

靶向蛋白非催化功能的药物开发新策略

杨欣语, 宋宜辉*, 余斌**

(郑州大学药学院, 河南 郑州 450001)

[摘要] 靶向蛋白催化功能的小分子抑制剂具有特异性差和临床副作用多等缺点, 靶向蛋白的非催化功能在药物开发中具有较大的潜力。鉴于靶向蛋白非催化功能抑制剂的广阔的应用前景, 对靶向蛋白非催化功能的抑制剂开发新策略即非催化功能结构域策略、变构调控策略和蛋白-蛋白相互作用策略进行总结, 同时对其存在的问题和应用前景进行展望, 以期对靶向蛋白非催化功能的药物开发提供方向。

[关键词] 药物开发策略; 蛋白非催化功能; 变构调控; 蛋白-蛋白相互作用

[中图分类号] R914

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2022) 01-0004-15

Targeting the Non-catalytic Functions of Proteins for New Drug Discovery

YANG Xinyu, SONG Yihui, YU Bin

(Zhengzhou University School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou 450001, China)

[Abstract] The small molecule inhibitors targeting the conserved catalytic function of proteins face such challenges as poor specificity and numerous side-effects, while targeting the non-catalytic functions of proteins has great potential for the development of drugs. In view of the wide prospects of inhibitors targeting the non-catalytic functions of proteins, this review briefly summarizes the new drug discovery strategies in this field, including non-catalytic functional domain strategy and the strategies of allosteric regulation and protein-protein interaction, with a prospect of their existing problems and future application, aiming to provide new directions for the development of drugs targeting the non-catalytic functions of proteins.

[Key words] drug discovery strategy; non-catalytic function of protein; allosteric regulation; protein-protein interaction

蛋白质在与生理功能密切相关的细胞信号传导中发挥着重要作用。完整的结构域是蛋白质发挥正常生理功能的结构基础。一个经典的蛋白酶常由保守的催化结构域和非催化结构域组成。催化结构域与酶的催化活性直接相关, 而非催化结构域则主要通过催化功能非依赖的方式如支架蛋白功能、变构调控和蛋白-蛋白相互作用等确定底物的特异性, 或协调其与信号通路不同组分之间的相互作用, 进而调控酶的活性^[1-2]。鉴于蛋白酶催化功能的重要性, 长期以来靶向蛋白酶保守的催化功能开发抑制剂一直是药物研发领域的热点。但这类抑制剂却面临着选择性不高、特异性不强和临床副作用多等挑战,

而蛋白非催化功能的特异性为高选择性抑制剂的开发提供了研究方向, 也日渐引起了大家的关注。基于蛋白质非催化功能的最新研究进展和抑制剂开发策略, 本文通过系统总结靶向蛋白非催化功能开发抑制剂的新策略, 即非催化结构域策略、变构调控策略和蛋白-蛋白相互作用策略, 为靶向蛋白非催化功能的抑制剂开发提供研究思路。

1 蛋白非催化结构域策略

酶的非催化结构域可作为支架蛋白, 通过与信号通路中的其他组分结合, 在细胞信号传导中发挥着关键作用, 如胺氧化酶蛋白中的赖氨酰氧化酶样蛋白-2 (lysyl oxidase-like 2 protein, LOXL2) N末端特有的富含半胱氨酸的清道夫受体 (scavenger receptor cysteine-rich, SRCR) 结构域可通过非依赖催化作用的支架功能调节内皮细胞外基质和血管的生成^[3]。研究表明, 蛋白质非催化结构域参与调控 RNA 代谢, DNA 修复, 细胞分裂、分化和基因组稳定性等各种细胞过程, 与诸多疾病如癌症和

接受日期: 2021-08-01

项目资助: 国家自然科学基金 (No. 31900875, No. 81973177)

*** 通信作者:** 宋宜辉, 副教授, 硕士生导师;

研究方向: 基于结构生物学的抗肿瘤药物发现;

Tel: 0371-67781908; **E-mail:** songyihui@zzu.edu.cn

**** 通信作者:** 余斌, 教授, 博士生导师;

研究方向: 原创先导化合物发现;

Tel: 0371-67781908; **E-mail:** yubin@zzu.edu.cn

血栓的发生密切相关^[4-7]。与传统的靶向蛋白保守催化功能的药物不同, 针对蛋白特异性非催化结构域开发的小分子抑制剂可能具有更高的选择性, 在疾病治疗领域具有较大的应用前景。目前已成功靶向了多个蛋白的非催化结构域, 如赖氨酸特异

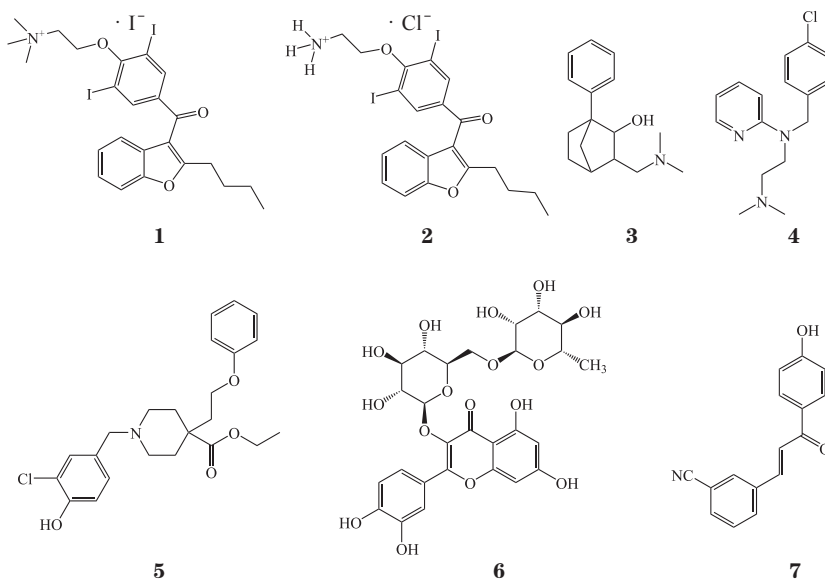
性去甲基化酶 4A (lysine-specific demethylase 4A, KDM4A) 的 TUDOR 结构域和局部黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 的非催化黏着斑定位区 (focal adhesion targeting, FAT) 等^[6,8], 部分代表性的抑制剂如表 1 所示。

表 1 蛋白非催化结构域策略相关靶点研究现状

Table 1 Current status of research on targets with non-catalytic domain strategy

靶点	化合物	活性 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	作用机制	研发状态
KDM4A	WAG-003 (1)	$\text{IC}_{50}=34$	抑制 TUDOR 结构域, 在调控染色质定位和底物特异性方面发挥重要作用	临床前
	<i>N,N</i> -desethylami (2)	$\text{IC}_{50}=72$		临床前
	化合物 3	$K_i=170$	立体特异性结合到 KDM4A 串联 TUDOR 结构域的三甲基赖氨酸结合口袋, 并拮抗其与 H3K4me3 的结合能力, 从而发挥抑制作用	临床前
FAK	CFAK-C4 (4)	-	破坏 VEGFR-3/FAK 结合, 在体外研究中导致 VEGFR-3 和 FAK 的磷酸化抑制, 体内研究与化疗药物联合使用治疗乳腺癌和胰腺癌时表现出显著的抗癌作用	临床前
PDIA1	ML359 (5)	$\text{IC}_{50}=0.25$	抑制血小板聚集, 调节血小板激活、纤维蛋白形成和血栓形成	临床前
	BAP2 (6)	$\text{IC}_{50}=0.9$	特异性抑制 PDIA1 的 b 型结构域, 改变参与未折叠蛋白反应, 内质网应激、凋亡和 DNA 修复反应的基因转录, 在体外和体内都能抑制肿瘤细胞生长	临床前
	Rutin (7)	$\text{IC}_{50}=6$	抑制血小板聚集, 抑制纤维蛋白生成, 阻止体内血栓形成	临床前

KDM4A: lysine-specific demethylase 4A (赖氨酸特异性去甲基化酶 4A); H3K4me3: trimethylated lysine 4 of histone H3 (组蛋白 H3 赖氨酸 27 三甲基化酶); FAK: focal adhesion kinase (局部黏着斑激酶); VEGFR-3: vascular endothelial growth factor receptor 3 (血管生长因子受体 3); PDIA1: protein disulfide isomerase A1 (蛋白质二硫键异构酶 A1)



1.1 靶向赖氨酸特异性去甲基化酶 4A 的非催化结构域研究现状

在人类基因组中, 含有 Jumonji C 结构域的组蛋白去甲基化酶 (Jumonji C domain-containing histone demethylase, JHDM) 家族成员组蛋白赖

氨酸特异性去甲基化酶 4 (histone lysine-specific demethylase 4, KDM4) 包含 A、B、C、D 和 E 5 种不同的亚型, 可以催化组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸 (histone H3 lysine 9, H3K9) 和组蛋白 H3 第 36 位赖氨酸 (histone H3 lysine 36, H3K36) 的去甲基

