



赖氨酸靶向共价抑制剂的研究进展

毛冰洁^{1,2}, 张艳¹, 王颖哲^{1,2}, 尤启冬^{1,2*}, 郭小可^{1,2*}

1. 中国药科大学江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 南京 210098

2. 中国药科大学药学院药物化学系, 南京 210098

*通讯作者, E-mail: youqd@163.com; kexin95@126.com

收稿日期: 2025-04-12; 接受日期: 2025-05-21; 网络版发表日期: 2025-07-11

国家自然科学基金(编号: 82473789, 82173673)和中央高校基本科研业务费(编号: 2632024TD10)资助项目

摘要 随着药物设计理念的革新, 共价抑制剂研究再度成为药物化学领域的热点. 在生物信息学与蛋白组学技术的推动下, 赖氨酸因其高丰度、低突变率等特性, 逐渐突破传统半胱氨酸靶向的局限, 展现出成为新一代共价药物设计核心靶点的潜力. 大量研究显示, 通过非共价抑制剂中添加共价弹头设计特异性靶向赖氨酸的共价抑制剂, 实现了对靶蛋白的高效、选择性抑制的目的. 本文系统综述了基于赖氨酸靶向共价抑制剂的研究进展, 重点探讨了靶向赖氨酸的共价弹头类型、作用机制及设计策略, 为靶向赖氨酸的共价药物开发提供思路 and 参考.

关键词 共价抑制剂, 赖氨酸, 共价弹头

1 引言

共价抑制剂是一类通过与靶蛋白活性位点形成共价键实现功能抑制的小分子药物^[1,2]. 其发展历程可追溯至经典药物: 非甾体抗炎药阿司匹林通过乙酰化环氧合酶(COX) Ser530实现对酶的不可逆抑制, 从而影响花生四烯酸的代谢, 进而干扰前列腺素的生物合成^[3]; 抗生素青霉素则通过 β -内酰胺环共价修饰细菌黏肽转肽酶活性位点中的Ser36, 从而抑制细菌细胞壁的合成^[4]. 然而, 传统共价药物因潜在的脱靶毒性, 如对乙酰氨基酚代谢产物NAPQI通过共价修饰肝细胞蛋白引发肝损伤^[5], 曾长期制约该领域发展.

21世纪以来, 靶向共价抑制剂(targeted covalent inhibitors, TCIs)的设计革新破解了上述困局. 通过“亲电弹头-识别基团”的理性设计, TCIs可精准锚定

靶点亲核残基, 实现高效、长效抑制及耐药屏障突破^[6]. 美国食品药品监督管理局(FDA)批准的奥希替尼(Osimertinib)^[7]、奈拉替尼(Neratinib)^[8]以及索托雷塞(Sotorasib)^[9]等药物, 标志着共价药物从“广谱修饰”到“精准靶向”的范式突破^[10].

当前共价药物主要靶向半胱氨酸(cysteine, Cys)和丝氨酸(serine, Ser), 其巯基/羟基的高亲核性虽利于共价键的形成^[11,12], 但也面临关键挑战: (1) 靶点资源有限; (2) 耐药突变频发^[13](如EGFR T790M/C797S); (3) 不可逆结合加剧脱靶风险^[14]. 相较之下, 赖氨酸凭借其高丰度、进化保守性及 ϵ -氨基的可逆修饰潜力, 成为具有突破性的共价抑制剂潜力靶点^[15-17]. 研究揭示, 蛋白微环境可通过氢键重构或疏水空腔包裹, 将赖氨酸 pK_a 从10.5降至6.5~8.0, 显著增强其生理pH下的亲核活性^[18]. 基于此设计的可逆共价抑制剂不仅能

引用格式: Mao B, Zhang Y, Wang Y, You Q, Guo X. Emerging strategies in lysine-targeted covalent inhibitor development: mechanisms and design advances. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 2380–2391, doi: 10.1360/SSC-2025-0121

规避不可逆修饰的毒性风险, 更可靶向传统“不可成药”蛋白, 为肿瘤及退行性等疾病的治疗开辟新路径^[19-21].

鉴于赖氨酸的诸多优势及近年来的快速发展, 本文针对赖氨酸靶向共价抑制剂进行了系统综述, 探讨了赖氨酸共价的作用机制, 并以近年来基于不同类型共价弹头设计的靶向赖氨酸共价抑制剂案例重点讨论了该领域的策略方法和研究进展.

2 赖氨酸的性质及作用机制

2.1 赖氨酸的性质

赖氨酸相较于半胱氨酸具有更高的丰度(5.8%, 其数量几乎是体内半胱氨酸的3倍^[22])、更优的位点分布等优势, 使得靶向共价药物有望扩大至更多目标蛋白.

赖氨酸残基的伯胺基团(主要为 ϵ -NH₂)理论上可与亲电弹头发生反应, 然而蛋白质表面赖氨酸氨基的 pK_a 约10.4^[23], 导致生理条件(pH 7.4)下99%的氨基处于质子化状态而丧失亲核性^[24]. Dahal团队^[25]通过对比生理pH 7.4和碱性条件(pH 10.2)下*N*- α -乙酰-*L*-赖氨酸的 ϵ -NH₂反应活性, 发现在生理pH 7.4时, 其 ϵ -NH几乎完全质子化, 不与亲电试剂反应; 在pH 10.2时, 部分 ϵ -NH发生去质子化, 显现出亲核特性, 能够与亲电试剂发生反应. 这种环境选择性质子化机制实际上为特异性靶向提供了独特优势——高丰度的赖氨酸群体中仅少数处于活性态, 可显著降低非特异性反应风险.

蛋白质的功能受多种因素精细调控, 其中赖氨酸电离状态的改变至关重要. 实现赖氨酸靶向的关键在于 pK_a 调控策略. 蛋白质微环境^[26]可通过以下机制改变赖氨酸电离状态: (1) 催化功能相关的构象调整. 如Shannon^[27]发现的RB7共价抑制剂在蛋白环境中的选择性结合现象, 通过合成一系列炔基官能化芳基卤化物, 研究其在复杂蛋白质组中的反应性和氨基酸选择性, 发现氯硝基苯等的反应性可通过芳环修饰调节, 对氯硝基苯和二氯三嗪分别在低微摩尔浓度下对半胱氨酸和赖氨酸具有选择性, 且溶液中与蛋白质组中的反应性存在差异; (2) 局部电荷环境改变. Isom团队^[23]设计的葡萄球菌核酸酶证实催化过程中质子转移的调控作用, 具体表现为: 在低极性和低极化性的微环境中, 赖氨酸的 pK_a 值降低, 倾向于以中性形式存在; 内

部赖氨酸可与表面羧基发生库仑相互作用影响 pK_a 值; 蛋白质构象变化也会改变微环境, 进而影响赖氨酸电离; (3) 小分子干预, Mofidi Najjar等^[28]发现姜黄素可通过改变过氧化氢酶结构降低赖氨酸 pK_a , 且低 pK_a 状态可增强糖基化反应敏感性. 这些调控机制为开发选择性赖氨酸靶向药物提供了重要理论支撑.

2.2 赖氨酸的共价机制

靶向共价抑制剂与目标蛋白空腔中赖氨酸的反应包括两个关键步骤(图1). (1) 非共价结合: 抑制剂通过分子间作用力(如范德华力、氢键网络等)精准识别并嵌入靶蛋白结合腔, 其结合强度由配体-蛋白亲和力(K_i)决定, 从而使共价弹头与目标赖氨酸残基接近; (2) 共价结合: 赖氨酸的 ϵ -NH₂亲核进攻亲电性共价弹头, 进而发生反应形成共价键^[29]. 当逆反应速率常数 K_{-2} 趋近于0时, 形成不可逆共价复合物; 而当正向反应速率 K_2 为0时, 则表现为常规非共价抑制剂模式.

