

热休克蛋白 90 抑制剂的进展

罗浩铭, 孙 薇, 尹建元, 杨晓虹*

(吉林大学药学院, 吉林 长春 130021)

摘要: 热休克蛋白 90 (Hsp90) 是抗肿瘤药物作用的新靶点, 其抑制剂通过破坏体内蛋白的结构和降解过程起到抗肿瘤的作用。近年来, Hsp90 抑制剂的研究不仅拘泥于对天然产物的结构改造, 更多的是通过高通量筛选和计算机辅助药物设计方法进行先导化合物的发现以及合成新型结构的 Hsp90 抑制剂。Hsp90 作为一类重要的生物学靶点在抗肿瘤药物的研制过程中越来越受到重视。本文对近年来以 Hsp90 为靶点的小分子抑制剂的研究进展进行综述。

关键词: 热休克蛋白 90 抑制剂; 高通量筛选; 构效关系; 分子-蛋白复合物; 进展

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2010) 07-0813-08

Progress in the study of heat shock protein 90 inhibitors

LUO Hao-ming, SUN Wei, YIN Jian-yuan, YANG Xiao-hong*

(School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Heat shock protein 90 is a new target of antitumor drug, the inhibitor of Hsp90 fight against tumor by destroy and degrade the structure of protein. In recent years, looking for Hsp90 inhibitor is not only via structure modifying of natural products, but also via high throughput screening and computer aided drug design to find and synthesize new kinds of Hsp90 inhibitor. Anyway, Hsp90 inhibitor has considered as an important biology target and to pay more and more attention. This review describes recent developments of small molecule Hsp90 inhibitors.

Key words: heat shock protein 90 inhibitor; high throughput screening; structure activity relationship; molecule-protein complex; progress

热休克蛋白 (Hsp90) 大量存在于真核细胞中, 是一类 ATP 依赖的分子伴侣, 在维持构型稳定、保持活性和一些蛋白的降解过程中发挥着重要作用^[1-3], 是细胞内最活跃分子伴侣之一, 许多信号传递蛋白的正常功能均依赖于 Hsp90。

Hsp90 的效应蛋白包括 Raf-1、突变型 B Raf、IGF-IR、Akt、Her2、C-Met、C-Kit、突变型 EGFR 等^[4]。在肿瘤的发展变化过程中, 这些效应蛋白均过度表达, 因此测定 Hsp90 的效应蛋白可以预防并监测癌症的发生。Hsp90 的主要分子伴侣包括 Hsp70、Hip、Hop、CDC37/P50 等, 其中 Hsp70 最为关键。

Hsp90 与 Hsp70 通过第三方伴侣蛋白 Hop 连接成为分子伴侣复合物, 这个伴侣复合物在细胞增殖过程中扮演着十分重要的角色。由于应激条件下的 Hsp90 在转化或选择效应蛋白上更具有优势, 因此, 它与小分子抑制剂的亲和力比正常细胞的 Hsp90 与小分子抑制剂的亲和力更高。Hsp90 已经成为一类重要的抗肿瘤生物学靶点。

Hsp90 在胞浆内主要以同源二聚体的形式存在, 每个同源二聚体由两个单体构成。Hsp90 单体包括 3 个主要的结构域, 即一个保守的 25×10^3 的 N 末端结构域, 一个 55×10^3 的 C 末端结构域和一个中间结构域, 这 3 个结构域之间有着非常重要的相互作用。N 末端结构域是 ATP/ADP 结合位点, 与 Hsp90 的功能

收稿日期: 2009-10-19.

*通讯作者 Tel: 86-431-85619660, E-mail: xiaohongyang88@126.com

关系密切, C 末端结构域是二聚化位点, 中间结构域是核定位信号和效应蛋白结合位点^[5]。

Hsp90 抑制剂主要分为两大类。第一类为天然抑制剂, 一般为从植物中提取的抗生素类化合物, 主要包括格尔德霉素类和根赤壳素类化合物。第二类为人工设计合成的抑制剂。由于天然抑制剂的局限性, 目前科学家正在努力用一些已经拥有的和一些新的结构骨架来尝试人工合成新的 Hsp90 抑制剂, 这些结构大都针对 Hsp90 N 末端 ATP 口袋结构设计合成。设计的方法包括基于蛋白结构的设计、高通量筛选、基于片段的设计和虚拟筛选。

Hsp90 抑制剂根据其化学结构不同, 可分为格尔德霉素及其衍生物、根赤壳素类化合物、嘌呤类化合物、(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸酯、氨基喹啉类化合物、吡唑类和异噁唑类化合物、新生霉素类化合物、萘酚类化合物和嘧啶并三嗪类化合物等。本文对近年来以 Hsp90 为靶点的小分子抑制剂的研究进展进行综述。