化^[9-12]。5种亚型KDM4的N端均含由Jumonji N和Jumonji C组成的保守催化结构域,分别为JmjN和JmjC,但C末端差异较大,仅4A、4B和4C 3种亚型的C末端包含独特的串联植物同源结构域(plant homeodomain, PHD)和TUDOR结构域(PDB ID: 5D6X)^[6]。研究表明:KDM4A、4B和4C的过表达与各种癌症的发生发展密切相关,是抗癌药物开发的重要作用靶点^[13-15]。目前报道的KDM4小分子抑制剂主要靶向其保守的催化结构域,根据其作用机制可分为3大类:1)金属螯合抑制剂,如N-草酰甘氨酸(N-oxalylglycine, NOG)是一类 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)辅助因子的模拟物,通过与酶催化位点的Fe(II)分子竞争性地结合而抑制KDM4蛋白的酶活性^[16]。但这类化合物的亲水性结构往往导致其具有较差的细胞穿透能力,因而限制了其临床应用^[17]。2)金属辅助因子干扰物,如双硫仑(disulfiram)和依布硒(ebselen),通过阻止辅助因子如铁和锌的结合而抑制KDM4的酶催化活性^[13]。3)组蛋白底物的竞争性抑制剂,如MS275,其通过与底物组蛋白的竞争性结合而达

到抑制效果^[13]。但由于KDM4酶家族催化机制的保守性,这些抑制剂面临着选择性差的问题。研究发现,含有TUDOR结构域的蛋白质在调节细胞过程,如RNA代谢、DNA损伤反应和染色质修饰中也发挥着至关重要的作用。因此,靶向KDM4中独特的非催化TUDOR结构域也成为开发高选择性抑制剂的潜在研究方向^[4-5]。KDM4A也称为含Jumonji结构域蛋白2A(Jumonji domain containing 2A, JMJD2A),在调节细胞增殖和分化、促进肿瘤发生中发挥着至关重要的作用^[12]。与抗心律失常药物胺碘酮类似,化合物WAG-003通过靶向KDM4A的TUDOR结构域中等抑制KDM4A的酶活性^[13]。化合物N,N-desethylami也对KDM4A的TUDOR结构域具有抑制作用^[18]。此外,共晶结构显示(PDB ID: 5VAR)(见图1),化合物3可直接与TUDOR结构域的三甲基赖氨酸结合口袋结合而发挥抑制作用,为靶向KDM4酶家族的TUDOR结构域开发更高选择性和高效力的非催化功能抑制剂奠定基础^[19]。

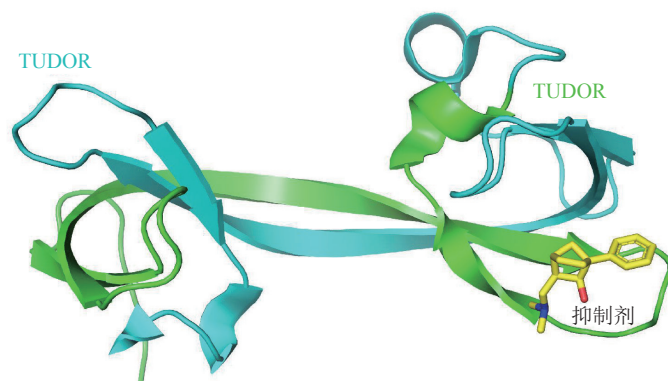


图1 化合物3靶向KDM4A非催化TUDOR结构域的晶体结构(PDB ID: 5VAR)

Figure 1 Crystal structure of compound 3 targeting the non-catalytic TUDOR domain of KDM4A (PDB ID: 5VAR)

1.2 靶向局部黏着斑激酶的非催化结构域研究现状

FAK也称为蛋白酪氨酸激酶2(protein tyrosine kinase 2, PTK2),是一种由PTK2基因编码的非受体型酪氨酸激酶,在整合素介导的信号转导通路中发挥着重要作用^[20]。FAK由N端的4.1-埃兹蛋白-根蛋白-膜突蛋白(FERM)结构域、位于中心的激酶结构域和C端2个富含脯氨酸的基序即富含脯氨酸基序1(proline-rich 1, PR1)和PR2及黏着

斑定位区FAT结构域组成(PDB ID: 2QVX)^[20]。其中位于中心的激酶结构域发挥酶催化功能。N端的FERM结构域介导FAK与整合素和生长因子受体等蛋白的直接相互作用,并通过与位于中心的激酶结构域的直接结合而阻止底物与催化结构域的结合,保护FAK免受肉瘤蛋白激酶(sarcoma, Src)磷酸化的激活。C端的FAT结构域包含多种蛋白-蛋白相互作用的结合位点,引导FAK到各种细胞

的黏着斑复合物中^[20-22]。Tyr397 是 FAK 的一个关键位点, 其自磷酸化介导了多个下游信号通路的激活^[23]。在静息状态下, FERM 结构域和中央激酶结构域形成自抑制分子内相互作用, FAK 处于无活性状态。一旦 FERM 结构域和中央激酶结构域之间的分子内相互作用被阻断, FAK 将被激活^[20]。FAK 的活化可增强 Tyr397 等位点的磷酸化, 进而激活 FAK 依赖的信号通路, 促进细胞的生长、增殖、生存和迁移等活动^[24]。此外, FAK 在转移性肿瘤中过表达, 其激活介导的 p53 降解也在细胞的增殖和存活中发挥着关键作用, 因而 FAK 是一个重要的肿瘤治疗靶点^[20]。目前报道的 FAK 小分子抑制剂分为两大类: 激酶依赖性酶功能抑制剂和激酶非依赖性支架功能抑制剂。其中激酶依赖性抑制剂如 TAE-226、PF-573228、PF-562271、PF-4554878 和 GSK-2256098 等均靶向 FAK 激酶结构域的腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 结合位点, 通过抑制 FAK 的 Tyr397 或 Tyr861 位点的磷酸化而抑制 FAK 的活性, 但这类抑制剂在抑制细胞生长并诱导细胞凋亡方面具有一定的局限性^[20, 24-25]。而另一类激酶非依赖性小分子抑制剂如 CFAK-C4 通过靶向 FAK 非催化结构域的支架功能而发挥抑制作用^[26-27]。血管生长因子受体 3 (vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGFR-3) 是一种受体酪氨酸激酶, 参与肿瘤细胞及其附近的淋巴管内皮和淋巴结转移性肿瘤的淋巴管生成^[28-29]。CFAK-C4 是一种靶向 FAK 的 FAT 结构域的 VEGFR-3 结合位点而开发的小分子抑制剂, 可以破坏 VEGFR-3 与 FAK 的相互作用。临床前研究证明: CFAK-C4 在包括胰腺癌、乳腺癌、神经母细胞瘤和晚期黑色素瘤等诸多癌症中呈现出治疗效果, 目前已被美国 FDA 认定为孤儿药^[23-24, 30]。因此, 靶向 FAK 非催化结构域的支架功能开发阻断 FAK 介导的肿瘤相关信号通路的高度特异性药物将成为一种可行且有潜力的抑癌策略^[26]。

1.3 靶向蛋白质二硫键异构酶 A1 的非催化结构域研究现状

蛋白质二硫键异构酶 A1 (protein disulfide isomerase A1, PDIA1) 是一种定位在内质网上的硫醇二硫醚氧化还原酶, 可催化其底物蛋白上半胱氨

酸残基之间二硫键的氧化、还原和异构化, 是重要的折叠催化剂。PDIA1 包含 2 种不同类型的类硫氧化还原结构域, 即催化结构域 (a 和 a') 和非催化结构域 (b 和 b') (PDB ID: 4EKZ) (见图 2)。2 种类型结构域的序列同源率为 37%, 均具有 Cys-Gly-His-Cys (CGHC) 活性位点基序, 但却独立地发挥二硫键氧化、还原和异构化功能。其中催化结构域 a 和 a' 发挥催化功能, 非催化型结构域 b 和 b' 则通过支架功能发挥底物募集作用^[31]。PDIA1 参与如血小板活化、血栓形成和病毒感染等生物过程, 其活性失调与诸多疾病如癌症、心血管和神经退行性疾病的发生发展密切相关。目前靶向 PDIA1 抑制剂可分为两大类: 催化 a 型结构域抑制剂如 RB-11-ca 和 KSC-34 和非催化 b 型结构域抑制剂如 ML359、Rutin 和 BAP2。其中, 化合物 ML359 和 Rutin 具有一定的体外抑制血小板聚集的活性, 可有效地阻断体内血栓的形成。并且这 2 个化合物均无明显的细胞毒性, 为抗血栓的药物治疗奠定了基础^[32-33]。化合物 BAP2 及其类似物通过靶向 PDIA1 的 b 型非催化结构域抑制 DNA 修复基因的表达进而达到抗肿瘤效果, 因而 BAP2 可与 DNA 损伤剂联合使用从而联合治疗恶性胶质瘤^[7, 34]。

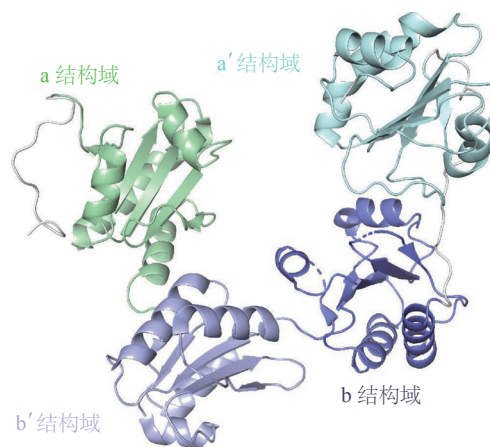


图 2 蛋白质二硫键异构酶 A1 的晶体结构 (PDB ID: 4EKZ)
Figure 2 Crystal structure of PDIA1 (PDB ID: 4EKZ)

