

文章编号: 1004-0374(2010)10-1053-16

发现靶向蛋白质间相互作用的小分子药物研究进展

聂爱华

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 蛋白质-蛋白质相互作用在多种细胞功能中具有重要的作用。靶向蛋白质-蛋白质相互作用已经成为新药发现的重要策略, 但发现能阻断蛋白质-蛋白质相互作用的小分子药物是一个巨大的挑战。尽管如此, 近年来人们还是发现了许多能调控蛋白质-蛋白质相互作用的小分子。该文主要总结了在病毒进入、细胞凋亡通路和神经退行性疾病等方面的蛋白质-蛋白质相互作用小分子抑制剂的研究进展。

关键词: 蛋白质-蛋白质相互作用; 小分子药物; 抑制剂

中图分类号: Q51; R97-4 **文献标识码:** A

Recent progress in targeting protein-protein interactions for small-molecule drugs discovery

NIE Ai-hua

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: Protein-protein interactions play a crucial role in numerous vital cell functions. Targeting protein-protein interactions is one of the most important strategies of drug discovery, but discovering small-molecule drugs that disrupt protein-protein interactions is an enormous challenge. However many small molecules which can modulate the protein-protein interactions have been discovered in the recent years. This review will focus on small-molecule inhibitors of protein-protein interactions in virus entry, apoptosis pathway and neurodegenerative diseases.

Key words: protein-protein interactions; small molecule drug; inhibitors

在生物体中, 许多关键的细胞功能包括细胞生长、DNA 复制、转录活性、翻译和跨膜信号转导都由多蛋白质复合物调控, 而这种蛋白质复合物的功能、活性和特殊性通常由发生于不同复合物亚单元之间的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interactions, PPIs) 控制。在人类蛋白质网络中包含了大约 375 000 种蛋白质-蛋白质相互作用^[1]。人们已经证明异常的 PPIs 能引发包括癌症、感染疾病和神经退行性疾病等多种人类疾病。因此, 在过去的十年内, 靶向蛋白质-蛋白质相互作用成为人们发现和开发新型药物的重要策略。目前, 文献中已经报道了大量能够调控蛋白质-蛋白质相互作用的抑制剂和稳定剂, 本文主要介绍蛋白质-蛋白质相互作

用小分子抑制剂的研究进展。

1 蛋白质-蛋白质相互作用: “热点”氨基酸与“热点区域”

蛋白质-蛋白质相互作用发生在两种相同或不同蛋白质相互接触的特定结构域表面, 一般认为彼此发生作用的表面积大约有 $1\ 500\sim 3\ 000\ \text{\AA}^2$ ^[2, 3], 这种相互作用能够调控由于蛋白质的界面接触而形成

收稿日期: 2010-04-19; 修回日期: 2010-04-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30873136)

*通讯作者: E-mail: aihuanie@yahoo.com; Tel: 010-66931643

的蛋白质复合物的生物功能。蛋白质-蛋白质相互作用的驱动力很大程度上来自于残基之间的疏水效应,但氢键和静电相互作用也时常扮演着关键的角色。参与蛋白质-蛋白质相互作用的氨基酸残基在位于各自的蛋白结构系列中有的连续,有的是非连续的,这些连续或非连续的残基相互之间的作用使得蛋白质与蛋白质以高的亲和力结合;但蛋白质与蛋白质之间的结合能并不是平均分配在所有相互作用的氨基酸残基上,而是在大多数情况下有可能集中在相互接触的某个区域中的几个氨基酸残基,这种氨基酸称为“热点”(hot spot)氨基酸^[4]。关于“热点”氨基酸一个里程碑性的工作是 Clackson 和 Wells 所做的利用丙氨酸扫描和蛋白质晶体 X-射线衍射分析方法对人生长激素(hGH)与其第一结合受体(hGHbp)胞外结构域结合的研究^[5, 6]。该项研究表明, hGH 和 hGHbp 相互结合的表面大约有 $1\ 350\ \text{\AA}^2$, 双方都有 30 多个氨基酸残基参与相互作用, 结合自由能为 $\Delta G = -12.3\ \text{kcal/mol}$ 。对于参与作用的 hGH 的 31 个氨基酸残基中, 有 8 个氨基酸残基贡献了结合自由能的 85%, 而对于 hGHbp 仅 W104 和 W169 两个残基对结合能的贡献就各自超过 $-4.5\ \text{kcal/mol}$, 这些氨基酸残基组成了 hGH 与 hGHbp 相互作用的“热点区域”(hot region)。

