

## • 专家论坛 •

## 例解生物学驱动的药物设计

郭宗儒\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 药理活性和成药性原则上取决于药物的微观结构和宏观性质, 这些都寓于分子结构之中。药物化学将活性化合物演化成药物, 是将二者融合一起, 优化而得。融合操作既可以是内在的结构体现, 也可以是外在的片段连接。新世纪以来的生物学进展为此提供了许多切入点, 例如人源化单克隆抗体、蛋白酶体-泛素系统、变构调节、天然大环化合物、结构生物学等。本文以上市的或处于临床试验的药物研发要点, 尝试解析生物学驱动的研发理念。

**关键词:** 生物学驱动药物创新; 抗体偶联药物; 变构抑制剂; 蛋白裂解靶向嵌合体; 大环小分子药物

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)08-1707-19

## Examples of biology-driven drug design

GUO Zong-ru\*

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

**Abstract:** Pharmacological activity and drug likeness depend in principle upon the microscopic structure and macroscopic properties of drugs, which reside in their molecular structures. By means of medicinal chemistry the evolution of an active compound to a novel drug (NME) essentially makes the two pillars coexistence in one chemical structure, which either could merge as an intrinsic structure or connect from external fragments to each other with covalent bonds. Since the new millennium the advance in biology provides several knowledge and technologies, for example humanized monoclonal antibody, proteasome-ubiquitin system, allosteric modulation, natural macromolecules, structural biology, etc., for innovation of novel medicines. Taking several examples on marketed drugs or drug candidates in clinical trials, this article tries to concisely illustrate R & D conception of biology-driven drug design.

**Key words:** biology-driven drug innovation; antibody drug conjugate; allosteric inhibitor; proteolysis targeting chimera; macrocyclic small molecule drug

## 1 引言

21世纪第二个10年已经过去, 这是一个医药生物技术巨足进展的10年。尤其体现在基因和细胞疗法、RNA干扰(RNAi)、反义寡核苷酸(ASO)、双特异抗体(BsAb)、抗体偶联药物(ADC)等药物和疗法相继的批准应用, 标志这些技术的成熟; 基因编辑(CRISPR)和蛋白裂解靶向嵌合体(PROTAC)也进入临床试验阶段, 预示着治疗学上的颠覆性变革。

与此同时, 生物学也助力了小分子药物研究, 在仍

以小分子药物治疗为主要手段的当今, 无论在靶标的发现和确证, 或是药物分子的结构建造, 生物学已成为研发的引擎和推动力, 单纯靠化学概念的药物研发已鲜有所见。

以靶标为核心的药物创制, 要旨是构建化学结构, 经过多层次的概念验证, 获得治疗上的新分子实体(NME), 在这当中离不开生物学的指导和参与。本文从药物化学的视角, 结合以本世纪小分子药物成功创制的实践, 挂一漏万地解析生物学在研发和优化药物结构的某些指导性特征。先导化合物演化成药物的过程是结构优化, 是将药理活性(强度和选择性)和成药性

收稿日期: 2020-02-26; 修回日期: 2020-03-12.

\*通讯作者 Tel: 86-10-83155752, E-mail: zrguo@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0182

(安全性和药代等)的全部要素融合到结构之中,融合过程可以从化合物的微观结构和宏观性质加以解析。

## 2 药物的微观结构和宏观性质

### 2.1 微观结构的核心作用

药物与靶标的结合(靶向)产生药效,与非靶结合(脱靶)产生不良反应,都是药物分子的特定原子、基团或片段与靶向/脱靶的生物大分子的特定部位发生相互作用,是双方的微观结构在空间的形状、电性、疏水性、氢键和范德华作用的互补性所致,所以,产生的药效和不良反应是由特异性的微观结构作决定,是药物的个性表现。

### 2.2 宏观性质的承载作用

药物的成药性包含有安全性(微观结构所决定)、药代性质(体内的吸收、分布、代谢、排泄)和物理化学性质(溶解性和过膜性等),这些因素赋予并保障药物分子在适宜的时间和空间发挥作用,除代谢转化有一定的微观结构因素外,主要由分子的整体性质所决定,包括分子大小、 $pK_a$ 、溶解性、分配系数(过膜性)、荷电性和极性表面积等。宏观性质在相当大的程度上不拘泥细微结构的差异。药物在体内的I相和II相代谢的化学处置,介于微观结构与宏观性质之间,例如CYP氧化酶的众多亚型反映了这种特征。

## 3 基于微观结构的优化与调整

### 3.1 杂泛性分子的功能变换

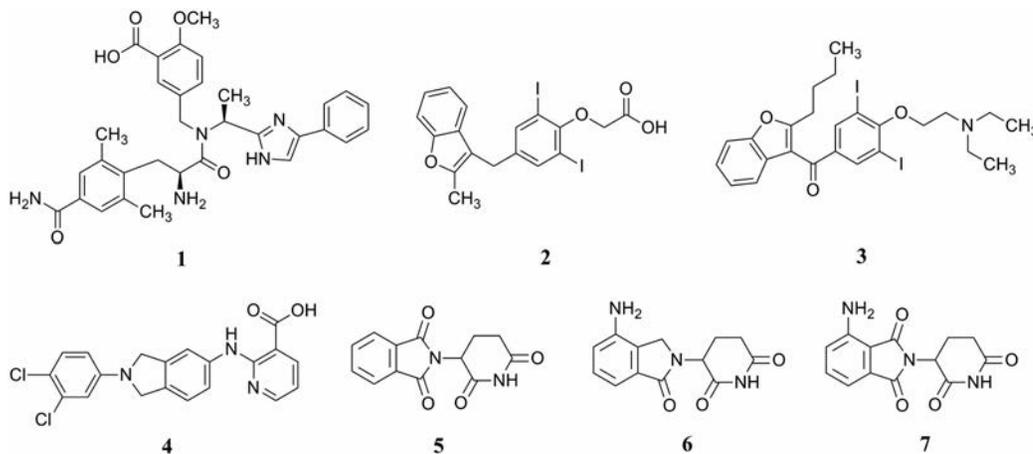
应用反向思维的思考方式处置化合物的杂泛性,或对受体多样性功能的转轨变换,应是创新的一种指导策略。要旨是不以常规思维作习惯的从众趋向,而是逆向思考和处理,将杂泛性作非常规的扬弃,为创制新药另辟蹊径。

2015年上市的口服治疗腹泻型肠易激综合征药物依卢多啉(**1**, eluxadoline),是从激动阿片受体的功能出发的,按照常规思维,激动阿片受体常以止痛为目标,而便秘和成瘾性等不良反应属避免消除之列。逆

向思维则是扬弃作用于中枢的止痛,利用使肠道蠕动减弱的作用,治疗腹泻型肠易激综合征,同时也不进入中枢,避免成瘾性。**1**从内源性物质内啡肽出发,消除肽的骨架结构,保留对 $\mu$ 受体激动但阻断 $\delta$ 受体的功能,从而消除了进入中枢的止痛和成瘾作用,只作用于肠黏膜的受体,不希望吸收进入循环血,只穿肠而过。事实上,**1**有较高的分子量( $MW = 570$ ),结构中含有脂肪氨基和芳香羧基,形成两性离子,降低了过膜性,都是减少吸收和中枢分布的因素,满足了作用于肠黏膜细胞的局部作用,成为只作用于肠道阿片受体,而无脱靶的止痛和成瘾性<sup>[1]</sup>。

人体I型ether-a-go-go相关基因(hERG1)的钾通道是心脏正常动作电位去极化作用的重要元件,对hERG1的抑制可引起心电图Q-T波延长,导致心源性猝死,因而成为评价新药安全性的重要内容—避免对hERG1的抑制作用。倘若逆向思维,激动hERG1钾通道,则可成为治疗Q-T波延长的疾病。关键之点是使激动作用有适宜的强度,只控制到正常化,而不引起心室的复极化过于短促,导致心律失常<sup>[2]</sup>。例如KB130015(**2**)是由胺碘酮(**3**, amiodarone)改构得来的,将抗心律失常药物的钾通道阻滞剂转变为hERG1钾通道激动剂<sup>[3]</sup>。PD-307243(**4**)可增加hERG离子流,显著降低hERG的去极化作用<sup>[4]</sup>。这几个候选化合物未获准上市。

沙利度胺(**5**, thalidomide)是20世纪60年代研发的镇静药,用于孕妇早期呕吐,却引起胎儿严重畸形而臭名昭著。后来发现**5**具有增强T细胞和介导杀伤细胞的免疫作用,抑制单核细胞促炎性细胞因子的生成(如TNF- $\alpha$ 和IL-6),理应毁誉参半。但数十年来人们的惯性思维对这些潜在功能却熟视无睹,直到2005年新基公司研发了类似物来那度胺(**6**, lenalidomide),作为免疫调节和抗血管生成的抗肿瘤药上市<sup>[5]</sup>。又于2012年上市了泊马度胺(**7**, pomalidomide),治疗多发性骨髓瘤。晚近发现**6**和**7**与泛素连接酶E3 cereblon



有强力结合作用,因而成为研制 PROTAC 的重要组成元件,关于 PROTAC 将于后面讨论<sup>[6]</sup>。

### 3.2 共价键药物的复兴

1947年,用氮芥治疗白血病开启了科学意义上的共价结合的药物治疗,但伴随的严重不良反应是因为氮芥的强亲电性和无选择性所致,与体内广泛存在的亲核性物质作无差别的烷基化,致使业界对共价结合药物的强烈成见,长时间来回避研制共价键型的药物。

21世纪以来共价结合的药物复苏,归功于结构生物学揭示靶标的微观结构特征,得以在适宜的位置用适度的亲电性基团共价结合于重要的亲核性元件,因而在强度和部位上避免脱靶性,提高选择性的不可逆抑制。迈克尔加合基团在多种激酶抑制剂中出现,其弱亲电性只与半胱氨酸的强亲核性的巯基发生共价结合,已有不少的成功药物上市。

例如2013年上市的伊布替尼(**8**, ibrutinib)是布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)的不可逆抑制剂,定位于激酶的ATP结合腔,丙烯酰胺作为弱亲电型加成基团,与酶的Cys481相处在范德华半径内,同巯基发生迈克尔加成,形成不可逆的共价键结合,**8**临床治疗与B淋巴细胞相关的套细胞白血病等<sup>[7]</sup>。作用于BTK的第二代阿可替尼(**9**, acalabritinib)也是共价结合型药物,丁炔酰

胺为共价结合基团<sup>[8]</sup>。我国百济神州研制的泽布替尼(**10**, zanubrutinib)也是BTK不可逆抑制剂,于2019年美国FDA批准上市,口服治疗与B细胞相关的多种癌症<sup>[9]</sup>。图1是伊布替尼(绿色)和泽布替尼(紫色)的复合物晶体结构的叠合图,可以看出分子的取向和迈克尔基团与Cys481的位置是相近的。

除不饱和酰胺作为共价键结合基团外,还有其他类型共价结合的药物,如抗丙肝药物波普瑞韦(**11**, baceprevir)和替拉匹韦(**12**, telaprevir),是含有 $\alpha$ 酮基酰胺的丙肝病毒NS3蛋白酶抑制剂,邻位的酰胺增强了酮基的亲电性,羰基与酶的Ser139发生羟醛缩合,生成可逆性共价结合的半缩酮结构(图2)。这些共价药物的分子结构保障了与蛋白酶活性部位结合,与靶标结合部位的形状互补,并且发生多处氢键和/或疏水性结合,将共价结合基团固定在发生共价结合的适宜位置,并以适度的亲电性避免脱靶作用,研发中结构生物学提供的微观结构信息是重要的设计依据<sup>[10]</sup>。

有机硼化合物近年来成功的药物如硼替佐米(**13**, bortezomib)是蛋白酶体抑制剂,用于治疗多发性骨髓瘤。其先导物是含有脂肪醛基的寡肽(**14**),皆知醛基是活泼的加成基团,脱靶性强,替换为硼原子具有首创性。硼的外层含有空轨道,可与未耦孤电子对形成配

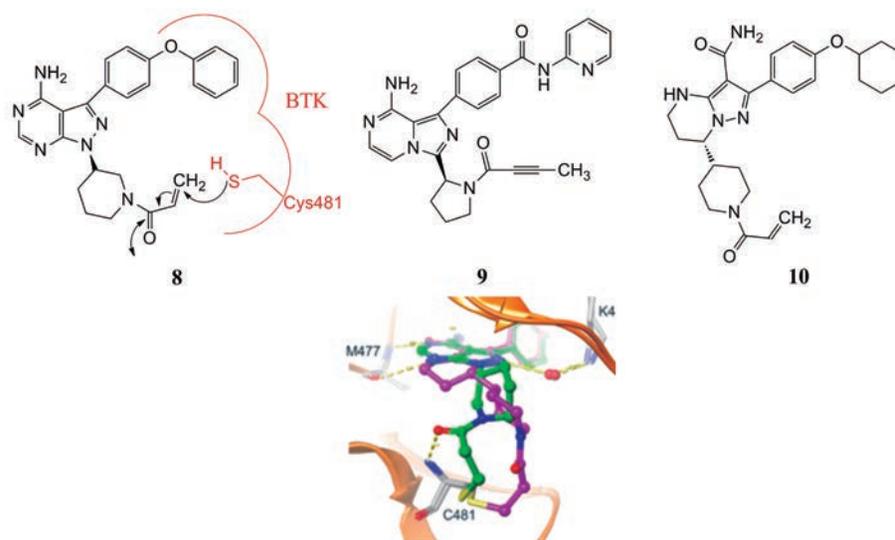


Figure 1 The comparison of binding mode between ibrutinib (**8**) and zanubrutinib (**10**)