值得注意的是, 即使采用不可逆抑制策略, 靶蛋白功能仍可通过新蛋白合成途径逐渐恢复. 因此, 靶蛋白活性恢复时间不仅取决于抑制剂-蛋白复合物的停留时间, 更与靶蛋白的生物合成速率密切相关. 由于共价抑制剂与常规抑制剂的作用机制存在本质差异, 传统药物活性评价指标(如IC₅₀和解离常数)已不适用于准确评估共价抑制剂的活性特性. 在靶向共价抑制剂设计中, 还需特别关注结合动力学特征^[30]. 共价抑制剂的效能通常采用动力学效率常数 $K_i = K_{\text{inact}}/K_i$ 进行表征(图1), 该参数综合反映了非共价结合亲和力(K_i)与共价键形成速率(K_{inact})的协同效应. 其中, K_{inact} 表征共价键形成的最大速率常数, K_i 则定义为达到半数最大抑制效率所需的抑制剂浓度^[31]. 作为与时间无关的二级速率常数, K_{inact}/K_i 值既能体现非共价相互作用的结合强度, 也可有效表征共价键形成的动力学上限^[32].

3 靶向赖氨酸的代表性共价抑制剂

3.1 α,β -不饱和羰基类靶向赖氨酸的共价抑制剂

基于迈克尔加成机制的 α,β -不饱和羰基化合物是靶向赖氨酸的核心弹头类型. 这类弹头通过与赖氨酸 ϵ -NH₂发生1,4-共轭加成反应形成稳定共价键, 其反应活性可通过电子效应和空间位阻协同调控. 天然产物渥曼青霉素(wortmannin)通过呋喃环开环机制共价修

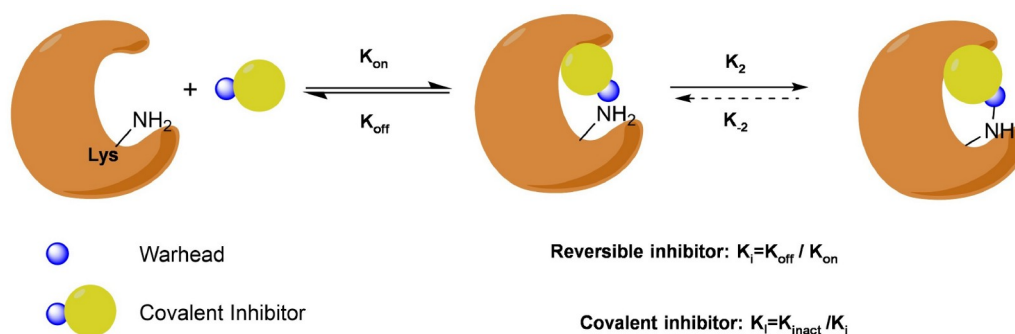


图1 (网络版彩图)赖氨酸靶向共价抑制剂的作用机理

Figure 1 (Color online) Mechanism of action of lysine-targeting covalent inhibitors.

饰磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol kinase, PI3K)的催化域Lys833, 但其选择性差和代谢不稳定性限制了临床应用^[33]. 通过将咪唑环用烯丙胺替代(图2A), 得到性质稳定的PI3K抑制剂索诺利塞(Sonolisib, $\text{IC}_{50} = 0.1 \text{ nM}$), 其通过烯胺与PI3K的ATP口袋中Lys833共价结合(图2B)^[34,35].

以丙烯酰胺为代表的共价弹头已成功运用在半胱氨酸靶向共价药物中. Liu等^[36]研究了酪氨酸激酶共价抑制剂与血浆蛋白共价结合, 结果显示, 除了奈拉替尼(neratinib)^[37]和吡咯替尼(pyrotinib)的报道外, 奥希替尼(osimertinib)、阿法替尼(afatinib)和伊布替尼(ibrutinib)的丙烯酰胺部分也被证实与人血清白蛋白的Lys190共价结合^[38], 说明丙烯酰胺亦可成为靶向赖氨酸的共价弹头, 但是需要考虑其引入后的选择性問題.

丙烯酸酯类共价弹头通过与赖氨酸发生共价反应, 在不可成药靶点领域展示出开发前景. 热休克蛋白72 (heat shock protein 72, HSP72)是一种应激诱导型ATP酶分子伴侣, 通过稳定蛋白和重新折叠蛋白维持细胞稳态^[36]. 由于与其结合的内源核苷酸底物具有高亲和力, 普通抑制剂很难竞争性结合, 使其成为不易成药靶点. 通过在原有抑制剂化合物1的结构基础上引入丙烯酸酯共价弹头, 获得丙烯酸酯类衍生物2(图3A), 其通过丙烯酸酯弹头与HSP72中的Lys56共价结合实现了对ATP酶活的高效抑制(图3B)^[39].

3.2 氟磺酰类靶向赖氨酸的共价抑制剂

芳基磺酰氟($\text{Ar-SO}_2\text{F}$)凭借其良好的平衡生物相容性和蛋白反应性, 在赖氨酸共价修饰领域展现出独

特优势^[40~42]. Zhao等^[43]开发的激酶探针XO44 (图4), 通过芳基磺酰氟共价标记ATP结合空腔的保守性Lys残基, 实现了活细胞内激酶组的广谱、高效标记, 为激酶抑制剂的靶点验证、脱靶效应评估及精准药物开发提供了革命性工具. 针对奥希替尼耐药型EGFR突变体(L858R/T790M/C797S), Ferlenghi团队^[44]设计、合成了化合物UPR1444 (图4), 其通过芳基磺酰氟弹头精准捕获催化域Lys745形成磺酰胺键, 显著增加了活性. 此外, 蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)由于界面面积大, 给PPI抑制剂的研发带来了较大的挑战, Gambini等^[45]将磺酰氟(SFs)弹头引入多肽BIM中, 通过共价靶向人髓样细胞白血病-1 (human myeloid cell leukemia-1, HMCL-1)的Lys234, 为这一挑战带来了新的研究策略.

尽管磺酰氟弹头已取得重要进展, 但其潜在的水解不稳定性可能限制其临床应用^[46], 在生理条件下, 磺酰氟容易发生水解反应, 导致其与靶蛋白的共价结合能力下降, 影响药物的疗效. 芳基氟硫酸盐在 $\text{pH} = 7.4$ 时非常稳定, 不易发生水解, 可有效解决磺酰氟弹头潜在的稳定性问题. Chen等^[47]的蛋白质组反应性分析显示, 在相同条件下, 芳基磺酰氟探针的修饰范围比芳基氟硫酸盐探针可能高出数十倍, 说明芳基氟硫酸盐具有更好的选择性, 更适合精准靶标治疗. 芳基氟硫酸盐与靶蛋白结合的能力在很大程度上受弹头的可逆结合、残基的适当取向和反应的过渡态稳定性的影响. Martín-Gago和Olsen^[48]就芳基氟硫酸盐弹头的反应性及其作为靶向共价抑制剂的优势进行了详细综述. Udompholkul等^[49]将芳基氟硫酸盐作为共价弹头引入X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apopto-

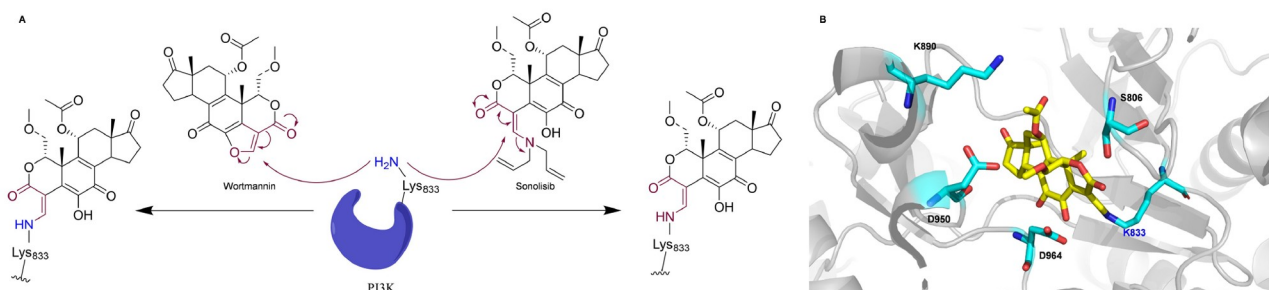


图 2 (网络版彩图) (A) 渥曼青霉素和索诺利塞与PI3K中Lys833反应; (B) 渥曼青霉素与PI3K中Lys833共价结合的晶体结构 (PDB:1E7U)

Figure 2 (Color online) (A) Wortmannin and Sonolisib react with Lys833 in PI3K; (B) crystal structure of the covalent binding of Wortmannin with Lys833 in PI3K (PDB:1E7U).