1 格尔德霉素及其衍生物

Geldanamycin (GM, 化合物 1) 是第一个发现的 Hsp90 抑制剂, 属于苯醌安莎霉素类抗生素, 于 1970 年首次从链霉菌属中分离得到^[6]。其结构中有一个苯醌环耦合的大的安莎环^[7]。GM 可以恢复肿瘤基因变异细胞的 v-src 显性, 主要抑制 DNA 合成的起始, 对 DNA 合成的阻断作用明显大于对 RNA 和蛋白合成的阻断作用。在美国癌症研究所 (NCI) 的体外筛选试验中, GM 在对高敏感细胞的 IC₅₀ 为 13 nmol·L⁻¹, 对所有的细胞 IC₅₀ 为 180 nmol·L⁻¹^[8]。酵母 Hsp90 与 GM 的晶体复合物结构 (图 1) 显示 GM 与 N-末端 ATP 连接口袋紧密相连。苯醌环在连接口袋的入口附近, 安莎环指向口袋的底端。与 Hsp90 结合时, GM 采取了与 ADP 相类似的 C 构型。对 Hsp90-GM 晶体复合物结构研究发现, 安莎环上氨基甲酸酯的氮原子与 Asp93 上的侧链羰基通过氢键结合, 同时氨基甲酸酯的羰基氧原子与 Asp93 通过一个水分子连接。构效

关系表明, 氨基甲酸酯是结构必需基团, 被其他基团取代将使化合物的活性降低。当 C12 上的甲基指向 Asn106 的主链碳原子时, C11 上的羟基则与 Lys58 的 δ-氨基连接。酰胺上的氧原子与 Phe138 的主链氮原子通过氢键相连。喹啉环通过水分子与 Lys112 和 Asn51 相连, 处在连接“口袋”的入口处^[9]。

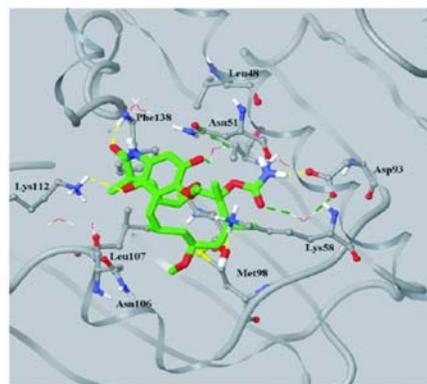
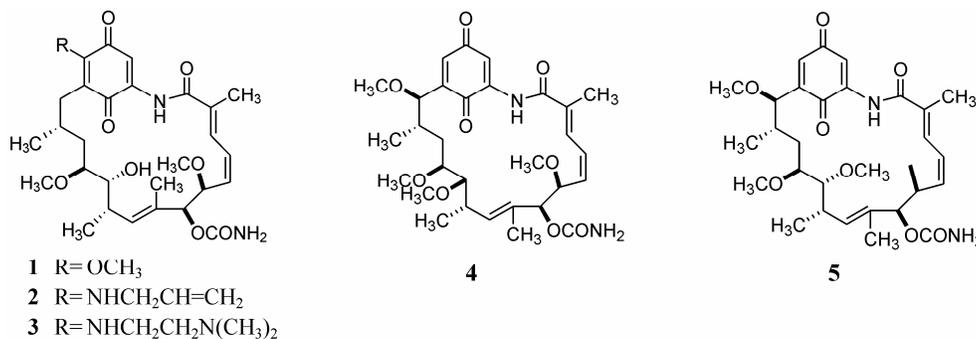


Figure 1 Co-crystal structure of GM with yeast Hsp90

由于 GM 水溶性差, 毒性大, 对其进行结构改造得到一系列衍生物, 如 17-烯丙胺-17-脱甲氧格尔德霉素 (17-AAG, 化合物 2) 和 17-(二甲基氨基乙基) 氨基-17-脱甲氧格尔德霉素 (17-DMAG, 化合物 3)。当给小鼠腹腔注射 17-AAG, 给药剂量为 75 mg·kg⁻¹ 时, 可诱导乳腺癌中 90% 以上 neu 表达下调。当给小鼠腹腔注射 17-DMAG, 给药剂量为 50 mg·kg⁻¹, 每周两次, 持续给药 6 周后, 发现其对可测定的 28 种实体肿瘤中的 4 种有较高的抑制活性。这两个化合物作为治疗肿瘤的药物目前正处于 I 期临床试验。17-DMAG 的水溶性比 17-AAG 好, 但治疗窗较窄。这类抗生素还包括 Herbimycin A (4) 和 Macbecin (5)。

2 根赤壳素类化合物

Radicicol (RD, 化合物 6) 是从真菌 *Monosporium bonorden* 中分离得到的大环内酯类抗生素, 它可以恢复肿瘤基因变异细胞的 v-src 显性, 是体外活性最高的 Hsp90 抑制剂。但 RD 在血清中不稳定, 因此在



体内没有活性。在还原剂的存在下, RD 可发生共轭二烯的迈克尔加成反应, 活性消失。RD 能够特异性的与 Hsp90 N-末端区域结合, 同时降低 SKBr3 的酪氨酸激酶受体 Her2、Raf-1 和突变型 p53 水平^[10, 11]。对 RD-Hsp90 复合物的晶体结构进行研究 (图 2), 结果表明 RD 采取折叠构象, 使其结构中的水杨酸酯和酚之间可以与水分子产生氢键。Asp79 的羧基侧链、Gly83 的主链氨基、Thr171 的羟基侧链通过 1 分子水与 RD 紧密结合。RD 结构中环氧环的氧原子可与 Lys44 的 δ -氨基形成氢键。另外, 根赤壳菌素与 Leu34 的主链羰基之间通过另一个水分子相连^[12]。