2 变构调控策略

变构调节是指小分子化合物与酶蛋白分子活性位点之外的某一位点特异性结合, 通过改变酶蛋白分子的构象变化而改变酶的活性^[35]。与传统的作用

于活性位点的药物相比, 靶向变构位点的抑制剂具有更高的选择性、较低的脱靶毒性和较低的剂量要求等优势^[35-36]。因而寻找调控蛋白酶变构调控机制的化合物也逐渐成为新药研发的新策略。目前已针对多个靶蛋白如含 SH2 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (src-homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2, SHP2)、蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein

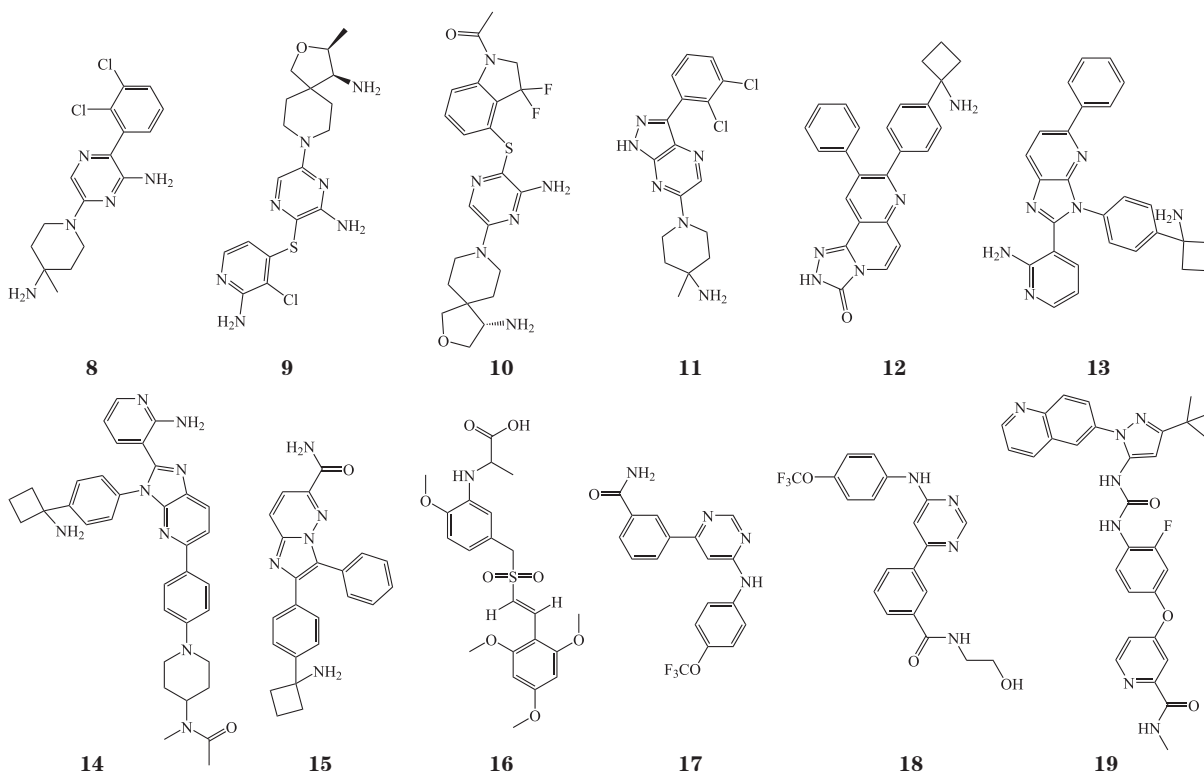
tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)、断裂点簇集区 (breakpoint cluster region, BCR)-艾贝尔逊酪氨酸激酶 (Abelson tyrosine kinase, ABL) 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase, AKT) 等的变构调控机制成功开发了多个变构抑制剂^[37-40], 部分代表性的抑制剂如表 2 所示。

表 2 变构调控策略相关靶点研究现状

Table 2 Current status of research on targets with allosteric regulation strategy

靶点	化合物	IC ₅₀ /(nmol·L ⁻¹)	作用机制	研发状态
SHP2	SHP-099 (8)	70	占据 SHP2 的变构位点, 稳定 SHP2 的自抑制构象, 抑制下游通路的激活, 从而发挥抗肿瘤作用	临床前
	TNO155 (9)	11	占据变构位点, 可以通过单一疗法或者联合用药治疗非小细胞肺癌和结直肠癌等其他晚期实体瘤	I 期临床
	JAB-3068 (10)	-	两者通过占据 SHP2 的变构位点, 对非小细胞肺癌、食管癌、其他转移性实体瘤发挥治疗作用。单独给药有非常显著的抗肿瘤作用, 能够促进 T 细胞杀伤肿瘤的功能, 也可以与其他药物联合应用	I 期临床
	JAB-3312			I 期临床
	BBP-398 (11)	-	占据变构位点, 可通过单一疗法或者联合用药在体内和体外发挥肿瘤抑制作用	I 期临床
	RMC-4630	-	减弱 Ras-Raf-MAPK-ERK 级联信号转导抑制肿瘤生长并导致肿瘤细胞死亡, 可通过单一疗法或联合用药发挥抗肿瘤作用	I 期临床
	ERAS-601	-	占据变构位点, 通过单药疗法或联合用药对晚期或转移性实体瘤发挥治疗作用	I 期临床
	RLY-1971	-	作为 SHP2 的变构抑制剂, 可单独用于治疗晚期或转移性实体瘤患者	I 期临床
AKT	MK-2206 (12)	对 AKT1/2/3 的 IC ₅₀ 分别为 8、12 和 65	锁定 PH-in 构象, 抑制其膜定位和激活, 目前用于治疗实体肿瘤, 可以与各种抗癌药物联合使用, 且比单药治疗中的每种药物表现出更强的肿瘤抑制活性	II 期临床
	ARQ092 (13)	对 AKT1/2/3 的 IC ₅₀ 分别为 5、4.5 和 16	ARQ092 与 ARQ751 通过去磷酸化细胞膜相关的活化以及阻止非活性形式定位于细胞质膜而抑制 AKT 活化, 有效抑制 AKT 的磷酸化	I 期临床
	ARQ751 (14)	对 AKT1/2/3 的 IC ₅₀ 分别为 0.55、0.81 和 1.3		I 期临床
	BAY1125976 (15)	对 AKT1/2/3 的 IC ₅₀ 分别为 5.2、18 和 427	结合于激酶和 PH 结构域形成的变构结合口袋而抑制全长 AKT1 和 AKT2 的活性, 从而抑制癌细胞的增殖, 表现出较强的抗肿瘤活性	I 期临床
BCR-ABL	ON012380 (16)	10	结合于 BCR-ABL 的底物结合位点, 而不是 ATP 位点, 这使得该化合物不受 Abl 激酶结构域突变的影响, 从而对 BCR-ABL 突变体 T315I 的细胞生长表现出较强的抑制作用	临床前
	GNF-2 (17)	138	结合于 ABL 激酶结构域 C 端附近的肉豆蔻酰基口袋而选择性抑制 BCR-ABL 依赖性的细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 但是对表达 T315I 突变体的细胞没有活性	临床前
	GNF-5 (18)	220	可以与肉豆蔻酰基口袋结合, 与化合物 GNF-2 相比, 有较好的药动学性质, 而且可以与药物联合使用对 T315I 突变体产生抑制作用	临床前
	DCC-2036 (19)	5.8	结合到被称为开关口袋的新区域而抑制 BCR-ABL 的构象活化, 对野生型以及 T315I 突变体都有效	I 期临床

SHP2: src-homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2 (含 SH2 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶 2); BCR-ABL: breakpoint cluster region-Abelson tyrosine kinase (断裂点簇集区-艾贝尔逊酪氨酸激酶); AKT: serine/threonine kinase (丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶); ras: rat sarcoma (鼠肉瘤); raf: rapidly accelerated fibrosarcoma (迅速加速纤维肉瘤); MAPK: mitogen-activated protein kinase (丝裂原活化蛋白激酶); ERK: extracellular regulated protein kinases (细胞外调节蛋白激酶); PH: Pleckstrin-homology (普列克底物蛋白同源结构域)