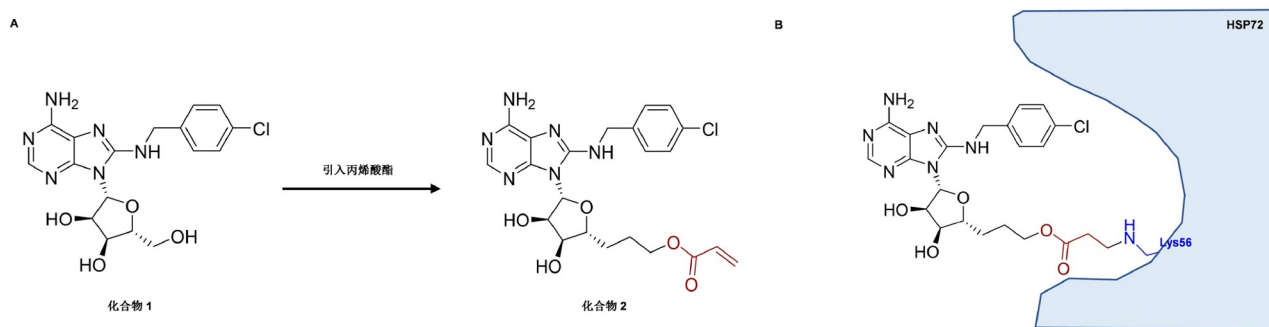


图 3 (网络版彩图) (A) 丙烯酸酯共价抑制剂2的发现; (B) 丙烯酸酯共价抑制剂2与HSP72蛋白的作用模式示意图

Figure 3 (Color online) (A) Discovery of acrylic covalent inhibitors 2; (B) the interaction mode of covalent inhibitor 2 with HSP72 protein.

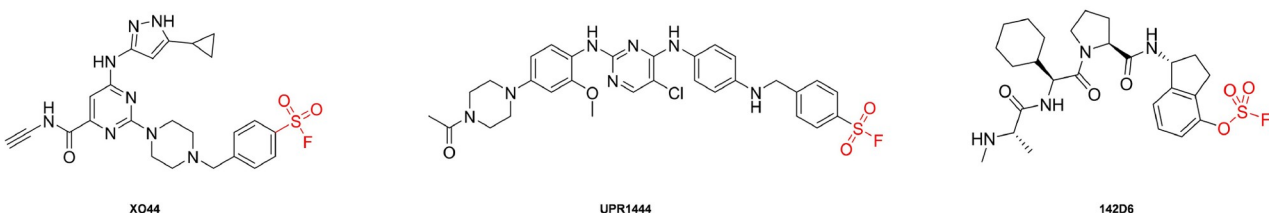


图 4 (网络版彩图) 化合物XO44、UPR1444、142D6的结构式

Figure 4 (Color online) Structures of compounds XO44, UPR1444 and 142D6.

sis protein, XIAP)的可逆抑制剂中,得到了靶向XIAP蛋白Lys299的共价抑制剂142D6 (图4), 其具有较长的半衰期和良好的口服生物利用度, 这一研究为开发长效低毒共价药物提供了新思路。

在开发共价蛋白标记工具及抑制剂的研究中, Chen等^[50]开发荧光转甲状腺素蛋白(TTR)探针时, 引入含不同功能基团的芳基氟代硫酸酯探针, 可实现对靶蛋白赖氨酸的共价修饰。这些研究探索了芳基氟代

硫酸酯与含Lys蛋白的作用, 为共价抑制剂的开发提供了方向。

3.3 醛/酮类靶向赖氨酸的共价抑制剂

醛基类弹头通过动态可逆的亚胺键(希夫碱)形成机制, 为赖氨酸靶向提供了独特的“共价可逆”调控模式。Chen等^[51]报道了利用2-乙炔基苯甲醛(EBA)的醛基(-CHO)与赖氨酸 ϵ -NH₂的反应性, 形成亚胺键, 从而

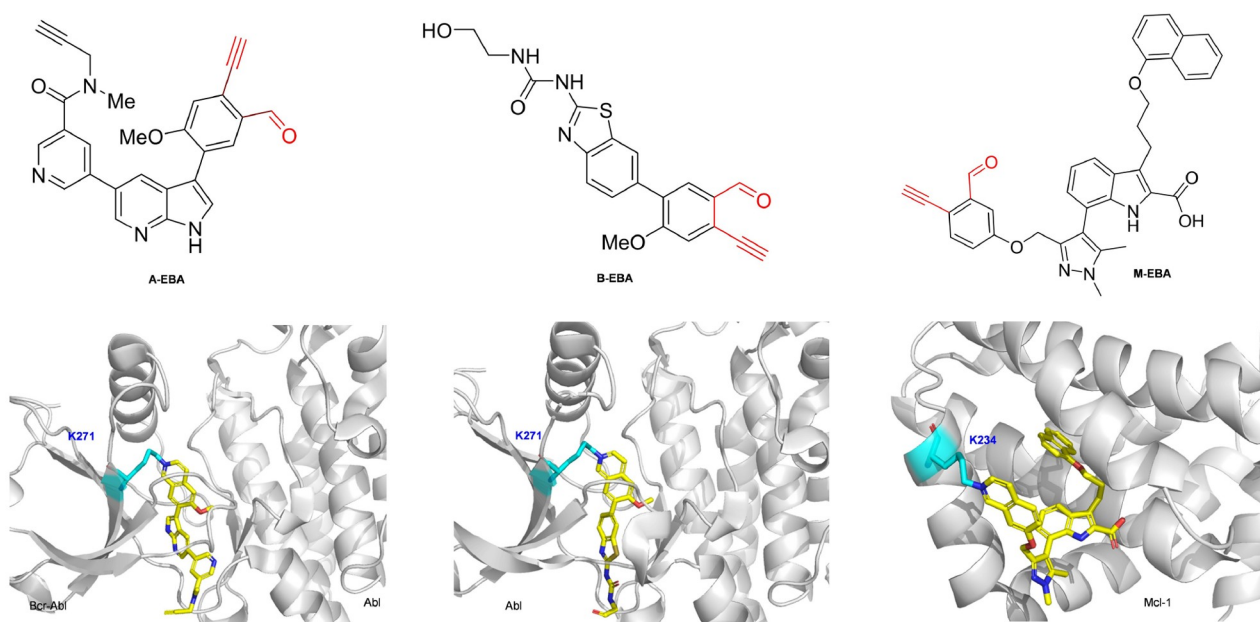


图5 (网络版彩图)含2-乙炔基苯甲醛(EBA)弹头的共价抑制剂与目标蛋白赖氨酸的共价结合示意图

Figure 5 (Color online) Schematic illustration of the covalent binding of covalent inhibitors to the lysine residue of target proteins via their 2-ethylbenzaldehyde (EBA) warhead.