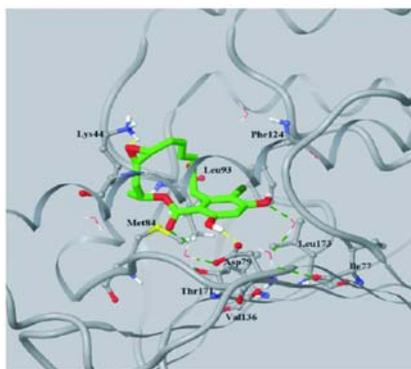


Figure 2 Co-crystal structure of RD with yeast Hsp90

化合物 7 是 RD 的脲类衍生物, 在抑制 v-src 和 3Y1 细胞的抗增殖试验中表现出了比 RD 更高的活性^[13], 在抗多种人类肿瘤异种移植模型试验中也表现出了很好的体内抗肿瘤活性。化合物 8 和化合物 9 在酪氨酸激酶试验中表现出了比 RD 更高的活性, 这与其在抗增殖试验中的结果一致。在衍生物基础上引入疏水的氨基甲酰甲基活性增加, 引入亲水基团或者芳环活性降低。化合物 10 是抑制 v-src 激酶活性最高的脲类衍生物 ($IC_{50} = 25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[14]。

根赤壳素类化合物结构中另一个重要修饰位点是环氧基团^[15], 通过 RD 的晶体结构可知, 环氧基团通过氢键与 Lys44 相连。将环氧基团用环丙烷进行替换, 得到的衍生物仍然保持着与 Hsp90 的高亲和力

($ED_{50} = 160 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 表明环氧基团并不是与 Hsp90 连接的主要位点, 可对其进行结构改造。

从 *Pochonia chlamydosporia* 中分离得到的化合物 11 (Pochonin D) 同样具有抑制 Hsp90 的活性, 表明环氧基团和二烯酮都不是与 Hsp90 连接的重要位点。7, 8-二醇取代会导致这类化合物失去活性^[16]。Prosiy 等^[17]以环丙烷衍生物为基础合成了一类新的抑制剂, 确定了 14 元环为根赤壳菌素的活性必需基团。

3 嘌呤类化合物

嘌呤类化合物是根据 Hsp90 N-末端独特的核苷酸连接口袋设计而成, 它是由一个嘌呤骨架连接一个芳环构成的独特 C 型结构。最初合成的嘌呤类化合物的活性比 17-AAG ($EC_{50} = 1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 大约低了 20 倍 ($EC_{50} = 15 \sim 20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。PU3 (化合物 12) 与 GM 的细胞效应类似, 均作用于 Raf-1、Her2 和雌激素受体, 对乳腺癌细胞具有抗增殖作用^[18]。对 PU3-Hsp90 晶体结构进行研究发现 (图 3), 腺嘌呤环所处的位置与天然 Hsp90 底物大概一致, 甲氧基与 Trp162 和 Tyr139 相连; 嘌呤环 6-氨基取代与 Asp93 的侧链形成氢键; 芳香环在 Leu107 侧链和 Phe138 之间出现叠加, 同后面的苯环构成 π - π 连接; 其他疏水性基团 (如甲氧基) 与 Trp162、Thr139、Phe138 和 Leu107 相连; 脂肪取代基嵌入了由 Val136、Ala111

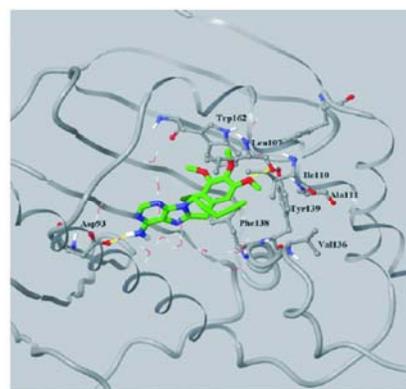
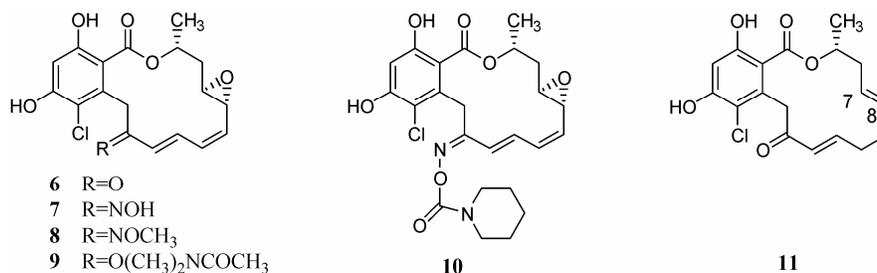


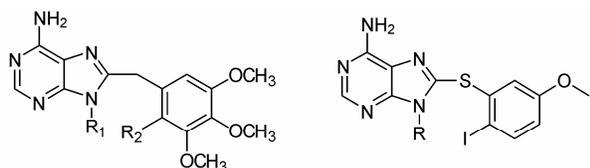
Figure 3 Co-crystal structure of PU3 with yeast Hsp90