随着蛋白质-蛋白质相互作用的面积增大,“热点”氨基酸残基的数目也会增加,这些氨基酸并非随机地分布在蛋白质-蛋白质相互作用的界面上,而是呈簇状分布。这些簇状分布的“热点”氨基酸组成蛋白质-蛋白质相互作用界面上的“热点区域”^[7]。一些特定的氨基酸,特别是色氨酸、精氨酸和酪氨酸在“热点区域”出现的几率较其他氨基酸高^[8]。一个蛋白质-蛋白质相互作用界面上有可能仅存在“一个热点区域”,也可能存在多个“热点区域”,如苹果酸脱氢酶二聚体(PDB: 1guy),两个单体之间相互作用的界面上有 64 个氨基酸残基,其中包括 14 个“热点”残基,组成两个“热点区域”^[9]。

2 阻断蛋白质-蛋白质相互作用: 靶向“热点区域”的小分子

虽然蛋白质-蛋白质相互作用的面积大,但如上所述蛋白质复合物的稳定性主要来自“热点区域”的结合自由能贡献决定。“热点区域”类似于酶的催化活性位点,一个配体如能在“热点区

域”同参与蛋白质-蛋白质相互作用的原始蛋白竞争性结合,就有可能调控/阻断通过蛋白质-蛋白质相互作用而产生的生物学功能;但靶向“热点区域”需要关注的问题是“热点区域”是否在没有形成蛋白质-蛋白质复合物的状态下即已存在。人们通过结构数据分析表明,“热点区域”保守的氨基酸残基在蛋白质表面能够形成一个被包埋于疏水界面的豁口/口袋(clefts/pockets),这种豁口/口袋在该蛋白质未与其他蛋白质结合之前的非结合状态就可能存在^[10]。人们不仅通过 NMR 法、X-射线晶体衍射法和其他生理物理学方法测定 PPIs 中的“热点区域”和可能的药物结合位点,还发展了包括 Q-SiteFinder 在内的多种预测方法^[11, 12],这些方法的测定/预测结果为 PPIs 调控剂(PPIM)的设计提供了结构基础。

目前, PPIs 调控剂有三种类型。第一类是治疗性抗体,它对分子靶标具有高的特异性并在人类血清中稳定,但无细胞穿透性、不能口服^[13];第二类是衍生于蛋白质-蛋白质相互作用界面的多肽,它主要作为蛋白质二聚和相互作用的抑制剂,但普遍缺乏代谢稳定性,口服生物利用度低^[14];第三类是小分子调控剂,从药物化学和药物开发的角度看小分子化合物应具有较好的前景。虽然在几年之前认为发展小分子 PPIs 调控剂几乎是不可能或是非常难的事情^[15],但 Wells 和 Mecleman^[16]的研究已经成功证明小分子可以直接靶向蛋白质作用界面并调控蛋白质-蛋白质相互作用。小分子能够覆盖 $300\sim 1000\ \text{\AA}^2$ 的表面积^[17],而一个“热点区域”的表面积通常为大约 $600\ \text{\AA}^2$ 。因此,小分子能够成为由异常的 PPIs 引发的疾病治疗药物。

2.1 病毒进入抑制剂

病毒感染人类宿主细胞的过程是病毒的结构蛋白或是其中的一些结构域首先与细胞表面的某些特定受体分子或分子簇相结合,然后以内化方式或是吞入形式将自身转入细胞内。在细胞内病毒脱去衣壳将 DNA 转录为 mRNA,经翻译生成病毒复制所需的相关酶类,这些酶类中的某些成分将终止宿主细胞本身的蛋白合成及蛋白复制,并复制形成足够的病毒基因组 DNA 或 RNA,同时形成病毒的结构蛋白组分。理论上干扰病毒感染过程中的每一个关键环节都可以作为抗病毒药物发现的策略,但如在病毒感染的最初阶段干扰病毒进入宿主细胞的机制,应不失为一个理想的抗病毒方法。在病毒进入的初

始阶段，病毒结构蛋白与宿主细胞表面的受体分子以及相关的辅助蛋白之间会发生蛋白质-蛋白质相互作用，通过这种相互作用，开启病毒分子进入细胞的通路。因此，阻断这种蛋白质-蛋白质相互作用，可以达到抑制病毒进入宿主细胞的目的。