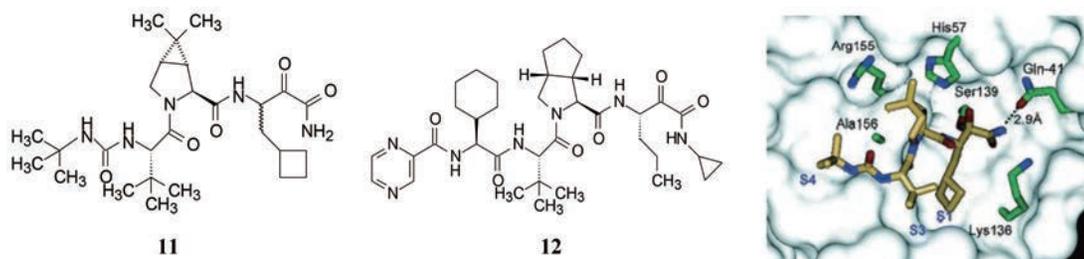


Figure 2 Binding mode of crystallography for baceprevir-NS3 complex

位键, **13**与苏氨酸残基的羟基发生配位结合, 酶的活性受到强效抑制<sup>[11]</sup>。抗真菌药物他伐硼罗<sup>[12]</sup>(**15**, tavorole)和抗过敏性皮炎药物克立硼罗<sup>[13]</sup>(**16**, crisaborole)分别是真菌亮氨酸转移RNA合成酶和磷酸二酯酶IV (PDE4)抑制剂,也是利用硼原子空轨道的亲电性与酶发生配位键结合,分别是在2014年和2016年批准上市的药物。

伏塞洛托(**17**, voxelotor)是2019年批准上市的治疗镰刀状红细胞病(SCD),SCD是由于血红蛋白 $\beta$ 链的Glu6变异为Val6,在低氧条件下发生四聚化,导致红细胞变形为镰刀状而使毛细血管堵塞,造成贫血和器官衰竭。伏塞洛托含有的芳香醛基是从先导物5-羟甲基咪唑(5-HMF)的优化中保留下来的。5-HMF与突变的血红蛋白复合物的晶体结合模式提示醛基与突变体的N端Val的氨基缩合成西佛碱,呈1:1的化学计量结合,阻断了血红蛋白的四聚化,减少了镰刀细胞的生成。**17**醛基邻位的羟基对于调节醛基的亲电性和降低脱靶性有重要影响<sup>[14]</sup>。

### 3.3 针对突变后耐药的靶标

癌细胞为了生存而逃逸药物的制裁可以经多种机制实现,其中一个环节是靶标分子发生突变,逃避药物的结合。细胞和结构生物学可从微观上揭示突变的结构差异,得以设计出针对变异的受体靶标,道高一尺,

魔高一丈。

例如治疗慢性粒细胞白血病的首创性药物伊马替尼(**18**, imatinib),持续用药使靶标Bcr-Abl蛋白的门户氨基酸残基The315变异为Ile315,使得**18**难以结合而无效。2017年上市的尼洛替尼(**19**, nilotinib)是诺华研制克服耐药的第二代产品,通过合成小型目标库而优化得到的,**19**与**18**的结构主要区别是两个苯环间的酰胺键-HN-CO-逆向为酰胺键-CO-NH-,以及右侧苯环连接较大的取代基团,结构生物学表明,酰胺基变向的**19**更适配于同突变型激酶发生氢键结合,**19**对转染Bcr-Abl的Ba/F3细胞活性比**18**提高了26倍( $IC_{50}$ 分别为25和678 nmol·L<sup>-1</sup>)<sup>[15]</sup>。

泊那替尼(**20**, ponatinib)是基于Abl<sup>T315I</sup>变异的微观结构“量体裁衣”式的设计而得。蛋白的Thr315变异为Ile,残基侧链的CH<sub>2</sub>OH变成CH(Me)Et,失去了OH,使嘧啶与苯环之间的-NH-不能形成氢键,**18**的-NH-已无所用,而且突变后的Ile体积较大,疏水性强,结合空间变小,**20**用炔键连接两个芳环,-C≡C-体积和位阻减小,并且有利于疏水结合,因而对Abl<sup>T315I</sup>变异的瘤株抑制有显著性提高,为第三代治疗慢粒白血病的药物,于2012年上市。图3a是伊马替尼与重要残基的结合模式图,图3b是泊那替尼与Abl<sup>T315I</sup>的分子对接图<sup>[16]</sup>。我国亚盛医药研制的GZD824(**21**)也是克服耐

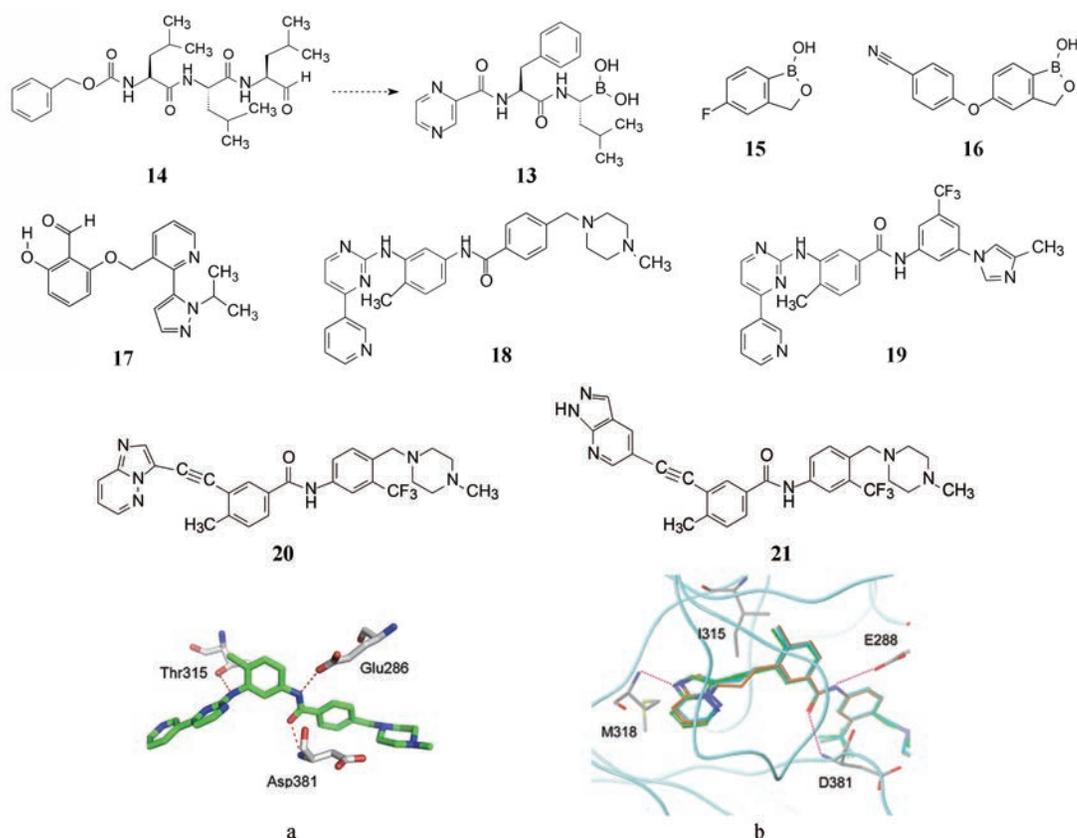


Figure 3 a. Sketch map of imatinib binding to critical residues of wild Abl; b. Docking diagram of ponatinib to Abl<sup>T315I</sup>

药的新一代药物, 临床研究对耐药的慢性髓性白血病已显示有良好治疗效果<sup>[17]</sup>。

RAS 基因家族编码的鸟苷三磷酸酶 (GTPase) 有 NRAS、HRAS 和 KRAS 等蛋白, 对细胞生长和增殖扮演重要角色。KRAS 是最常见的肿瘤驱动基因之一, 在人癌的突变率占 30%, 尤其在肺、结肠和胰脏发生 KRAS 的 G12C (KRAS<sup>G12C</sup>) 残基变异。虽然以 RAS 为靶标的药物研究已 30 多年, 但因该蛋白缺乏适宜的结合腔穴而成效甚微, 被认为是非成药性靶标。通过结构生物学和分子动力学研究发现, 发生突变而隐蔽的 Cys12 残基由于 His95 侧链的移动可显露出来, 这是以前所不知的新结合腔, 因而可作为抑制剂的“抓手”, 经反复筛选发现了苗头化合物, 进而骨架迁越和结构优化, 优选出 AMG-510 (**22**), 选择性地结合于 KRAS<sup>G12C</sup>, 分子中含有丙烯酰胺是迈克尔加成基, 与 Cys12 发生共价结合, 为不可逆抑制剂。图 4 是 **22** 与 KRAS<sup>G12C</sup> 的结合图。临床研究表明治疗小细胞肺癌有很高的应答率。**22** 结构中吡啶环的 2,6-烷基取代, 形成阻转异构体, R-构型活性显著高于 S 异构体, AMG-510 为 R 构型<sup>[18,19]</sup>。

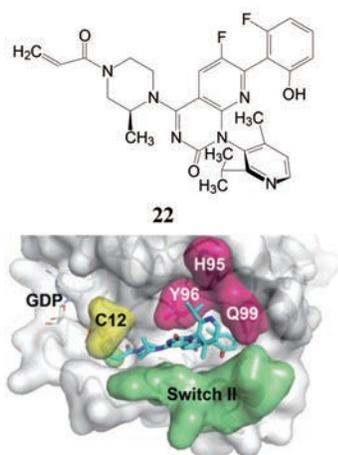


Figure 4 Binding diagram of AMG-510 (**22**) to GDP-KRAS<sup>G12C</sup>

### 3.4 变构调节剂

变构调节是指小分子与受体蛋白活性部位以外的区域 (称作变构区或别构区) 作特异性结合, 引起蛋白的构象变化而改变其活性。经变构结合而激活活性的称为正向调节, 即激动剂, 比如酶的辅因子; 抑制蛋白活性的负向调节即变构抑制 (allosteric inhibitor)。变构抑制剂的结合位点与靶标活性中心的位点相隔离, 之间没有竞争性结合, 所以变构抑制剂对活性中心发生变异的蛋白仍然有疗效, 也为联合用药提供了选择。

变构调节剂作为药物有诸多优势, 首先是提高选择性, 酶或受体多存在同工酶和亚型, 功能的差异使得结合于活性中心的化合物 (正构药物) 因结合同一部

位而缺乏选择性作用, 而变构结合腔则各有不同, 避免了脱靶作用。另外有些靶标的活性腔穴结构特殊, 成药性差, 例如结合于磷酸酶活性中心的化合物难以过膜进入细胞奏效, 而变构抑制剂可回避强极性分子。此外, 一些靶标的活性中心因功能“娇嫩”, 窗口窄小, 难以调节“无过无不及”的作用, 而变构抑制则容易控制, 达到精准治疗。

上节叙述的 Abl1 激酶存在有变构区域, 处于 C 端半段处, 天然变构底物豆蔻酸 (正十四烷酸) 为正向调节剂, 参与酶功能的自调节作用。诺华公司根据伊马替尼-Abl1 晶体结构的特征, 通过基于片段的分子设计 (FBDD) 发现了与豆蔻酸竞争结合于变构域的先导物, 用核磁共振 <sup>15</sup>N、<sup>1</sup>H-HSQC 分析了化合物与激酶的作用, 测定 C 端螺旋的 Val525 的信号变化, 以评价结合状态, 经构效分析优化出候选物阿思尼布 (**23**, asciminib), 对重组 BCR-Abl1 的 Luc-Ba/F3 细胞生长半数抑制率 (IC<sub>50</sub>) 野生型和 T315I 突变型分别为 1 和 25 nmol·L<sup>-1</sup>, III 期临床结果表现良好<sup>[20,21]</sup>。图 5 显示了变构药物阿思尼布和正构药物尼罗替尼 (nilotinib) 与 BCR-Abl1 结合位点的区别, 前者结合于变构区, 后者占据 ATP 结合区。

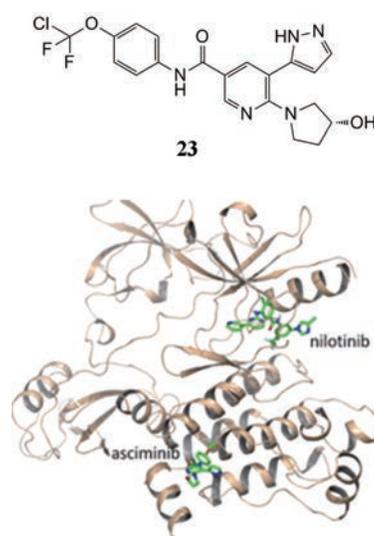
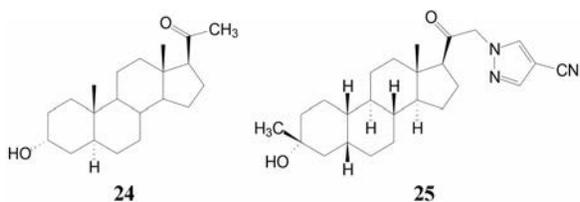


Figure 5 Asciminib binds to allosteric domain, different from nilotinib which binds to ATP binding site

产后抑郁症是类严重抑郁症, 在妊娠晚期和分娩后发生, 发病率较高, 是产妇自杀的首要原因。γ-氨基丁酸结合于 GABA<sub>A</sub> 受体活性中心, 若功能失调, 会发生多种神经系统疾病, 如精神病、癫痫、睡眠障碍等。GABA<sub>A</sub> 受体是由 5 个亚基聚集的离子通道, GABA<sub>A</sub> 受体不同的亚基构成决定通道的生理功能和在突触或突触外的定位的差异。