实现对不同目标蛋白的共价修饰(图5), 因其具有较好的水解稳定性, 适合作为共价弹头用于各种蛋白赖氨酸的靶向共价抑制剂开发。Chen等^[51]通过在Abl激酶非共价抑制剂PPA结构中添加水杨醛弹头得到共价抑制剂A5 (图6A), 共晶结构显示其通过水杨醛与Abl激酶中Lys271的 ϵ -NH₂形成亚胺键, 同时观察到亚胺氮和羟基氢原子之间形成分子内氢键, 从而稳定了形成的希夫碱^[52] (图6B)。此项研究结果显示, 可以通过分子内氢键稳定亚胺键, 尽管分子内氢键可增强亚胺键的热力学稳定性, 邻羟基苯甲醛类弹头在体内复杂代谢环境中仍可能面临潜在挑战, 其亚胺键可能受pH波动或酶促作用影响发生水解, 导致药物有效浓度维持时间受限, 需通过结构优化(如引入刚性基团或配位辅助结构)进一步提升代谢稳定性。

Fei等^[53]通过分析ALKBH5的蛋白质结构并将水杨醛弹头引入非共价小分子配体中, 设计合成了ALKBH5共价抑制剂DDO-02267 (图7A)。DDO-02267特异性靶向ALKBH5中的Lys132 (图7B), 在体外表现出对ALKBH5的显著选择性(IC₅₀ = 2.53 μ M)。此外, DDO-02267增加了细胞内的m⁶A水平并可靶向AML细胞中的ALKBH5-AXL信号轴。

Dal Corso等^[54]系统分析了伯胺与醛基之间反应的平衡常数, 并研究了不同的芳香醛形成亚胺的比例, 发现邻位硼酸基团可诱导分子内B-N配位从而稳定亚胺, 故邻位硼酸取代的苯甲醛较普通苯甲醛具有更高的热力学稳定性, 能够进一步提高与蛋白的亲和力。通过将硼酸引入苯甲醛的邻位, 使得希夫碱形成时获得亚氨基硼酸酯, 后者通过亲核氮孤对电子和亲电硼中心之间的分子内配位键稳定^[55,56]。这种策略被成功应用于葡萄球菌分选酶可逆共价抑制剂RMR1 (图8A)的设计中^[55], 其通过邻氨基苯硼酸(AMPB)修饰的苯甲醛弹头与Lys173侧链氨基形成二氮硼烷结构, RMR1修饰的抑制剂的抗菌活性较母体化合物增强约13倍。

在难成药靶点髓细胞白血病1 (Mcl-1)的抑制剂开发中, Akçay等^[57]将邻硼酸苯甲醛弹头引入之前报道的基于吡啶酸的Mcl-1抑制剂3中, 邻硼酸苯甲醛弹头与Mcl-1蛋白中Lys234的 ϵ -NH₂发生可逆共价结合(图8B), 形成亚氨基硼酸酯键, 得到可逆共价抑制剂醛基硼酸衍生物4 (IC₅₀ = 3.4 nM)。硼酸基团的强极性可能降低分子脂溶性, 影响细胞膜穿透性, 进而可能影响药物在细胞内的有效浓度, 对药物发挥作用产生不利

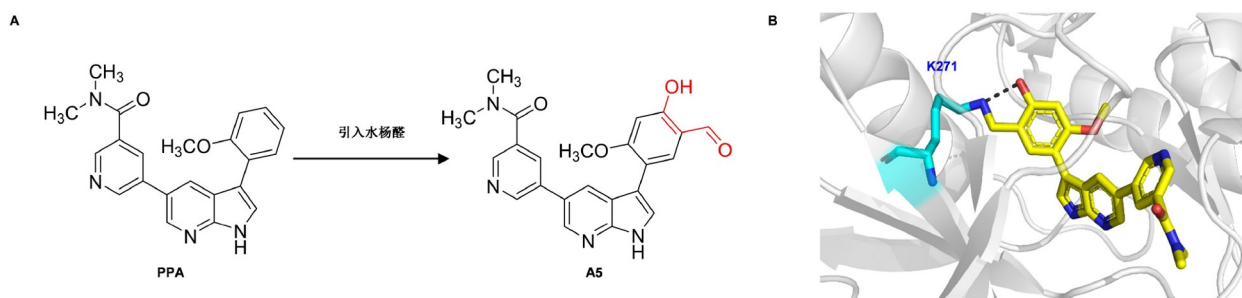


图 6 (网络版彩图) (A) 向PPA中添加共价弹头得到共价抑制剂A5; (B) 共价抑制剂A5与Abl激酶中Lys271共价结合的晶体结构(PDB:7W7Y)

Figure 6 (Color online) (A) Compound A5 obtained by incorporating a covalent warhead into PPA; (B) crystal structure of compound A5 covalently bound to Lys271 of Abl kinase (PDB:7W7Y).

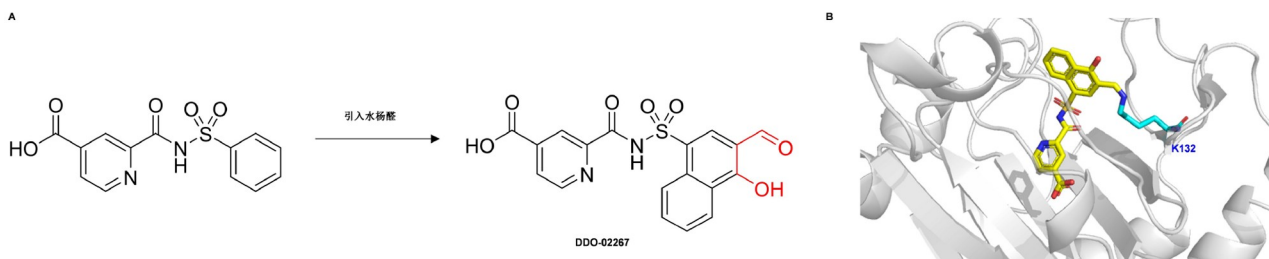


图 7 (网络版彩图) (A) ALKBH5共价抑制剂DDO-02267的化学结构; (B) DDO-02267与ALKBH5蛋白Lys132残基的分子对接示意图

Figure 7 (Color online) (A) ALKBH5 covalent inhibitor DDO-02267; (B) the binding mode of DDO-02267 with Lys132 residue in ALKBH5 protein.

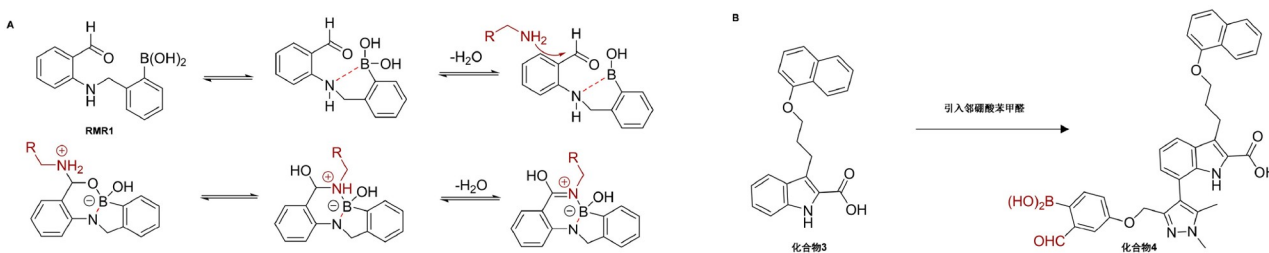


图 8 (网络版彩图) (A) RMR1与赖氨酸反应机理; (B) 由非共价抑制剂咪唑酸类衍生物3设计得到靶向Mcl-1的可逆共价抑制剂咪唑酸类衍生物4

Figure 8 (Color online) (A) Reaction mechanism of RMR1 with lysine; (B) reversible covalent inhibitor 4 targeting Mcl-1, designed from non-covalent inhibitor 3.

影响. 对于此类化合物, 应考虑通过优化脂溶性取代基改善跨膜效率.

醛基的高反应性虽为共价修饰提供动力, 但也可能导致潜在的细胞毒性和免疫反应等^[58]. 邻羟基苯甲醛类结构在体内代谢过程中, 醛基可能被氧化或发生其他化学反应, 影响药物的代谢稳定性, 进而影响

药物的疗效和安全性. 为此, 研究人员提出了酮基替换策略, 将醛变为酮可使代谢稳定性及溶解度得到较大提升, 并能够通过引入取代基调控亚胺的平衡常数^[59]. 与前述类似, 在酮基邻位引入硼酸酯得到了2-乙酰苯基硼酸(APBA), 其能够通过形成稳定的亚氨基硼酸酯, 可与赖氨酸发生可逆共价结合(图9A)^[60].

