# 点击化学在药物发现中的应用

汇报人: 王风(博士一年级)

日期: 2022年05月05日



# CONTENTS

# 点击化学的简介

- 1.1 点击化学的背景
- 1.2 点击化学的定义
- 1.3 点击化学的特征与优势

# 2 点击化学的反应类型

- 2.1 叠氮-炔烃环加成反应(CuAAC和SPAAC)
- 2.2 硫(VI)-氟置换反应(SuFEx)
- 3 点击化学在药物发现中的应用
  - 3.1 药物研发的流程及策略
  - 3.2 点击化学在药物靶标鉴定中的应用
  - 3.3 点击化学在药物发现中的应用

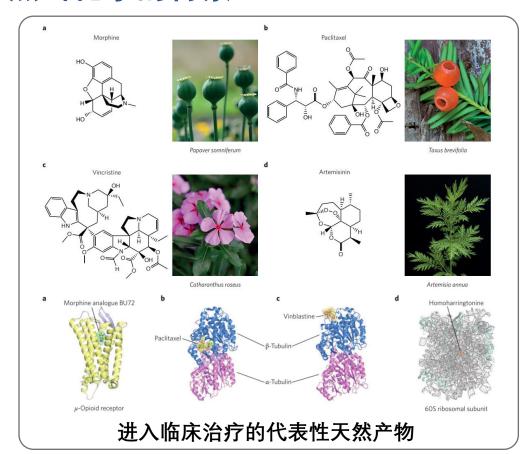
总结与展望

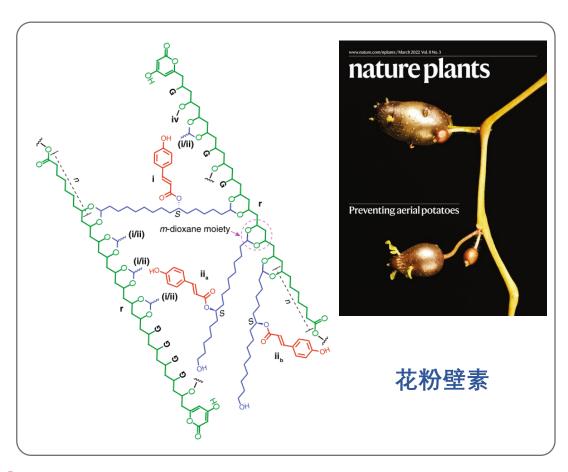


# 1. 点击化学的简介



### 1.1 点击化学的背景





**点击化学的概念最早来源于对天然产物和生物合成途径的观察。**自然界仅凭借二十余种<u>氨基酸</u>和十余种初 级代谢产物,能够通过拼接上千万个这一类型的单元(氨基酸、单糖),来合成非常复杂的生物分子(蛋白质和多 糖)。这一过程具有明显的倾向性,即"乐于"借助形成碳-杂原子键,来完成这一复杂的拼接。





# 1. 点击化学的简介



### 1.2 点击化学的定义



K. Barry Sharpless & 林国强院士 拍摄于2018年4月 Sharpless教授应邀参观上海中医药大学

### 2001年,提出"点击化学"概念



"Click it or ticket."

■ 点击化学 (Click chemistry): 又译为"链接化学"。主旨是通过小单元的拼接,来快速可靠地完成形形色色分子的化学合成。它尤其强调开辟以碳-杂原子键 (C-X-C) 合成为基础的组合化学新方法,并借助这些反应来简单高效地获得分子多样性。

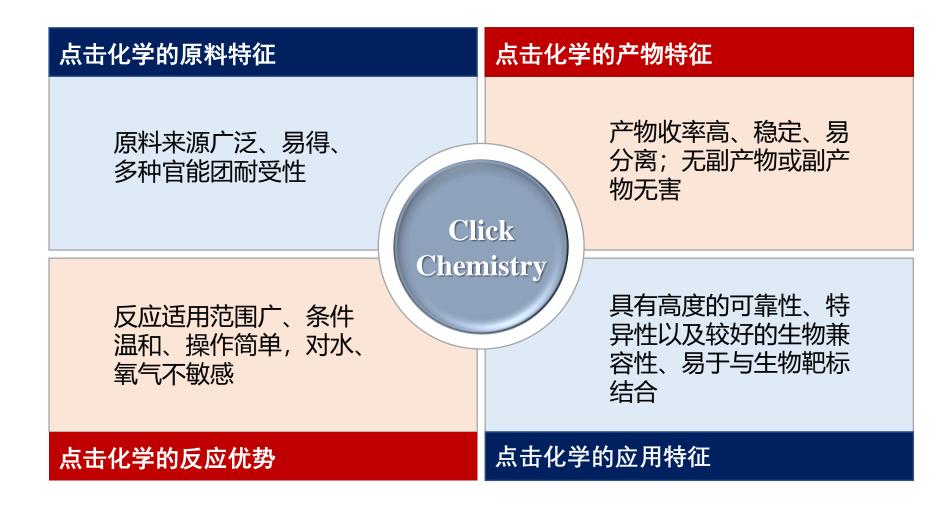




# 1. 点击化学的简介



### 1.3 点击化学的特征与优势



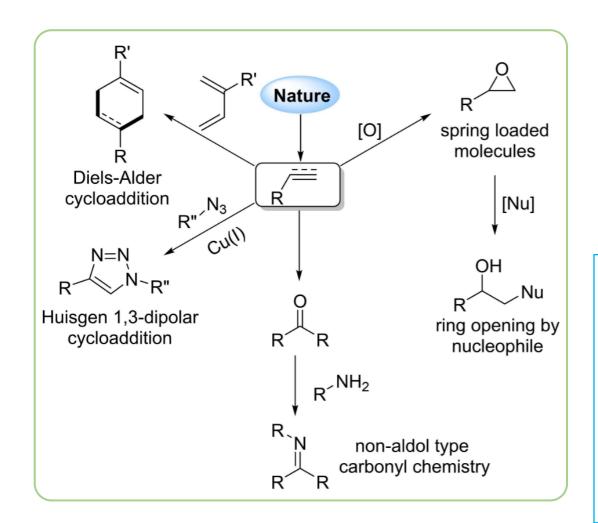


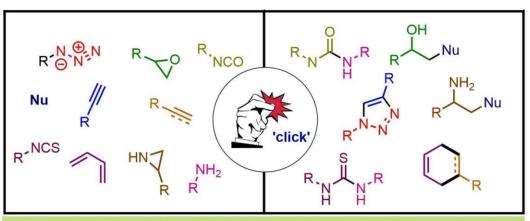


# 2. 点击化学的反应类型



### 口按反应类型分类





Divided by Functional Groups. United by 'Click Reactions'.