和 Ile110 构成的疏水通道中^[18]。通过对 GM、RD 和 PU3-Hsp90 复合物的晶体结构进行研究, 设计这类能与口袋结构结合的化合物主要因素应包括: ① 在口袋底部, 抑制剂与 Asp93/Ser52 的连接; ② 在口袋顶部, Lys112、Lys58 和抑制剂上功能性氢受体的连接; ③ 疏水口袋中部连接位点由 Met98、Val150、Leu107、Leu103、Phe138 和 Val186 组成。

PU3 的活性较天然 Hsp90 抑制剂低, 如果在 C2 位和 N9 位侧链修饰后可提高活性, 如 C2 位上氟取代, 这可能是由于提高了 C6 的氨基形成氢键的能力, 同时, 氟取代也使化合物的水溶性增加。在具有甲氧基芳环的 C2 位引入氯原子, 通过增加立体适应性和减少芳环的旋转, 可以使化合物的活性比 PU3 的活性高 3 倍 ($IC_{50} = 4.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。芳环结构与嘌呤骨架之间的角度很重要, 引入氧原子、甲氧基、氨基等都会使化合物失去活性。

PU24FCI (化合物 13) 降解 MCF-7 细胞中 Her2 的能力比 PU3 ($IC_{50} = 1\sim 2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 高 30 倍, 同时也显示出抗癌细胞增殖的活性 ($IC_{50} = 2\sim 7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 并可诱导 Akt、Raf-1、Bcr-Abl、Her2、mAR 和突变型 p53 的降解^[19]。化合物 14 和 15 也表现出了对 Hsp90 的抑制作用, 其结构特点是在 N9 位引入了无分支的烷氨基链。

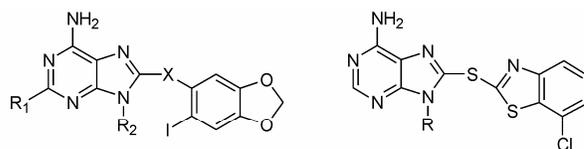


12 $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$ 14 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{CH}_3)_3$
 13 $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ $R_2 = \text{Cl}$ 15 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{CH}_3)_3$

PU-DZ8 (化合物 16) 是将芳香环 C5 位上的甲氧基用二氧甲叉基取代得到的一种嘌呤类化合物, 它较好的降解 SKBr3 细胞中 Her2 的作用 ($IC_{50} = 90 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[20]。PU-H71 (化合物 17) 含有 3-异丙基氨基-丙基侧链, 它对 SKBr3 细胞的 Her2 有更强的降解作用 ($IC_{500} = 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[20]。在 NCI-N417 肿瘤试验中, PU-H71 可诱导 Akt 失活、PARP 卵裂, 导致肿瘤细胞的凋亡, 这是第一例报道 Hsp90 抑制剂引起的细胞凋亡。小鼠腹腔注射 PU-H71, 给药剂量为 $75 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 连续给药 5 天, 能够有效的抑制 NCI-N417 小细胞肺癌, 通过测定发现给药后 6 h 起效, 36 h 后仍在肿瘤内存在药理学相关剂量 ($5.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 这也证实了其在体内抑制肿瘤方面的活性。2009 年

PU-H71 已进入临床试验。

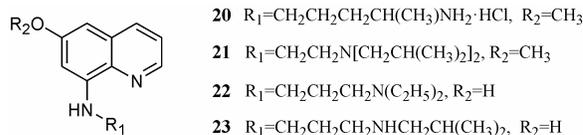
多取代芳香环还可用苯并噻唑或吡啶并噻唑取代^[21], 苯并噻唑在 7' 位用氯原子取代为活性最佳。化合物 18 诱导 MCF-7 细胞中 Her2 降解的 IC_{50} 为 $180 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。N9 位用 2-环丙烷氨基乙基、2-新戊烷氨基乙基、2-二乙基磷酸盐乙基取代活性升高。同苯并噻唑一样, 吡啶并噻唑类化合物中活性最高的化合物为 N9 位用 2 个碳连接的二乙基磷酸盐基团取代得到的化合物 (19), 如果吡啶环 7' 位用 Br、Cl 取代可以降解 Her2。



16 $R_1 = \text{F}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$, $X = \text{CH}_2$ 18 $R = \text{C}_4\text{H}_9$
 17 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$, $X = \text{S}$ 19 $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{PO}(\text{COCH}_2\text{CH}_3)_2$