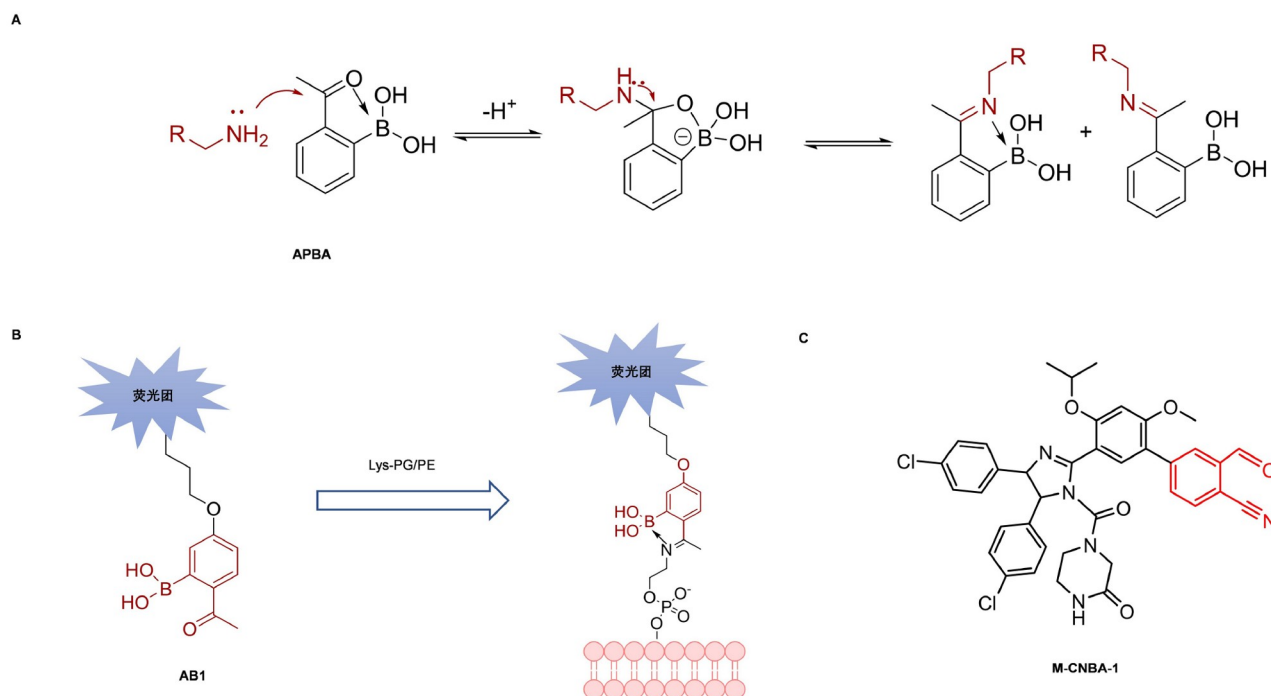


图9 (网络版彩图) (A) 2-酰基苯硼酸与赖氨酸反应机理; (B) AB1与Lys-PG和PE反应; (C) 含有邻氰基苯甲醛(CNBA)的共价抑制剂M-CNBA-1

Figure 9 (Color online) (A) Reaction mechanism of 2-acylphenylboronic acid with lysine; (B) reaction of AB1 with Lys-PG and PE; (C) A covalent inhibitor containing *o*-cyanobenzaldehyde (CNBA): M-CNBA-1.

Bandyopadhyay等^[61]合成了一种基于邻氨基苯硼酸(2-aminophenylboronic acid, APBA)的AB1, 通过APBA弹头与细菌表面两种主要的膜脂质磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)和赖氨酰磷脂酰甘油(lysylphosphatidylglycerol, Lys-PG)的ε-NH₂形成亚氨基硼酸酯, 可有效实现对革兰氏阳性菌的标记(图9B)。

为了解决生理条件下, 赖氨酸侧链的氨基处于较低亲核活性的质子化状态而难以实现高效地共价修饰的问题, Ling等^[62]发现了一类邻氰基苯甲醛(CNBA)弹头, 其通过独特的动态共价捕获机制, 融合了醛基的可逆亚胺键形成能力与氰基的邻基参与效应实现了赖氨酸修饰的可控性. 系统性验证显示, CNBA对模型蛋白FKBP12的赖氨酸显示出高标记率和高选择性. 在此基础上, 该团队将CNBA弹头引入MDM2-p53抑制剂Nutlin-3的结构中, 获得了M-CNBA-1 (图9C), 其通过靶向MDM2表面暴露的Lys94, 实现了对MDM2-p53相互作用的不可逆抑制, 从而大幅度提高

Nutlin类分子的抗肿瘤活性. CNBA作为一种新型选择性高效赖氨酸共价修饰弹头, 有望用于未来的药物开发。

3.4 二氯三嗪类靶向赖氨酸的共价抑制剂

二氯三嗪作为一种具有芳香性、易于合成和水解稳定的亲电基团, 成为新一代高选择性赖氨酸共价弹头的代表. Shannon团队^[27]通过探索芳基卤代物对蛋白质的反应性, 筛选发现了二氯三嗪衍生物RB7 (图10A)能够选择性共价修饰赖氨酸. 受此启发, Anderson等^[63]设计了含有二氯三嗪共价弹头的化合物KEA1-97, 可靶向硫氧化还原蛋白中第72位的赖氨酸(lysine 72), 有效破坏硫氧化还原蛋白与胱天蛋白酶1的相互作用, 诱导凋亡进而抑制乳腺癌细胞生长(图10B)。

3.5 活性酯类靶向赖氨酸的共价抑制剂

活性酯类弹头通过可控的酰化反应机制, 为靶向

赖氨酸提供了高选择性解决方案. 该策略受天然产物渥曼青霉素启发, 其通过活性 β -内酯环共价修饰 PI3K^[33], 实现了赖氨酸靶向. 基于此, Dalton团队^[64]通过对异二聚体脂质激酶磷酸肌醇3-激酶 δ (PI3K δ) 的抑制剂GSK-2292767进行改造, 引入4-氟苯酚活性酯, 得到酯类衍生物**5**. 该分子通过酰化Lys779实现不可逆抑制PI3K δ ($IC_{50} = 8$ nM) (图11A, B). Fournier等^[65]开发的酯类衍生物**6**进一步验证了活性酯的潜力, 其通过催化Lys779酰化, 通过二氢异苯并咪唑骨架精准定位至

PI3K δ 结合空腔, 进而活性酯弹头与Lys779形成酰胺键从而使激酶失活(图11C).

除了以上所述, Taylor团队^[66]设计了酰胺化的方酸酯类化合物作为一种温和的赖氨酸反应基团, 用于蛋白共价配体、共价探针的开发. 与此同时, 通过调整酰胺化部分链接的基团还可以有效地调整方酰胺与赖氨酸的反应活性, 更有利于对反应基团活性的控制. 随后, 在结核分枝杆菌靶向治疗中, UDP-方酸衍生物对分枝杆菌细胞壁中呋喃半乳糖基转移酶(GltT2)的

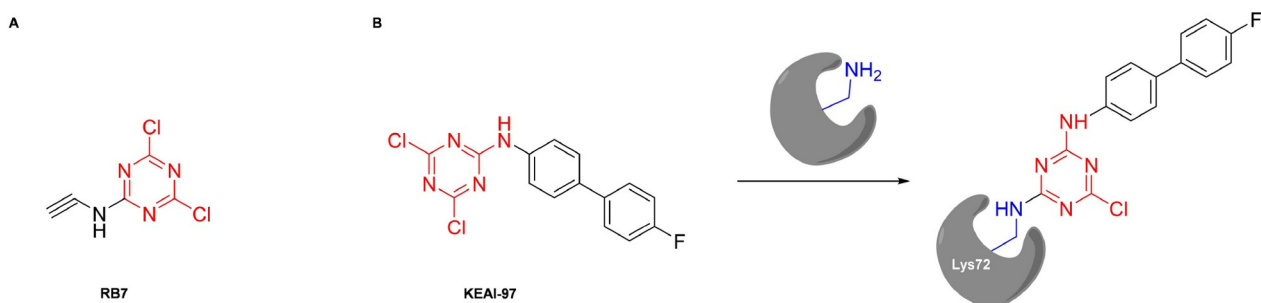


图 10 (网络版彩图) (A) 化合物RB7的结构; (B) KEA1-97与硫氧化还原蛋白中赖氨酸反应

Figure 10 (Color online) (A) Chemical structure of compound RB7; (B) reaction of KEA1-97 with lysine in thioredoxin.