### 共同特征:

- 多为烯烃或炔烃衍生物,碳-碳多键为反应构建 的片段提供能量和机械途径;
- 大多数点击化学反应涉及碳-杂原子(主要是 N、O、S)键的形成;
- 点击化学反应通常是环合过程或缩合过程,副产物相对较少,具有极高的原子经济性。





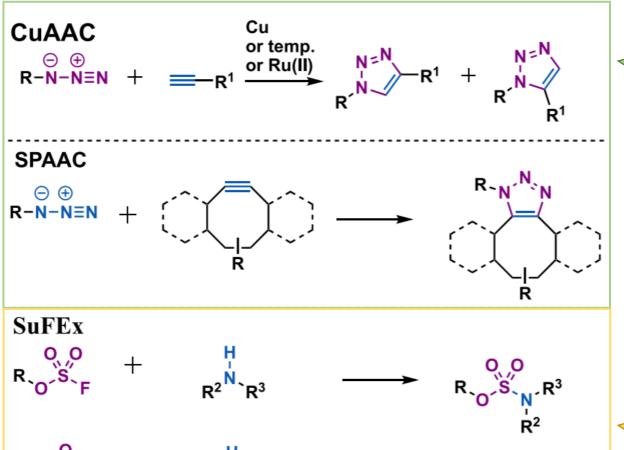
# 2. 点击化学的反应类型



### □ 经典的点击化学反应

- ✓ **K. Barry Sharpless**. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2002**; 41(14):2596-2599.
- ✓ **Morten Meldal.** *J Org Chem.* **2002**; 67(9):3057-3064.
- ✓ Carolyn R Bertozzi. J Am Chem Soc.
   2004;126(46):15046-15047.

✓ **K. Barry Sharpless**. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2014**;53(36):9430-9448.





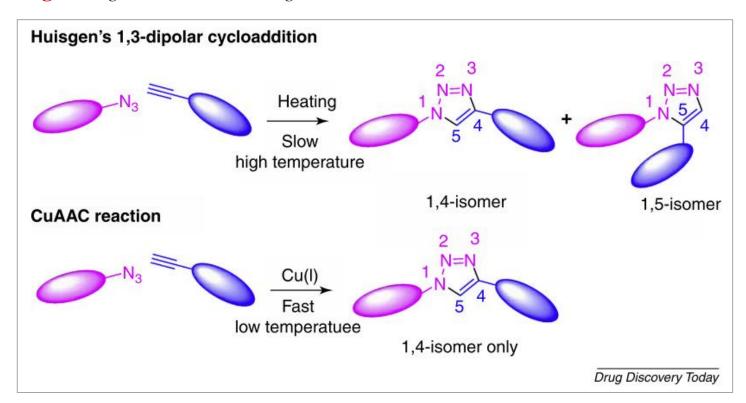






### 2.1.1 copper(I)-catalyzed azide—alkyne cycloaddition (CuAAC)

**Huisgen.** Angew Chem Int Ed Engl. **1963**, 2, 565–598.



- 反应温度高;
- 反应时间长;
- 区域选择性差。

- 高效且专一地生成1,4-取代的三氮唑结构;
- 反应速率大大提升;
- ➤ CuAAC反应是目前使用最为广泛的点击化学反应。

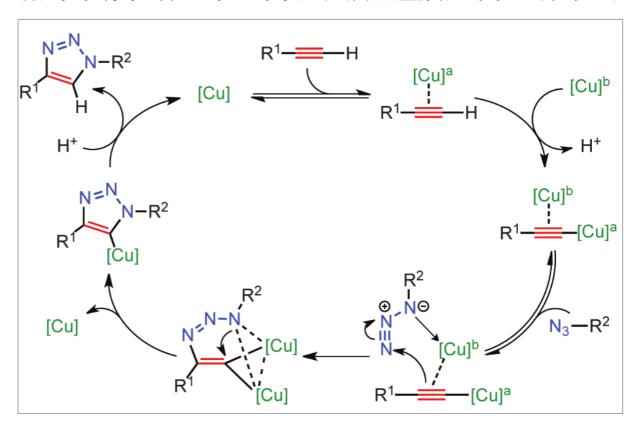






### 2.1.1 copper(I)-catalyzed azide—alkyne cycloaddition (CuAAC)

机理:反应循环中存在有两个Cu离子和炔基叠氮共同形成的六元铜金属环



- ➤ 活性铜(I)催化剂可以直接用一价铜盐或通过抗败血酸钠还原二价铜得到。
- 铜(I)可以参与很多氧化还原循环,产生对生物体系有毒的活性自由基, 所以不能应用于生物体系。







### 2.1.1 copper(I)-catalyzed azide—alkyne cycloaddition (CuAAC)

➤ 配体辅助的CuAAC反应(水溶性配体)

- 能够螯合铜离子,从而稳定一价铜离子;
- 加速反应速率;
- 极大减小对细胞或生物体的毒性;
- 适用于细胞表面标记。

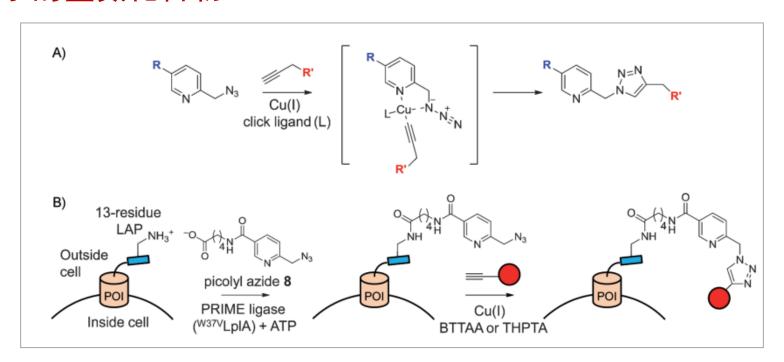






### 2.1.1 copper(I)-catalyzed azide—alkyne cycloaddition (CuAAC)

▶ 螯合铜离子的叠氮化合物



- 通过吡啶环上的N原子螯合铜离子,提升反应位点的有效铜离子浓度;
- 降低反应浓度的同时,能够提高反应效率;
- 能够与水溶性铜离子配体联用,进一步提升反应效率;
- 适用于活细胞内的生物大分子标记。