内源性活性甾体如别孕烷醇酮 (**24**) 是内源性孕

烷类神经甾体,通过结合于 $\gamma$ -氨基丁酸A ( $GABA_A$ ) 受体的变构位点,对 $GABA_A$ 受体作正向变构调节,影响大脑神经元回路,调节行为状态,机体利用孕激素的代谢物反映了内源物(或其代谢物)高效率的利用。**24**的变构调节对上述疾病有治疗作用<sup>[22]</sup>。美国Sage公司深入研究了**24**的变构调节特征,可将 $GABA_A$ 受体活性调节到适宜的水平,**24**定名为布瑞诺龙(brexanolone),2019年FDA批准临床静脉滴注治疗产后抑郁症。Sage公司进而研制口服的 $GABA_A$ 受体变构调节剂,珠兰诺隆(**25**, zuranolone, Sage-217)对突触和突触外 $GABA_A$ 受体的变构位点都有良好的调节作用,已进入III期临床研究<sup>[23,24]</sup>。



脂肪酸代谢失调包括脂肪酸合成 (FASyn) 的增强和脂肪酸氧化 (FAOxn) 的降低,导致多种代谢性疾病的发生,例如胰岛素抵抗和非酒精性脂肪肝等。乙酰辅酶A羧化酶 (ACC) 是脂肪合成和氧化分解的限速

酶。ACC蛋白由3个功能域构成:生物素羧化酶域 (BC)、生物素羧基载体蛋白域 (BCCP) 和羧基转移酶域 (CT),CT催化乙酰辅酶A (Ac-SCoA) 转化成丙二酰辅酶A ( $OOCCH_2CO-SCoA$ ),是脂肪链延长的限速步骤,如图6所示。ACC有两种组织特异性亚型:ACC1和ACC2。ACC1在富含脂质的组织如脂肪和肝脏中表达,催化脂肪的生成;ACC2表达于氧化组织(例如肌肉)的线粒体膜上,功能是通过抑制肉碱棕榈酰转移酶 (CPT) 对线粒体摄取脂肪酸作负性调控,CPT负责将脂肪酸的酰基偶联到肉碱上,以穿越线粒体膜进行 $\beta$ -氧化,所以抑制ACC1/2可同时降低脂肪酸的生成和提高氧化降解<sup>[25]</sup>。

真菌的代谢产物 soraphen A (**26**) 是ACC1/2的强效抑制剂,但未能成药。基于**26**与人ACC2-BC的晶体结构,Harriman等<sup>[26]</sup>经虚拟筛选得到高打分的250个化合物,经ACC1和ACC2活性测定,发现了化合物**27** (ND-022) 有初步活性,**27**与ACC2-BC晶体结构显示与**26**有相似的结合模式(图7a),经结构优化得到非索考司他 (**28**, firsocostat),抑制ACC1/2的 $IC_{50}$ 为2~6  $nmol \cdot L^{-1}$ ,而对100多个酶受体或离子通道没有活性( $>10 \mu mol \cdot L^{-1}$ ),显示高选择性作用,临床研究显示**27**可降低患者肝脏脂肪含量、降低纤维化以及肝脏生

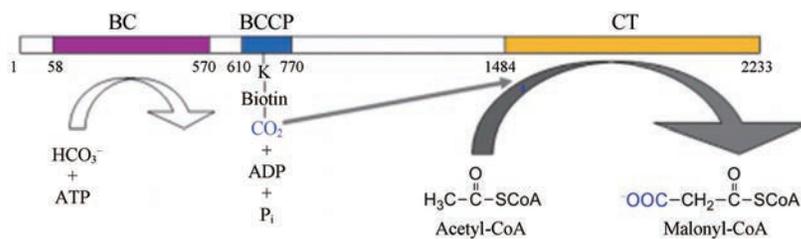


Figure 6 Schematic depicting various ACC domains and their functions

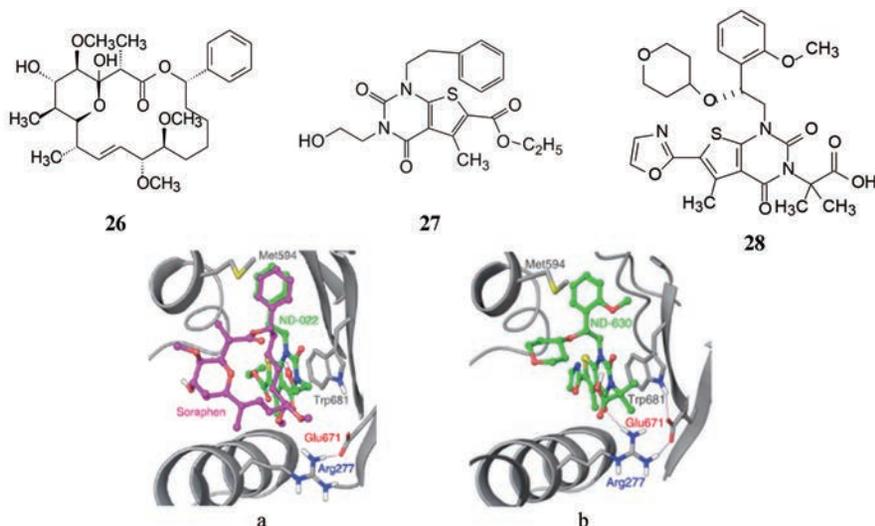


Figure 7 a. Cocrystal structure of **27** complexed with *h*ACC2 BC overlaid with the structure of *h*ACC2 BC complexed with soraphen A (**26**). b. Structure of firsocostat (**28**) modeled into the cocrystal structure of its amide complexed with *h*ACC2 BC

物化学标志物水平。图 7b 是非索考司他与 hACC2 BC 结构的分子对接图。

### 3.5 大环小分子药物

大环小分子药物是当前药物研发的一个新的策略。鉴于已有的大环类药物(环肽和大环内酯)与通常药物性质的不同(例如超出类药 5 原则的范围),因而在成药性较差的靶标(例如蛋白-蛋白相互作用)的药物研究中注重大环化合物。大环药物的相对分子质量大约在 500~1 000, 弥补了常规药物分子尺寸小结合强度不够的不足, 而环状结构限制了分子的某些构象, 降低了开链的结合自由能(熵贡献), 此外, 肽链成环还提高了过膜性是因为构象的改变、表面积的小, 分子内氢键有利于过膜。大环化合物改变了分子柔性、形状和表面积, 使得过膜性、稳定性和对靶标的选择性都提高了。

2011 年上市的克唑替尼 (**29**, crizotinib) 对间变性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, ALK) 与核磷蛋白 (nucleophosmin, NPM) 的融合蛋白有强效抑制活性, 对细胞活性  $IC_{50} = 20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , ALK 融合蛋白是发生间变性淋巴瘤、炎性肌纤维细胞瘤和非小细胞肺癌的关键性酶, 克唑替尼是以 ALK 为靶标的治疗非小细胞肺癌 (NSCLC) 首创口服药<sup>[27]</sup>。然而续贯使用出现耐药性和难以进入中枢的缺点 (NSCLC 常常发生脑转移), 辉瑞继续研制克服耐药性和能够透过血脑屏障治疗脑转移的新一代 ALK 抑制剂。发生耐受的患者 ALK 激酶与克唑替尼的复合物共晶显示多位点发生残基变异或插入, 如图 8 列出的突变和插入位点, 其中 L1196M、G1269A 和 G1202R 都是直接与克唑替尼接触的残基, L1196 是门户氨基酸残基, 是最容易发生变异的守门员。

**29** 与 ALK 共晶的重要提示是分子的结合构象呈 U 形的弯曲状, 两个苯环靠近, 可以将空间上接近的这两个苯环连接成大环结构以固定该活性构象。设计中

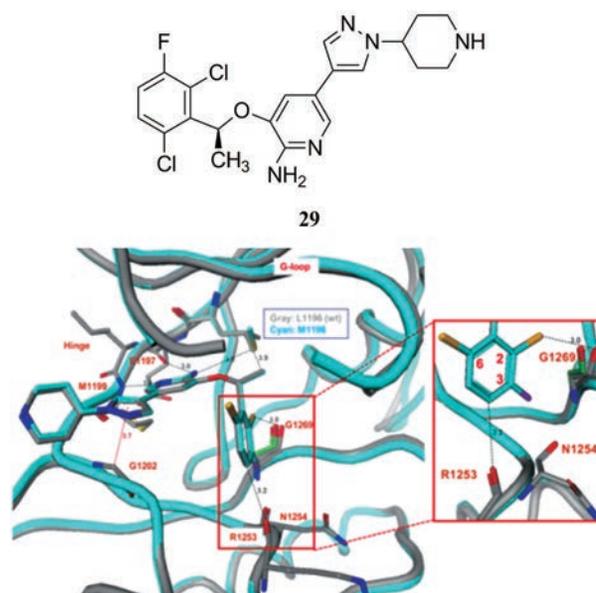


Figure 8 Crystallography of ALK-crizotinib complex and the mutation sites of ALK

环的大小、原子的种类依靠分子模拟, 经 SAR 分析, 最终得到了选择性抑制变异的 ALK 激酶的大环药物劳拉替尼 (**30**, lorlatinib), 于 2018 年批准上市<sup>[28]</sup>。图 9 是由克唑替尼演化成劳拉替尼过程中重要节点的化合物。

抗丙肝药西美瑞韦也是大环化合物, 上市于 2013 年。作用靶标是丙肝病毒的蛋白酶 NS3, NS3 的功能是裂解结构性原蛋白使成熟化, 裂解产物六肽 (**31**) 却是 NS3 抑制剂。研制者以 **31** 为起始物, 在结构和计算生物学指引下, 经剪裁、非肽化和 SAR 分析, 依次消除 P6 和 P5 的二肽, N 端氨基乙酰化, 变换 C 端为环丙叉甘氨酸和脯氨酸萘甲氧基化得到 **32**, 为了提高分子的亲脂性, 将脯氨酸母核变换成环戊二酸, 异丙基变成叔丁基, 萘环修饰成取代的喹啉片段和环丙基的乙烯化成 **33**, P3 片段简化成环戊脲基成 **34**, 结构生物学表明, **34** 的环戊基与 C 端的乙烯基位置接近, 从而将环戊基

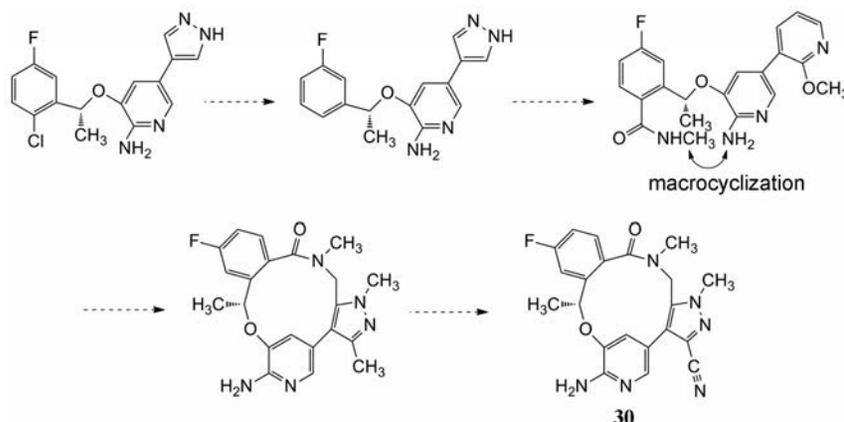
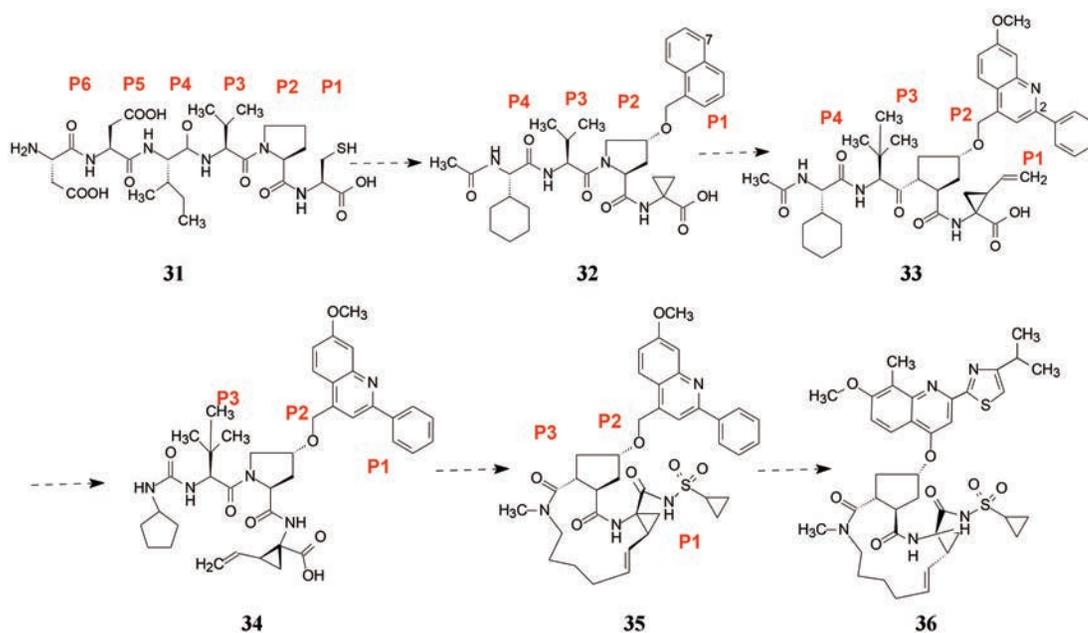


Figure 9 Evolutional scheme of crizotinib (**29**) to macromolecule lorlatinib (**30**) via typical compounds