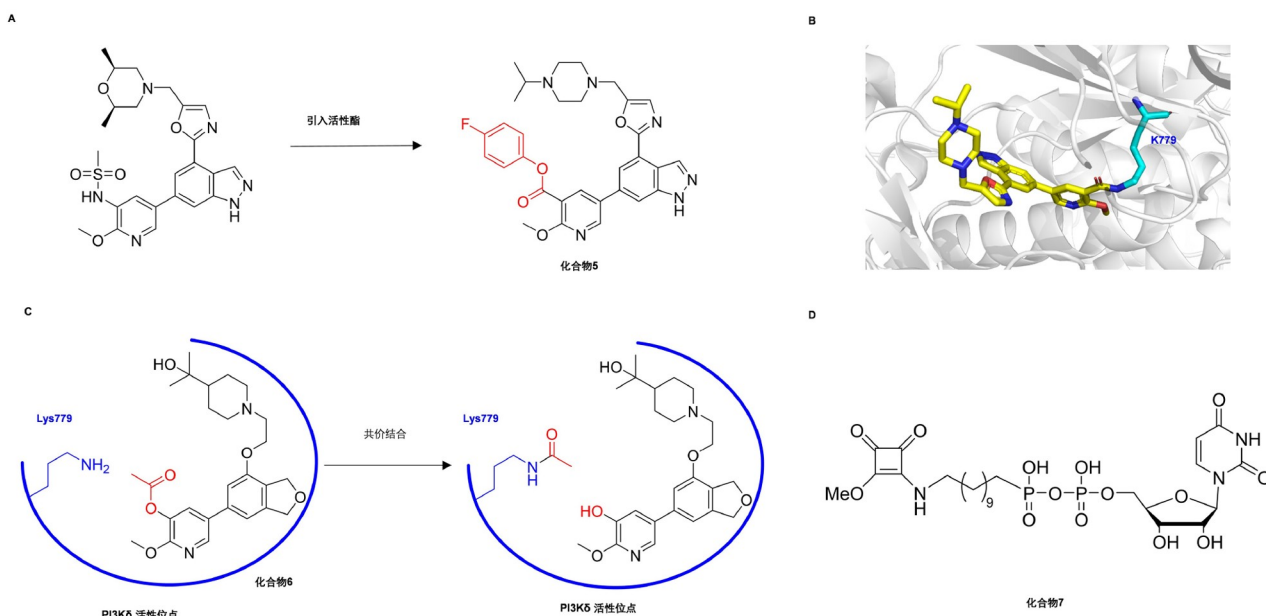


图 11 (网络版彩图) (A) 由临床候选药物设计得到靶向PI3K δ 的Lys779选择性共价抑制剂**5**; (B) 酯类衍生物**4**与PI3K δ 的Lys779共价结合的晶体结构(PDB:6EYZ); (C) 酯类衍生物**5**催化Lys779酰化示意图; (D) 化合物**7** UDP-方酸酯结构式

Figure 11 (Color online) (A) A selective covalent inhibitor **5** targeting Lys779 of PI3K δ designed from clinical candidate drugs; (B) the crystal structure of the covalent binding between ester derivative **4** and Lys779 of PI3K δ (PDB:6EYZ); (C) a schematic diagram of the acylation of Lys779 catalyzed by ester derivative **5**; (D) the structural formula of compound **7** UDP-sugarate.

共价修饰展现出卓越的位点选择性。尽管该酶表面具有21个暴露的赖氨酸, UDP-方酸酯化合物7 (图11D)能够通过适度的反应性和配体导向的邻近效应, 特异性共价修饰GltT2酶结合位点附近的赖氨酸残基(如Lys343)。这种“智能弹头”设计, 为肿瘤精准治疗开辟了新维度。

3.6 乙烯基砜类靶向赖氨酸的共价抑制剂

乙烯基砜作为迈克尔加成受体, 也可作为共价弹头设计靶向赖氨酸的共价抑制剂^[67]。在转甲状腺素蛋白(TTR)淀粉样变性引发的相关疾病^[68~70]治疗中, Suh等^[71]设计了共价抑制剂乙烯基砜类衍生物8, 其能够选择性地与Lys15的 ϵ -NH₂发生迈克尔加成, 这种共价修饰成功抑制了TTR四聚体的解离(图12A)。

Anscombe等^[72]于2015年开发了细胞周期蛋白依赖性激酶2 (CDK2)抑制剂NU6300 (图12B), 该抑制剂中乙烯基砜弹头能够选择性地与CDK2中非保守Lys89形成共价键(图12C), 进而抑制酶活(IC₅₀ = 0.16 μ M)。

4 总结与展望

赖氨酸因其高丰度、低突变率以及进化保守性, 显著拓展了可成药靶点的范围。靶向催化域保守赖氨酸可有效规避突变逃逸, 为克服临床耐药难题提供新路径。近年来, 可逆共价、微环境响应型弹头等技术

的成熟, 为开发选择性赖氨酸靶向药物提供了有力支撑。通过非共价抑制剂的结构基础上添加磺酰氟、水杨醛等共价弹头, 已获得了多个靶向赖氨酸的共价抑制剂。动态共价捕获(如CNBA)、微环境激活(如APBA)等策略的提出, 进一步提升了赖氨酸的反应活性, 已在激酶、蛋白-蛋白相互作用等领域取得显著进展, 不仅突破了传统不可成药靶点的限制, 更通过可逆共价机制将脱靶风险进一步降低。

然而, 目前该领域仍然存在部分问题有待进一步研究解决。现有研究多集中于细胞水平验证研究, 而在动物模型中的研究相对较少。由于体内生理环境复杂, 涉及多器官系统协同、药物代谢动力学及免疫反应等问题, 该类抑制剂能否像体外预期的高效、低毒还有待进一步的评价研究。靶向赖氨酸的小分子共价药物仍需应对动态修饰监控、耐药性预判及临床转化效率三大挑战, 未来研究可通过扩大动物模型研究、加强药代动力学、毒性评估等明确体内有效性和安全性特征以推进临床转化; 同时聚焦弹头设计创新, 结合计算机辅助设计与结构生物学优化性能; 整合蛋白质组学等技术挖掘新靶点、解析修饰机制, 推动肿瘤、神经退行性疾病等的精准治疗。当前, 靶向赖氨酸的共价抑制剂研究正处于快速积累阶段, 这一领域仍蕴藏巨大开发潜力。随着新型筛选策略的迭代和评价体系的完善, 赖氨酸靶向共价抑制剂将为肿瘤、感染性疾病及遗传性疾病等提供更精准的治疗方案。