2.1 靶向含 SH2 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶 2 的变构调控研究现状

SHP2 是由 *PTPN11* 基因编码的一种非受体酪氨酸磷酸酶, 是多个信号通路如 RAS-RAF-MAPK-ERK、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-AKT-雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、Janus 激酶 (Janus Kinase, JAK)-信号转导与转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 等的关键调控因子^[41-42]。SHP2 是蛋白酪氨酸磷酸酶家族 (protein tyrosine phosphatase, PTP) 的一员, 全长为 593 个氨基酸, 由 N 末端的 2 个 SH2 结构域 N-SH2 和 C-SH2, 中间保守的蛋白酪氨酸磷酸酶催化结构域 PTP 和 C 端尾巴组成^[43]。在基底状态下, SHP2 采取自抑制构象 (PBD ID: 2SHP), N-SH2 结构域被铆定到 PTP 结构域上, 催化位点被堵塞。磷酸化蛋白的结合或激活突变将解除 SHP2 的自抑制状态, SHP2 将采取开放构象 (PBD ID: 6CRF) (见图 3)。N-SH2 结构域将远离 PTP 结构域, 催化位点被释放, SHP2 的酶活性被激活, 进而激活下游的级联信号通路^[44-45]。临床研究表明, SHP2 的激

活或过表达与努南综合征、青少年单核粒细胞白血病、豹皮综合征等多种类型疾病的发生密切相关, 是治疗疾病的潜在药物作用靶点^[46-48]。目前已经报道了多个靶向 SHP2 催化位点的中等活力小分子抑制剂, 如 NSC-87877、II-B08 和 cefsulodin 衍生物等, 这些抑制剂可通过下调 SHP2 的 PTP 活性而达到治疗疾病的目的。通过对多样性小分子化合物库的筛选, 笔者所在课题组也发现了 2 种结构新颖的 SHP2 的 PTP 抑制剂 SYK-85 和 WS-635^[49]。但由于 PTP 家族催化结构域的序列保守性, 这些药物的特异性通常较低, 并且 PTP 催化位点的高度溶剂化和极性性质也阻碍了 SHP2 小分子抑制剂的临床开发^[50-60]。为了克服以上缺点, 2016 年诺华团队基于 SHP2 独特的变构调控机制建立了一套多重高通量筛选方案, 开发了首个高效、高选择性且具有良好口服生物利用度的 SHP2 变构抑制剂 SHP-099, SHP-099 的开发为后续 SHP2 变构抑制剂的开发提供了结构骨架^[44]。截至目前, 已有 8 个高效、高选择性且口服有效的变构 SHP2 小分子抑制剂, 即 TNO155、RMC-4630、RLY-1971、JAB-3068、JAB-3312、BBP-398、ERAS-601 和 SH3809 进入临床研

究, 以评估其单用或联用在实体瘤和获得性耐药癌症中的治疗效果^[61-63]。作为“分子胶水”, 这些化合物通过结合在 N-SH2、C-SH2 和 PTP 的相互作用界面上稳定 SHP2 的自抑制构象, 变构地抑制 SHP2 的酶活性。在体外可通过调控 SHP2 介导的相关信号通路而抑制癌细胞的增殖, 进而达到治疗癌症的效果^[44, 64]。临床前数据表明, TNO155 与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、小鼠肉瘤病毒癌基因同源体 B (murine sarcoma viral oncogene homolog B, BRAF)、Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因 G12C 突变 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene G12C mutation, KRAS^{G12C}) 和细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 4/6 抑制剂以及程序性死亡受体 1 (programmed death-1, PD-1) 抗体联合使用均呈现出较好的协同疗效^[65]。自 2007 年以来, 单一 TNO155 或 TNO155 与 PD-1 抗体 spartalizumab、CDK4/6 抑制剂 ribociclib、BRAF 抑制剂 dabrafenib (Tafinlar[®])、口服 ERK 抑制剂 LTT462 或 KRAS^{G12C} 特异性口服抑制剂如 MRTX849、JDQ443 和 JDQ443 联合使用已经进入了 I / II 期临床研究, 以确定最大耐受剂量和推荐剂量下药物的抗肿瘤活性、安全性、耐受性和 PK/PD 性质, 为获得性耐药患者提供了另一种治疗策略。药理学研究表明, 在 osimertinib 耐药的非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 模型中, BBP-398 单独或与 EGFR 抑制剂 osimertinib 联合使用在体内外均呈现出有效的肿瘤抑制作用, 且可恢复 NSCLC 对 osimertinib 的敏感性^[66]。RMC-4630 可通过干扰 RAS-RAF-MAPK-ERK 级联信号而抑制肿瘤生长, 最终导致肿瘤细胞死亡。单用 RMC-4630 或与 MEK 抑制剂 cobimetinib 协同使用均呈现较好的抗肿瘤作用。此外, RMC-4630 可与 KRAS^{G12C} 抑制剂 AMG510 联合使用治疗 KRAS^{G12C} 突变的晚期实体肿瘤患者。ERAS-601 和 RLY-1971 单用或其他药物联合使用也对晚期或转移性实体瘤发挥治疗作用。此外, 由北京加科思新药研发有限公司自主开发的变构 SHP2 抑制剂 JAB-3068 和 JAB-3312 也已获批准开展针对 NSCLC、头颈部癌、食管癌和其他转移性实体瘤患者的安全性、耐受性、药动学和初步抗肿瘤活性的临床研究^[42]。

瘤活性的临床研究^[42]。

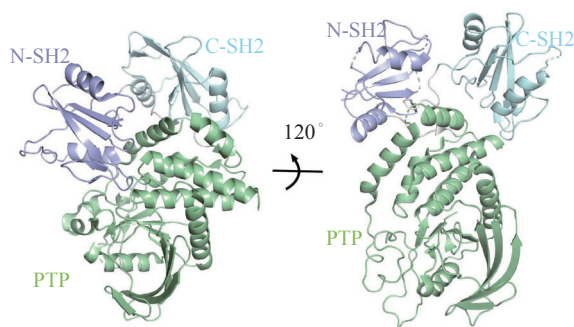


图3 SHP2的自抑制构象 (PDB ID: 2SHP) 与开放构象 (PDB ID: 6CRF)

Figure 3 Auto-inhibited (PDB ID: 2SHP) and open conformation of SHP2 (PDB ID: 6CRF)

2.2 靶向丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的变构调控研究现状

AKT 也被称为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 是 PI3K 信号通路的重要成员, 其过表达或激活与乳腺癌、结肠癌和卵巢癌等一系列癌症的发生和发展密切相关, 是癌症治疗的一个潜在药物作用靶点^[67-69]。AKT 家族包括 AKT1~3 这 3 种亚型, 均由 N 末端的 PH 结构域、中心的激酶结构域 (kinase domain, KD) 和 C 末端的调节结构域 3 部分组成 (PDB ID: 6HHG)^[70] (见图 4)。3 种亚型的激酶结构域高度保守, 同源性超过 85%。但它们的 PH 结构域在不同的亚型中存在较大的差异, 同源性约为 60%, 可促进 AKT 与膜磷脂的黏附^[68]。AKT 的 N 末端 PH 结构域与中心的 KD 结构域之间的分子内相互作用介导了 AKT 的“PH-in”和“PH-out”2 种构象的转换。PH 与 KD 结构域间的分子内相互作用可使 AKT 处于非活化的“PH-in”构象, 防止 AKT 激酶结构域的活性环被磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 -1 (PI3K-dependent kinase 1, PDK1) 磷酸化, 但当二者之间的相互作用受到破坏后, AKT 转变为“PH-out”构象, 激酶结构域的活性环可被 PDK1 磷酸化, 进而导致 AKT 的活化^[36, 68]。由于 AKT 激酶家族中 ATP 结合位点的保守性, 因而靶向 AKT 激酶结构域的 ATP 竞争抑制剂面临着选择性和脱靶副作用的挑战, 多项临床试验已终止^[37]。因而针对 AKT 的变构调控机制, 开发高选择性和低毒性的 ATP 非竞争性变构抑制剂逐渐引起了研究者的关注^[68, 71]。目

前报道的处于临床试验阶段的 AKT 变构抑制剂主要有 MK-2206、ARQ092、ARQ751 和 BAY1125976^[72]。MK-2206 是一种高效、高选择性的新型非 ATP 竞争性变构 AKT 抑制剂^[73]。单用 MK-2206 或 MK-2206 与细胞毒性药物如拓扑异构酶抑制剂 (阿霉素和喜树碱)、抗代谢物 (吉西他滨和 5-氟尿嘧啶)、抗微管药物 (多西紫杉醇) 和 DNA 交联剂 (卡铂) 联用均在体内和体外呈现出抗肿瘤活性, 并且耐受性良好^[74]。临床研究表明, 虽然 MK-2206 的半衰期较长, 可连续隔日服用, 但仍具有皮疹、疲劳和胃肠道毒性等缺陷, 因此仍需针对该化合物进行进一步的优化^[75]。ARQ092 是一种可口服、高效且高选择性的变构 AKT 抑制剂, 在实体瘤和血液肿瘤中具有抗肿瘤活性, 但仍具有轻度至中度的高血糖、皮疹、腹泻、呕吐、黏膜炎和转氨酶升高等药物相关不良反应^[76]。与 ARQ092 相比, ARQ751 是一种具有更高效力和选择性的 AKT 变构抑制剂^[77]。生化和细胞分析表明, 这 2 种化合物均可有效地调控 AKT 介导的相关信号通路从而抑制 AKT 的活性, 进而抑制诸多肿瘤细胞的增殖, 其中在白血病、乳腺癌、子宫内膜癌和结直肠癌细胞系中效果最强^[77]。BAY1125976 也是一种有效的高选择性变构 AKT 抑制剂, 通过结合到由 PH 和 KD 结构域形成的变构结合口袋而选择性地抑制 AKT1 和 AKT2 的活性。BAY1125976 呈现较好的疗效和体内耐受性, 并在多个 PI3K/AKT/mTOR 通路激活的肿瘤模型中显示出剂量依赖性的抗肿瘤疗效^[78]。相比于 MK-2206, BAY1125976 的半衰期较短, 在临床用药过程中也有高血糖、皮疹等现象出现, 因而也仍需进一步的优化^[79]。