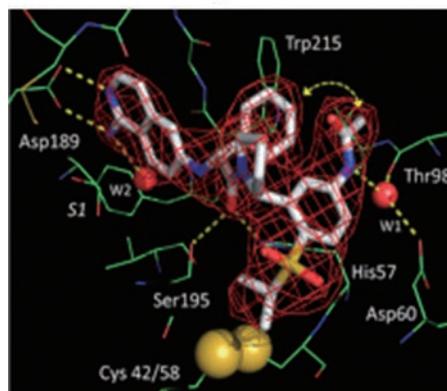
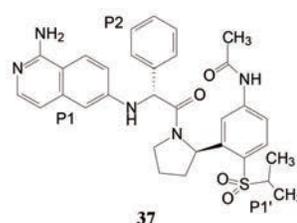


与乙烯基融合连接成脂质性大环化合物 **35**, 同时将必需的酸性基团换作酰胺磺酰片段,  $-\text{NH}-$  的两边存在拉电子基团使其有弱酸性, 模拟了原来 C 端的羧基, 并调整了化合物的极性, 用作钠盐; 再修饰喹啉环, 得到高活性和选择性的 NS3 蛋白酶抑制剂, 即抗丙肝药西美瑞韦 (**36**, simeprevir)。结构演化中每一个环节 (箭头表示) 包含着多轮的合成和构效分析<sup>[29]</sup>。

BMS 研制抗血栓药物, 靶标是针对凝血过程的生物化学级联反应中两个环节: 凝血因子 FVIIa 和 FXIa, 这两个蛋白酶在凝血和血栓形成扮演重要角色。出血和凝血 (或发生血栓) 是研制酶抑制剂的两个侧面, 过分抑制, 可能引起出血。这两个酶血液中的高水平有发生心肌梗死和深静脉血栓的危险, 而低表达引起出血倾向较小, 因此, FVIIa 和 FXIa 抑制剂应是出血风险低的抗血栓药物。BMS 以大环化合物为研发目标。

研究发现活性较高的先导化合物 **37** 结合 FVIIa 因子的  $K_i = 8.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 是含有氨基异喹啉 (P1) 和无取代的苯环 (P2) 化合物。共晶结构提示 P1 进入 S1 腔中, 氨基与 Asp189 侧链形成盐桥键, 还与 Tyr228 芳环上的羟基形成氢键。中间的酰胺片段与 His57 咪唑环和 Ser195 的羟基形成氢键网络。P1' 和 P2 的苯基发生疏水折拢作用 (hydrophobic collapse), 与 S2 的 His57、Trp215 和 Thr99 发生范德华作用。乙酰苯胺基的 NH 经结构水分子的氢键与 Asp60 侧链相结合。重要的是乙酰氨基的甲基接近于 P2 的苯基, 这为构建大环提供了连接位点。图 10 是 **37** 与 FVIIa 的共晶结构图。

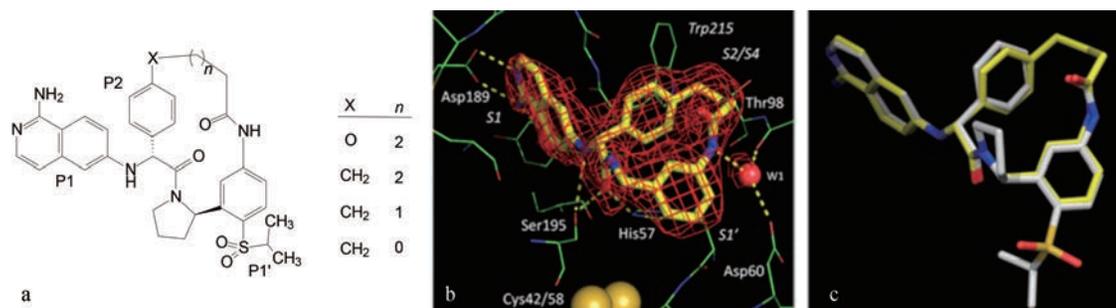
大环的尺寸大小、组成环的元素种类对于环的构象和结合强度有重要影响, 虽然有共晶结构和分子模



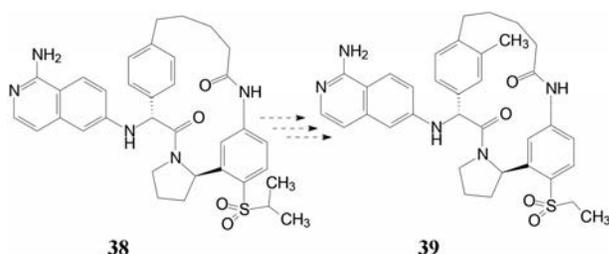
**Figure 10** Crystal structure of **37** bound to FVIIa. The proximity of the P1' acetanilide and P2 phenyl groups suggested that macrocyclization was feasible, as indicated by the double-headed yellow arrow

拟, 仍需经构效关系作结构优化。化合物 **38** (图 11a,  $\text{X}=\text{CH}_2$ ,  $n=2$ ) 活性比较高, 图 11b 是 **38** 与 FVIIa 的共晶结构图, 结合模式与 **37** 相同。图 11c 是叠合 **38** (黄色) 与 **37** (白色) 在共晶结构中的分子结构, 可以看出基本可以重叠。

**38** 为 *R* 构型, 使得 P2 处的苯环和大环进入 FVIIa 疏水腔中, 分子模拟发现 *S* 构型不能发生疏水相互作用。进而对 P2 苯环上取代基和磺酰基优化, 优化出化合物 **39** 的活性  $K_i = 1.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 离体实验部分促



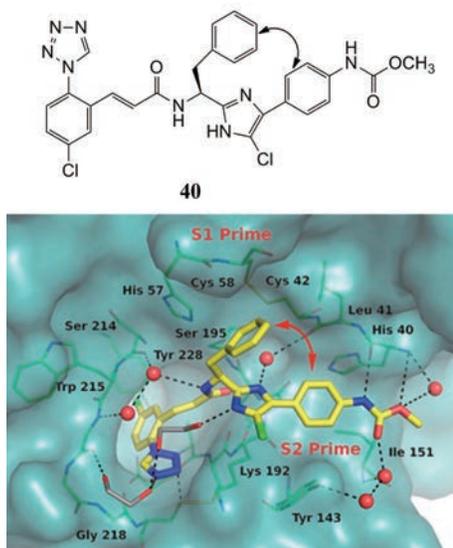
**Figure 11** a. General structure for optimization of macrocycle size; b. Crystallographic structure of (*R*)-**38** in FVIIa; c. Overlay of **37** (white) and (*R*)-**38** (yellow) bound to FVIIa



凝血时间的活性  $aPTTEC_{1.5x} = 1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 对其他与凝血相关的因子抑制作用很低, 显示很高的选择性, 而且口服生物利用度和在血浆中的稳定性也较好。**39** 的大环有两种稳定的低能构象体, 比例为 1:1, 动力学研究有待于确定优化出更强的化合物<sup>[30]</sup>。

沿着凝血过程路径, BMS 公司研制抗血栓药物的另一个环节是 FXIa, 也是级联反应的一个重要节点。通过先导物的优化得到化合物 **40**, 对 FXIa 的结合常数  $K_i = 5.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 离体实验部分促凝血时间的活性  $aPTTEC_{1.5x} = 5.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

图 12 的共晶结构显示, **40** 的高活性是由于多个杂



**Figure 12** X-ray crystal structure of acyclic phenyl imidazole **40** in factor XIa

原子参与了同 FXIa 酶活性中心的氢键结合, 如虚线所示。两个苯环在空间接近, 确定为形成大环的位点, 如图 12 中双箭头所示。

**41** 通式是用亚烷基 ( $X=\text{CH}_2$ ) 或氧亚烷基 ( $X=\text{O}$ ) 连接成 12 和 13 元环 ( $n = 1, 2$ ), 大环内有或无双键, 省去一个苯环, 咪唑环作不同基团的取代, 经多次 SAR 辅以共晶结构的引导研究, 优化出化合物 **42**,  $K_i = 0.16 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $aPTTEC_{1.5x} = 0.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

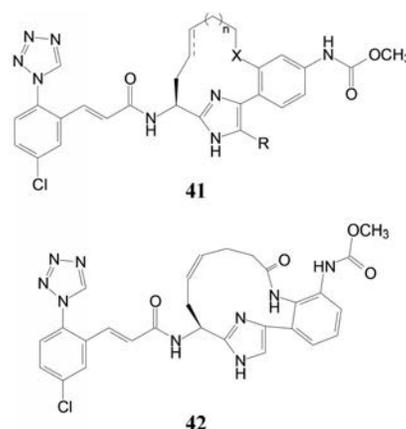
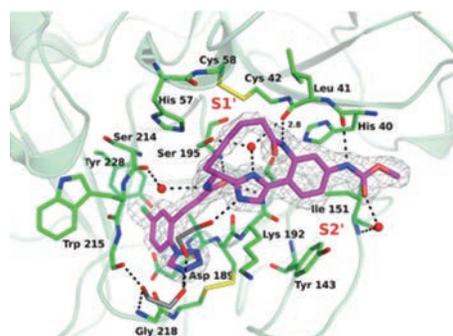
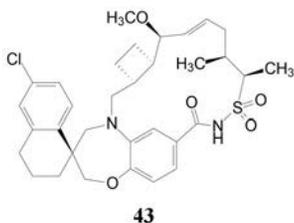


图 13 是 **42** 与 FXIa 的共晶结构, 大环中的 CONH 与 Leu41 发生氢键结合, 环中的反式双键使处于 S1' 域的大环构象处于适宜的空间, 避开了与 Cys42-Cys58 的二硫键发生位阻作用。**42** 的口服生物利用度较低, 结构仍需优化<sup>[31]</sup>。



**Figure 13** X-ray crystal structure of **42** bound to factor XIa

安进公司研制的 AMG-176 (**43**) 是针对诱导性髓性白血病细胞分化蛋白 MCL-1 的抑制剂, 具有促进细胞凋亡和抗癌活性, MCL-1 蛋白的可药性很差, 长时间未能发现适宜的活性化合物。43 高活性地结合 MCL-1,  $K_i$  值  $0.13 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 是第一个抑制 MCL-1/Bcl-2 样蛋白 11 生成的抑制剂。现处于临床研究阶段, 口服治疗髓性白血病<sup>[32]</sup>。



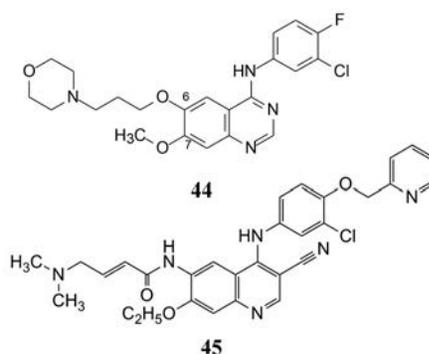
#### 4 优化宏观性质的策略与方法

药物的宏观性质包括生物药剂学和药代动力学内容, 药物的溶解性和过膜性与吸收、分布、代谢、排泄密切相关, 除了代谢转化可与特定的结构关联外, 其余性质都体现在药物分子的宏观性质之中。溶解性是指在水中的分子分散, 过膜性是分子穿越脂质生物膜的能力, 要求有一定的脂溶性, 所以溶解性与过膜性既对立又统一, 可理解为分配性。吸收、分布和排泄都涉及(多次)过膜过程。以靶标为中心的药物治疗, 对在组织器官分布的预测, 大都是个盲区, 还不能做到“指哪儿打哪儿”。利用生物学原理提高药物对组织器官的靶向性, 近年来有显著的进展, 一定程度上实现“指哪儿打哪儿”。

##### 4.1 提高溶解性

为提高溶解性在分子结构中加入助溶基团或片段是熟知的方法。基于结构生物学的提示, 助溶基团可连接在“次要”的部位, 避免干扰对微观结构与靶标的结合。例如治疗非小细胞肺癌的吉非替尼 (**44**, gefitinib), 是表皮生长因子受体 (EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂, 结合于酶的 ATP 结合位点, 共晶结构显示, 喹唑啉环的 6,7 位在酶的开口处, 所以连接的哌嗪丙氧基没有与酶结合, 而是进入到水相, 起到助溶作用(可成盐)。第三代的 EGFR 激酶抑制剂奈拉替尼 (**45**, neratinib), 靶向干扰乳腺癌细胞的 HER2 蛋白, 进而阻止癌细胞生长, 是 EGFR 激酶的不可逆抑制剂, 由于酶的开口处有 Gys 残基, 与 6 位距离接近, 6 位侧链含有碱性的二甲胺基团(助溶基) 和不饱和酰胺, 后者为弱迈克尔加成基团, 可与 Cys 的巯基发生迈克尔加成反应, 形成共价键结合, 因而成为作用更强的药物。所以 6 位的侧链既是实现不可逆结合的元素也是助溶性基团。

依马替尼 (**46**, imatinib) 是 Bcr-Abl 编码的蛋白酪



氨酸激酶抑制剂, 治疗慢性粒细胞白血病。结构中甲基哌嗪是作为助溶性基团, 后来共晶结构发现外端的氮质子化后与 His361 骨架的羰基发生氢键结合, 所以既有助于溶解性也贡献于结合。如图 14 所示。