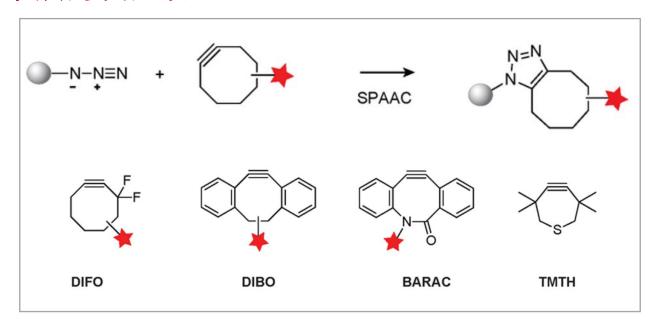






### 2.1.2 Strain-promoted Azide – Alkyne cycloaddition (SPAAC)

> 以高张力的环辛炔为反应物



- 环辛炔结构具有较大的角张力,因而其反应活性很高;
- 无需铜离子催化;
- 无明显的细胞毒性;
- 在生理条件下稳定;
- 多种环辛炔衍生物已商品化。







### □ SO<sub>2</sub>F<sub>2</sub>介导的SuFEx反应(Sharpless & Jiajia Dong, 2014)

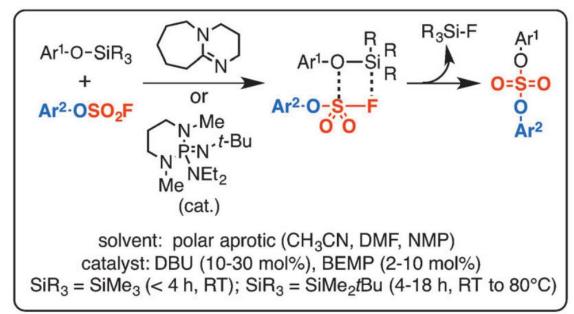




$$Ar^{1-}O-SiR_{3} \xrightarrow{SO_{2}F_{2}(g)} Ar^{1-}OSO_{2}F$$

$$CH_{3}CN, RT$$

$$Ar^{1-}OSO_{2}F$$



➤ 形成的Ar-O-SO<sub>2</sub>-链接具有良好的 稳定性,对水气的敏感性远低于 磷酸酯等类似物。

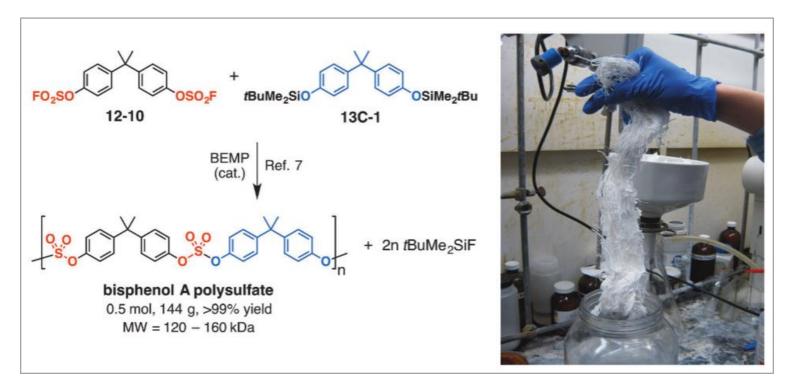






### □ SuFEx反应在材料科学领域的应用(Valery V Fokin & Jiajia Dong, 2014)

- ✓ 六价硫氟化物: 磺酰氟、氟代硫酸盐
- ✓ O、N亲核试剂: 苯酚、氨基和硅醚

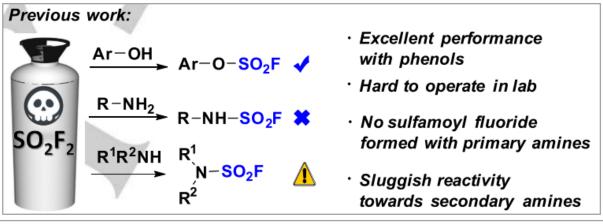


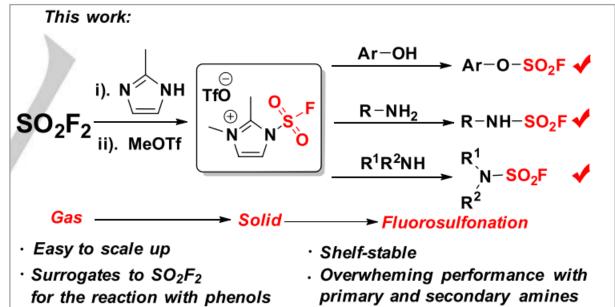
- 双 (芳基氟硫酸盐)和双 (芳基甲硅烷基醚)合成高分子量多硫酸盐聚合物;
- 该反应与许多官能团兼容,并且由于其操作简单而易于放大。





# □ 一种稳定的氟磺酰咪唑盐,作为 "F-SO<sub>2</sub>+" 供体(Sharpless & Jiajia Dong, 2017)





结合后的磺酰氟基团 反应活性大幅度提升。





### □ SOF₄介导的SuFEx反应(Sharpless, 2017)

HO 
$$\longrightarrow$$
 NH<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  SO<sub>2</sub>F<sub>2</sub>: SOF<sub>4</sub> (1:1)  $\longrightarrow$  Et<sub>3</sub>N (3 mol equiv) CH<sub>3</sub>CN, r.t.  $\longrightarrow$  Power September 1-26  $\longrightarrow$  Some conditions  $\longrightarrow$  Some conditions  $\longrightarrow$  Power Solid mp: 50 °C  $\longrightarrow$  NH<sub>2</sub> Same conditions  $\longrightarrow$  Power Solid mp: 50 °C  $\longrightarrow$ 

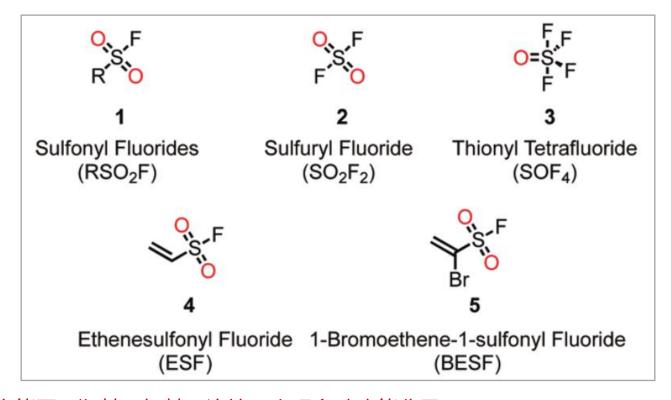
- ➤ SOF<sub>4</sub>对胺基官能团的反应活性高于羟基,从而得到另一种形式的六价硫链接;
- ➤ 结合SO<sub>2</sub>F<sub>2</sub>气体对酚羟基的高度选择性,可以实现对化合物的正交修饰。







### ■ Modular SuFExable hubs for click chemistry.



- 与常见的官能团(羟基、氨基)连接,实现多种功能分子;
- ▶ 与CuAAC相比, SuFEx在无金属条件下反应,在生物和药物发现应用中具有特别重要的意义;
- ➤ 与CuAAC 形成的 1,4-三氮唑连接相比,通过 SuFEx 连接产生的离去连接更加多样化;
- 在药物发现、生物医药以及聚合物和材料科学等方面的应用极为广泛。