2.1.1 艾滋病(HIV)进入抑制剂

HIV 进入的第一步是病毒被膜与巨噬细胞或 T- 辅助淋巴细胞表面的 CD4 结合，这种结合受病毒被膜表面的 gp120 介导。在天然状态下，包装糖蛋白由三个 gp120 分子和三个 gp41 分子通过非共价键相互作用形成一个杂六聚体，其中 gp41 是跨膜亚单元^[18]。CD4 与 gp120 的结合诱导 gp120 构象发生变化，使得 gp120 与趋化因子受体 CCR5 或 CXCR4 结合，这种共受体的结合导致 gp41 的外功能区疏水 N- 端(融合肽)插入靶细胞膜。gp41 外功能区的两个螺旋卷曲七肽重复系列(HR1 和 HR2) 反平行结合形成六螺旋束使得靶细胞膜和病毒膜紧密接触进而导致融合^[19]。因此，靶向 HIV 进入的每一个蛋白质-蛋白质相互作用环节的抑制剂，都有可能成为治疗艾滋病的新药。

CD4 的胞外区含有 370 个氨基酸残基，组成四个结构域(D1~D4)，其中 D1 结构域与 gp120 结合，主要的结合位点是位于 D1 上的 F43 和 R59 残基。gp120 含有五个高度糖基化的可变结构域(V1~V5) 和五个保守结构域(C1~C5)。V1~V4 通过分子内的二硫键形成 loop 结构。C1~C5 通过折叠形成 gp120 的核心结构，这种结构使得遗传多样性的 HIV-1 利用保守核心结构以共同的机制进入宿主。CD4-gp120 复合物结构^[20] 揭示有 22 个 CD4 残基和 26 个 gp120 氨基酸残基直接参与相互作用，CD4 的 F43 是多重作用中心，它由 gp120 的 E370、I371、N425、M426、W427、G473 和 D368 残基所包围，这些残基之间的结合能占 CD4-gp120 结合能的 23%。因此，存在于 gp120 上保守的 CD4 结合口袋可以成为“热点区域”，它提供了小分子抑制剂的结合位点。化合物 1~38 见附录 1。

化合物 1(BMS-378806)^[21] 和 2(BMS-488043)^[22] 是 Bristol-Myers Squibb 公司研制的 gp120-CD4 相互作用抑制剂，两者都以相同的机制阻断 HIV-1 进入，以 1:1 的计量关系选择性地与 gp120 结合，从而竞争性地抑制了可溶性的 CD4(sCD4) 与 gp120 的相互作用。生物实验和模拟结果都表明 BMS-378806 和 BMS-488043 结合在 gp120 上的 CD4-F43

结合位点^[23-25]。但也有研究指出这两个化合物不是阻断 sCD4 的结合，而是阻止了 gp120 与 CD4 结合时所需的构象变化而发挥抗病毒效应^[26, 27]。BMS-378806 曾进入 I 期临床试验，但在 II 期临床时终止，原因是 gp120 中 1~2 个氨基酸残基的变化便会导致耐药性呈现 40~500 倍的增加，这些氨基酸残基包括 gp120 中的 Trp 112、Thr 257、Ser 375、Phe 382 和 Met 426^[28]。BMS-488043 正在进行 II 期临床试验^[29]。

