**33**)。其能够通过结构中的磺酰氟与 BCL6 中的 Tyr58 的羟基发生共价结合。TMX-2164 能有效抑制 BCL6 的激酶活性 ( $IC_{50} = 251 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 并在 DLBCL 细胞中显示出较高的抗增殖活性。



**4.3.3 Ras 相关蛋白共价抑制剂** 由于 Ras 相关蛋白 (Ras-related protein, Ral) 缺乏亲核半胱氨酸残基, Bum-Erdene 等<sup>[73]</sup> 利用作用于酪氨酸的亲电弹头芳基磺酰氟共价靶向 Ras 样 GTP 水解酶 (Ras-like guanosine triphosphatase, RAL GTPase) 的氨基酸残基 Tyr82 (见图 7)。化合物 **34** 能够抑制鸟嘌呤交换因子 Rgl2 介导的 Ral GTPase 的核苷酸交换,  $IC_{50}$  为  $49.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

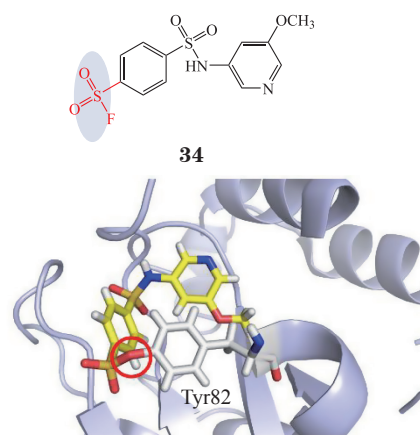


图 7 化合物 34 与 GDP 结合的人 RalA 蛋白的共晶结构 (PDB ID: 6P0I)

Figure 7 Co-crystal structure of compound 34 with GDP-bound human RalA (PDB ID: 6P0I)

## 6 结语与展望

共价抑制剂具有降低耐药性及靶向不可成药的靶点等优势, 使其成为激酶抑制剂领域的焦点, 并在疾病治疗中发挥着不可替代的作用, 共价结合也

早已应用到多个领域的研究当中<sup>[74-77]</sup>。但其同样具有潜在风险, 如对合成速度缓慢且具有重要功能的靶蛋白的持续抑制可能会造成严重的副作用。为更好地发挥共价抑制剂优势, Bradshaw 等<sup>[78]</sup>利用半胱氨酸反应性反式氰基丙烯酸酯亲电试剂鉴定了新的 BTK、FGFR 的共价抑制剂。开发具有低固有反应性弹头的共价抑制剂以降低脱靶可能性同样是共价抑制剂的发展方向之一, 如 McAulay 等<sup>[79]</sup>于 2020 年发现了新的炔基苯并噁嗪和二氢喹啉亲电

弹头, 并开发出新型靶向半胱氨酸的 JAK3 共价抑制剂。除半胱氨酸外, 研究人员也在努力开发共价靶向弱亲核氨基酸残基的共价抑制剂, 如靶向谷氨酸和精氨酸<sup>[80-81]</sup>。共价抑制剂目前正受到广泛的关注, 可以说这一浩瀚的宝库仍具有广泛的开发空间。相信随着众多开发与评价共价抑制剂的策略的提出与改进, 共价抑制剂必将迎来蓬勃发展并为人类疾病的治疗带来新的希望。