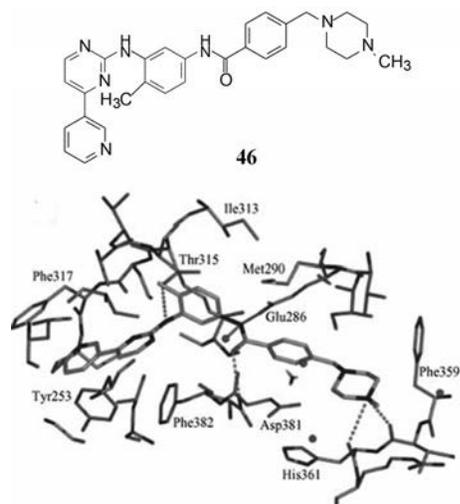


Figure 14 Sketch of the binding mode of imatinib to Abl

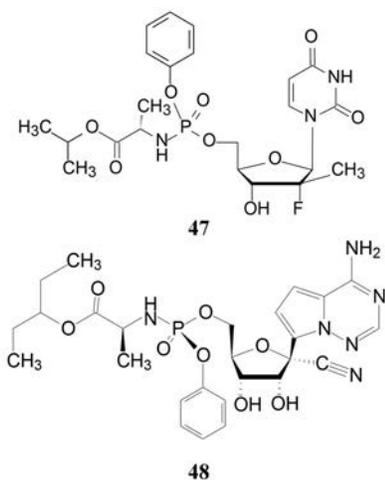
##### 4.2 基于生物学特征的前药设计

传统的前药设计多以化学理念所驱动, 例如对不利于溶解、过膜或不稳定的结构作暂时的可逆性屏蔽加以克服。如今应用生物化学和酶学原理设计前药不乏成功的范例。有代表性的是抗丙肝药索磷布韦 (**47**, sofosbuvir)。本文以 47 的结构演化过程加以解析梳理。

为了研制 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 抑制剂, 吉利德公司认定 2',2'-双取代的戊糖可能对丙肝病毒的 RdRp 有选择性作用, 连接的碱基是尿嘧啶而不是胞嘧啶, 是为了避开胞苷在体内容易氧化脱氨的不稳定性, 索性设计为 2'-F-2'-CH<sub>3</sub> 双取代的尿苷, 其实, RdRp 的抑制剂是 RdRp 的(假)底物, 需要三磷酸化的活化形式, 参与到病毒的 RNA 链中成为抗代谢物。核苷的第一个磷酸化是限速步骤, 而尿苷恰恰不能被激酶催化生成一磷酸尿苷, 为此预构成 5'-磷酸-2'-F-2'-CH<sub>3</sub>-尿苷, 但后者含有两个负电荷, 不利于过膜吸收和

体内传输,需要以前药形式作暂时性掩盖:一个负离子制成苯酯,另一个成L-丙氨酸的磷酰胺,苯酯和磷酰胺都是化学稳定的基团。丙氨酸安全无毒性,却又带出一个羧基,为此优化制成异丙酯。索磷布韦有良好的口服生物利用度,吸收后在肝脏被酯酶水解掉异丙醇,羧基负离子 $SN_i$ 进攻磷原子,离去苯酚,形成的环状磷酰胺,后者被肝细胞中特定的核苷酸结合蛋白HINT1水解N-P键,脱去丙氨酸成一磷酸核苷,呈现一磷酸尿苷,再相继发生两次磷酸化成活化形式抑制病毒核酸的合成。这个活化过程全部是在肝脏中完成的,“就地”抑制丙肝病毒。索磷布韦成为治疗丙肝患者的有效药物<sup>[33]</sup>。

吉利德利用该前药平台技术还研制了冠状病毒的RdRp抑制剂瑞德西韦(48, remdecivir),对SARS、MERS、EBOLA和2019-nCoV有显著抑制活性<sup>[34]</sup>,目前在我国进行III期临床研究治疗新冠肺炎。



### 4.3 抗体偶联药物

**4.3.1 原理** 抗体偶联药物(antibody drug conjugate, ADC)是抗体与毒性小分子经连接域形成的共价结合的药物,目前研发的都是抗肿瘤药。不同的肿瘤表面抗原不同,只能同其特异的抗体结合,这种特异性的识别和结合,是由于结构上广泛的互补性结合所致。ADC利用抗体导向肿瘤细胞表面抗原的特性,精准地输送到肿瘤病变处,避免对正常细胞的脱靶性。在ADC中抗体可视作具有导向的运载体。上市的肿瘤抗体药物准确度高但对癌细胞的杀伤力不强,ADC是把抗体分子偶联小分子毒性化合物,后者作用是杀伤癌细胞的“弹头”。所以抗体履行了药代的(细胞)吸收和分布,弹头实现药效。

抗原蛋白不仅结合抗体,还引发细胞对ADC的吞饮作用,将ADC摄入瘤细胞内,并经胞浆的内涵体

(endosome)和溶酶体(lysosome)裂解释放出毒性分子,实施对肿瘤细胞的选择性杀伤。所以ADC还得有可降解的释放性。图15简要描述了ADC的摄入和释放过程。

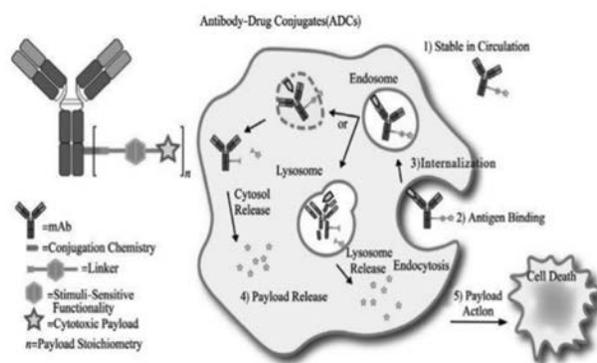
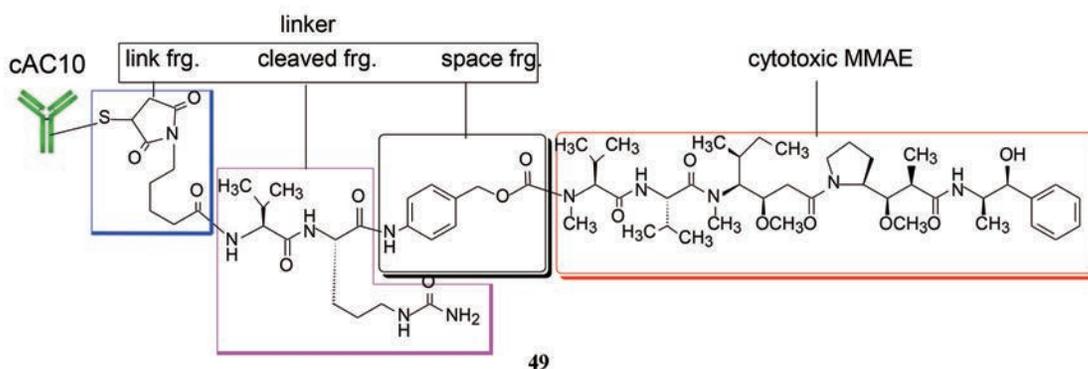


Figure 15 Sketch of the process in ADC action

**4.3.2 组成** 抗体偶联药物既含有细胞毒性分子以杀伤细胞,又有重组单克隆抗体(mAb)实现高度的靶向性、稳定性和有利的药代动力学特征,主要表现为:治疗效力强,特异性高,免疫原性弱,不容易产生抗药性,血清中循环时间长,对非靶点毒性弱等,是一类靶向递送治疗药。

ADC分子由3部分组成:抗体、毒性分子、连接域。肿瘤细胞的抗体必须是安全和特异的,因而研制ADC的抗体都是已批准上市的抗体分子。抗体需作化学修饰以共价结合于连接域,并仍保持对抗原的识别,每个抗体载药的化学计量比和分子均匀性也是抗体偶联药物安全性和药效的决定因素,若偶联的毒物分子偏少,杀伤作用不强;偶联过多,会阻挡并影响抗体的识别,通常一个抗体分子连接三/四个到七/八个毒性分子,以优化结果确定。此外还有稳定性和可重复性等,因而ADC包含许多技术问题和规模制备的瓶颈。毒性分子通常是细胞毒化合物,可以不是批准的药物,也不拒绝高毒性分子。一些批准上市的ADC的毒性分子,都是多年来研究的抗肿瘤成分,未能批准,而在ADC中得到了应用。连接域是共价连接抗体和毒性分子的桥梁,要求不影响抗体和毒性分子的活性,化学稳定,而在靶细胞内可裂解释放出毒性分子,药物化学的技术要求很高,本文不拟深入讨论。

以化合物49为例简析ADC的组成和作用过程。49是2012年上市的第一个ADC药物为布妥昔单抗(49, brentuximab vedotin),治疗霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤。这个药物是抗CD30的IgG抗体布妥昔单抗(brentuximab)和抗微管蛋白的小分子化合物单甲基奥瑞他汀E(MMAE)通过可被蛋白酶裂解的连



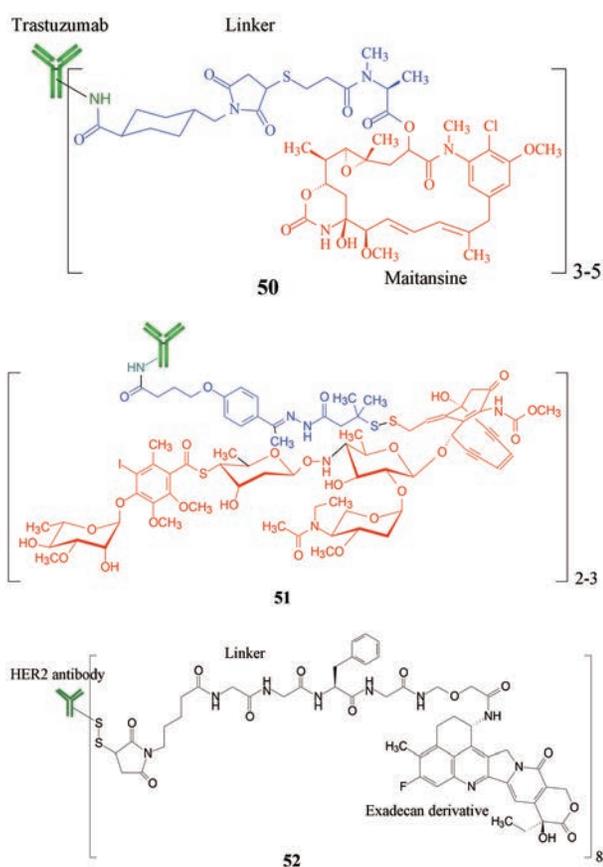
接基共价连接而成。**49**通过结合CD30,内吞到细胞里,被运送到溶酶体,把连接域的肽键剪切掉,将MMAE游离出来,与细胞的微管强效结合,阻滞细胞周期于G2,导致细胞凋亡<sup>[35]</sup>。

恩特曲妥单抗(**50**, trastuzumab emtansine)是针对实体瘤的ADC药物,治疗HER2阳性的转移性乳腺癌。其组成是结合于HER2/neu蛋白的曲妥珠单抗(trastuzumab),经含有硫代琥珀酰亚胺片段的连接域与美坦新(maitansine)共价键结合。美坦新是从美登木植物分离的大环生物碱,结合并阻止微管蛋白聚合,中止细胞的有丝分裂。单独应用虽然活性很高,但选择性差(神经和胃肠道毒性),所以这个古老的生物碱未能成药。ADC使用了美坦新,对癌细胞的靶向递送,并在癌细胞内释放出来,达到精准治疗<sup>[36]</sup>。

奥加米星吉妥单抗(**51**, gemtuzumab ozogamicin)是以CD33为靶标的单抗,经连接域同奥加米星(ozogamicin)缀合而成,临床用于治疗急性髓系白血病(AML)。连接域中含有脲和二硫键的组成。毒性分子奥佐米星是含有烯二炔类的抗生素,结构中的共轭烯二炔是比较稳定的片段,但在细胞内亲核性基团进攻下,电荷转移形成1,4-失氢苯二自由基,性质极其活泼,与DNA双螺旋的小沟发生交联结合,使癌细胞凋亡。这些烯二炔类高细胞毒性分子的抗生素研发多年都未获成功,而纳入ADC的组成,发挥出高活性的潜质,实现了成药性<sup>[37]</sup>。

Fam-trastuzumab deruxtecan-nxki(**52**)是结合于CD79的ADC,治疗无法切除或转移性HER2阳性乳腺癌患者。Deruxtecan是喜树碱衍生物DX-8951与连接基的缀合物,是将马来酰亚胺-GGFG预构于羧基片段上,ADC被细胞饮吞后,溶酶体水解酰胺键,游离出DX-8951(和连接基甲酯),作为拓扑异构酶I强效抑制剂,使癌细胞凋亡<sup>[38]</sup>。

从药物化学视角,对癌细胞有较大杀伤作用的细胞毒性物质如化疗药物、细胞毒素、放射性核素等都可



以作为ADC的毒性片段加以偶联,所连接的毒性片段需具备以下几个特征:①作用机制明确;②细胞毒作用必须很高;③可以被修饰和与连接基团共价连接,化学性质稳定,也容易在细胞内酶促释放呈现活性;④ADC在溶液中稳定存在并充分溶解。

**4.3.3 批准上市的ADC药物** 截至2019年底,美国FDA批准上市的ADC药物有7个,表1列出了名称、组成和适应症。本文对有代表性的毒性分子作了简要介绍。

#### 4.4 小分子偶联药物

上节讨论的ADC也可视为大分子作为精准递送装置的前药,将药物甚至毒物分子运送到靶细胞内。某些小分子也可起到递送作用。一些肿瘤为了增殖和

**Table 1** List of ADC approved by FDA. ALCL: Anaplastic large cell lymphoma; AML: Acute myeloid leukemia

Generic name	Trade name	Composition	Target	Indication	Launch time/company
Brentuximab vedotin	Adcetris	Brentuximab/vedotin	CD30	Hodgkin's lymphoma, ALCL	2011-08 Seattle/Takeda
Trastuzumab emtansine	Kadcyla	Trastuzumab/maitansine	HER2	Breast cancer	2013-02 Genetech/Roche
Gemtumab ozogamicin	Mylotarg	Gemtumab/ozogamicin	CD33	AML	2017-01 Wyeth/Pfizer
Inotumab ozogamicin	Besponsa	Inotumab/ozogamicin	CD22	Lymphocytic leukemia	2017-08 Wyeth/Pfizer
Polatumab vedotin	Polivy	Polatumab/vedotin	CD79	Large B-cell lymphoma	
Enfortumab vedotin	Padcev	Enfortumab/vedotin	Nectin-4	Urothelial carcinoma	2019-12 Seattle/Astellas
fam-Trastuzumab deruxatecan-nxki	Enhertu	Trastuzumab/deruxatecan	HER2	Breast cancer	2019-12 Daichi-Sankyo/AstraZeneca