导致病毒-细胞融合的关键步骤之一是宿主细胞的趋化因子受体与 gp120 的结合，对 HIV-1 临床分离株来说，这种称为共受体的蛋白主要为 CCR5 和 CXCR4 两种^[30]，它们含有 352 个氨基酸残基，由胞外的具有高度酸性 N- 端和三个 Loop 区(ECL1~ECL3)、七个跨膜螺旋结构域(TM1~TM7)、胞内三个 Loop 区(IL1~IL3) 和 C- 端组成。CXCR4 是 T- 亲淋巴(X4) HIV 株的共受体，而 CCR5 是巨噬细胞(M- 嗜性(或 X5) HIV 株的共受体。人们通过大量的生物实验(如定点突变、丙氨酸扫描等) 以及 NMR 方法并结合计算机模拟^[31-34]，基本确定了这三种蛋白质中参与相互作用的关键结构域：gp120 的 V3 loop 区和四股桥层(4-stranded bridging sheet) 分别与 CCR5 和 CXCR4 的第二胞外结构域(ECL2) 和 N- 端形成两个主要的结合区域。当 gp120 与 CCR5 结合时^[31, 34]，V3 loop 区的 F322、Y323、T324、T325 和 G326 残基与 CCR5 的 CEL2 结构域中的 I165、F182、P183、Y184、Y187、F189 和 W190 形成的疏水口袋发生作用；gp120 V3 loop 区的 E327、G326 和 H315 分别与 CCR5 的 M1、Q186 和 Y14 形成氢键，V3 loop 区的 K312、T324 和 R333 分别与 CCR5 的 Y184、M1 和 S185 发生静电相互作用；CCR5 N- 端 Y10(已硫酸化)、D11 和 Y15 分别与 gp120 四股桥层的 R327、R440 和 I439 发生作用。当 gp120 与 CXCR4 结合时^[35, 36]，参与的残基主要有 gp120 V3 loop 区的 R298、R303、R306 和 R318，CXCR4 N- 端的 E2、Y7、D10、Y12、E15、D20、Y21、D22 以及 ECL2 结构域中的 N176、E179、D182、R183、Y184、D187、R188、F189、Y190、P191 和 D193 等。

虽然 gp120 与 CCR5 和 CXCR4 的相互作用很复杂，但人们已经发现了许多能阻断这种作用的小分子抑制剂。典型的 CCR5 抑制剂有化合物 3、4、5 和 6^[37]，这些化合物均具有强的抑制 R5 HIV-1 病毒株的活性。化合物 3(马拉维若，maraviroc, UK-

427857)^[38]是Pfizer公司开发的CCR5抑制剂,于2007年被FDA批准为临床治疗艾滋病的药物;化合物4(Aplaviroc,GSK-873140)^[39]是GlaxoSmith-Kline公司发现的化合物,但由于肝脏毒性进行到IIb期临床研究后中断;化合物5(Vicriviroc,SCH417690)^[40]由Schering-Plough公司发现,目前正在进行III期临床研究;化合物6(TAK-220)^[41]为Takeda公司研发,已进行了II期临床试验。人们研究了上述四种抑制剂与CCR5的结合,认为这些化合物都结合在相同的由CCR5跨膜螺旋区(TM)的残基(W86、W94、Y108、F109、T195、I198、W248、Y251、E283和M287)形成的口袋,但各自与分布于口袋中的残基有独特的结合方式^[42]。化合物7(AMD3100)和8(AMD070)为AnorMED公司发现的典型CXCR4抑制剂^[37],这两个化合物均具有强的抑制X4HIV-1病毒株的活性。AMD3100的碱性氮原子与CXCR4ECL2结构域中的D182、D193和TM4中的D171、TM6中的D262这些残基上的酸性羧基发生静电相互作用,阻断了gp120与CXCR4的结合^[43]。AMD070与CXCR4中的Y45(TM1)、W94(TM2)、D97(TM2)、D171(TM4)、D262(TM6)和E288(TM7)等残基发生作用,由此可见AMD070是通过与CXCR4的结合诱导CXCR4发生构象变化而阻断了CXCR4与gp120的结合^[44]。AMD3100作为治疗艾滋病的药物进行了I期临床研究,但由于该化合物具有心脏毒性导致临床研究终止。AMD070是一个可以口服的CXCR4抑制剂,可以选择性地抑制HIV-1感染病人的X4-嗜性病毒,作为治疗艾滋病的候选药物目前正在进行II期临床试验^[45]。化合物9(KRH-3955)是Kureha化学工业公司最近发表的可以口服的CXCR4抑制剂^[46],该化合物结合位点位于CXCR4的三个胞外结构域(ECL~ECL3)上,具有强的抑制X4HIV-1病毒的活性,在体内外均选择性地抑制X4HIV-1的感染,是一个很有希望进入临床研究的抗HIV-1病毒感染的候选药物。

跨膜亚单元gp41含有345个氨基酸残基,与其他I型跨膜融合蛋白一样,gp41由胞外结构域(残基512~683)、跨膜结构域(残基684~704)和胞内结构域(残基705~856)组成。胞外结构域含有四个主要功能区:融合肽(FP,残基512~527)、N-端七肽重复序列(HR1,残基542~592)、C-端七肽重复序列(HR2,残基623~664)和色氨酸富集区(TR,残基665~683)。在共受体(CCR5或CXCR4)和gp120的