### [ 参考文献 ]

- [1] De Cesco S, Kurian J, Dufresne C, et al. Covalent inhibitors design and discovery[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2017, 138: 96-114[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.019>.
- [2] Lei J P, Zhou Y Z, Xie D Q, et al. Mechanistic insights into a classic wonder drug-aspirin[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(1): 70-73.
- [3] Waxman D J, Strominger J L. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics[J/OL]. *Annual Reviews Inc*, 1983, 52: 825-869[2021-09-24]. [https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.52.070183.004141?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub++pubmed](https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.52.070183.004141?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rft_dat=cr_pub++pubmed). DOI: 10.1146/annurev.bi.52.070183.004141.
- [4] Dungo R T, Keating G M. Afatinib: first global approval[J]. *Drugs*, 2013, 73(13): 1503-1515.
- [5] Robak P, Robak T. Bortezomib for the treatment of hematologic malignancies: 15 years later [J]. *Drugs R D*, 2019, 19(2): 73-92.
- [6] Barf T, Kaptein A. Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(14): 6243-6262.
- [7] Smith A J, Zhang X Y, Leach A G, et al. Beyond picomolar affinities: quantitative aspects of noncovalent and covalent binding of drugs to proteins[J]. *J Med Chem*, 2009, 52(2): 225-233.
- [8] Claxton A J, Cramer J, Pierce C. A systematic review of the associations between dose regimens and medication compliance[J]. *Clin Ther*, 2001, 23(8): 1296-1310.
- [9] Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 144: 19-50[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.006>.
- [10] Baillie T A. Targeted covalent inhibitors for drug design[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(43): 13408-13421.
- [11] Sutanto F, Konstantinidou M, Domling A. Covalent inhibitors: a rational approach to drug discovery[J]. *RSC Med Chem*, 2020, 11(8): 876-884.
- [12] Krippendorff B F, Neuhaus R, Lienau P, et al. Mechanism-based inhibition: deriving  $k_i$  and  $k_{inact}$  directly from time-dependent  $IC_{50}$  values[J]. *J Biomol Screen*, 2009, 14(8): 913-923.
- [13] Gehring M, Laufer S A. Emerging and re-emerging warheads for targeted covalent inhibitors: applications in medicinal chemistry and chemical biology[J]. *J Med Chem*, 2019, 62(12): 5673-5724.
- [14] Gauthier J Y, Chauret N, Cromlish W, et al. The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(3): 923-928.
- [15] Li D, Ambrogio L, Shimamura T, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models[J]. *Oncogene*, 2008, 27(34): 4702-4711.
- [16] Liang C Y, Tian D, Ren X D, et al. The development of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors from 2012 to 2017: a mini-review[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2018, 151: 315-326[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.062>.
- [17] Kettle J G, Cassar D J. Covalent inhibitors of the GTPase KRAS(G12C): a review of the patent literature[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2020, 30(2): 103-120.
- [18] Andersen J L, Gesser B, Funder E D, et al. Dimethyl fumarate is an allosteric covalent inhibitor of the p90 ribosomal s6 kinases[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4344[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06787-w>.
- [19] Bertinaria M, Gastaldi S, Marini E, et al. Development of covalent NLRP3 inflammasome inhibitors: chemistry and biological activity[J/