2.3 靶向断裂点簇集区-艾贝尔逊酪氨酸激酶的变构调控研究现状

BCR-ABL 是由断点聚集区蛋白 BCR 与 ABL 蛋白融合而成的一种相对分子质量约为 210 000 的非受体型酪氨酸蛋白激酶。BCR-ABL 可催化 γ -磷酸基团从 ATP 转移到蛋白中特定酪氨酸残基的羟基上, 参与 RAS-RAF-MAPK-ERK、PI3K-AKT、JAK-STAT 和髓细胞组织增生蛋白 (myelocytomatosis proteins, Myc) 等多种信号通路^[39,80]。ABL 蛋白由 N 端无序的 Cap 结构域、SRC 同源结构域 3 (Src

homology 2, SH3)、SH2、C 端激酶结构域 KD、SH3 与 SH2 连接区 (Contactor^{SH3/2}) 和 SH2 与 KD 连接区 (Linker^{SH2/KD}) 构成。SH2、SH3 和 KD 3 个结构域之间的分子内相互作用可变构地调控 ABL 蛋白的酶活性。N 端的肉豆蔻酰基插入 C 端的口袋后将稳定 ABL 的 KD 结构域, 使 ABL 呈现自组装的抑制构象。当 SH2 结合到 N 端的 KD 结构域, ABL 呈现扩展的激活构象^[23,81]。单独的 ABL 蛋白可在细胞核和细胞质之间穿梭, 但当其与 BCR 蛋白融合后, ABL 蛋白将失去穿梭特性, 停留在细胞质内。BCR 与 ABL 蛋白的融合可激活 ABL 的酪氨酸激酶活性, 通过与致癌途径中蛋白质的相互作用而导致癌症的发生^[82]。临床研究发现 BCR-ABL 融合蛋白与慢性粒细胞白血病的发生密切相关^[39]。目前报道的靶向 BCR-ABL 抑制剂分为两类: 1) ATP 竞争性抑制剂如 imatinib、nilotinib 和 PPY-A 等, 可与活化或非活化构象的 BCR-ABL 蛋白相结合; 2) ATP 非竞争性变构抑制剂如 ON012380、GNF-2 及其衍生物 GNF-5 和 DCC-2036 等, 可结合到酶的底物结合位点或远离 ATP 结合位点的变构口袋中。但 ATP 竞争性抑制剂却面临着耐药性的挑战, 而单用 ATP 非竞争性变构抑制剂或与 ATP 竞争性抑制剂联合使用可在一定程度上克服单一药物的耐受突变^[83-85]。ON012380 可与 BCR-ABL 的底物结合位点而非 ATP 结合位点相结合, 因而这些化合物不受 ABL 激酶突变的影响, 对 BCR-ABL 突变体 T315I 细胞的生长也呈现出较好抑制效果^[86-87]。GNF-2 及其衍生物 GNF-5 是一类高选择性的变构 BCR-ABL 抑制剂, 通过与 ABL 酶 C 末端的豆蔻酸盐结合口袋相结合, 诱导稳定 BCR-ABL 的非活化构象^[88]。相比于 GNF-2, GNF-5 具有更好的药动学特性。研究表明, GNF-5 可与 ATP 竞争性抑制剂 imatinib 联合使用而改变 ATP 结合位点的构象, 协同抑制耐药突变^[89]。DCC-2036 是一种全新的酪氨酸激酶抑制剂, 通过结合到一个称为“开关口袋”的新区域而抑制 BCR-ABL 的构象活化^[90]。研究显示, DCC-2036 也表现出良好的生物利用度和安全性, 在 imatinib 耐药性慢性粒细胞白血病治疗方面具有较大的潜力^[83]。

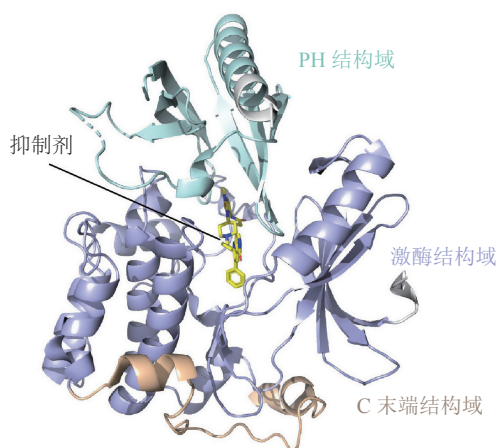


图4 靶向 AKT 变构位点的抑制剂共晶结构 (PDB ID: 6HHG)

Figure 4 Co-crystal structure of inhibitors targeting the allosteric site of AKT (PDB ID: 6HHG)

3 蛋白-蛋白相互作用策略

蛋白质和蛋白质之间的相互作用在诸多重要的细胞功能中发挥着至关重要的作用, 对于生物体维持正常的生理功能是必不可少的。除此之外, 蛋白-蛋白相互作用也与众多疾病如癌症和自身免疫性疾病的发生密切相关^[91-92]。如胚胎外胚层发育蛋白 (embryonic ectoderm development, EED)

与 *Zeste* 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 之间的相互作用可促进癌细胞的增殖, WD40 重复蛋白 5 (WD40 repeat protein 5, WDR5) 与混合谱系白血病 1 蛋白 (mixed lineage leukemia 1, MLL1) 之间相互作用与急性白血病的发生密切相关^[93-94]。因此, 开发靶向蛋白-蛋白相互作用界面的抑制剂在疾病研究领域至关重要。但是与传统的单一靶点相比, 蛋白-蛋白相互作用界面具有大而平坦且疏水的特点, 是高选择性小分子抑制剂的发现和开发过程中需要面临的问题^[95]。目前已报道了多个成功靶向蛋白-蛋白相互作用界面如 EED-EZH2、MLL-WDR5、鼠双微粒体 2 (murine double minute 2, MDM2)-p53、B 细胞淋巴瘤 (B cell lymphoma, BCL-2)-B 细胞淋巴瘤相关 X 蛋白 (B cell lymphoma associated X protein, Bax)、表面抗原分化簇 4 (cluster of differentiation 4, CD4)-糖蛋白 120 (glycoprotein 120, gp120)、RAS-RAF 和 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1)-核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, NRF2) 等开发抑制剂的案例, 部分代表性抑制剂如表 3 所示。

表 3 蛋白-蛋白相互作用策略相关靶点研究现状

Table 3 Current status of research on targets with protein-protein interaction strategy

靶点	化合物	活性 / (nmol · L ⁻¹)	作用机制	研发状态
EZH2-EED	astemizole (20)	IC ₅₀ =93 800	通过使 PRC2 复合体失效来抑制 PRC2 驱动的淋巴瘤的增殖	临床前
	EED226 (21)	IC ₅₀ =23.4	直接结合到 EED 的 H3K27me3 结合口袋导致 PRC2 活性丧失	临床前
	A-395 (22)	IC ₅₀ =90	结合于 EED 的 H3K27me3 结合位点, 从而抑制了 PRC2 复合物的形成和激活	临床前
MLL1-WDR5	MM-101 (23)	IC ₅₀ =2.9	特异性抑制含有 MLL1 融合蛋白的白血病细胞的生长并诱导细胞凋亡	临床前
	OICR-9429 (24)	K _d =93	选择性地抑制 p30 表达的人 AML 细胞的增殖并诱导分化	临床前
	WDR5-47 (25)	IC ₅₀ =300	占据 WDR5 结合口袋的中心空腔而干扰 WDR5-MLL1 的相互作用来抑制 H3K4 甲基转移酶活性	临床前
	MM-401 (26)	IC ₅₀ =0.9	抑制 MLL1 甲基转移酶活性, 诱导细胞周期阻滞、凋亡和髓样分化	临床前

EED: embryonic ectoderm development (胚胎外胚层发育蛋白); EZH2: enhancer of zeste homolog 2 (Zeste 基因增强子同源物 2); WDR5: WD40 repeat protein 5 (WD40 重复蛋白 5); MLL1: mixed lineage leukemia 1 (混合谱系白血病 1); PRC2: polycomb repressive complex 2 (多梳抑制复合体 2); H3K27me3: trimethylated lysine 27 of histone H3 (组蛋白 H3 赖氨酸 27 三甲基化酶); AML: acute myeloid leukemia (急性髓系白血病)