### □ 硫(VI)氟化物交换的点击化学技术在新型抗菌药物研发中的应用研究

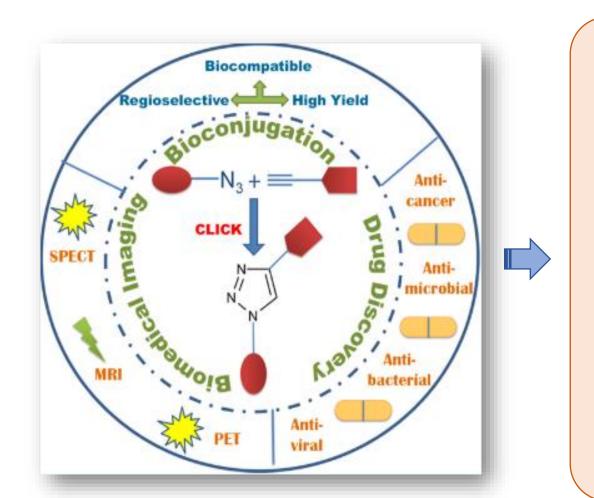
- 研究表明,含S(VI)-F-的化合物显示出低细胞毒性和低溶血活性, 可选择性地抑制革兰氏阳性细菌及其 生物膜, 在体外和体内都显示出良好的抗菌活性;
- ➤ S(VI)-F基团,特别是芳基氟硫酸酯,可作为多功能组分赋予前体分子新的或改进的生物活性。





# 3. 点击化学在药物发现中的应用





- 3.1 药物研发的流程及策略
- 3.2 点击化学在药物靶标鉴定中的应用
- 3.3 点击化学在药物发现中的应用
  - 3.3.1 1,2,3-三氮唑作为特定官能团的生物电子等排体
  - 3.3.2 1,2,3-三氮唑作为药效团的连接单元
  - 3.3.3 1,2,3-三氮唑作为拟肽结构
  - 3.3.4 1,2,3-三氮唑作为分子偶联结构
  - 3.3.5 基于点击化学的组合化学用于生物活性分子的发现
  - 3.3.6 原位点击化学用于生物活性分子的发现