生长在膜上高表达某种蛋白(受体),以结合并摄入比正常细胞所需的更多物质。小分子偶联药物 (small molecule drug conjugate, SMDC) 就是利用癌细胞高表达蛋白的配体(或其类似物),经共价连接偶联效应分子(药物、毒物或核素等),实现由小分子导向递送活性成分到细胞内起到杀伤作用的目的,所以 SMDC 和 ADC 的设计原理是相同的。

**4.4.1 叶酸偶联药物** 癌细胞无控制地增殖需要比正常细胞合成更多的核酸和蛋白,核酸碱基和甲硫氨酸的 *de novo* 合成需要一碳单元的供给,来源是四氢叶酸,叶酸的主要功能是 *de novo* 合成核酸碱基的一碳单元的供体。后者由四氢叶酸提供,因而癌细胞需要摄取更多的叶酸。强极性的叶酸分子是靠叶酸受体 (FR) 结合并转运进入细胞,FR $\alpha$  在肿瘤组织的表达高于正常细胞,因而可用作肿瘤治疗和诊断药物的设计依据。

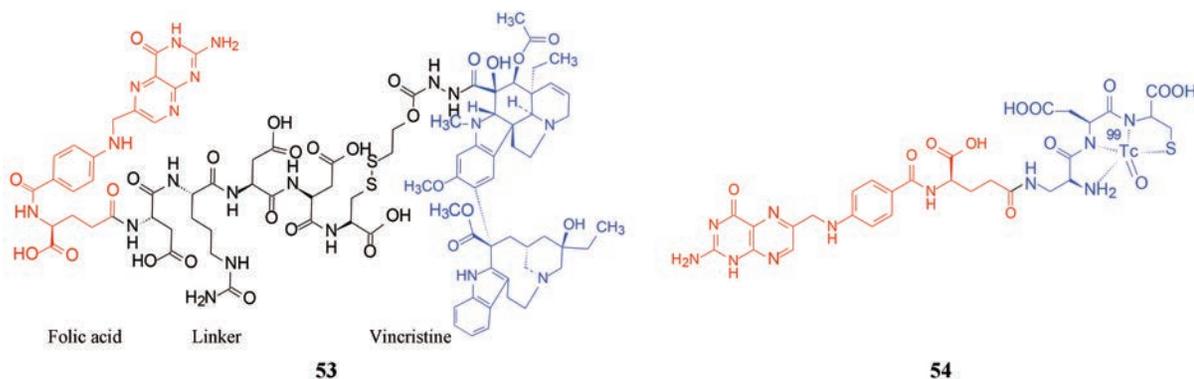
长春福肽 (53, vintafolide) 是叶酸与长春碱经连接域共价结合的偶联物,旨在提高长春碱的选择性杀伤,是默沙东从 Endocyte 公司购入的处于后期开发阶段的卵巢癌候选药物<sup>[39]</sup>。在 II 期临床研究显示出对卵巢癌和非小细胞肺癌的安全有效性,但 III 期临床未达到对耐受铂制剂的卵巢癌患者预定的终点,终止了研发。

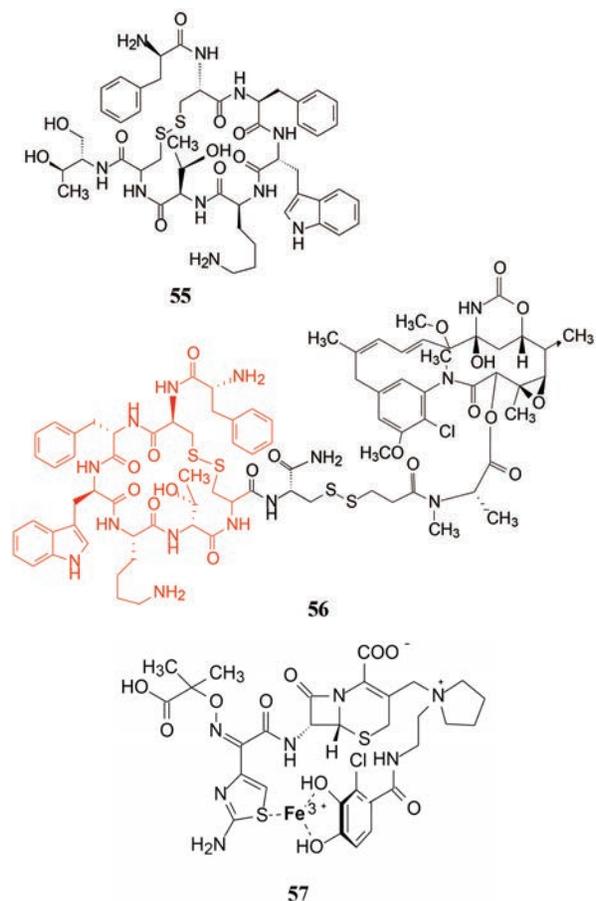
与治疗配套的诊断制剂 [<sup>99m</sup>Tc] 依他福肽 (54, <sup>99m</sup>Tc-etarfolatide) 也是以叶酸为导向的 SMDC,是连接基与叶酸和螯合了 <sup>99</sup>Tc 的三肽的偶联物,用于全身成像的肿瘤诊断药,指导给药方案<sup>[40]</sup>。

**4.4.2 生长抑素简化物奥曲肽偶联药物** 神经内分泌肿瘤和小细胞肺癌细胞表面高表达生长抑素受体 2 (SSTR2), 是为了结合并摄入生长抑素 (somatostatin, SST) 到癌细胞内。SST 是由 14 个氨基酸组成的环肽,是机体的正常成分,具有抑制生长激素释放的作用,半衰期很短 ( $t_{1/2} = 2 \sim 3$  min)。经结构简化,奥曲肽 (55, octreotide) 与天然的 SST 有相同的药理作用,  $t_{1/2} = 90$  min, 静脉注射对生长激素释放的抑制作用是天然 SST 的 70 倍,是消化系统疾病的重要上市药物。

奥曲肽是 SSTR2 的强效配体,用作 SMDC 的载体与美坦新 (maitansine) 经连接域共价结合,化合物代号为 PEN-221 (56), 用于治疗神经内分泌肿瘤和小细胞肺癌,是由于这类肿瘤细胞表面高表达 SSR2, PEN-221 在奥曲肽的引领下富集在癌细胞上,经内吞释放出强效细胞毒作用的美坦新而杀伤肿瘤。PEN-221 目前处于临床试验阶段<sup>[41]</sup>。

**4.4.3 铁离子导向的抗革兰氏阴性菌药物** 革兰氏阴性菌细胞膜由外膜和内膜双层结构构成,比只有一层膜的阳性菌更难以摄入药物,因而抗革兰氏阴性菌的药物较少。细菌增殖生长需要从宿主细胞摄取铁离子,是靠细胞壁上的载铁蛋白摄入菌体内。Ito 等<sup>[42]</sup> 利用该蛋白的嗜铁属性,将 Fe<sup>3+</sup> 螯合在含有儿茶酚结构 (Fe<sup>3+</sup> 的螯合片段) 的头孢菌素上,研发出头孢德罗 (57, cefiderocol)。螯合的铁离子被载铁蛋白结合并摄入,携带着抗菌的头孢菌素也因此进入菌体内,后者与青霉素结合蛋白作用,阻断细胞壁的合成而杀死细菌。





**57** 对多种有氧阴性菌 (包括多药耐药菌) 抑制活性  $MIC_{50} < 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 具有可克服碳青霉烯类抗药性 3 种主要机制 (孔蛋白通道改变、 $\beta$ -内酰胺酶失活、外排泵过量产生) 的独特能力。III 期临床显示对复杂尿路感染以及难治的肠道感染疗效显著, 头孢德罗于 2019 年经 FDA 批准上市<sup>[43]</sup>。

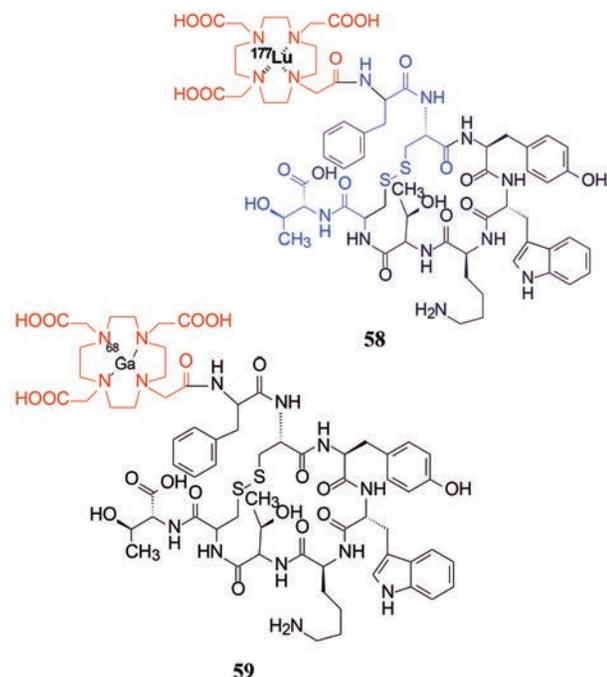
#### 4.5 肽受体放射核素疗法

肽受体放射核素疗法 (PRRT) 是指通过放射性标记肽与分子靶标的特异性结合, 向肿瘤细胞递送辐射源的治疗方法。传统的放射治疗是将核素发射的射线从外部照射聚焦于肿瘤部位, 达到治疗的目的。PRRT 则是核素螯合在活性多肽的分子上, 活性肽以高度的亲和力结合在肿瘤细胞的相应受体上进入细胞中作内照射, 达到精确的放射治疗效果。

奥曲肽对高表达生长抑素受体的亲和力是当今实现了 PRRT 的成功范例, 2018 年诺华公司上市的奥曲肽镭-177 (**58**,  $^{177}\text{Lu}$ -dotatate), 治疗肠道神经内分泌瘤。设计原理是放射性核素  $^{177}\text{Lu}$  与双功能螯合剂  $N',N'',N''',N''''$ -四羧甲基四氮杂环癸烷 (DOTA) 形成强效螯合物, 后者与 Tyr3-octreotide (奥曲肽的 3 号氨基酸残基为酪氨酸) 经连接域共价结合而成 (**59**), 奥曲肽片段引导 **59**

递送到生长抑素高表达的肿瘤部位, 经细胞吞饮摄入胞内, 实现肿瘤细胞内的放射治疗<sup>[44]</sup>。

DOTA 还可螯合不同的放射性核素, 例如  $^{68}\text{Ga}$ -dotatate (**59**) 富集于高表达 SSTR 的肿瘤部位组织, 用于正电子成像 (PET) 或 CT 造影, 是 **58** 在治疗前的诊断试剂。



上述的抗体偶联药物和小分子偶联药物的设计策略, 是利用抗体对抗原的特异性, 小分子配体对高表达的靶标蛋白的高亲和力, 把本来没有组织分布特异性的毒性效应分子携带到作用靶标处, 赋予其选择性杀伤作用, 抗体或小分子给效应分子以选择性助力。下一节讨论的是利用体内分解蛋白的蛋白酶体, 用双功能小分子把目标蛋白招募到蛋白酶体处, 彻底裂解掉病原蛋白, 这种双功能分子助力裂解目标蛋白的策略就是蛋白裂解靶向嵌合体技术。

#### 4.6 蛋白裂解靶向嵌合体技术

**4.6.1 原理** 蛋白酶体 (proteasome) 是细胞内负责裂解受损伤的或错误蛋白成寡肽碎片而加以清除 (或再利用) 的酶蛋白, 蛋白裂解靶向嵌合体技术 (PROTAC) 是用小分子诱导蛋白酶体彻底摧毁目标蛋白的结构与功能, 而不是暂时性抑制作用, PROTAC 小分子是利用生物学原理化学降解目标蛋白的一种平台技术。

被蛋白酶体裂解的目标蛋白需要预先泛素化, 即连接一定数量的泛素蛋白后才能被裂解, 泛素化需要 E1、E2 和 E3 等酶系的级联反应而完成, 其中限速步骤是泛素连接酶 E3 的作用。人体有 600 余种 E3, 特异性催化目标蛋白的泛素连接反应。目前用于 PROTAC

的E3不到10种。

PROTAC是双功能小分子,一个功能是具有结合E3连接酶的能力,将E3募集到自身附近;另一个功能是识别并结合目标蛋白,从而将本不相关的E3连接酶和目标蛋白拉近而发生泛素化,经泛素化的目标蛋白被蛋白酶体识别为底物而启动裂解,彻底淬灭目标蛋白的功能。所以PROTAC是介导E3连接酶将目标蛋白泛素化的化学诱导剂,三元体促成目标蛋白的泛素化,成为蛋白酶体裂解目标,达到治疗的目的。PROTAC分子扮演招募的角色,本身无杀伤作用,过程中理论上也没有消耗,犹如催化剂。图16是蛋白酶体-PROTAC-目标蛋白裂解的示意图,是以事件驱动的裂解目标蛋白的药理过程,有别于传统药物分子是以占据目标蛋白而抑制的药理过程。