作用下,gp41的融合肽插入宿主细胞膜,之后三个gp41分子中的HR1和HR2反平行结合形成六螺旋束,使得宿主细胞膜和病毒膜逐步接近,最后导致融合^[19]。人们已经获得由HR1(N36)和HR2(C34)形成的六螺旋束晶体结构:中心是由三条螺旋结构的N36平行结合形成三聚体超螺旋,三条螺旋结构的C34反平行地结合在该三聚体外侧^[47]。中心三聚体表面在彼此相邻的两个N36之间形成三个相同的疏水口袋,包括残基L566、T569、V570、I573、K574、Q577和L565'、L568'、T569'、W571'、G572'、I573'、L576',C34的I635、D632、W631和W628残基侧链进入上述口袋,形成N36和C34之间的主要相互作用(“热点区域”)。根据N36和C34的相互作用方式,人们已经发现了一些能够进入该口袋的小分子融合抑制剂,这些抑制剂能够阻断HR1和HR2的结合和六螺旋束的形成。化合物10(NB-2)和11(NB-64)是两个结构相似的融合抑制剂^[48],这两个化合物中的羧基与gp41HR1结构域中的K574形成盐桥,化合物10的两个甲基与残基W571、I573和L576发生疏水作用,化合物11的氯代苯基与L565、L568、V570、W571和I573发生疏水作用。通过这些相互作用这两个化合物与gp41个核心结构结合阻断了六螺旋束的形成。化合物12是最近报道的gp41融合抑制剂^[49],该化合物能进入gp41核心结构的疏水口袋并且与残基L566、L568、V570、W571和K574发生相互作用,活性评价表明其对HIV-1_{IIIB}和94UG103的抑制活性EC₅₀值小于100nmol·L⁻¹。

2.1.2 人呼吸道合胞病毒(hRSV)融合抑制剂

人呼吸道合胞病毒(hRSV)不仅是一个世界范围内引起婴幼儿严重下呼吸道感染的最常见病原体,近年来认为它也是成人呼吸道感染的一个重要病原体,尤其是老年人、免疫受抑者更易发生。至今对hRSV的防治尚无特异措施。hRSV属副粘病毒科肺炎病毒属,在病毒颗粒表面存在F、G和SH三种跨膜蛋白。SH和G蛋白并非病毒复制所必需,而F蛋白是病毒与宿主细胞膜融合以及成熟病毒颗粒形成所必需的。F蛋白是一个典型的含有574个氨基酸残基I型糖蛋白,即含有一个裂解的N端信号序列和位于C端的“锚区”。F蛋白首先合成F0前体,其中含有F₂区(氨基酸1~130)、裂解多肽(氨基酸130~136)和F₁区(氨基酸137~574)。F蛋白的跨膜区位于F₁区的C末端,F₁区N-端是由19个

连续的疏水氨基酸形成具有融合活性的肽段，此肽段富含甘氨酸，可能包埋于F蛋白四聚体中。F₁区N-端1/3处富含 α -螺旋，其中包含一个长的七肽重复序列HR1(氨基酸149~206)和一个两性 α -螺旋。在F₁区的中部有一个半胱氨酸聚集区，通过一系列交替的 β 折叠和环形结构组成F蛋白四聚体的球形表面。这个区域之后是第二个七肽重复序列HR2(氨基酸474~523)，其定位于外功能区邻近跨膜区。与其他的病毒融合蛋白(如gp41)相似，融合肽插入宿主细胞膜后F-蛋白的构象变化导致HR1和HR2反平行结合形成六螺旋束，进而引起病毒与宿主细胞膜的融合^[50]。因此，阻断HR1和HR2的结合是发现新型防治hRSV药物的重要策略。

hRSV-N57和hRSV-C45形成的六螺旋束晶体结构^[51]与gp41相似，中心是由三条螺旋结构的N57平行结合形成三聚体核心结构，三条螺旋结构的C45反平行地结合在该三聚体外侧。中心三聚体表面在彼此相邻的两个N57之间形成三个相同的疏水口袋，包括残基T198、V192、L193、K196、I199、D200和L188'、K191'、V192'、D194'、L195'、Y198'、C45的F483、F488和I492残基侧链进入上述口袋，形成N57和C45之间的主要相互作用(“热点区域”)，这种作用方式提供了进行小分子抑制剂设计的靶点。