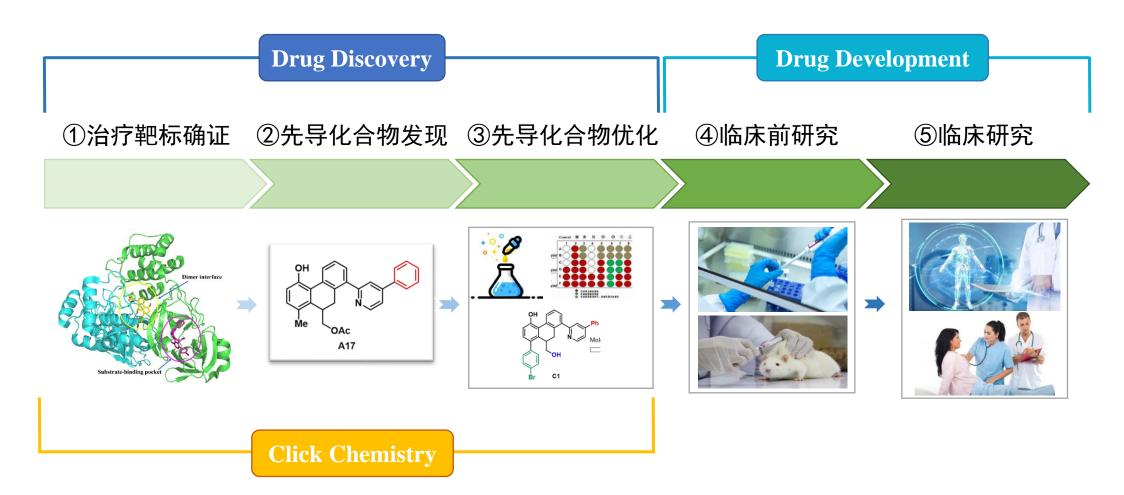




# 3.1 药物研发的流程及策略



### 3.1.1 药物研发的流程





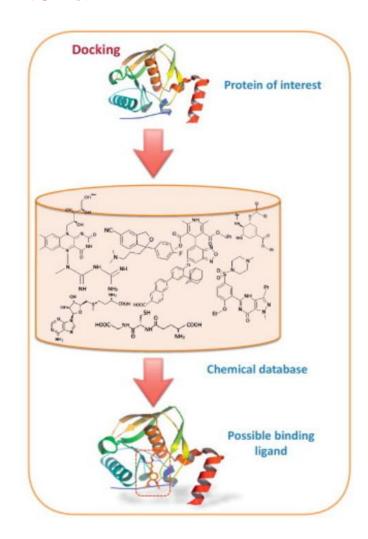


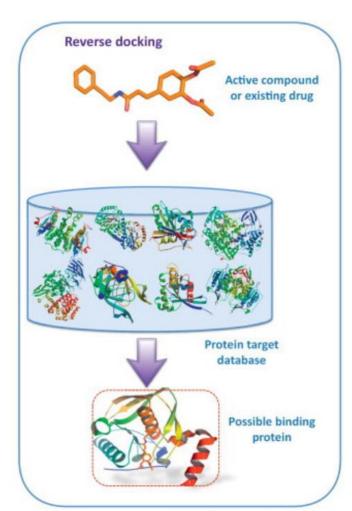
# 3.1 药物研发的流程及策略



### 3.1.2 药物研发的策略

已知疾病相关的蛋白靶标来筛选具有不同生物活性的小分子



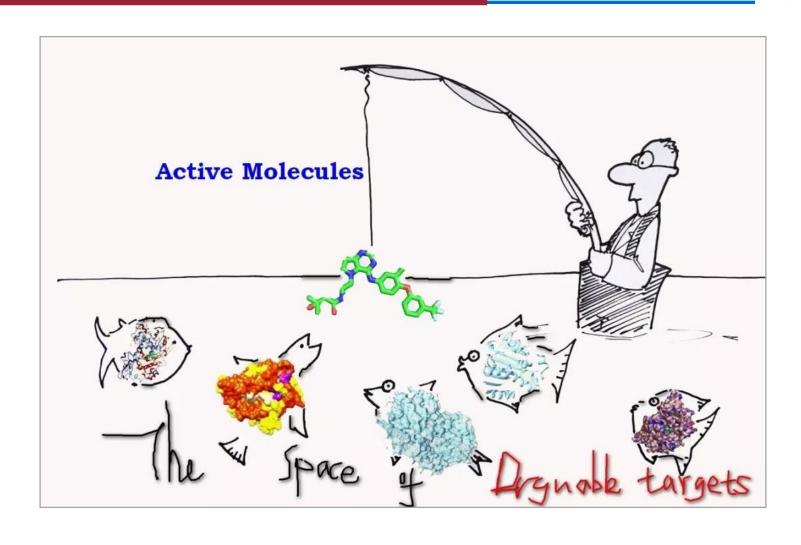


》已知活性小分子(来源于天然产物或表型筛选获得),对其进行研究获得生物靶标以及作用机制。









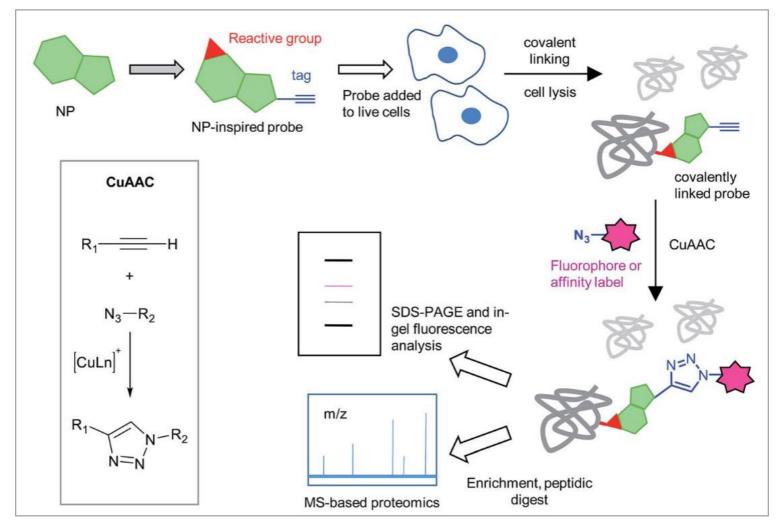
- ▶ 通过点击化学手段,将活性小分子与靶标结合,从而确证靶标结构;
- ▶ 目前,该策略广泛应用于中药活性成分及其他天然产物靶标鉴定中。







### □基于点击化学的药物靶标鉴定的方法

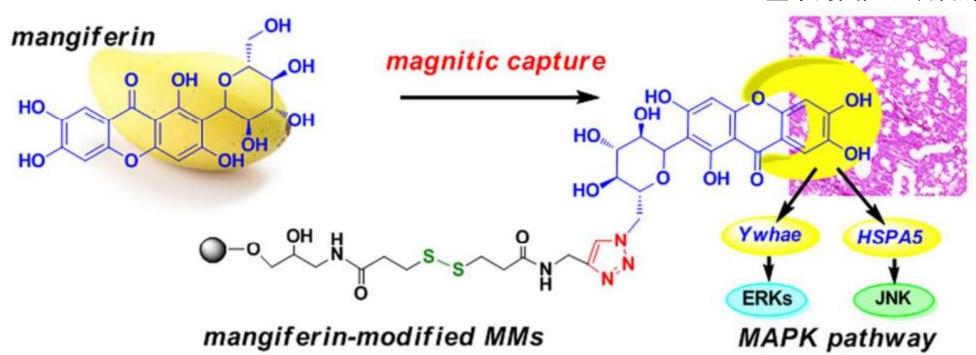






### □基于铜催化的点击化学对芒果苷作用靶点的鉴定

LPS诱导的小鼠肺炎模型中的炎症组织裂解



- ➤ 结果表明, 芒果干发挥抗炎作用的靶点是Ywhae和HSPA5;
- ➤ ELISA 表明芒果苷通过结合Hspa5 和 Ywhae 抑制下游 MAPK 信号通路发挥抗炎作用。



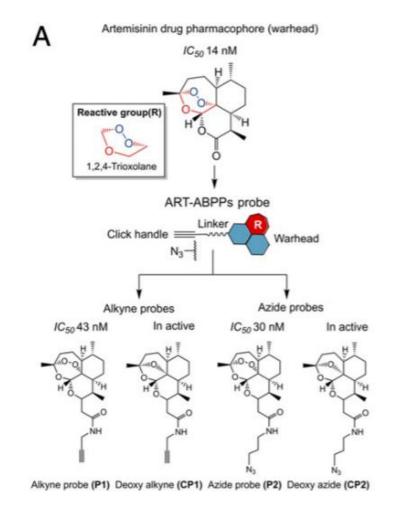


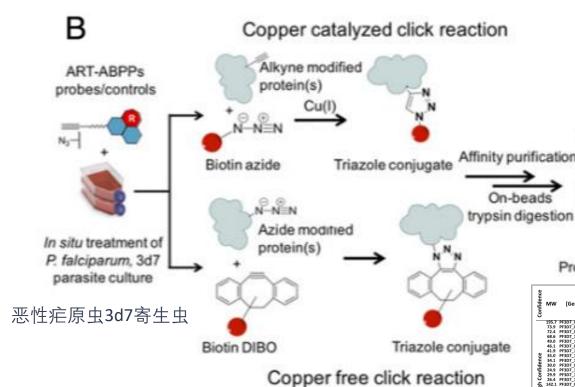


LC-MS/MS

Protein identification

### □基于铜催化点击化学及无铜点击化学对青蒿素作用靶点的鉴定





▶ 实验结果显示SPAAC反应具有更高的灵敏性。

对照品:为了避免非特异性依赖性标记





# 3.3 点击化学在药物发现中的应用



### ■ 1,4-取代的-1, 2, 3-三氮唑

- ▶ 作为药效团,能够参与氢键的形成或疏水相互作用;
- ▶ 作为分子骨架,能够调节其他药效团,维持其活性构象;
- 作为连接基团,能够连接两个活性分子或活性分子与探针。

### 经典的点击化学反应(CuAAC)





# 3.3 点击化学在药物发现中的应用



### ■ 含有 1,2,3-三氮唑结构的药物



# 3.3.1 1,2,3-三氮唑作为特定官能团的生物电子等排体



### ロ 用于替代原有活性分子中的相应结构

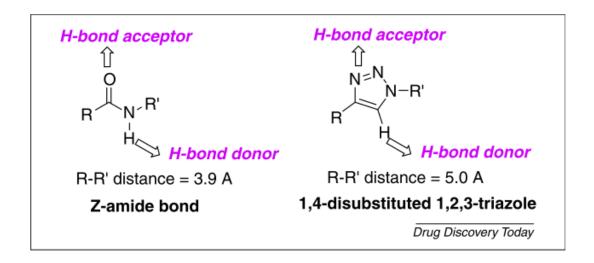
**Figure1:** Discovery of selective  $\sigma(1)$  receptor ligand using 1,2,3-triazole as a bioisosteric replacement of parazole.

化合物2针对δ1受体的活性以及选择性有所提升。

Carmen Almansa, et al. J Med Chem. 2015;58(5):2441-2451.