4 氨基喹啉类化合物

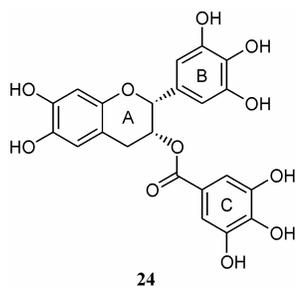
在高通量筛选实验中, 抗疟疾药物喹西特 (8-(4-氨基戊基氨基)-6-甲氧基喹啉-二盐酸盐, 20) 表现出对 Hsp90 的抑制剂作用。在荧光偏振实验和免疫印迹实验中也表现出较高活性 ($IC_{50} \approx 30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。该化合物可以诱导一些主要控制信号传导的 Hsp90 效应蛋白的降解, 如 Raf-1 激酶、Akt 和一些跨膜酪氨酸激酶如 Her2 等。Ganesh 等^[22]以其作为先导化合物得到了化合物 21, 其结构中在喹啉环和二异丁基之间用两个碳原子相连。用二丁基、二乙基、二异丙基取代二异丁基都会使活性消失, 表明末端氮原子上的二异丁基是活性必需基团。延长连接喹啉环和末端氮原子的碳链会使得活性降低, 表明两个碳原子的连接是最有利的结构。在 6-羟基-8-氨基喹啉系列化合物中, 只有化合物 22 和 23 表现出了活性。研究表明连接喹啉环和末端氮原子的碳链越长活性越高。化合物 22 的活性比化合物 23 高, 其结构差异主要是末端氮上的取代基, 化合物 22 为二乙基取代, 化合物 23 为一个异丁基取代。通过构效关系研究发现, 末端氮原子的二烷基取代有利于活性的提高。化合物 23 不能阻断 GM 与 Hsp90 相连, 但可以在低摩尔浓度下诱导 Her2 的降解。



20 $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}_2$, HCl , $R_2 = \text{CH}_3$
 21 $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2]_2$, $R_2 = \text{CH}_3$
 22 $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, $R_2 = \text{H}$
 23 $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_2 = \text{H}$

5 (-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸酯

表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (EGCG, **24**) 是绿茶中的主要成分, 它通过与 Hsp90 连接来抑制 AhR 介导的转录。有研究表明, EGCG 通过连接在 Hsp90 的 C-末端 ATP 连接位点或其附近位点上来抑制 Hsp90 的二聚化作用, 诱导异常的构型改变, 抑制 Hsp90 伴侣蛋白功能。共免疫沉淀法揭示出 EGCG 可以使包括 Hsp90 和 XAP2 在内的复合物保持稳定, 降低芳烃中心转运蛋白与配体活化 AhR 的结合。EGCG 降低了 K^+ -ATP 通道对 ATP 的敏感性, B 环上的 5-羟基是其与 ATP 口袋连接的重要部位。与其他 Hsp90 抑制剂相比, EGCG 的独特之处在于它使 Hsp90 与 Hsp70、CYP40、XAP2 连接稳定。EGCG 不仅与芳烃受体连接的 Hsp90 相连, 还可与单纯的 Hsp90 相连。在 EGCG 对人类卵巢癌细胞试验中发现, 它可以降低一些 Hsp90 效应蛋白水平, 如 ErBb2、Raf-1 和磷光体-AKT。EGCG 同样可以改变 Hsp90 与副陪伴蛋白的结合。离体细胞试验证实 EGCG 有效浓度范围是 $10\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [23]。



6 吡唑类和异噁唑类化合物

通过对 50 000 个化合物进行高通量筛选, 3, 4-二芳基吡唑类化合物 CCT018159 (**25**) 显示出抑制酵母 Hsp90 ATP 酶的活性 ($IC_{50} = 8.9\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。CCT018159 对 HCT116 克隆癌细胞显示了较好的抗增殖活性, 并可使 Hsp90 效应蛋白 Raf-1、Cdk4 降解 [24]。吡唑类化合物的共同结构特点是都具有一个间苯二酚环和一个吡唑环, 其中间苯二酚 5 位上的亲脂性基团 (烷基) 很重要 [25]。对 CCT018159-Hsp90 复合物进行晶体学研究的结果表明 (图 4), 在复合物中, CCT018159 的两个酚羟基和临近吡唑的 N 原子与氨基酸通过口袋基底水分子连接构成氢键网络。最重要的是, CCT018159 通过水分子和 Asp79 的羧基侧链、Gly83 的主链氨基和 Thr171 的羟基侧链紧密相连; 通过一个水分子与 Leu34 位的主链羰基相连 [24]。构效关系表明, CCT018159 的甲基化衍生物和减少一个羟基的衍生物使活性降低或消失; 当化合物的乙基

被氢或丙基取代后, IC_{50} 值分别提高了 8 倍和 5 倍; 当乙基用 Cl 原子取代后, 抑制 Hsp90 ATP 酶活性增强 ($IC_{50} < 1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 同时保留了抗细胞增殖活性; 当 5 位用酰氯取代后, 化合物与 Hsp90 的结合能力有所增强, 显示出了比 CCT018159 更好的细胞活性。化合物 **26** 是 5 位酰胺取代系列中与 Hsp90 结合能力最强的化合物 ($IC_{50} = 25\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 该化合物可以降低 Raf-1 和 Cdk4 的细胞水平, 同时细胞活性和抗人癌细胞增殖的作用均超过了 CCT018159。通过对化合物 **26** 的晶体结构研究发现, 这类化合物与 Hsp90 结合紧密可能是因为酰胺与 Gly97 形成氢键的原因 [25]。吡唑环 4 位用酰氯或者氨基取代得到的化合物 **27** 和 **28** 也是 Hsp90 的抑制剂, 其 IC_{50} 分别为 0.258 和 $0.461\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因为化合物 **27** 的酮羰基和化合物 **28** 的氨基磺胺基团可与 Phe138 形成氢键, 所以其亲和力均有所提高。化合物 **28** 可以诱导 Raf-1、Her2 和 Cdk4 的降解并抑制 HCT116 癌细胞的生长 ($GI_{50} = 11.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) [26]。