化合物**13**^[52](BMS-433771)是Bristol-Myers Squibb公司发现的一个具备口服性质的RSV融合抑制剂，该化合物通过分子中的两个芳香环模拟F-蛋白HR2中的残基F483和F488与HR1的相互作用，从而阻断了六螺旋束的形成。在体外该化合物抑制RSV A和B亚型的EC₅₀值平均为20 nmol·L⁻¹；在两种啮齿动物模型中，感染之前口服给药都能有效地抑制RSV的感染；该化合物具有好的药代动力学性质，具有进行临床研究的潜力。

化合物**14**(JNJ-2408068)和**15**(TMC353121)是Johnson & Johnson公司开发的RSV融合抑制剂^[53]，这两个化合物都具有相同的苯并咪唑母核结构，后者是以前者为先导化合物通过分子模拟进行结构优化而得到的。这两个化合物与化合物**13**相似，都是通过分子中的疏水基团模拟F-蛋白HR2中的残基F483和F488与HR1的相互作用，抑制了RSV与宿主细胞融合时所必须的六螺旋束的形成或构象变化^[54]，阻断了RSV进入宿主细胞内而避免感染。化合物**14**和**15**抗RSV的活性都在pM级，但化合物**14**在有些

组织中的消除半衰期过长，如在肺部的t_{1/2}为153 h；而化合物**15**不但对RSV A和B亚型都具有同等强度的高抑制活性，而且具有良好的药代动力学性质，已经被选定作为进入临床研究的候选药物^[54]。

2.1.3 登革热病毒(dengue virus)融合抑制剂

登革热属于黄病毒属，目前还没有治疗这种病毒感染特效药。该病毒为单链正股RNA病毒，病毒基因组编码三种结构蛋白(E、M、C)和7种非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5)，E、M蛋白为包膜糖蛋白，C为核心蛋白。E蛋白是II型融合蛋白，黄病毒属的E蛋白具有大约40%的同源性。E蛋白参与病毒与宿主细胞亲和、吸附以及细胞融合过程，是病毒亲嗜性以及毒力的主要决定蛋白。

在登革热病毒的生命周期中，病毒粒子经历三种主要的构象：未成熟、成熟和融合活化状态。E蛋白在这三种状态中的构象不同，因此在糖蛋白壳中E蛋白将会发生构象重排以最终达到融合所需要的活化构象。E蛋白重排中有三种关键的构象过渡态：未成熟病毒粒子中prM-E杂二聚体、成熟病毒粒子中E蛋白同二聚体和融合活化病毒粒子中的E蛋白同三聚体。人们研究了登革热E蛋白外功能区(残基1~394)的晶体结构^[55, 56]，该区域共包括三个结构域：结构域I(DI)含有N-端，但处于分子的中心；结构域II(DII)比较伸展，调控着E蛋白的二聚，疏水保守的融合多肽处于结构域II(DII)的顶端；结构域III(DIII)类似免疫球蛋白结构，与受体结合的位点可能包含于该结构域内。DI和DII由四股多肽链相连，DI和DIII之间由一股多肽链相连。连接DI和DII以及DI和DIII之间的肽链运动对E蛋白的构象变化起重要作用。在成熟病毒粒子的E蛋白中，DI和DII结合区域存有一个称为N-辛烷基- β -D-葡萄糖苷(β -OG)结合口袋(包含残基T280、V130、L198、Q200、A205、I270、S274、Q271、L277、K47、T48、E49、L135、A50和Y137)，但在融合后的E蛋白中由于“k1” β -发卡区的运动，该口袋被封闭。因此，人们推测如果在融合之前该口袋结合一个小分子，会导致“k1” β -发卡区运动受阻，进而影响DIII结构域不能向DI~DII靠近，成熟病毒粒子E蛋白构象就不能转化为发生融合作用所需要的活化E蛋白构象，由此可能阻断了融合活化E蛋白三聚体的形成，终止了病毒进入宿主细胞的过程。根据上述机制，人们已经发现了能抑制