- OL]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 670: 116–139[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.11.013>.
- [20] Haag S M, Gulen M F, Reymond L, *et al.* Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors[J]. *Nature*, 2018, 559(7713): 269–273.
- [21] Hatcher J M, Yang G, Wang L, *et al.* Discovery of a selective, covalent IRAK1 inhibitor with antiproliferative activity in MYD88 mutated B-Cell lymphoma[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11(11): 2238–2243.
- [22] Miller R M, Taunton J. Targeting protein kinases with selective and semipromiscuous covalent inhibitors[J]. *Methods Enzymol*, 2014, 548:93–116[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397918-6.00004-5>.
- [23] Shuai W, Wang G, Zhang Y W, *et al.* Recent progress on tubulin inhibitors with dual targeting capabilities for cancer therapy[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(12): 7963–7990.
- [24] Gu X, Zhang Z X, Jiao M R, *et al.* Discovery of SIPI6473, a new, potent, and orally bioavailable multikinase inhibitor for the treatment of non-small cell lung cancer[J]. *Pharmaceutical Fronts*, 2021, 3(1): e1–e7.
- [25] Hossam M, Lasheen D S, Abouzid K A M. Covalent EGFR inhibitors: binding mechanisms, synthetic approaches, and clinical profiles[J]. *Arch Pharm*, 2016, 349(8): 573–593.
- [26] Finlay M R, 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(20): 8249–8267.
- [27] Thress K S, Paweletz C P, Felip E, *et al.* Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M[J]. *Nat Med*, 2015, 21(6): 560–562.
- [28] Basu D, Richters A, Rauh D. Structure-based design and synthesis of covalent-reversible inhibitors to overcome drug resistance in EGFR[J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(12): 2767–2780.
- [29] Xue G, Chen J H, Liu L H, *et al.* Protein degradation through covalent inhibitor-based PROTACs [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2020, 56(10): 1521–1524.
- [30] Wu J J, Zhang M Z, Liu D L. Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor [J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9: 21[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0250-9>.
- [31] Byrd J C, Smith S, Wagner-Johnston N, *et al.* First-in-human phase I study of the BTK inhibitor GDC-0853 in relapsed or refractory B-cell NHL and CLL[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(16): 13023–13035.
- [32] Pei J P, Wang G, Feng L, *et al.* Targeting lysosomal degradation pathways: new strategies and techniques for drug discovery[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(7): 3493–3507.
- [33] Herman S E M, Sun X, McAuley E M, *et al.* Modeling tumor-host interactions of chronic lymphocytic leukemia in xenografted mice to study tumor biology and evaluate targeted therapy[J]. *Leukemia*, 2013, 27(12): 2311–2321.
- [34] Smith P F, Krishnarajah J, Nunn P A, *et al.* A phase I trial of PRN1008, a novel reversible covalent inhibitor of Bruton's tyrosine kinase, in healthy volunteers[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2017, 83(11): 2367–2376.
- [35] Chiusaroli R, Grotti A, Lanza M, *et al.* THU0066 CR6086, a selective antagonist at the EP4 prostanoid receptor, improves or resolves disease features in a rat model of rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(Suppl 2): 215–216.
- [36] Liu P Y, Wang Y J, Li X. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(5): 871–879.
- [37] Bond M J, Chu L, Nalawansa D A, *et al.* Targeted degradation of oncogenic KRAS(G12C) by VHL-recruiting PROTACs[J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6(8): 1367–1375.
- [38] Janes M R, Zhang J C, Li L S, *et al.* Targeting KRAS mutant cancers with a covalent G12C-specific inhibitor[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 578–589.
- [39] Lanman B A, Allen J R, Allen J G, *et al.* Discovery of a covalent inhibitor of KRAS<sup>G12C</sup> (AMG 510) for the treatment of solid tumors[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(1): 52–65.
- [40] Fell J B, Fischer J P, Baer B R, *et al.* Identification of the clinical development candidate MRTX849, a covalent KRAS<sup>G12C</sup> inhibitor for the treatment of cancer[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(13): 6679–6693.
- [41] Syed Y Y. Selnexor: first global approval[J]. *Drugs*, 2019, 79(13): 1485–1494.
- [42] Arango N P, Yuca E, Zhao M, *et al.* Selnexor (KPT-330) demonstrates anti-tumor efficacy in preclinical models of triple-negative breast cancer[J]. *Breast Cancer Research*, 2017, 19(1): 93–102.
- [43] Ruan S D, Dong Y Z, Lu J G, *et al.* Synthesis of a novel PTH1–34 analog with increased human serum albumin affinity[J].