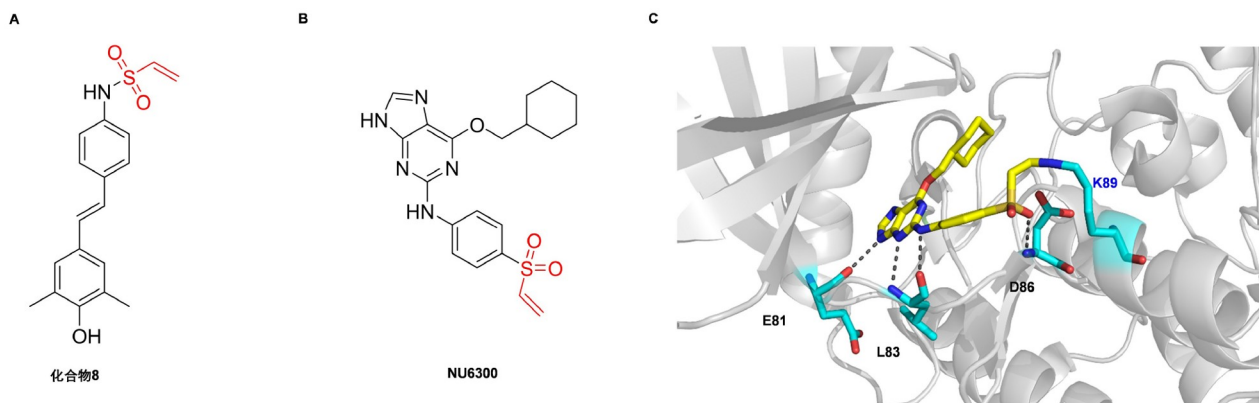


图 12 (网络版彩图) (A) 乙烯基砜类衍生物8; (B) NU6300的化学结构; (C) NU6300与CDK2中Lys89共价结合的晶体结构(PDB:5CYI)

Figure12 (Color online) (A) Vinyl sulfone derivative 8; (B) chemical structure of NU6300; (C) crystal structure of NU6300 covalently bound to Lys89 in CDK2 (PDB:5CYI).

参考文献

- 1 Dalton SE, Di Pietro O, Hennessy E. *J Med Chem*, 2025, 68: 2307–2313
- 2 Singh J, Petter RC, Baillie TA, Whitty A. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10: 307–317
- 3 Roth GJ, Stanford N, Majerus PW. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72: 3073–3076
- 4 Spratt BG. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1980, 289: 273–283
- 5 Jóźwiak-Bebenista M, Nowak JZ. *Acta Pol Pharm*, 2014, 71: 11–23
- 6 De Cesco S, Kurian J, Dufresne C, Mittermaier AK, Moitessier N. *Eur J Med Chem*, 2017, 138: 96–114
- 7 Fu K, Xie F, Wang F, Fu L. *J Hematol Oncol*, 2022, 15: 173
- 8 Chan A, Moy B, Mansi J, Ejlertsen B, Holmes FA, Chia S, Iwata H, Gnani M, Loibl S, Barrios CH, Somali I, Smichkoska S, Martinez N, Alonso MG, Link JS, Mayer IA, Cold S, Murillo SM, Senecal F, Inoue K, Ruiz-Borrego M, Hui R, Denduluri N, Patt D, Rugo HS, Johnston SRD, Bryce R, Zhang B, Xu F, Wong A, Martin M. *Clin Breast Cancer*, 2021, 21: 80–91.e7
- 9 de Langen AJ, Johnson ML, Mazieres J, Dingemans AMC, Mountzios G, Pless M, Wolf J, Schuler M, Lena H, Skoulidis F, Yoneshima Y, Kim SW, Linardou H, Novello S, van der Wekken AJ, Chen Y, Peters S, Felip E, Solomon BJ, Ramalingam SS, Dooms C, Lindsay CR, Ferreira CG, Blais N, Obiozor CC, Wang Y, Mehta B, Varrieur T, Ngarmchamnanrith G, Stollenwerk B, Waterhouse D, Paz-Ares L. *Lancet*, 2023, 401: 733–746
- 10 Baillie TA. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 13408–13421
- 11 Hillebrand L, Liang XJ, Serafim RAM, Gehringer M. *J Med Chem*, 2024, 67: 7668–7758
- 12 Gauthier JY, Chauret N, Cromlish W, Desmarais S, Duong LT, Falgout JP, Kimmel DB, Lamontagne S, Léger S, LeRiche T, Li CS, Massé F, McKay DJ, Nicoll-Griffith DA, Oballa RM, Palmer JT, Percival MD, Riendeau D, Robichaud J, Rodan GA, Rodan SB, Seto C, Thérien M, Truong VL, Venuti MC, Wesolowski G, Young RN, Zamboni R, Black WC. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 923–928
- 13 Luan S, Liu D, Zhao L. *Sci Sin Chim*, 2015, 45: 911–922 (in Chinese) [栾升霖, 刘丹, 赵临襄. 中国科学: 化学, 2015, 45: 911–922]
- 14 Gong Y, Andina D, Nahar S, Leroux JC, Gauthier MA. *Chem Sci*, 2017, 8: 4082–4086
- 15 Barf T, Kaptein A. *J Med Chem*, 2012, 55: 6243–6262
- 16 Smith AJT, Zhang X, Leach AG, Houk KN. *J Med Chem*, 2008, 52: 225–233
- 17 Claxton AJ, Cramer J, Pierce C. *Clin Ther*, 2001, 23: 1296–1310
- 18 Pettinger J, Jones K, Cheeseman MD. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 15200–15209
- 19 Gambini L, Baggio C, Udompholkul P, Jossart J, Salem AF, Perry JJP, Pellecchia M. *J Med Chem*, 2019, 62: 5616–5627
- 20 Pettinger J, Carter M, Jones K, Cheeseman MD. *J Med Chem*, 2019, 62: 11383–11398
- 21 Cuesta A, Taunton J. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 365–381
- 22 Abbasov ME, Kavanagh ME, Ichu TA, Lazear MR, Tao Y, Crowley VM, am Ende CW, Hacker SM, Ho J, Dix MM, Suciu R, Hayward MM, Kiessling LL, Cravatt BF. *Nat Chem*, 2021, 13: 1081–1092
- 23 Isom DG, Castañeda CA, Cannon BR, Garcia-Moreno E. B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 5260–5265
- 24 Platzer G, Okon M, McIntosh LP. *J Biomol NMR*, 2014, 60: 109–129
- 25 Dahal UP, Gilbert AM, Obach RS, Flanagan ME, Chen JM, Garcia-Irizarry C, Starr JT, Schuff B, Uccello DP, Young JA. *MedChemComm*, 2016, 7: 864–872
- 26 Yan Y, Xu JG, Chen GZ. *Sci Chim B-Chem*, 1997, 27: 16–22 (in Chinese) [鄢远, 许金钧, 陈国珍. 中国科学(B辑): 化学, 1997, 27: 16–22]
- 27 Shannon DA, Banerjee R, Webster ER, Bak DW, Wang C, Weerapana E. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 3330–3333
- 28 Mofidi Najjar F, Taghavi F, Ghadari R, Sheibani N, Moosavi-Movahedi AA. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 630: 81–90
- 29 Kim H, Hwang YS, Kim M, Park SB. *RSC Med Chem*, 2021, 12: 1037–1045
- 30 StreLOW JM. *SLAS Discov*, 2017, 22: 3–20
- 31 Copeland RA. *Methods Biochem Anal*, 2005, 46: 1–265
- 32 Li KS, Quinn JG, Saabye MJ, Guerrero JFS, Nonomiya J, Lian Q, Phung W, Izrayelit Y, Walters BT, Gustafson A, Endres NF, Beresini MH, Mulvihill MM. *Anal Chem*, 2022, 94: 1230–1239
- 33 Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayotou G. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 1722–1733