登革热病毒进入的小分子化合物。

化合物16是Purdue大学的研究人员发现的具有抑制黄热病毒的活性物质。研究人员通过虚拟筛选NCI化合物库得到能进入 β -OG结合口袋的“苗头”化合物,再经由结构改造得到化合物16^[57]。该化合物抑制黄热病毒复制的 EC_{50} 值为 $0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,治疗指数为170。进行虚拟对接可以看到该化合物能够进入 β -OG结合口袋的中部,疏水的苯环直接指向结合位点的底部^[57]。化合物17是Novartis公司选取 β -OG结合口袋为靶点进行虚拟筛选发现活性化合物后再经结构优化得到的登革热病毒进入小分子抑制剂^[58]。该化合物在BHK21细胞系上抑制DENV-2的 EC_{50} 值为 $70 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,机制研究表明,该化合物在登革热病毒感染的早期发挥作用。分子对接表明化合物17的氯代苯基噻吩片段深埋于 β -OG结合口袋内,喹啉环的苯基与L198和P53之间存在疏水作用,氨基上的氢原子和吡啶氮原子分别与E49和Q271的侧链发生氢键作用。

2.1.4 流感病毒(influenzavirus)融合抑制剂

甲型流感病毒细胞膜含有三种蛋白:血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)和质子通道(M2)。M2和NA两者都是现在临床上使用的抗流感药物的靶点,如以M2为靶点的药物有金刚烷胺和金刚乙胺、以NA为靶点的药物有扎那米韦和奥塞米韦,但这些药物目前存在一定的抗药性^[59, 60]。因此,需要寻找新作用机制的抗流感药物。

HA含有550个氨基酸残基,由HA1和HA2两部分组成,中间以二硫键相连。由HA通过切断产生的HA2(残基176~221)含有疏水性的N-端(融合肽),在中性pH条件下,HA2形成三聚体结构^[61],融合肽处于三聚体结构内部,每一个HA2单体中的残基L55或V55、R54、E57与相邻的另一个HA2单体中的残基E97、L98、Y94、L99、A101形成疏水性口袋,在该三聚体结构表面共有三个这样的疏水口袋(也称之为结合口袋tert-butyl hydroquinone, TBHQ)。在酸性pH条件(发生融合)下,上述三聚体会发生结构重组,变为HA2融合活化三聚体构象^[62],在此构象中,融合肽从中性三聚体结构内部伸展出来指向靶细胞内涵体膜进而发生融合。因此,在中性pH三聚体疏水性口袋结合小分子,稳定该三聚体结构使其不能向融合活化三聚体构象转变,进而阻断病毒与宿主细胞膜的融合,便成为寻找新型抗流感病毒药物的策略。

化合物18是最近发现的流感病毒融合抑制剂^[63]。在六种不同的人类甲型H3N2流感病毒株感染的MDCK(Madin-Darby canine kidney)细胞系上,该化合物的 EC_{50} 值在 $3\sim 23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,但对甲型H1N1、H5N1、H7N2和B型流感病毒没有活性。机理研究表明,该化合物结合于TBHQ结合口袋,阻断了HA2融合活化构象三聚体的产生而发挥抗病毒作用,可以作为人们寻找新型抗流感病毒的药物先导结构。

2.2 与细胞凋亡相关的蛋白质-蛋白质相互作用抑制剂

细胞凋亡(programmed cell death 或apoptosis)是生物体维持自身动态平衡的一种基因调控的自主过程,这种动态平衡的破坏可能导致诸如癌症等多种疾病。通过众多科学家对细胞凋亡信号通路的研究工作,已经发现了一些调控细胞凋亡的蛋白质-蛋白质相互作用,如Bcl-2家族蛋白之间的相互作用、凋亡抑制蛋白(IAPs)与Caspases的相互作用以及p53与MDM2之间的相互作用。目前,发现阻断这些蛋白-蛋白相互作用的化合物已经成为开发新型抗癌药物的重要策略。