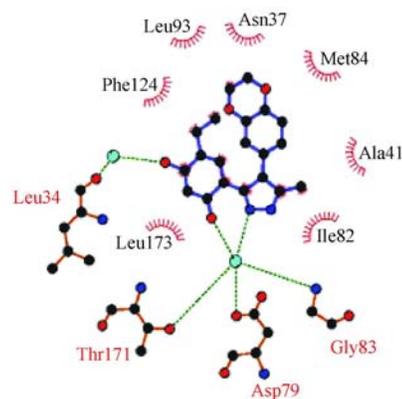
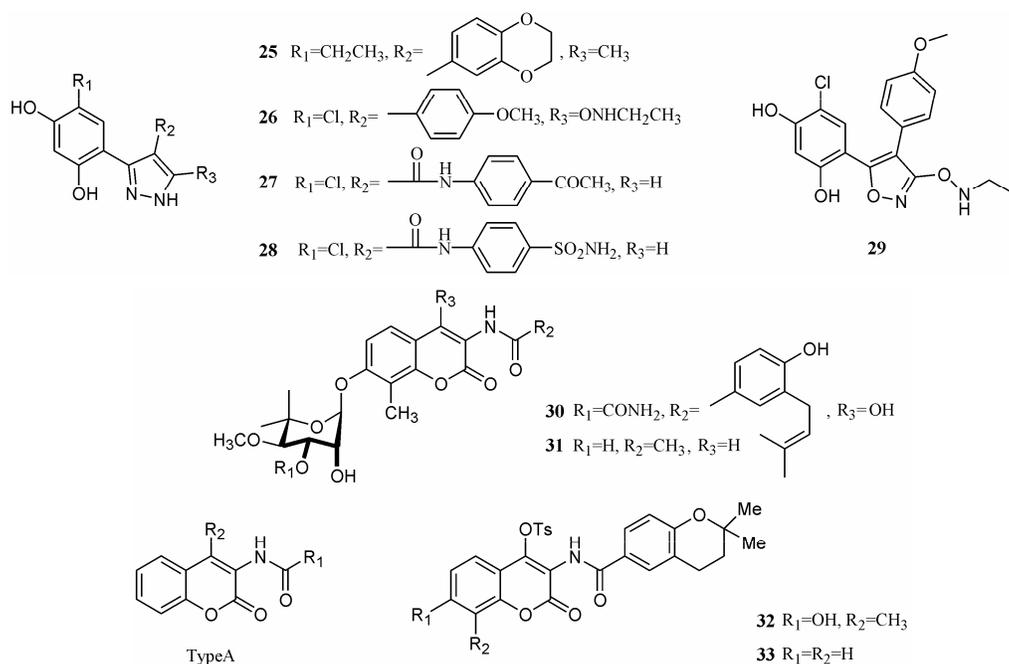


Figure 4 Co-crystal structure of CCT018159 with yeast Hsp90

异噁唑类化合物因其与吡唑类化合物的结构相似, 也显示了抑制 Hsp90 的活性。这类化合物同样是与 Hsp90 N 末端的 ATP 口袋相连, 化合物 **29** 在 FP 实验中显示了良好的活性 ($IC_{50} = 28\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 它与吡唑类化合物一样, 可以诱导 Hsp90 效应蛋白 Raf-1、Her2、Cdk4 和 Akt 的降解。对异噁唑的 4-芳环对位进行氨基取代可使活性提高 ($IC_{50} < 70\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 抑制 HCT116 生长活性高于吡唑类化合物。与吡唑类化合物相比, 5'位更容易被取代, 苯基, 苯乙基, 叔丁基和异丙基取代均可保持良好活性 [27]。

7 新生霉素类化合物

新生霉素 (**30**) 是一类 DNA 解旋酶抑制剂, 最近研究表明, 它可与 Hsp90 的 C 末端 ATP 连接区域相



互作用, 并通过泛素-蛋白酶体途径诱导效应蛋白的降解。但是, 与其抑制 DNA 解旋酶相比, 新生霉素降解 Hsp90 效应蛋白的活性很低 ($IC_{50} = 700 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 需要进一步对其进行结构改造。通过对库内的化合物进行筛选, 发现化合物 **31** 是库内化合物中活性最强的 Hsp90 抑制剂, 它与新生霉素相比缺少了 4 位羟基、苯甲酰侧链和 3' 位的氨基甲酸酯。构效关系研究表明, 3' 位的氨基甲酸酯对其抑制 Hsp90 的功能是不利的, 2', 3'-二元醇是很重要的。为了简化此类化合物的结构, 可同时去掉 4 位的羟基和 3' 位的氨基甲酸^[28]。Blagg 等^[29]对新生霉素结构上的诺维糖基团进行研究, 认为其对活性的影响比较重要, 而 4 位羟基和 8 位甲基并不是结构必需基团。对无糖香豆素的研究中, Radanyi 等^[30]认为去掉诺维糖基团同时在香豆素的 C-4 位上用甲苯磺酰取代, 得到化合物 **32**, 显示出了比新生霉素更高的诱导效应蛋白降解能力。化合物 **33** 和 **32** 具有类似的生物活性, 具有进一步研究价值。构效关系表明, 氨基香豆素类 Hsp90 抑制剂骨架结构为 TypeA, 其结构中包括了两个可以引入不同分子的活性中心位点 R_1 和 R_2 , 而 7-羟基和 8-甲基不是抑制 Hsp90 活性所必需的基团。