### □ 用于酰胺结构的生物电子等排体

**Figure2**: 1,4-Disubstituted 1,2,3-triazole as a good bioequivalent surrogate for the amide bond.



三氮唑结构具有更强的靶标蛋白相互作用 能力以及生物环境稳定性。

Peng Zhan, et al. Drug Discov Today. 2016;21(1):118-132.





# 3.3.1 1,2,3-三氮唑作为特定官能团的生物电子等排体



### □ 用于酰胺结构的生物电子等排体

Figure 3: Discovery of a new series of potent HIV-1 Vif antagonists, using 1,2,3-triazole as an amide bioisostere.

O<sub>2</sub>N—S NH O O<sub>2</sub>N—S N<sub>N</sub>N A 
$$\frac{4}{\text{EC}_{50}} = 6 \mu \text{M} \text{ (H9 cells)}$$
 $C_{50} = 0.01 \mu \text{M} \text{ (H9 cells)}$ 
 $C_{2}N$ 
 $C_{2}N$ 

▶ 利用Cu催化的点击化学反应能够简化前体分子的合成,并能够高效获得这一类分子的化合物库, 从而提高药物筛选的效率。





# 3.3.2 1,2,3-三氮唑作为药效团的连接单元



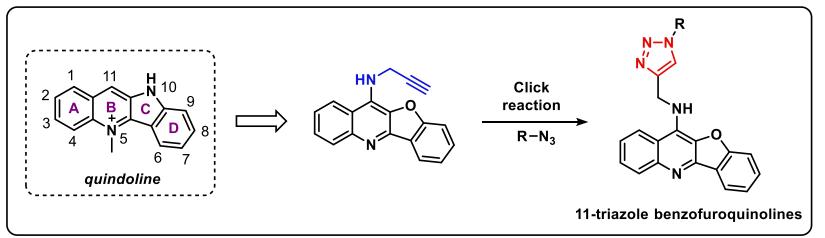
### □ 将一些具有特殊活性的功能基团连接在已有的分子上

Figure 4: Click chemistry in lead optimization of boronic acids as β-lactamase inhibitors.

- 引入羧基不仅降低了其细菌耐药性,且提高了其水溶性;
- > 实现硼酸类抑制剂的多样化。

Fabio Prati, et al. J Med Chem. 2015;58(14):5445-5458.

Figure 5: Discovery of benzofuro[3,2-b]quinolone derivatives as c-myc G-quadruplex-specific stabilizers via click chemistry.



- 高效得到一类喹叨啉类衍生物;
- 结合亲和力、选择性和体内抑制活性均有提升。





# 3.3.2 1,2,3-三氮唑作为药效团的连接单元

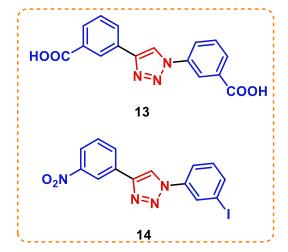


**Figure 6:** A click chemistry platform for the discovery of [3-hydroxy-5-(1h-1,2,3-triazol-4-yl)picolinoyl]glycines as orally active hypoxia-inducing-factor prolyl hydroxylase inhibitors with favorable safety profiles for the treatment of anemia.

Xiaojin Zhang, et al. J Med Chem. 2018;61(12):5332-5349.

Figure 7: Discovery of triazole derivatives that induce Nrf2-dependent gene products and inhibit Keap1-Nrf2 protein—protein

interaction via in silico docking calculations and click chemistry.



化合物13和14在体外能够很好的抑制蛋白蛋白相互作用并增强Nrf2依赖性基因表达。





# 3.3.3 1,2,3-三氮唑作为拟肽结构



### □ 三氮唑作为肽键的电子等排体能够提高蛋白酶的稳定性

Figure 8: Discovery of novel epoxide-incorporating peptidomimetics as selective calpain inhibitors via click chemistry.

Gregory R J Thatcher, et al. J Med Chem. 2013;56(15):6054–6068.

### □ 引入蛋白水解稳定的三氮唑结构用于多肽的环化

Figure 9: Click-chemistry-mediated synthesis of melanocortin receptors agonist.

与生成酰胺键相比,生成 三氮唑具有反应效率高, 产物单一的优点。

可以稳定这个直链肽的α螺旋结构,从而使得它与蛋白靶标的结合力得到提升。





# 3.3.4 1,2,3-三氮唑作为分子偶联结构



### □ 1, 2, 3-三氮唑作为药物载体的连接单元

Figure 10: Click-chemistry-mediated conjugation of a nonspecific antiviral sapogenin with a HIV fusion inhibitor.

▶ 两者单独使用时其抗病毒效力较弱

➢ 开发了一系列杂合化合物,其中,化合物19表现出协同作用,具有较强的抗HIV-1 效力和良好的药代动力学性能。





# 3.3.4 1,2,3-三氮唑作为分子偶联结构



### □ 1, 2, 3-三氮唑用于构建PROTAC降解剂

PROTACs被认为是一种很有前途的靶向治疗方法,点击化学作为可靠的连接手段应用广泛。

Figure 11: Click-chemistry-mediated rapid synthesis of bispecific molecules for inducing protein degradation.

高效获得一类诱导蛋白降解的双特异性分子。





# 3.3.4 1,2,3-三氮唑作为分子偶联结构



### □ 1, 2, 3-三氮唑用于偶联药物分子、靶向基团/探针

Figure 12: A click chemistry platform for synthesis of 1,2,3-triazole as a linker unit of targeting conjugates or probes.

通过使用靶向基团或探针,使得功能性蛋白质可以在其自然 环境中被检测。 Kenneth A Jacobson, et al. J Med Chem. **2014**;57(9):3874–3883. Iwao Ojima, et al. J Med Chem. **2014**;57(13):5777–5791. Olaf Prante, et al. J Med Chem. **2013**;56(22):9361–9365.