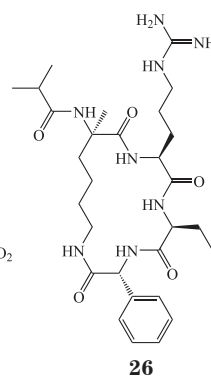
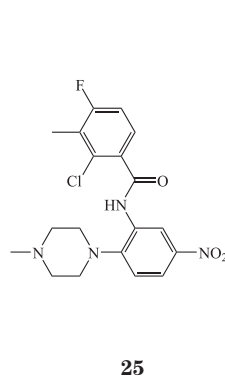
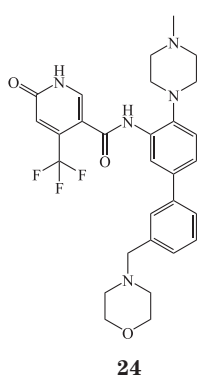
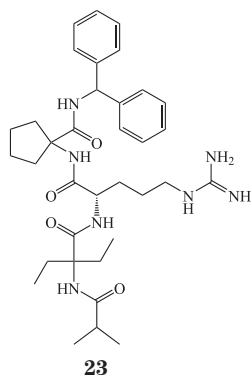
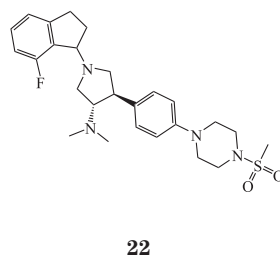
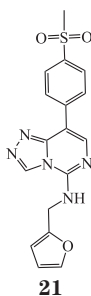
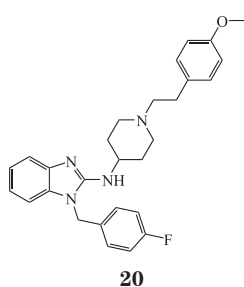
3.1 靶向胚胎外胚层发育蛋白与 *Zeste* 基因增强子同源物 2 的相互作用研究现状

多梳抑制复合体 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 由 3 个核心亚基 EZH2、EED 和 *Zeste 12*

基因抑制因子 (suppressor of zeste 12, SUZ12) 组成, 在转录调控、细胞周期、衰老和细胞分化等过程中发挥着关键作用^[96]。通过催化亚基 EZH2 和 EED 之间的蛋白-蛋白相互作用, PRC2 可通过调控

H3K27me3 的甲基化调节染色质的结构和转录抑制^[97]。PRC2 的异常活化与癌症的发生发展密切相关, 是潜在的表观遗传癌症治疗靶点^[98]。抑制 EZH2 和 EED 之间的相互作用可使 PRC2 复合物失去活力, 通过抑制癌细胞的增殖而达到治疗癌症的目的^[93]。近几年报道的靶向 EZH2-EED 之间相互作用界面的高效、高选择性的小分子抑制剂主要有 astemizole、EED226 和 A-395^[96-97, 99]。研究表明, astemizole

可通过干扰 EZH2 和 EED 之间的相互作用而破坏 PRC2 复合物的稳定性, 进而影响其甲基转移酶活性而抑制 PRC2 驱动的淋巴瘤细胞的增殖^[97]。结构研究表明, 抑制剂 A-395 和 EED226 通过直接结合到 EED 的 H3K27me3 结合口袋而阻止 PRC2 的活化^[96, 99]。这些抑制剂的发现为进一步开发更高效且高选择性的 PRC2 抑制剂奠定了基础。



3.2 靶向混合谱系白血病 1 蛋白与 WD40 重复蛋白 5 的相互作用研究现状

MLL1 是一种组蛋白 H3K4 甲基转移酶, WDR5 是激活 MLL1 酶活性所必需的多蛋白复合物的重要组成部分。MLL1 与 WDR5 的相互作用在急性淋巴细胞系白血病 (acute lymphoid leukemia, ALL) 和 AML 的发展中发挥着重要作用, 因此靶向 MLL1 蛋白或 MLL1 与 WDR5 蛋白-蛋白相互作用界面开发抑制剂为急性白血病的治疗提供了机会^[100]。近几年报道的作用于 MLL1-WDR5 蛋白-蛋白相互作用界面的抑制剂主要有拟肽类抑制剂如 MM-101 及其衍生物和小分子抑制剂如 OICR-9429 和 WDR5-47 等^[101-102]。拟肽类抑制剂 MM-101 和 MM-401 可通过模拟 MLL1 与 WDR5 的结合模式而抑制 MLL1 的 H3K4 甲基转移酶活性, 为进一步开发更有效的混

合谱系白血病药物奠定了基础^[100, 103]。高亲和力和高选择性小分子抑制剂 OICR-9429 可通过与 WDR5 直接结合, 竞争性地破坏 MLL1 与 WDR5 之间的相互作用。由于 WDR5 参与 p30 诱导的自我更新和白血病发生, OICR-9429 可选择性地抑制 p30 表达的人白血病细胞的增殖和分化, 因此其对白血病的治疗发挥着重要作用^[104]。此外, 相对分子质量较低的小分子拮抗剂 WDR5-47 也对 WDR5 具有中等的亲和力, 可通过占据 WDR5 结合口袋的中心空腔而强效地抑制 MLL1 与 WDR5 之间的相互作用, 该化合物的发现为进一步设计优化较高亲和力的化合物提供了结构骨架^[105]。

4 结语与展望

近年来, 靶向蛋白的非催化功能开发抑制剂受

到广泛关注, 诸多成功案例已被报道, 为该类抑制剂在相关疾病领域的临床应用奠定了基础。蛋白非催化结构域策略通过靶向蛋白的非催化结构域开发抑制剂来达到治疗效果; 变构调控策略是通过靶向蛋白的变构位点进行新药研发; 蛋白-蛋白相互作用策略则是通过靶向蛋白-蛋白相互作用界面开发高选择性的小分子抑制剂。3种靶向蛋白非催化功能的药物开发新策略在药物研究领域均具有广阔的前景, 但仍存在不足之处。目前针对蛋白非催化结构域的药物开发仍在临床前初期研究阶段, 缺乏深入的药理学、活性机制、毒性和成药性等临床前评价研究。相比于活性位点抑制剂, 针对变构位点的抑制剂具有更高的选择性以及较低的毒性、脱靶毒性和更低的剂量要求^[106-107]。但是由于变构位点相比正构位

点具有更低的进化压力, 变构位点发生耐药突变的机会增加, 变构药物面临着耐药性的挑战。因此研究变构调节策略中的耐药突变机制对于解决这一挑战具有重要的意义^[107]。由于蛋白质-蛋白质界面大且平坦, 获得高活性靶向蛋白相互作用的小分子抑制剂在新药研发领域仍具有一定的挑战^[108]。此外, 靶蛋白非催化功能的作用机制及其靶向开发策略等领域的研究仍相对较少, 在一定程度上限制了非催化功能抑制剂的开发。因此, 开发针对靶蛋白非催化功能的抑制剂设计策略、深入探究该类抑制剂的作用机制等是该领域重要的研究方向。总的来说, 非催化功能抑制剂在疾病领域具有非常大的潜力, 靶向非催化功能的抑制剂的开发是药物研发领域的重要研究方向, 有望在未来几年取得突破进展。

【参考文献】

- [1] Mace P D, Murphy J M. There's more to death than life: non-catalytic functions in kinase and pseudokinase signaling[J/OL]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100705[2021-08-01]. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100705>.
- [2] Lee D H, Kim G W, Jeon Y H, *et al*. Advances in histone demethylase KDM4 as cancer therapeutic targets[J]. *FASEB J*, 2020, 34(3): 3461–3484.
- [3] Umana-Diaz C, Pichol-Thievend C, Marchand M F, *et al*. Scavenger receptor cysteine-rich domains of lysyl oxidase-like2 regulate endothelial ECM and angiogenesis through non-catalytic scaffolding mechanisms[J/OL]. *Matrix Biol*, 2020, 88: 33–52[2021-08-01]. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.11.003>.
- [4] Chen C, Nott T J, Jin J, *et al*. Deciphering arginine methylation: tudor tells the tale[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(10): 629–642.
- [5] Pek J W, Anand A, Kai T. Tudor domain proteins in development[J]. *Development*, 2012, 139(13): 2255–2266.
- [6] Upadhyay A K, Judge R A, Li L M, *et al*. Targeting lysine specific demethylase 4A (KDM4A) tandem TUDOR domain—a fragment based approach[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(10): 1708–1713.
- [7] Powell L E, Foster P A. Protein disulphide isomerase inhibition as a potential cancer therapeutic strategy[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(8): 2812–2825.
- [8] Golubovskaya V M, Nyberg C, Zheng M, *et al*. A small molecule inhibitor, 1, 2, 4, 5-benzenetetraamine tetrahydrochloride, targeting the Y397 site of focal adhesion kinase decreases tumor growth[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(23): 7405–7416.
- [9] Chen Z Z, Zang J Y, Kappler J, *et al*. Structural basis of the recognition of a methylated histone tail by JMJD2A[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(26): 10818–10823.
- [10] Couture J F, Collazo E, Ortiz-Tello P A, *et al*. Specificity and mechanism of JMJD2A, a trimethyllysine-specific histone demethylase[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(8): 689–695.
- [11] Klose R J, Kallin E M, Zhang Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation[J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(9): 715–727.
- [12] Ng S S, Kavanagh K L, McDonough M A, *et al*. Crystal structures of histone demethylase JMJD2A reveal basis for substrate specificity[J]. *Nature*, 2007, 448(7149): 87–91.
- [13] Labbé R M, Holowatyj A, Yang Z Q. Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4: structures, functions and therapeutic potential[J]. *Am J Transl Res*, 2013, 6(1): 1–15.
- [14] Ye Q, Holowatyj A, Wu J, *et al*. Genetic alterations of KDM4 subfamily and therapeutic effect of novel demethylase inhibitor in breast cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(4): 1519–1530.
- [15] Young L C, Hendzel M J. The oncogenic potential of Jumonji D2 (JMJD2/KDM4) histone demethylase overexpression[J]. *Biochem Cell Biol*, 2013, 91(6): 369–377.
- [16] Itoh Y, Suzuki T, Miyata N. Small-molecular modulators of cancer-associated epigenetic mechanisms[J]. *Mol Biosyst*, 2013, 9(5): 873–