- Pharmaceutical Fronts*, 2021, 3(1): e23–e29.
- [44] Kharenko O A, Patel R G, Brown S D, *et al.* Design and characterization of novel covalent bromodomain and extra-terminal domain (BET) inhibitors targeting a methionine[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(18): 8202–8211.
- [45] Bianco I D, Kelley M J, Crowl R M, *et al.* Identification of two specific lysines responsible for the inhibition of phospholipase A2 by manoilide[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1250(2): 197–203.
- [46] Walker E H, Pacold M E, Perisic O, *et al.* Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine[J]. *Mol Cell*, 2000, 6(4): 909–919.
- [47] Hotte S J, Chi K N, Joshua A M, *et al.* A phase II study of PX-866 in patients with recurrent or metastatic castration-resistant prostate cancer: Canadian cancer trials group study IND205[J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2019, 17(3): 201–208.
- [48] Dalton S E, Dittus L, Thomas D A, *et al.* Selectively targeting the kinome-conserved lysine of PI3K $\delta$  as a general approach to covalent kinase inhibition[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(3): 932–939.
- [49] Castro-Falc3n G, Seiler G S, Demir 3, *et al.* Neolymphostin A is a covalent phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/mammalian target of rapamycin (mTOR) dual inhibitor that employs an unusual electrophilic vinylogous ester[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(23): 10463–10472.
- [50] Wan X B, Yang T P, Cuesta A, *et al.* Discovery of lysine-targeted eIF4E inhibitors through covalent docking[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(11): 4960–4964.
- [51] Baggio C, Gambini L, Udompholkul P, *et al.* Design of potent pan-IAP and lys-covalent XIAP selective inhibitors using a thermodynamics driven approach[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(14): 6350–6363.
- [52] Baggio C, Udompholkul P, Gambini L, *et al.* Aryl-fluorosulfate-based lysine covalent pan-inhibitors of apoptosis protein (IAP) antagonists with cellular efficacy[J]. *J Med Chem*, 2019, 62(20): 9188–9200.
- [53] Akcay G, Belmonte M A, Aquila B, *et al.* Inhibition of Mcl-1 through covalent modification of a noncatalytic lysine side chain[J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(11): 931–936.
- [54] Gambini L, Udompholkul P, Baggio C, *et al.* Design, synthesis, and structural characterization of lysine covalent BH3 peptides targeting Mcl-1[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(8): 4903–4912.
- [55] Joharapurkar A A, Dhanesha N A, Jain M R. Inhibition of the methionine aminopeptidase 2 enzyme for the treatment of obesity[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2014, 7: 73–84[2021-09-24]. <https://doi.org/0.2147/DMSO.S56924>.
- [56] Kim E J, Shin W H. General pharmacology of CKD-732, a new anticancer agent: effects on central nervous, cardiovascular, and respiratory system[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(2): 217–223.
- [57] Hughes T E, Kim D D, Marjason J, *et al.* Ascending dose-controlled trial of beloranib, a novel obesity treatment for safety, tolerability, and weight loss in obese women[J]. *Obesity*, 2013, 21(9): 1782–1788.
- [58] Ehmann D E, Jahic H, Ross P L, *et al.* Avibactam is a covalent, reversible, non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(29): 11663–11668.
- [59] Chowdhury S R, Xie F Z, Gu J X, *et al.* Small-molecule amyloid  $\beta$ -aggregation inhibitors in Alzheimer's disease drug development[J]. *Pharmaceutical Fronts*, 2019, 1(1): e22–e32.
- [60] Polinsky R J. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Clin Ther*, 1998, 20(4): 634–647.
- [61] Birks J S, Evans G J. Rivastigmine for Alzheimer's disease[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 10(4): CD001191[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001191.pub3>.
- [62] Perni R B, Almquist S J, Byrn R A, *et al.* Preclinical profile of VX-950, a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of hepatitis C virus NS3-4A serine protease[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(3): 899–909.
- [63] Venkatraman S, Bogen S L, 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(20): 6074–6086.
- [64] Arasappan A, Bennett F, Bogen S L, *et al.* Discovery of narlaprevir (SCH 900518): a potent, second generation HCV NS3 serine protease inhibitor[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2010, 1(2): 64–69.
- [65] Groll M, Berkers C R, Ploegh H L, *et al.* Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome[J]. *Structure*, 2006, 14(3): 451–456.