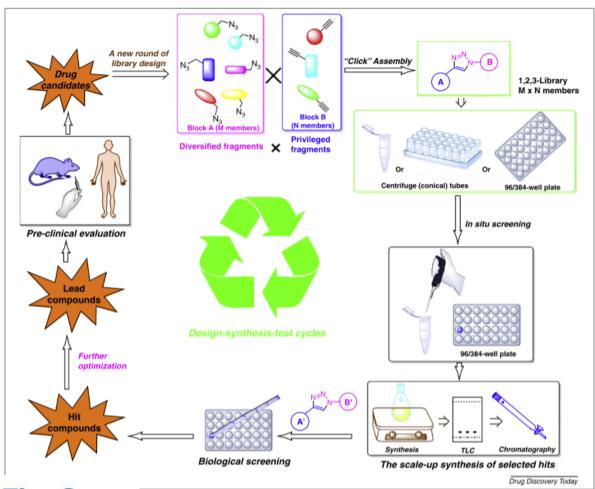
# 3.3.5 基于点击化学的组合化学用于生物活性分子的发现

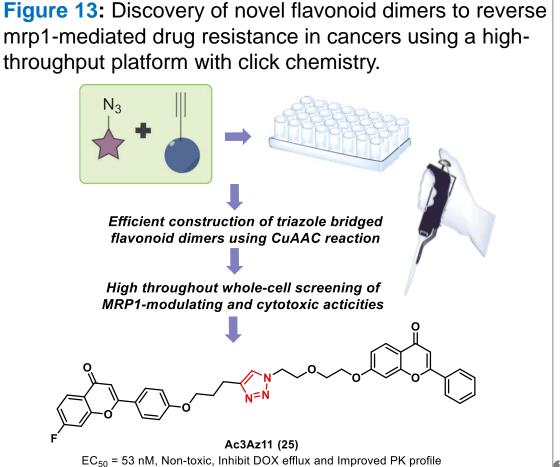


□ 生物活性分子的发现是依赖SAR数据的迭代生成;

Peng Zhan, et al. Expert Opin Drug Discov. **2019**;14(8):779-789. Peng Zhan, et al. Drug Discov Today. **2016**;21(1):118-132.

- □ 这种传统的方法费时费力, 导致从hit-to-lead的探索过程漫长且昂贵; Tak Hang Chan, et al. J Med Chem. 2018;61(22):9931-9951.
- □ CuAAC点击化学和原位筛选为建立SAR和利用组合库鉴定先导化合物提供了强大的方法。

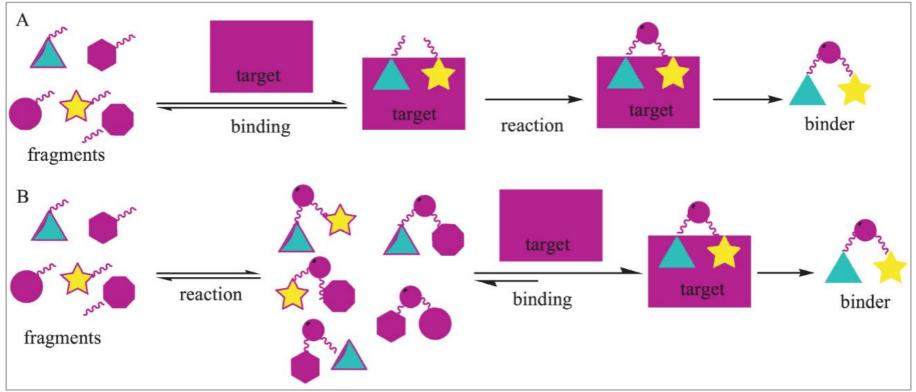








- 靶向合成(target-guided synthesis, TGS): 是一种利用生物靶标本身直接从含有互补反应官能团片段池中组装选择性配体的合成方法。
- □ 主要分为两类:
- (1) 不可逆反应形成的动力学控制 TGS, 即动力学 TGS(kinetic TGS, KTGS, 图A);
- (2) 可逆反应形成的热力学控制 TGS, 又称动态组合化学 (dynamic combinatorial chemistry, DCC, 图B)

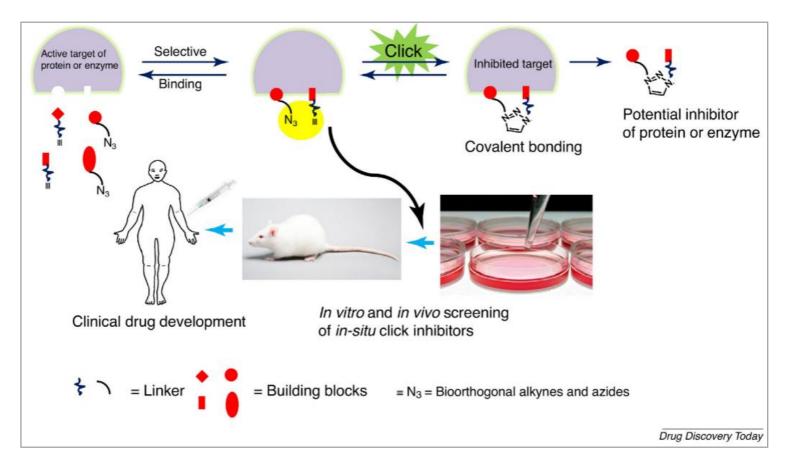








□ 原位点击化学(*in situ* click chemistry): 是叠氮-炔烃环加成反应在 TGS 中的应用。**即借助酶为合成模板**, **选择性连接各模块组分(building blocks),从而合成酶自身的抑制剂。** 



- 原位点击化学是一种用于药物开发的新策略;
- 选择在酶的生理活性条件下可发生的点击化学反应;
- 借助于酶的优势构象对小分子物质 亲和力的不同,高选择性合成更具药 效的酶自身的抑制剂。

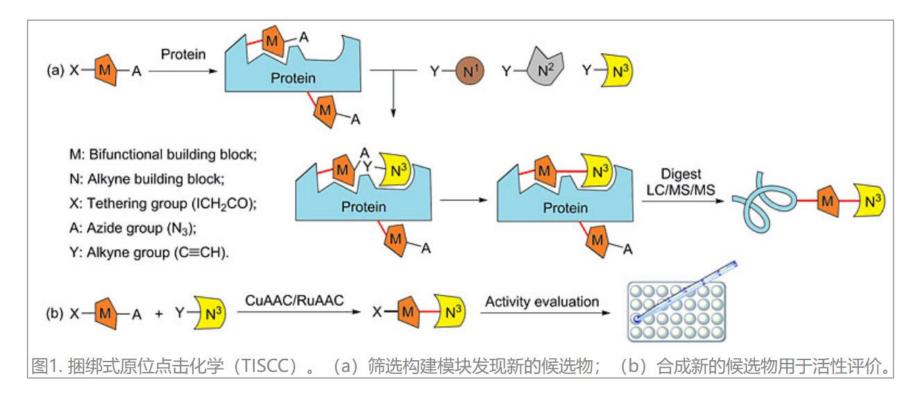
Schematic illustration of in situ click chemistry used to develop enzyme or protein inhibitors and drug development.