8 萘酚类化合物

Barril 等^[31]通过虚拟筛选得到了化合物 **34** 和化合物 **35** 可作为 Hsp90 抑制剂, 它们在孔雀绿试验和 FP 试验中均显示了较高的分子活性。但是, 这类化合物对细胞生长的抑制活性很低。对化合物 **35**-Hsp90

晶体复合物研究表明 (图 5), 萘环嵌入到由 Met98、Leu56 和 Lys52 构成的 ATP 结合位点中, 萘酚的羟基与 Asp93 相连, 苯酚的氧原子通过氢键与 Thr184 相连, 而磺酰胺基团仅作为连接苯酚与萘的中间结构而不与蛋白结合。尽管结合位点具有高疏水性, 但还是有两个水分子嵌入进去与主链原子相连。构效关系研究表明^[32], 用氨基替换中央环上的羟基使得活性下降。用 2-苯酚替换 2-萘酚会使化合物的活性完全消失, 3, 4-二氧甲叉基-2-苯酚替换 2-萘酚后化合物有较

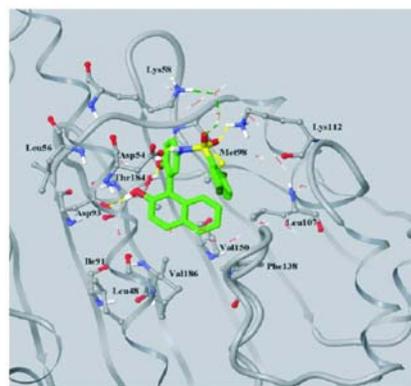
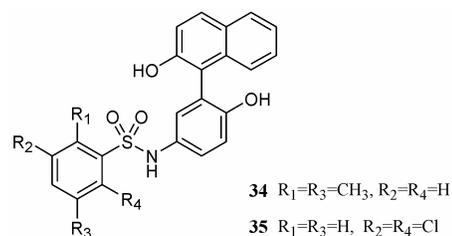


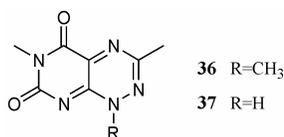
Figure 5 Co-crystal structure of Compound **35** with yeast Hsp90



好的耐受性, 但活性会下降。该系列化合物在测试效应蛋白降解的 WB 实验中都没有显示预测的活性, 这可能与该类化合物的细胞渗透性不理想有关。

9 嘧啶并三嗪类化合物

嘧啶并三嗪类化合物是一类新型结构的 Hsp90 抑制剂, 其作用机制与之前的抑制剂不同。多肽折叠的机制认为, 新合成出的展开多肽开始连接在 Hsp40 上, 然后再从 Hsp40 转移至 Hsp70。Hsp70 和 Hsp90 通过它们的碳末端与两个 Hop (热休克蛋白组织蛋白) 的 TPR 区 (TPR1 和 TPR2A) 相互作用。多肽从 Hsp70 转移至 Hsp90 是成熟前的最后一个环节, 通过 TPR2A 使 Hsp90 和 Hop 连接是至关重要的。嘧啶并三嗪类化合物可以在 TPR 区与 TPR2A 竞争 Hsp90 的结合位点, 阻碍 Hsp90-Hop-Hsp70 复合物的形成, 从而抑制 Hsp90 的功能, 使 Her2 水平下降, 最终使细胞凋亡。通过人乳腺癌细胞 BT474 和 SKBR3 与这类化合物作用的实验可发现癌细胞的凋亡, 证实这类化合物具有良好的体外活性。化合物 **36** 比化合物 **37** 在 N1 位多一个甲基取代基, 这一微小变化导致化合物 **37** 无活性。其原因可能是失去甲基取代后增加了化合物 **37** 的极性并且减少了它对细胞膜的通透性。另外, 化合物 **37** 在体外也没有活性, 推测原因可能是甲基部分是化合物与 TPR 连接口袋相互作用的关键疏水基团^[33]。



结论

Hsp90 是一类新的抗癌生物靶点。目前, 已有多种 Hsp90 抑制剂进入临床研究, 取得了良好的效果, 有望为人类抗击癌症做出重要贡献。但是现有某些 Hsp90 抑制剂的作用机制尚不明确, 需要进一步对其进行探索。研制疗效确切的小分子 Hsp90 抑制剂是研究新型抗癌药物的新途径。