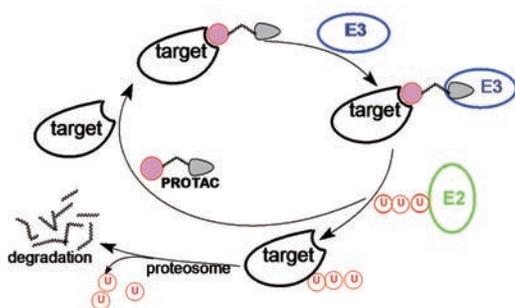


Figure 16 Sketch of event-driven pharmacology of PROTAC molecule

**4.6.2 目标蛋白的配基** 当今研究的目标蛋白多是发生突变的靶标蛋白和成药性低的靶标,例如与癌症相关的受体蛋白发生突变,使原有“占据性”的药物失去活性,则以“过程性”的PROTAC裂解这些蛋白,因而,常以现有的药物或活性化合物作为配基元件,经改构作为PROTAC的组成部分,例如雌受体拮抗剂“昔芬”、雄受体拮抗剂“鲁胺”和激酶抑制剂“替尼”类药物多作为相应靶标的PROTAC的组成部分。

**4.6.3 E3连接酶的配体** PROTAC结构中募集E3连接酶的配体大多经筛选得到的,目前种类尚不多。例如具有E3功能的人体cereblon的配体是“度胺”类邻苯二甲酰亚胺类药物,最早作为招募剂对IKZF1和IKZF3的转录因子进行泛素化被蛋白酶体裂解<sup>[45]</sup>,已经用于研制裂解溴域蛋白(BRD2/3/4)、FK结合蛋白(FKBP12) Bcr-Abl蛋白Sirt2、CDK9、FLT3、BTK、ALK激酶和组氨酸去乙酰化酶6(HDAC6)的PROTAC分子中。

Von HippelLindau (VHL) E3连接酶的发现源自于缺氧诱导因子1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )能够结合VHL,从而构建了多肽作为VHL结合剂,进一步演化为含有羟脯氨酸的非

肽分子,例如VH032<sup>[46]</sup>。VH032已用于研究雌受体裂解剂(SERD)的PROTAC、HaloTag融合蛋白、BCR-ABL、溴域4蛋白(BRD4)、TBK1以及跨膜激酶。

结合于转录因子p53(是种抑癌蛋白)的MDM2是E3连接酶,发现小分子nutlins类化合物,例如(-)-nutlin 3和依达奴林(idasanutlin)占据MDM2的结合腔,只阻止了MDM2与p53的结合,但不影响其E3连接酶的活性<sup>[47]</sup>,从而作为构建PROTAC的元件,Crews率先设计合成了以(-)-nutlin 3为E3招募元件的PROTAC,作为雄受体裂解剂(SARD)<sup>[48]</sup>,nutlin类还用于裂解与肿瘤相关的溴域4(BRD4)的PROTAC。

凋亡蛋白1细胞抑制蛋白(cIAP1)也是E3连接酶,相应的小分子招募配体methyl bestatin用作PROTAC的元件<sup>[49]</sup>。

图17列出了代表性的用于设计PROTAC的招募E3连接酶的配基元件。

**4.6.4 举例** 为了治疗去势前列腺癌而又耐受雄受体(AR)拮抗剂的患者,Han等<sup>[50,51]</sup>研究AR的PROTAC裂解剂,以“鲁胺”类AR拮抗剂为结合AR的配基,分析了恩扎卢胺(60, enzalutamide)和其他AR拮抗剂与雄受体的共晶结构,发现连接胺酰基的苯环未同受体接触,处于溶剂相,因而以此作为连接位点连接招募E3连接酶VHL的配体,对连接基作多轮优化,得到了61,对高表达AR的LNCaP细胞的 $IC_{50} = 2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而对照的AR拮抗剂恩扎卢胺的 $IC_{50} = 150 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Arvinas公司已有两个PROTAC候选化合物进入临床研究。ARV-110(62)是口服雄受体裂解剂(SARD),用于治疗转移性去势抵抗性前列腺癌(mCRPC)患者。62也是由E3连接酶VHL和雄受体拮抗剂“鲁胺”类似物经连接基结合而成,能选择性地靶向雄激素受体蛋白,使其发生降解。在临床前模型中,无论是AR突变,还是过量表达(均为AR靶向疗法失效的常见原因),ARV-110都显示有良好的降解效果。

另一临床试验的化合物是ARV-471,为口服雌受体蛋白裂解剂(SERD),治疗 $\alpha$ 雌受体(野生型和突变型)呈阳性的乳腺癌患者。

Bruton酪氨酸激酶(BTK)在B细胞的发育、分化和信号传导起重要作用,B细胞肿瘤中BTK过高表达,因而BTK是研制B细胞肿瘤的药物靶标。已有的药物是伊布替尼(63, ibrutinib),2013年批准上市治疗套细胞淋巴瘤和慢性淋巴白血病。分子中含有迈克尔加成基团,与BTK的Cys481发生共价结合,故为不可逆抑制剂。然而伊布替尼治疗过程会诱发肿瘤变异,Cys481变异为Ser481,失去了Cys巯基与迈克尔基团发生的亲核加成能力而失效。

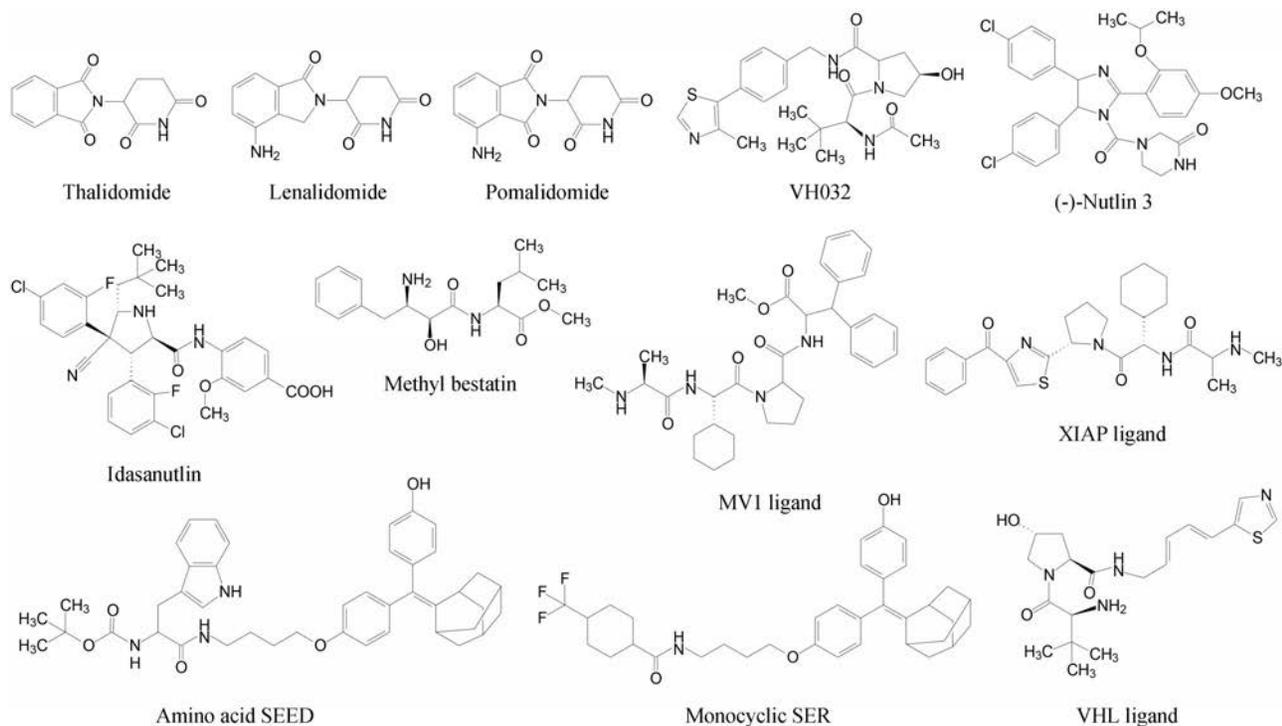


Figure 17 Typical structures of E3 ligase recruiter

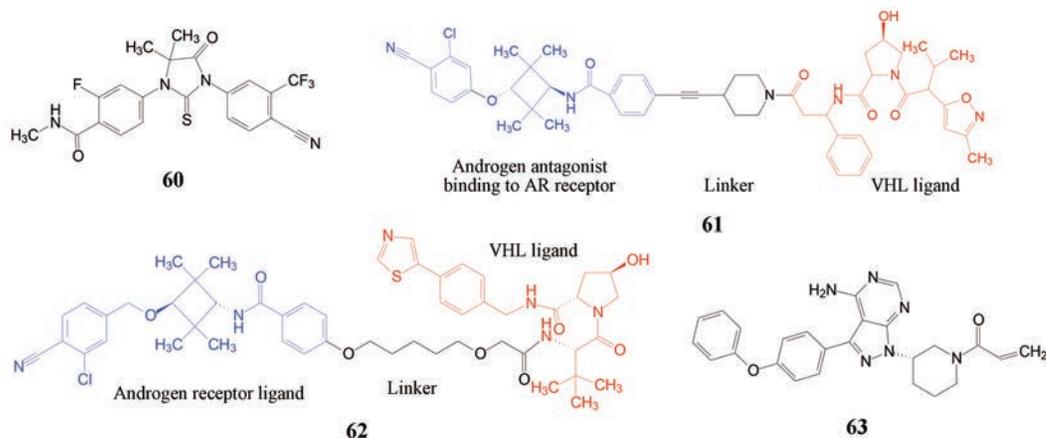
Sun 等<sup>[52]</sup>设计优化出化合物 **64** 为裂解 BTK 的 PROTAC 分子, 是由伊布替尼的类似物与泊马度胺 (pomalidomide, 结合 E3 连接酶 cereblon 的配体) 经乙二醇片段连接而成。实验表明 P131 对野生型和 C481S 变异的淋巴瘤细胞的 BTK 有高效抑制作用,  $IC_{50}$  均为纳摩尔水平, 可有效地抑制 BTK 发生 C481S 变异的 HBL-1 细胞增殖, 而对其他激酶几乎没有活性, 提示 P131 提高了对野生和变异的 BTK 的选择性杀伤作用。

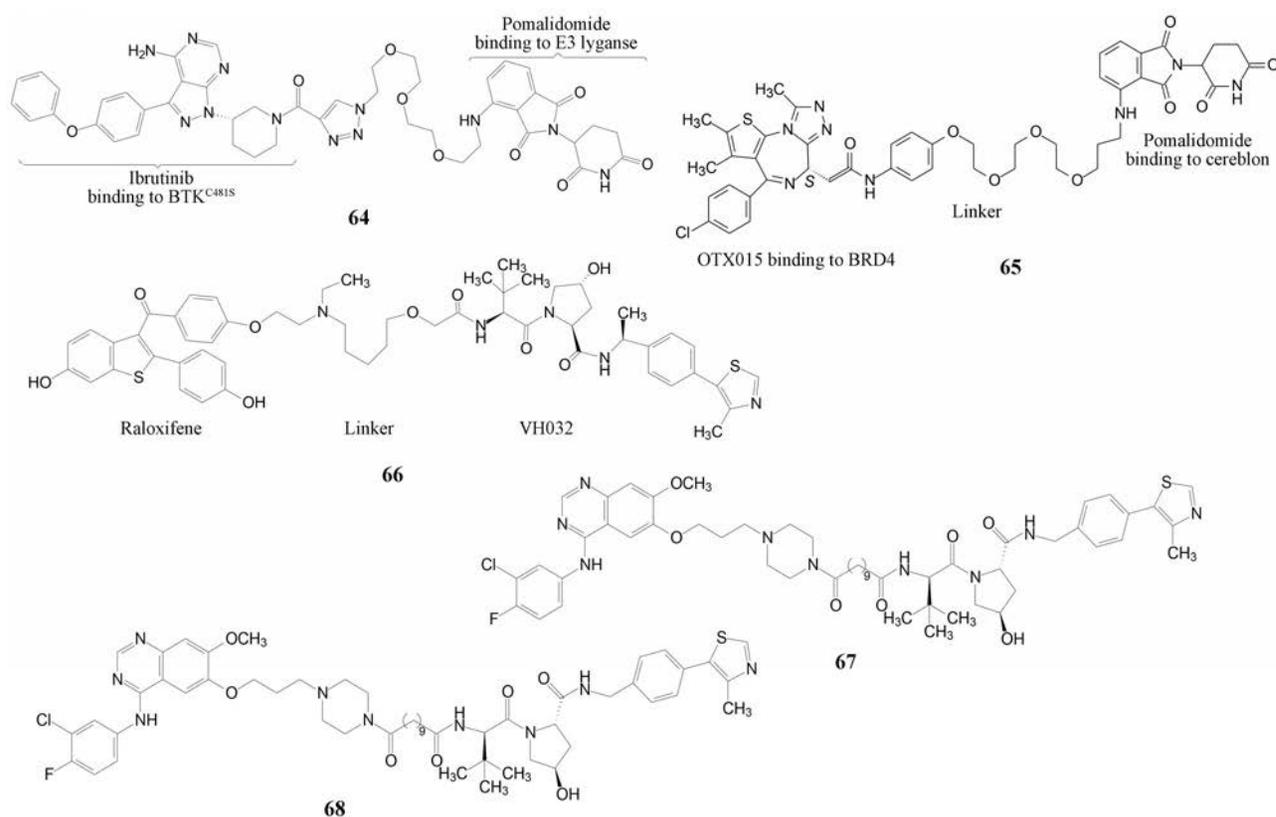
溴域 4 (BRD4) 在多种肿瘤高表达, 是肿瘤治疗药物的靶标, 噻吩三唑并二氮草化合物 (如 OTX015) 是 BRD4 的配基, Lu 等<sup>[53]</sup>将其 E3 裂解酶 cereblon 的配基泊马度胺经聚乙二醇连接, 化合物 **65** (代号 ARV-825) 可诱导蛋白酶体选择性裂解 BRD4 蛋白,  $IC_{50} < 1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**65** 可降低 Brkitt 淋巴瘤细胞中 C-myc 水平, 阻断细胞增殖, 并诱导凋亡。体外实验加入来那度胺可阻断 **65** 的裂解作用, 是因为竞争性低结合 cereblon, 阻止了 BRD4 的泛素化作用。