### □ 利用捆绑式原位点击化学发现细胞可渗透的O-GlcNAc转移酶抑制剂



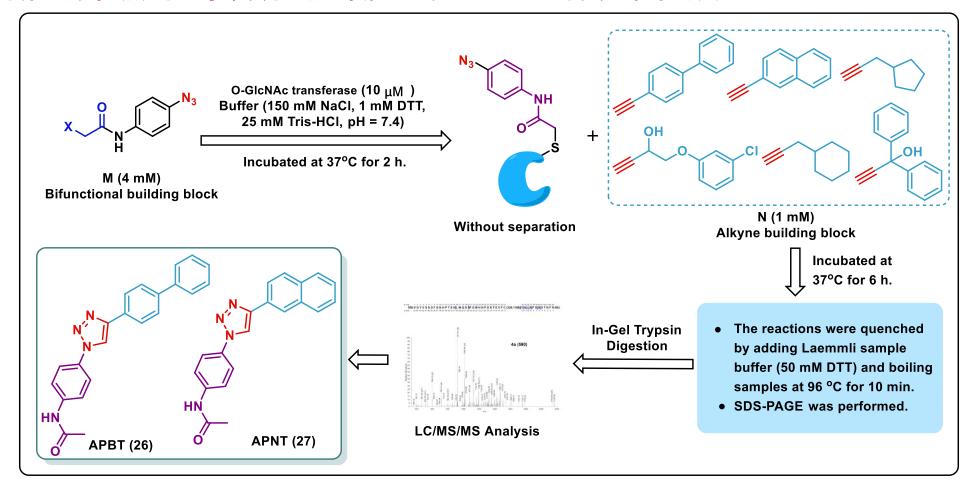
- $\triangleright$  构建模块M (含有两个活性基团ICH<sub>2</sub>CO) 和N<sub>3</sub>) : 实现与靶蛋白上半胱氨酸位点的捆绑;
- ▶ 构建模块N(含有一个活性基团C≡CH):将其加入模块M与靶蛋白捆绑的混合液中,在合适的位点发生原位点击化学反应;
- ▶ 利用SDS-PAGE将蛋白质与小分子分离,胰蛋白酶水解,并通过LC/MS/MS找出修饰的肽段;
- 新候选物的结构由修饰的精确分子量精确推断出来。







### □ 利用捆绑式原位点击化学发现细胞可渗透的O-GlcNAc转移酶抑制剂



- ➤ 在细胞中降低 O-GlcNAc糖基化水平,且没有明显的细胞毒性;
- ➤ TISCC 使用了更通用的构建模块,且只需检测蛋白质片段,即可以同时筛选多个结合口袋。







### ■ 点击化学在药物发现中的应用总结

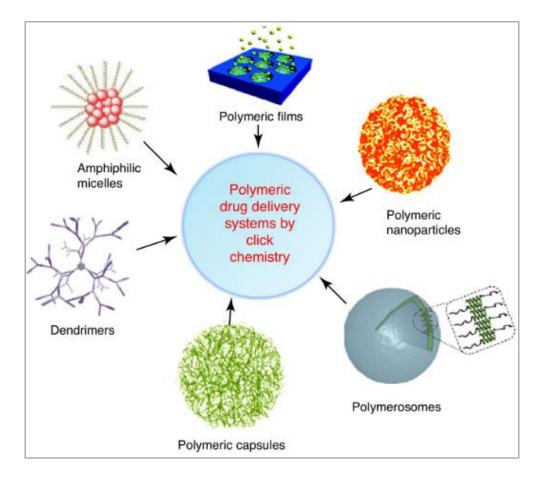
- 药物化学中最艰巨的挑战之一是合理化和加速先导化合物的发现和优化。 CuAAC 点击化学为制备药物和生物活性分子中常见的三唑基序提供了 一种简单且选择性的合成工具。
- ▶ 基于等排取代原理,三氮唑可以取代先导化合物中的酰胺键、各种杂芳基等。在保留关键的氢键和疏水相互作用的同时,从而扩展化合物库的结构多样性,并提供改善先导化合物的效力、理化性质和药代动力学特性的潜力。
- > 点击化学广泛用于(构象受限)肽模拟物或化学探针的合成。
- 点击化学与高通量筛选或组合化学的结合为生物活性分子的发现提供了一种快速、高效和可靠的工具。
- ▶ 基于CuAAC点击化学的药物发现是药物化学领域的研究热点之一。







### ■ 点击化学在其他方面的应用总结



点击化学被广泛应用于材料自组装、表面修饰、超分子化学、树枝状分子、功能聚合物等生物医用材料以及纳米药物领域。

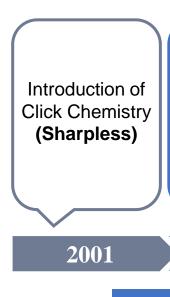






### ■ 点击化学发展历程

Jiajia Dong, et al. Nature. 2019;574(7776):86-89.



Development of CuAAC (Sharpless and Meldal)

Development of SPAAC (Bertozzi)

Introduction of SuFEx Click Chemistry and use of SO<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (Sharpless)

Use of SOF<sub>4</sub> as a SuFEx connective hub (Sharpless) Modular click
chemistry libraries
for functional
screens using a
diazotizing reagent
(Sharpless and
Dong Jiajia)

Destination unknown

2002

2004

2014

2017

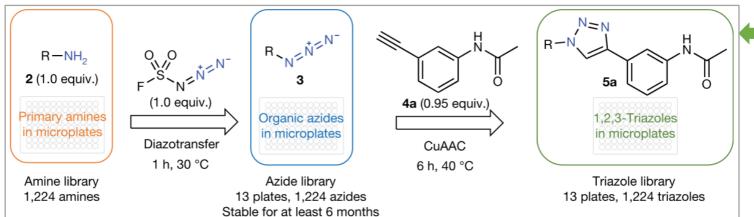
2019

**Future** 

### The 1st generation of CC

The **2**<sup>nd</sup> generation of CC

The 3<sup>rd</sup> generation of CC



在实现了砌块的极大多样性和链接的高度可预测性的前提下,建立了高度可预测的高通量合成模式。







# ■展望

### □ SuFEx反应机理的深入研究。

Sufex反应作为新型点击化学技术,虽然刚刚兴起不久,但高价硫氟类化合物也已经材料化学、化学生物学、生物制药等领域上展现出巨大的应用前景。对其反应机理进行深入理解将为 Sufex 在未来几年和几十年内发挥真正潜力奠定基础。

### 口 第三代点击化学将在药物研发及其他跨学科领域大放异彩。

基于这种模块化的合成方式,短时间内对于给定药物小分子或者大分子砌块进行万次以上的改造是可行的,合成效率的提高对于药物先导分子的发现将起到直接的作用。

### 口发展新的点击化学反应永远在路上。

- (1) 开发更稳定、活性影响小、有助于提高反应速率的点击化学基团;
- (2) 发展新的反应类型,能够生成酰胺、酯、磷酸二酯等天然键的点击化学反应,以带动新的应用前景和寻找新的发展机会。



# 敬请大家批评指正!

汇报人: 王风 (博士一年级)

日期: 2022年05月05日