References

- [1] Whitesell L, Lindquist S. Hsp90 and the chaperoning of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 761–772.
- [2] Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery [J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 271–294.
- [3] Maloney A, Workman P. Hsp90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2002, 2: 3–24.
- [4] Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59: 1640–1648.
- [5] Prodromou C, Pearl LH. Structure and functional relationships of Hsp90 [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003, 3: 301–323.
- [6] DeBoer C, Meulman PA, Wnuk RJ, et al. Geldanamycin, a new antibiotic [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1970, 23: 442–447.
- [7] Liao ZY, Zhen YS. Advances in antitumor activity of the Hsp90 inhibitor geldanamycin [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2001, 36: 716–720.
- [8] Supko JG, Hickman RL, Grever MR, et al. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1995, 36: 305–315.
- [9] Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, et al. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent [J]. *Cell*, 1997, 89: 239–250.
- [10] Schulte TW, Akinaga S, Soga S, et al. Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin [J]. *Cell Stress Chaperones*, 1998, 3: 100–108.
- [11] Sharma SV, Agatsuma T, Nakano H. Targeting of the protein chaperone, Hsp90, by the transformation suppressing agent radicicol [J]. *Oncogene*, 1998, 16: 2639–2645.
- [12] Roe SM, Prodromou C, Pearl LH, et al. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin [J]. *J Med Chem*, 1999, 42: 260–266.
- [13] Agatsuma T, Ogawa H, Akasaka K, et al. Halohydrin and oxime derivatives of radicicol: synthesis and antitumor activities [J]. *Bioorg Med Chem*, 2002, 10: 3445–3454.
- [14] Ikuina Y, Amishiro N, Miyata M, et al. Synthesis and antitumor activity of novel O-carbamoylmethyloxime derivatives of radicicol [J]. *J Med Chem*, 2003, 46: 2534–2541.
- [15] Yamamoto K, Garbaccio RM, Stachel SJ, et al. Total synthesis as a resource in the discovery of potentially valuable antitumor agents: cycloproparadicicol [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, 42: 1280–1284.
- [16] Moulin E, Barluenga S, Winssinger N. Concise synthesis of pochonin A, an Hsp90 inhibitor [J]. *Org Lett*, 2005, 7: 5637–5639.

- [17] Proisy N, Sharp SY, Boxall K, et al. Inhibition of Hsp90 with synthetic macrolactones: synthesis and structural and biological evaluation of ring and conformational analogs of radicicol [J]. *Chem Biol*, 2006, 13: 1203–1215.
- [18] Chiosis G, Timaul MN, Lucas B, et al. A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells [J]. *Chem Biol*, 2001, 8: 289–299.
- [19] Vilenchik M, Solit D, Basso A, et al. Targeting wide-range oncogenic transformation via PU24FCl, a specific inhibitor of tumor Hsp90 [J]. *Chem Biol*, 2004, 11: 787–797.
- [20] He H, Zatorska D, Kim J, et al. Identification of potent water soluble purine-scaffold inhibitors of the heat shock protein 90 [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 381–390.
- [21] Zhang L, Fan J, Hong K, et al. 7'-Substituted benzothiazolothio- and pyridinothiazolothio-purines as potent heat shock protein 90 inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 5352–5362.
- [22] Ganesh T, Min J, Du Y, et al. Discovery of aminoquinolines as a new class of potent inhibitors of heat shock protein 90 (Hsp90): synthesis, biology, and molecular modeling [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 6903–6910.
- [23] Yin ZY, Henry EC, Gasiewicz TA. (–)-Epigallocatechin-3-gallate is a novel Hsp90 inhibitor [J]. *Biochemistry*, 2009, 48: 336–345.
- [24] Cheung KM, Matthews TP, James K, et al. The identification, synthesis, protein crystal structure and *in vitro* biochemical evaluation of a new 3, 4-diarylpyrazole class of Hsp90 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15: 3338–3343.
- [25] Dymock BW, Barril X, Brough PA, et al. Novel, potent small-molecule inhibitors of the molecular chaperone Hsp90 discovered through structure-based design [J]. *J Med Chem*, 2005, 48: 4212–4215.
- [26] Brough PA, Barril X, Beswick M, et al. 3-(5-Chloro-2, 4-dihydroxyphenyl)-pyrazole-4-carboxamides as inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15: 5197–5201.
- [27] Brough PA, Aherne W, Barril X, et al. 4, 5-Diarylisoaxazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 196–218.
- [28] Huang YT, Blagg BSJ. A library of noviosylated coumarin analogues [J]. *J Org Chem*, 2007, 72: 3609–3613.
- [29] Yu XM, Shen G, Blagg BSJ, et al. Hsp90 inhibitors identified from a library of Novobiocin analogues [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12778–12779.
- [30] Radanyi C, Le Bras G, Messaoudi S, et al. Synthesis and biological activity of simplified denoviose-coumarins related to novobiocin as potent inhibitors of heat-shock protein 90 (hsp90) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 2495–2498.
- [31] Barril X, Brough P, Drysdale M, et al. Structure-based discovery of a new class of Hsp90 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15: 5187–5191.
- [32] Ganesh T, Thepchatrri P, Li L, et al. Synthesis and SAR study of *N*-(4-hydroxy-3-(2-hydroxynaphthalene-1-yl)phenyl)-arylsulfonamides: heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors with submicromolar activity in an *in vitro* assay [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 4982–4987.
- [33] Yi F, Regan L. A novel class of small molecule inhibitors of Hsp90 [J]. *ACS Chem Biol*, 2008, 3: 645–654.