Hu 等<sup>[54]</sup>为研制雌受体裂解剂 (SERD), 用雷洛替芬作为  $\alpha$  雌受体 ( $ER\alpha$ ) 的配基, VHL 配基募集 E3 连接酶, 通过 SAR 优化连接基的长度和组成, 得到高活性的  $ER\alpha$  裂解剂 ERD-308 (**66**), 对 MCF-7 和 T47D  $ER+$  乳腺癌细胞的  $DC_{50}$  (蛋白降解 50% 的受试物浓度) 分别为 0.17 和 0.43  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

第一代 EGFR 激酶抑制剂吉非替尼用于治疗非小细胞肺癌已近 20 年, 治疗中酶的突变逃逸抑制而失效, Cheng 等<sup>[55]</sup>将吉非替尼 6 位侧链的咪啉环 (不参与





同激酶结合的助溶基团)变为哌嗪作为设计 PROTAC 的连接位点,用 VHL 的配基或沙利度胺分别作为 E3 连接酶 VHL 和 cereblon 的招募基,通过系统的 SAR 分析,优化出 MS39 (**67**) 和 MS154 (**68**) 两个 PROTAC 分子,对突变型的 EGFR<sup>L858R</sup> 结合的  $K_i$  值分别为 12 和 3.8 nmol·L<sup>-1</sup>,与对野生型的 EGFR 没有显著性差异,但对野生和突变细胞株的 EGFR 裂解作用有显著差异,**67** 和 **68** 选择性地对突变的 EGFR 裂解,而对野生型作用很弱,反映了 PROTAC 分子作为事件驱动的过程与占据驱动过程所产生的后果是不同的。

## 5 结语

生物学在多层面上提供了知识、技术和方法,药物化学从不同视角认识、把握和应用,已显示新药创制的基本路径。大到抗体偶联药物和蛋白裂解靶向嵌合分子,小到针对单个氨基酸突变设计抗耐药的活性分子,为药物创制开拓了广阔领域,也为药物化学提出更多的探索与挑战。分子生物学发现的众多蛋白通路和靶标,那些可药性 (druggability) 蛋白犹如低垂的果实纷纷开发出新药,而非可药性的靶标例如底物是强极性分子的酶系和蛋白-蛋白相互作用多为“高悬”的果实而有待采摘,个别成功的例子是作用于 BCL-2 蛋白的抗肿瘤药维奈克拉 (venetoclax),是多种生物物理技术联合应用的项目,显示了药物化学的平台技术的重要

性<sup>[56]</sup>。类药 5 规则 (RO5) 概括的小分子药物的属性指导了一代人的研发思路,却也当作律条束缚了人们的思维和创新空间。许多大环药物突破 RO5 且优于开链分子,有待从大样本的微观结构中提取有益的信息,以开拓小分子药物的化学空间和路径。

作者贡献: 郭宗儒负责本论文的撰写及修改。

利益冲突: 无任何利益冲突。

## References

- [1] Breslin HJ, Cai CZ, Miskowski TA, et al. Identification of potent phenyl imidazoles as opioid receptor agonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 2505-2508.
- [2] Sanguinetti MC. HERG1 channel agonists and cardiac arrhythmia [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2014, 15: 22-27.
- [3] Singh BN, Malm J, Mellin C, et al. Synthesis and preliminary characterization of a novel antiarrhythmic compound (KB130015) with an improved toxicity profile compared with amiodarone [J]. *J Med Chem*, 2002, 45: 623-630.
- [4] Gordon E, Lozinskaya IM, Lin Z, et al. 2-[2-(3,4-Dichlorophenyl)-2,3-dihydro-1H-isoindol-5-ylamino]-nicotinic acid (PD-307243) causes instantaneous current through human ether-a-go-go-related gene potassium channels [J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 73: 639-651.
- [5] Muller GW, Chen R, Huang SY, et al. Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF- $\alpha$  production [J].

- Bioorg Med Chem Lett, 1999, 9: 1625-1630.
- [6] Matyskiela ME, Zhang WH, Man HW, et al. A celebron modulator (CC-220) with improved degradation of Ikaros and Aiolos [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 535-542.
- [7] Pan Z, Scheerens H, Li S, et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase [J]. *ChemMedChem*, 2007, 2: 58-61.
- [8] Herman SEM, Montraveta A, Niemann CU, et al. The Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor acalabrutinib demonstrates potent on-target effects and efficacy in two mouse models of chronic lymphocytic leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 2831-2841.
- [9] Guo YH, Liu Y, Hu N, et al. Discovery of zanubrutinib (BGB-3111), a novel, potent, and selective covalent inhibitor of Bruton's tyrosine kinase [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 7923-7940.
- [10] Bogen SL, Arasappan A, Bennet F, et al. Discovery of SCH446211 (SCH6): a new ketoamide inhibitor of the HCV NS3 serine protease and HCV subgenomic RNA replication [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 2750-2757.
- [11] Adams J, Behnke M, Chen S, et al. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8: 333-338.
- [12] Baker SJ, Zhang YK, Akama T, et al. Discovery of a new boron-containing antifungal agent, 5-fluoro-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaborole (AN2690), for the potential treatment of onychomycosis [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 4447-4450.
- [13] Akama T, Baker SJ, Zhang YK, et al. Discovery and structure-activity study of a novel benzoxaborole anti-inflammatory agent (AN2728) for the potential topical treatment of psoriasis and atopic dermatitis [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 2129-2132.
- [14] Metcalf B, Chuang C, Dufu K, et al. Discovery of GBT440, an orally bioavailable Rstate stabilizer of sickle cell hemoglobin [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 23: 321-326.
- [15] Manley P, Stiefl N, Cowan-Jacob S, et al. Structural resemblances and comparisons of the relative pharmacological properties of imatinib and nilotinib [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 6977-6986.
- [16] Huang WS, Metcalf CA, Sundaramoorthi R, et al. Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)-methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 4701-4719.
- [17] Ren XM, Pan XF, Zhang Z, et al. Identification of GZD824 as an orally bioavailable inhibitor that targets phosphorylated and nonphosphorylated breakpoint cluster region-abelson (Bcr-Abl) kinase and overcomes clinically acquired mutation-induced resistance against imatinib [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 879-894.
- [18] Canon J, Rex K, Saili AY, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2019, 575: 217-223.
- [19] Lanman BA, Allen JR, Allen JG, et al. Discovery of a covalent inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the treatment of solid tumors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 52-65.
- [20] Wylie AA, Schoepfer J, Jahnke W, et al. The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1 [J]. *Nature*, 2017, 543: 733-737.
- [21] Schoepfer J, Jahnke W, Berellini G, et al. Discovery of asciminib (ABL001), an allosteric inhibitor of the tyrosine kinase activity of BCR-ABL1 [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 8120-8135.
- [22] Veleiro AS, Burton G. Structure-activity relationships of neuroactive steroids acting on the GABAA receptor [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 455-472.
- [23] Botella GM, Salituro FG, Harrison BL, et al. Neuroactive steroids. 1. Positive allosteric modulators of the ( $\gamma$ -aminobutyric acid)<sub>A</sub> receptor: structure-activity relationships of heterocyclic substitution at C21 [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 3500-3511.
- [24] Botella GM, Salituro FG, Harrison BL, et al. Neuroactive steroids. 2. 3 $\alpha$ -Hydroxy-3 $\beta$ -methyl-21-(4-cyano-1*H*-pyrazol-1'-yl)-19-nor-5 $\beta$ -pregnan-20-one (SAGE-217): a clinical next generation neuroactive steroid positive allosteric modulator of the ( $\gamma$ -aminobutyric acid)<sub>A</sub> receptor [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 7810-7819.
- [25] Bourbeau MP, Bartberger MD. Recent advances in the development of acetyl-CoA carboxylase (ACC) inhibitors for the treatment of metabolic disease [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 525-536.
- [26] Harriman G, Greenwood J, Bhat S, et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition by ND-630 reduces hepatic steatosis, improves insulin sensitivity, and modulates dyslipidemia in rats [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 1796-1805.
- [27] Cui JJ, Tran-Dubé M, Shen H, et al. Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK) [J]. *J Med Chem*, 2011, 54: 6342-6363.
- [28] Johnson TW, Richardson PF, Bailey S, et al. Discovery of (10*R*)-7-amino-12-fluoro-2, 10, 16-trimethyl-15-oxo-10, 15, 16, 17-tetrahydro-2*H*-8, 4- (metheno)pyrazolo[4, 3-*h*] [2, 5, 11] -benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 4720-4744.
- [29] Guo ZR. From protein substrate to hepatitis C drug simeprevir [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 1353-1356.
- [30] Priestley ES, Cheney DL, DeLuca I, et al. Structure-based design of macrocyclic coagulation factor VIIa inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 6225-6236.
- [31] Corte JR, Fang TA, Osuna H, et al. Structure-based design of

- macrocyclic factor XIa inhibitors: discovery of the macrocyclic amide linker [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 1060-1067.
- [32] Garner TP, Lopez A, Reyna DE, et al. Progress in targeting the BCL-2 family of proteins [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 39: 133-142.
- [33] Sofia MJ, Bao DH, Chang W, et al. Discovery of a  $\beta$ -D-2'-deoxy-2'- $\alpha$ -fluoro-2'- $\beta$ -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 7202-7218.
- [34] Siegel D, Hui HC, Doerffler E, et al. Discovery and synthesis of a phosphoramidate prodrug of a pyrrolo[2,1f] [triazin-4-amino] adenine C-nucleoside (GS-5734) for the treatment of Ebola and emerging viruses [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 1648-1661.
- [35] Cao H, Yamamoto K, Yang LX, et al. Brentuximab vedotin: first-line agent for advanced Hodgkin lymphoma [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33: 3879-3885.
- [36] Chari RV. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs [J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 98-107.
- [37] Buckwalter M, Dowell JA, Korh-Bradley J, et al. Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin as a single-agent treatment of pediatric patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Pharmacol*, 2004, 44: 873-880.
- [38] Modi S, Saura C, Yamashita T, et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer [J]. *New Engl J Med*, 2020, 382: 610-621.
- [39] Reddy JA, Dorton R, Westrick E, et al. Preclinical evaluation of EC145, a folate-vinca alkaloid conjugate [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 4434-4442.
- [40] Parker N, Turk MJ, Westrick E, et al. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay [J]. *Anal Biochem*, 2005, 338: 284-293.
- [41] White BH, Whalen K, Kriksiciukaite K, et al. Discovery of an SSTR2-targeting maytansinoid conjugate (PEN-221) with potent activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 2708-2719.
- [42] Ito A, Sato T, Ota M, et al. *In vitro* antibacterial properties of cefiderocol, a novel siderophore cephalosporin, against gram-negative bacteria [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62: 1-11.
- [43] Breeman WA, Chan HS, de Zanger RM, et al. Overview of development and formulation of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE for PRRT [J]. *Curr Radiopharm*, 2016, 9: 8-18.
- [44] Chamberlain PP, Lopez-Girona A, Miller K, et al. Structure of the human cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21: 803-809.
- [45] Galdeano C, Gadd MS, Soares P, et al. Structure-guided design and optimization of small molecules targeting the protein-protein interaction between the von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase and the hypoxia inducible factor (HIF) alpha subunit with *in vitro* nanomolar affinities [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 8657-8663.
- [46] Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2 [J]. *Science*, 2004, 303: 844-848.
- [47] Schneekloth AR, Pucheault M, Tae HS, et al. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 5904-5908.
- [48] Itoh Y, Ishikawa M, Naito M, et al. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 5820-5826.
- [49] Konstantinidou M, Li JY, Zhang BD, et al. PROTACs - a game-changing technology [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2019, 14: 1255-1268.
- [50] Han X, Wang C, Qin C, et al. Discovery of ARD-69 as a highly potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of androgen receptor (AR) for the treatment of prostate cancer [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 941-964.
- [51] Han X, Zhao LJ, Xiang WG, et al. Discovery of highly potent and efficient PROTAC degraders of androgen receptor (AR) by employing weak binding affinity VHL E3 ligase ligands [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 11218-11231.
- [52] Sun YH, Zhao XW, Ding N, et al. PROTAC-induced BTK degradation as a novel therapy for mutated BTK C481S induced ibrutinib-resistant B-cell malignancies [J]. *Cell Res*, 2018, 28: 779-781.
- [53] Lu J, Qian Y, Altieri M, et al. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4 [J]. *Chem Biol*, 2015, 22: 755-763.
- [54] Hu J, Hu B, Wang M, et al. Discovery of ERD-308 as a highly potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of estrogen receptor (ER) [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 1420-1442.
- [55] Cheng M, Yu XF, Lu K, et al. Discovery of potent and selective epidermal growth factor receptor (EGFR) bifunctional small-molecule degraders [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 1216-1232.
- [56] Park CM, Bruncko M, Adickes J, et al. Discovery of an orally bioavailable small molecule inhibitor of prosurvival B-cell lymphoma 2 proteins [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 6902-6915.