- 34 Bowles DW, Kochenderfer M, Cohn A, Sideris L, Nguyen N, Cline-Burkhardt V, Schnadig I, Choi M, Nabell L, Chaudhry A, Ruxer R, Ucar A, Hausman D, Walker L, Spira A, Jimeno A. *Clin Colorectal Cancer*, 2016, 15: 337–344.e2
- 35 Pitz MW, Eisenhauer EA, MacNeil MV, Thiessen B, Easaw JC, Macdonald DR, Eisenstat DD, Kakumanu AS, Salim M, Chalchal H, Squire J, Tsao MS, Kamel-Reid S, Banerji S, Tu D, Powers J, Hausman DF, Mason WP. *Neuro-Oncology*, 2015, 17: 1270–1274
- 36 Meng J, Liu X, Ma S, Zhang H, Yu S, Zhang Y, Chen M, Zhu X, Liu Y, Yi L, Ding X, Chen X, Miao L, Zhong D. *Acta Pharm Sin*, 2019, 40: 980–988
- 37 Wang J, Li-Chan XX, Atherton J, Deng L, Espina R, Yu L, Horwatt P, Ross S, Lockhead S, Ahmad S, Chandrasekaran A, Oganessian A, Scatina JA, Mutlib A, Talaat R. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38: 1083–1093
- 38 Liu X, Feng D, Zheng M, Cui Y, Zhong D. *Drug Metab Pharm*, 2020, 35: 456–465
- 39 Pettinger J, Le Bihan Y, Widya M, van Montfort RLM, Jones K, Cheeseman MD. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 3536–3540
- 40 Narayanan A, Jones LH. *Chem Sci*, 2015, 6: 2650–2659
- 41 Yang B, Wu H, Schnier PD, Liu Y, Liu J, Wang N, DeGrado WF, Wang L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 11162–11167
- 42 Liu F, Wang H, Li S, Bare GAL, Chen X, Wang C, Moses JE, Wu P, Sharpless KB. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 8029–8033
- 43 Zhao Q, Ouyang X, Wan X, Gajiwala KS, Kath JC, Jones LH, Burlingame AL, Taunton J. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 680–685
- 44 Ferlenghi F, Scalvini L, Vacondio F, Castelli R, Bozza N, Marseglia G, Rivara S, Lodola A, La Monica S, Minari R, Petronini PG, Alfieri R, Tiseo M, Mor M. *Eur J Med Chem*, 2021, 225: 113786
- 45 Gambini L, Udompholkul P, Baggio C, Muralidharan A, Kenjić N, Assar Z, Perry JJP, Pellecchia M. *J Med Chem*, 2021, 64: 4903–4912
- 46 Baggio C, Udompholkul P, Gambini L, Salem AF, Jossart J, Perry JJP, Pellecchia M. *J Med Chem*, 2019, 62: 9188–9200
- 47 Chen W, Dong J, Plate L, Mortenson DE, Brighty GJ, Li S, Liu Y, Galmozzi A, Lee PS, Hulce JJ, Cravatt BF, Saez E, Powers ET, Wilson IA, Sharpless KB, Kelly JW. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 7353–7364
- 48 Martín-Gago P, Olsen CA. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 957–966
- 49 Udompholkul P, Garza-Granados A, Alboreggia G, Baggio C, McGuire J, Pegan SD, Pellecchia M. *J Med Chem*, 2023, 66: 8159–8169
- 50 Chen W, Dong J, Plate L, Mortenson DE, Brighty GJ, Li S. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 7353–7364
- 51 Chen P, Tang G, Zhu C, Sun J, Wang X, Xiang M, Huang H, Wang W, Li L, Zhang ZM, Gao L, Yao SQ. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 3844–3849
- 52 Chen P, Sun J, Zhu C, Tang G, Wang W, Xu M, Xiang M, Zhang C, Zhang Z, Gao L, Yao SQ. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61: e202203878
- 53 Fei WL, Wang YZ, Feng QL, Li CT, Jiang RX, Zhang SD, Pan Y, Ni PF, Huang FR, Huangfu YB, Zhang SD, You QD, Guo XK. *Eur J Med Chem*, 2025, 284: 117183
- 54 Dal Corso A, Catalano M, Schmid A, Scheuermann J, Neri D. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 17178–17182
- 55 Reja RM, Wang W, Lyu Y, Haeflner F, Gao J. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 1152–1157
- 56 Cal PMSD, Vicente JB, Pires E, Coelho AV, Veiros LiF, Cordeiro C, Gois PMP. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 10299–10305
- 57 Akçay G, Belmonte MA, Aquila B, Chuaqui C, Hird AW, Lamb ML, Rawlins PB, Su N, Tentarelli S, Grimster NP, Su Q. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 931–936
- 58 Gampe C, Verma VA. *J Med Chem*, 2020, 63: 14357–14381
- 59 Crugeiras J, Rios A, Riveiros E, Richard JP. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 15815–15824
- 60 Bandyopadhyay A, Gao J. *Chem Eur J*, 2015, 21: 14748–14752
- 61 Bandyopadhyay A, McCarthy KA, Kelly MA, Gao J. *Nat Commun*, 2015, 6: 6561
- 62 Ling H, Li L, Duan L, Huang W, Zheng J, Zhang S, Li X, Qiu X, Zhou Y, Ma N, Ren X, Zhang J, Wang Z, Zhao Y, Tian R, Zhang Z-M, Ding K. *J Am Chem Soc*, 2025, 147: 25056–25060
- 63 Anderson KE, To M, Olzmann JA, Nomura DK. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 2522–2528
- 64 Dalton SE, Dittus L, Thomas DA, Convery MA, Nunes J, Bush JT, Evans JP, Werner T, Bantscheff M, Murphy JA, Campos S. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 932–939
- 65 Fournier JCL, Evans JP, Zappacosta F, Thomas DA, Patel VK, White GV, Campos S, Tomkinson NCO. *ACS Chem Biol*, 2021, 16: 1644–1653
- 66 Taylor KI, Ho JS, Trial HO, Carter AW, Kiessling LL. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 25056–25060
- 67 de Bruin G, van Rooden EJ, Ward D, Wesseling C, van den Nieuwendijk AMCH, van Boeckel CAA, Driessen C, Kisselev AF, Florea BI, van der Stelt M, Overkleef HS. *Eur J Org Chem*, 2017, 2017: 5921–5934
- 68 Ferina J, Daggett V. *J Mol Biol*, 2019, 431: 1540–1564

- 69 Szwec S, Kapłucha Z, Chamberlain JS, Konieczny P. *BioDrugs*, 2024, 38: 95–119
- 70 Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJW, McFarlane HT, Madsen AØ, Riekel C, Eisenberg D. *Nature*, 2007, 447: 453–457
- 71 Suh EH, Liu Y, Connelly S, Genereux JC, Wilson IA, Kelly JW. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 17869–17880
- 72 Anscombe E, Meschini E, Mora-Vidal R, Martin MP, Staunton D, Geitmann M, Danielson UH, Stanley WA, Wang LZ, Reuillon T, Golding BT, Cano C, Newell DR, Noble MEM, Wedge SR, Endicott JA, Griffin RJ. *Chem Biol*, 2015, 22: 1159–1164

Emerging strategies in lysine-targeted covalent inhibitor development: mechanisms and design advances

Bingjie Mao^{1,2}, Yan Zhang¹, Yingzhe Wang^{1,2}, Qidong You^{1,2*}, Xiaoke Guo^{1,2*}

¹ Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, China Pharmaceutical University, Nanjing 210098, China

² Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210098, China

*Corresponding authors (email: youqd@163.com; kexin95@126.com)

Abstract: With the innovation of drug design concepts, the research on covalent inhibitors has once again become a hotspot in the field of medicinal chemistry. Driven by bioinformatics and proteomics technologies, lysine, due to its characteristics such as high abundance and low mutation rate, has gradually broken through the limitations of traditional cysteine-targeting and shown the potential to become a core target for the design of a new generation of covalent drugs. A large number of studies have shown that by adding covalent warheads to non-covalent inhibitors to design covalent inhibitors specifically targeting lysine, the goal of highly efficient and selective inhibition of target proteins has been achieved. This article systematically reviews the research progress of lysine-targeted covalent inhibitors, with a focus on exploring the types of covalent warheads targeting lysine, their action mechanisms, and design strategies, providing ideas and references for the development of lysine-targeted covalent drugs.

Keywords: covalent inhibitors, lysine, covalent warhead

doi: [10.1360/SSC-2025-0121](https://doi.org/10.1360/SSC-2025-0121)