- [66] Bibo-Verdugo B, Jiang Z, Caffrey C R, *et al.* Targeting proteasomes in infectious organisms to combat disease[J]. *FEBS J*, 2017, 284(10): 1503–1517.
- [67] Teicher B A, Ara G, Herbst R, *et al.* The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(9): 2638–2645.
- [68] Xie J M, Wan N, Liang Z, *et al.* Ixazomib - the first oral proteasome inhibitor[J]. *Leuk Lymphoma*, 2019, 60(3): 610–618.
- [69] Zanzwar S, Abeykoon J P, Kapoor P. Ixazomib: a novel drug for multiple myeloma[J]. *Expert Rev Hematol*, 2018, 11(10): 761–771.
- [70] Federspiel J D, Codreanu S G, Goyal S, *et al.* Specificity of protein covalent modification by the electrophilic proteasome inhibitor carfilzomib in human cells[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(10): 3233–3242.
- [71] Hatcher J M, Wu G W, Zeng C Y, *et al.* SRPKIN-1: a covalent SRPK1/2 inhibitor that potently converts VEGF from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoform[J]. *Cell Chem Biol*, 2018, 25(4): 460–470.
- [72] Teng M X, Ficarro S B, Yoon H, *et al.* Rationally Designed Covalent BCL6 inhibitor that targets a tyrosine residue in the homodimer interface[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11(6): 1269–1273.
- [73] Bum-Erdene K, Liu D G, Gonzalez-Gutierrez G, *et al.* Small-molecule covalent bond formation at tyrosine creates a binding site and inhibits activation of Ral GTPases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(13): 7131–7139.
- [74] Tran N H, Huynh N, Chavez G, *et al.* A series of hybrid p450 BM3 enzymes with different catalytic activity in the light-initiated hydroxylation of lauric acid[J]. *J Inorg Biochem*, 2012, 115: 50–56[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.05.012>.
- [75] Liu H L, Feng J, Zhang J Y, *et al.* A catalytic chiral gel microfluidic reactor assembled via dynamic covalent chemistry[J]. *Chem Sci*, 2015, 6(4): 2292–2296.
- [76] Liao J Y, Zhang S L, Wang Z S, *et al.* Transition-metal catalyzed asymmetric reactions under continuous flow from 2015 to early 2020[J]. *Green Synth Catal*, 2020, 1(2): 121–133.
- [77] Li Y Y, Yuan B, Sun Z T, *et al.* C-H bond functionalization reactions enabled by photobiocatalytic cascades[J]. *Green Synth Catal*, 2021, 2(3): 267–274.
- [78] Bradshaw J M, McFarland J M, Paavilainen V O, *et al.* Prolonged and tunable residence time using reversible covalent kinase inhibitors[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(7): 525–531.
- [79] McAulay K, Hoyt E A, Thomas M, *et al.* Alkynyl benzoxazines and dihydroquinazolines as cysteine targeting covalent warheads and their application in identification of selective irreversible kinase inhibitors[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(23): 10358–10372.
- [80] Martin-Gago P, Fansa E K, Winzker M, *et al.* Covalent protein labeling at glutamic acids[J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(5): 589–597.
- [81] Gong Y, Andina D, Nahar S, *et al.* Releasable and traceless PEGylation of arginine-rich antimicrobial peptides[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(5): 4082–4086.



**[专家介绍]** 王贯: 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室副研究员, 长期从事神经退行性疾病和恶性肿瘤耐药相关靶标的筛选和分子机制研究, 并基于新靶标和新机制进行肿瘤精准分型以及靶向药物设计发现。发展了基于自噬与有丝分裂灾难这两类程序性细胞死亡的数据资源和分析平台, 围绕 ERK1/2/5、TRKs、eEF2K 等靶标设计合成了多个候选化合物, 并考察了它们通过经典或非经典通路介导的程序性细胞死亡。主持国家自然科学基金4项(其中2项为联合负责), 四川省科技厅项目1项, 中国博士后科学基金面上项目(一等)1项等, 在 *J Med Chem*、*Acta Pharm Sin B*、*Eur J Med Chem* 等期刊上发表文章 30 余篇, 申请发明专利 10 项。在学术会议做口头报告多次, 获奖 2 项, 指导本科生和研究生获得省级和校级优秀毕业生及获得奖学金等。



**[专家介绍]** 欧阳亮: 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室研究员, 国家优秀青年基金获得者, 四川省学术与技术带头人后备人选, 入选四川大学“双百人才工程”计划, 获第二十二届中国药学会-施维雅青年药物化学奖。长期从事细胞自噬原创新靶标的药物设计合成, 先导化合物发现应用基础研究。在相关领域取得了系统和创新的成果: 发展针对自噬靶标识别的新方法, 建立小分子库, 为基于自噬靶标的药物筛选提供了普适性高效工具; 围绕自噬性死亡通路中原创新靶标 ULK1、BRD4-AMPK 等首次设计合成多个小分子先导化合物并揭示其自噬调控相关机制, 为基于自噬全新药物靶标及先导化合物的发现奠定了科学基础。主持国家自然科学基金5项, 重大新药创制科技重大专项子任务1项, 科技部国家重点研发计划子任务1项等, 在 *Chem Sci*、*J Med Chem*、*Autophagy*、*Acta Pharm Sin B* 等刊物发表 SCI 论文 80 余篇, 总引超 4 000 次, 单篇最高引超 900 次, 申请发明专利 10 余项, 部分正实现临床转化。