- 896.
- [17] Maes T, Carceller E, Salas J. Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors[J/OL]. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, 23: 52–60[2021-08-01]. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.009>.
- [18] Wagner E K, Nath N, Flemming R. Identification and characterization of small molecule inhibitors of a plant homeodomain finger[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(41): 8293–8306.
- [19] Upadhyay A K, Judge R A, Li L M, *et al*. Targeting lysine specific demethylase 4A (KDM4A) tandem TUDOR domain—a fragment based approach[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(10): 1708–1713.
- [20] Shanthi E, Krishna M H, Arunesh G M, *et al*. Focal adhesion kinase inhibitors in the treatment of metastatic cancer: a patent review[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2014, 24(10): 1077–1100.
- [21] Liu G H, Guibao C D, Zheng J, *et al*. Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(8): 2751–2760.
- [22] Lietha D, Cai X M, Ceccarelli D F J, *et al*. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase[J]. *Cell*, 2007, 129(6): 1177–1187.
- [23] Ma W W. Development of focal adhesion kinase inhibitors in cancer therapy[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11(7): 638–642.
- [24] Mitra S K, Hanson D A, Schlaepfer D D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(1): 56–68.
- [25] Slack-Davis J K, Martin K H, Tilghman R W, *et al*. Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(20): 14845–14852.
- [26] Cance W G, Kurenova E, Marlowe T, *et al*. Disrupting the scaffold to improve focal adhesion kinase–targeted cancer therapeutics[J/OL]. *Sci Signal*, 2013, 6(268): pe10[2021-08-01]. <https://www.science.org/doi/full/10.1126/scisignal.2004021>.
- [27] Golubovskaya V M. Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials[J/OL]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014, 19: 687–706[2021-08-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952878/>.
- [28] Liu X E, Sun X D, Wu J M. Expression and significance of VEGF-C and FLT-4 in gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(3): 352–355.
- [29] Nishida N, Yano H, Komai K, *et al*. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma[J]. *Cancer*, 2004, 101(6): 1364–1374.
- [30] Kurenova E V, Hunt D L, He D H, *et al*. Small molecule chloropyramine hydrochloride (C4) targets the binding site of focal adhesion kinase and vascular endothelial growth factor receptor 3 and suppresses breast cancer growth *in vivo*[J]. *J Med Chem*, 2009, 52(15): 4716–4724.
- [31] Cole K S, Grandjean J M D, Chen K, *et al*. Characterization of an A-site selective protein disulfide isomerase A1 inhibitor[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(13): 2035–2043.
- [32] Khodier C, VerPlank L, Nag P P, *et al*. Identification of ML359 as a small molecule inhibitor of protein disulfide isomerase[M//]. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US), 2014.
- [33] Jasuja R, Passam F H, Kennedy D R, *et al*. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(6): 2104–2113.
- [34] Xu S L, Liu Y J, Yang K, *et al*. Inhibition of protein disulfide isomerase in glioblastoma causes marked downregulation of DNA repair and DNA damage response genes[J]. *Theranostics*, 2019, 9(8): 2282–2298.
- [35] Shen A. Allosteric regulation of protease activity by small molecules[J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(8): 1431–1443.
- [36] Lu S Y, Qiu Y, Ni D, *et al*. Emergence of allosteric drug-resistance mutations: new challenges for allosteric drug discovery[J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(1): 177–184.
- [37] Yun J. Allosteric AKT inhibitors as a targeted cancer therapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(7): 504–506.
- [38] Wiesmann C, Barr K J, Kung J, *et al*. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(8): 730–737.
- [39] Adrián F J, Ding Q, Sim T. Allosteric inhibitors of BCR-ABL-dependent cell proliferation[J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(2): 95–102.
- [40] Wu J W, Zhang H, Zhao G L, *et al*. Allosteric inhibitors of SHP2: an updated patent review (2015–2020)[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(19): 3825–3842.
- [41] Yuan X R, Bu H, Zhou J P, *et al*. Recent advances of SHP2 inhibitors in cancer therapy: current development and clinical application[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(20): 11368–11396.
- [42] Song Y H, Zhao M, Zhang H Q, *et al*. Double-edged roles of protein

- tyrosine phosphatase SHP2 in cancer and its inhibitors in clinical trials[J/OL]. *Pharmacol Ther*, 2021: 107966[2021-08-01]. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107966>.
- [43] Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, *et al*. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2[J]. *Cell*, 1998, 92(4): 441–450.
- [44] Chen Y N P, LaMarche M J, Chan H M, *et al*. Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 148–152.
- [45] Sun X, Ren Y, Gunawan S, *et al*. Selective inhibition of leukemia-associated SHP2^{E69K} mutant by the allosteric SHP2 inhibitor SHP099[J]. *Leukemia*, 2018, 32(5): 1246–1249.
- [46] Chan G, Kalaitzidis D, Neel B G. The tyrosine phosphatase SHP2 (PTPN11) in cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27(2): 179–192.
- [47] Zhang J, Zhang F, Niu R F. Functions of SHP2 in cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(9): 2075–2083.
- [48] Rehman A U, Rahman M U, Khan M T. The landscape of protein tyrosine phosphatase (SHP2) and cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(32): 3767–3777.
- [49] Song Y H, Zhao M, Wu Y H, *et al*. A multifunctional cross-validation high-throughput screening protocol enabling the discovery of new SHP2 inhibitors[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(3): 750–762.
- [50] Hellmuth K, Grosskopf S, Lum C T, *et al*. Specific inhibitors of the protein tyrosine phosphatase SHP2 identified by high-throughput docking[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(20): 7275–7280.
- [51] Grosskopf S, Eckert C, Arkona C, *et al*. Selective inhibitors of the protein tyrosine phosphatase SHP2 block cellular motility and growth of cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *ChemMedChem*, 2015, 10(5): 815–826.
- [52] Liu S J, Yu Z H, Yu X, *et al*. SHP2 is a target of the immunosuppressant tautomycin[J]. *Chem Biol*, 2011, 18(1): 101–110.
- [53] Carr G, Berrue F, Klaiiklay S, *et al*. Natural products with protein tyrosine phosphatase inhibitory activity[J]. *Methods*, 2014, 65(2): 229–238.
- [54] Liu W, Yu B, Xu G, *et al*. Identification of cryptotanshinone as an inhibitor of oncogenic protein tyrosine phosphatase SHP2 (PTPN11) [J]. *J Med Chem*, 2013, 56(18): 7212–7221.
- [55] Liu D P, Kong G P, Chen Q C, *et al*. Fatty acids as natural specific inhibitors of the proto-oncogenic protein SHP2[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(22): 6833–6837.
- [56] Zeng L F, Zhang R Y, Yu Z H, *et al*. Therapeutic potential of targeting the oncogenic SHP2 phosphatase[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(15): 6594–6609.
- [57] Chen L W, Sung S S, Yip M L R, *et al*. Discovery of a novel SHP2 protein tyrosine phosphatase inhibitor[J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(2): 562–570.
- [58] Flemming A. Allosteric phosphatase inhibitor puts brake on cancer cells[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(8): 530–531.
- [59] Zhang X, He Y T, Liu S J, *et al*. Salicylic acid based small molecule inhibitor for the oncogenic Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP2)[J]. *J Med Chem*, 2010, 53(6): 2482–2493.
- [60] He R J, Yu Z H, Zhang R Y, *et al*. Exploring the existing drug space for novel pTyr mimetic and SHP2 inhibitors[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 6(7): 782–786.
- [61] Yuan X R, Bu H, Zhou J P, *et al*. Recent advances of SHP2 inhibitors in cancer therapy: current development and clinical application[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(20): 11368–11396.
- [62] Song Y H, Zhao M, Wu Y H, *et al*. A multifunctional cross-validation high-throughput screening protocol enabling the discovery of new SHP2 inhibitors[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(3): 750–762.
- [63] Wang J, Zhang L, Pratilas C A, *et al*. SHP2 inhibition as a promising anti-cancer therapy: function in tumor cell signaling and immune modulation[J]. *J Cancer Immunol*, 2021, 3(1): 18–29.
- [64] LaMarche M J, Acker M, Argintaru A, *et al*. Identification of TNO155, an allosteric SHP2 inhibitor for the treatment of cancer[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(22): 13578–13594.
- [65] Liu C, Lu H Y, Wang H Y, *et al*. Combinations with allosteric SHP2 inhibitor TNO155 to block receptor tyrosine kinase signaling[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(1): 342–354.
- [66] Sun Y T, Meyers B A, Czako B, *et al*. Allosteric SHP2 inhibitor, IACS-13909, overcomes EGFR-dependent and EGFR-independent resistance mechanisms toward osimertinib[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(21): 4840–4853.
- [67] Lindsley C W, Barnett S F, Layton M E, *et al*. The PI3K/Akt pathway: recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(1): 7–18.
- [68] Yun J. Allosteric AKT inhibitors as a targeted cancer therapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(7): 504–506.
- [69] Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT

- pathway in human cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7): 489–501.
- [70] Hanada M, Feng J H, Hemmings B A. Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1697(1/2): 3–16.
- [71] Lu S Y, Zhang J. Designed covalent allosteric modulators: an emerging paradigm in drug discovery[J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(2): 447–453.
- [72] Lazaro G, Kostaras E, Vivanco I. Inhibitors in AKTion: ATP-competitive vs allosteric[J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48(3): 933–943.
- [73] Tolcher A, Yap T, Fearen I, et al. A phase I study of MK-2206, an oral potent allosteric Akt inhibitor (Akti), in patients (pts) with advanced solid tumor (ST)[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(Suppl 15): 3503–3503.
- [74] Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, et al. MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs *in vitro* and *in vivo*[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(7): 1956–1967.
- [75] Yap T A, Yan L, Patnaik A, et al. First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(35): 4688–4695.
- [76] Tolcher A, Harb W, Sachdev J, et al. Results from a phase 1 study of ARQ 092, a novel pan AKT-inhibitor, in subjects with advanced solid tumors or recurrent malignant lymphoma[J/OL]. *Eur J Cancer*, 2015, 51: S66[2021-08-01]. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(16\)30201-5](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(16)30201-5).
- [77] Yu Y, Savage R E, Eathiraj S, et al. Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT pathway with an allosteric AKT inhibitor, ARQ 092[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140479[2021-08-01]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140479>.
- [78] Politz O, Siegel F, Bärfacker L, et al. BAY 1125976, a selective allosteric AKT1/2 inhibitor, exhibits high efficacy on AKT signaling-dependent tumor growth in mouse models[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(2): 449–459.
- [79] Schneeweiss A, Hess D, Joerger M, et al. Phase 1 dose escalation study of the allosteric AKT inhibitor bay 1125976 in advanced solid cancer-lack of association between activating AKT mutation and AKT inhibition-derived efficacy[J/OL]. *Cancers*, 2019, 11(12): 1987[2021-08-01]. <https://doi.org/10.3390/cancers11121987>.
- [80] Sawyers C L. Signal transduction pathways involved in BCR-ABL transformation[J]. *Baillieres Clin Haematol*, 1997, 10(2): 223–231.
- [81] Saleh T, Rossi P, Kalodimos C G. Atomic view of the energy landscape in the allosteric regulation of Abl kinase[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(11): 893–901.
- [82] Cilloni D, Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(4): 930–937.
- [83] Lu X Y, Cai Q, Ding K. Recent developments in the third generation inhibitors of Bcr-Abl for overriding T315I mutation[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(14): 2146–2157.
- [84] Quintás-Cardama A. Experimental non-ATP-competitive therapies for chronic myelogenous leukemia[J]. *Leukemia*, 2008, 22(5): 932–940.
- [85] Schenone S, Bruno O, Radi M, et al. New insights into small-molecule inhibitors of Bcr-Abl[J]. *Med Res Rev*, 2011, 31(1): 1–41.
- [86] Weisberg E, Manley P W, Cowan-Jacob S W, et al. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(5): 345–356.
- [87] Gumireddy K, Baker S J, Cosenza S C, et al. A non-ATP-competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(6): 1992–1997.
- [88] Fabbro D, Manley P W, Jahnke W, et al. Inhibitors of the Abl kinase directed at either the ATP-or myristate-binding site[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804(3): 454–462.
- [89] Zhang J M, Adrián F J, Jahnke W, et al. Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors[J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 501–506.
- [90] Cortes J E, Talpaz M, Kantarjian H M, et al. A phase 1 study of DCC-2036, a novel oral inhibitor of BCR-ABL kinase, in patients with Philadelphia chromosome positive (Ph⁺) leukemias including patients with T315I mutation[J/OL]. *Blood*, 2011, 118(21): 601[2021-08-01]. <http://doi.org/10.1182/blood.V118.21.601.601>.
- [91] Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Rezaei-Tavirani M, et al. Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases[J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2014, 7(1): 17–31.
- [92] Ryan D P, Matthews J M. Protein-protein interactions in human disease[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, 15(4): 441–446.
- [93] Chamberlain S J, Yee D, Magnuson T. Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(6): 1496–1505.
- [94] Li D D, Chen W L, Xu X L, et al. Structure-based design and synthesis of small molecular inhibitors disturbing the interaction of MLL1-WDR5[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2016, 118: 1–8[2021-08-01]. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.032>.
- [95] Ni D, Lu S, Zhang J. Emerging roles of allosteric modulators in the

- regulation of protein-protein interactions (PPIs): a new paradigm for PPI drug discovery[J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(6): 2314–2342.
- [96] Qi W, Zhao K H, Gu J, *et al*. An allosteric PRC2 inhibitor targeting the H3K27me3 binding pocket of EED[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(4): 381–388.
- [97] Kong X Q, Chen L M, Jiao L Y, *et al*. Astemizole arrests the proliferation of cancer cells by disrupting the EZH2-EED interaction of polycomb repressive complex 2[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(22): 9512–9521.
- [98] Chang C J, Hung M C. The role of EZH2 in tumour progression[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(2): 243–247.
- [99] He Y P, Selvaraju S, Curtin M L, *et al*. The EED protein-protein interaction inhibitor A-395 inactivates the PRC2 complex[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(4): 389–395.
- [100] Karatas H, Townsend E C, Cao F, *et al*. High-affinity, small-molecule peptidomimetic inhibitors of MLL1/WDR5 protein-protein interaction[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(2): 669–682.
- [101] Getlik M, Smil D, Zepeda-Velázquez C, *et al*. Structure-based optimization of a small molecule antagonist of the interaction between WD repeat-containing protein 5 (WDR5) and mixed-lineage leukemia 1 (MLL1)[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(6): 2478–2496.
- [102] Li D D, Chen W L, Wang Z H, *et al*. High-affinity small molecular blockers of mixed lineage leukemia 1 (MLL1)-WDR5 interaction inhibit MLL1 complex H3K4 methyltransferase activity[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2016, 124: 480–489[2021-08-01]. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.036>.
- [103] Cao F, Townsend E C, Karatas H, *et al*. Targeting MLL1 H3K4 methyltransferase activity in mixed-lineage leukemia[J]. *Mol Cell*, 2014, 53(2): 247–261.
- [104] Grebien F, Vedadi M, Getlik M, *et al*. Pharmacological targeting of the WDR5-MLL interaction in C/EBPα N-terminal leukemia[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(8): 571–578.
- [105] Li D D, Chen W L, Xu X L, *et al*. Structure-based design and synthesis of small molecular inhibitors disturbing the interaction of MLL1-WDR5[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2016, 118: 1–8[2021-08-01]. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.032>.
- [106] Shen A. Allosteric regulation of protease activity by small molecules[J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(8): 1431–1443.
- [107] Lu S Y, Qiu Y, Ni D, *et al*. Emergence of allosteric drug-resistance mutations: new challenges for allosteric drug discovery[J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(1): 177–184.
- [108] Veselovsky A V, Archakov A I. Inhibitors of protein-protein interactions as potential drugs[J]. *Curr Comput-Aid Drug Des*, 2007, 3(1): 51–58.



药学学报及《药学进展》等专题编辑。

【本期栏目主编】余斌：郑州大学药学院教授，博士生导师。研究方向：原创先导化合物发现。近年来，以通讯作者身份在权威学术期刊 *J Med Chem*、*Pharmacol Ther*、*Drug Discov Today*、*J Hematol Oncol* 等发表 80 余篇论文，累计被引用 3 200 余次，H-index 为 31；参编英文学术专著 2 部，获授权国家发明专利 10 项；主持国家自然科学基金面上 / 青年科学基金项目、河南省优秀青年科学基金、河南省高校科技创新人才支持计划、郑州大学青年人才创新团队支持计划 / 青年拔尖人才等；担任国际生物医学领域重要学术论文评估机构 Faculty Opinions (原 F1000 Prime) 的 Faculty Member，河南省药学会药物化学专业委员会常务委员，国际期刊 *Front Drug Discov* 副主编，*Curr Med Chem* 的 Section Editor，《药学学报》、《中国化学快报》及《中国天然药物》等期刊青年编委，国内外权威学术期刊 *Drug Discov Today*、*Eur J Med Chem*、*Pharmacol Res*、《药



【专家介绍】宋宜辉：郑州大学药学院副教授，硕士生导师。研究方向：基于结构生物学的抗肿瘤药物发现。以第一作者和通讯作者身份在 *Pharmacol Ther*、*J Med Chem*、*Acta Pharm Sin B*、*Drug Discov Today*、*J Hematol Oncol* 和 *Eur J Med Chem* 等权威学术期刊发表论文多篇。申请国家发明专利 3 项。主持国家自然科学基金青年基金项目和博士后科学基金面上项目各 1 项，省部级项目 2 项，横向项目 1 项。担任国际期刊 *Front Drug Discov* 编委。