2.2.1 Bcl-2家族蛋白

Bcl-2家族蛋白是线粒体内或在凋亡途径的关键调节子,它能诱导或阻止存在于线粒体膜间隙的凋亡基因蛋白,如细胞色素c、凋亡诱导因子、Smac/DIABLO、EndoG和Omin/HtrA2的释放。Bcl-2家族蛋白分为两类:一类是促凋亡蛋白,包括Bak、Bok、Bax、Bcl-Xs、Bad、Bid、Bim、Bik、Hrk、Bnip3、Nix、Puma、Bmf和Noxa等;另一类为抗凋亡蛋白,包括Bcl-2、Bcl-X_L、Bcl-w、A1/Bfl-1、Boo和Mcl-1等。这两类蛋白的“阴阳”平衡控制着凋亡基因蛋白的释放。抗凋亡蛋白通过其BH1、BH2和BH3构成的活性区域与Bak和(或)Bax结合,抑制了Bak和Bax的活性。人们经由NMR方法测定了Bcl-X_L与Bak的72~87残基组成的多肽复合物的结构^[64],结果表明两者之间的相互作用主要发生在Bcl-X_L的残基F97、R100、Y101、A104、F105、L108、V126、L129、F130、I139、V141、A142、F146、Y195与Bak多肽片段的残基V74、R76、Q77、L78、A79、I80、I81、D83、D84、I85、N86之间。通过分子设计和(或)高通量筛选,已经发现了一些能模拟促凋亡蛋白BH3结构域功能的小分子有机化合物。这些分子能够结合于抗凋亡

蛋白(Bcl-X_L、Bcl-2、Bcl-w和Mcl-1)表面疏水口袋,从而阻断了这些抗凋亡蛋白与BH3促凋亡蛋白结合的活性,进而诱导细胞的凋亡或增强耐药肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

化合物**19**(ABT-737)是Abbott实验室发现的Bcl-2家族抗凋亡蛋白抑制剂,它能与Bcl-2($K_i < 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Bcl-X_L ($K_i < 0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和Bcl-w($K_i = 0.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)结合,与Mcl-1和A1/Bfl-1结合的 K_i 值大于 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,并能强烈抑制这些抗凋亡蛋白的活性,是一种全Bcl-2家族抗凋亡蛋白抑制剂。根据Bcl-X_L与ABT-737复合物的晶体结构^[65],该化合物主要以疏水相互作用与Bcl-X_L结合,这种作用发生在该化合物分子中的多个芳香环与Bcl-X_L的残基F97、A104、F105、L108、V126、L130、V141、A142、F146和Y197的侧链之间。临床前评价显示,该化合物能选择性地诱导多发性骨髓瘤凋亡而不影响正常细胞;它也能强烈提高紫杉醇对NSCLC细胞系的细胞毒性。利用ABT-737对接种了H146和H1963 SCLC细胞系的小鼠进行单药治疗,结果表明该化合物能使上述肿瘤在小鼠体内完全消退。但ABT-737不能口服,在水中的溶解度低,因而限制了其在临床上的使用。化合物**20**(ABT-263)是Abbott实验室在ABT-737的结构基础上,发展的第二代Bcl-2家族抗凋亡蛋白抑制剂^[66]。它能与Bcl-2($K_i < 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Bcl-X_L ($K_i < 0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Bcl-w($K_i < 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和Mcl-1($K_i = 550 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)结合,该化合物克服了ABT-737不能口服的缺点,目前作为治疗小细胞肺癌(SCLC)和B-细胞恶性肿瘤的候选药物已进入I期临床研究^[67]。

化合物**21**(Obatoclax, GX15-070)由Gemin X生物技术公司开发的BH3模拟物^[68]。从结构看该化合物是吡啶双吡咯衍生物,能够与Bcl-2($\text{IC}_{50} = 1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Bcl-X_L ($\text{IC}_{50} = \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Bcl-w($\text{IC}_{50} = 7.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和Mcl-1($\text{IC}_{50} = 2.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)结合,因此该化合物也是一种全Bcl-2家族抗凋亡蛋白抑制剂。Obatoclax能诱导血液瘤、乳腺癌以及多种对美法仑、ABT-737和硼替佐米(Bortezomib)耐药的细胞系凋亡。目前,单独或联合硼替佐米、多西他奇、托泊替康和利妥昔单抗(rituximab),obatoclax作为治疗复发或顽固性套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、NSCLC和其他实体瘤的候选药物已进入I期临床研究;作为治疗Hodgkin淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤的候选药物正进入II期临床。

2.2.2 凋亡抑制蛋白家族(Inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)

凋亡抑制蛋白IAPs是凋亡主要调节者Caspases的内源性抑制物,它们选择性地与Caspase-3、-7和(或)Caspase-9结合,阻断细胞凋亡所必须依赖的Caspases的蛋白水解活性,进而抑制细胞凋亡。已经证明许多IAPs在癌细胞中异常表达,如Survivin在多种恶性肿瘤中有高表达,但在正常细胞中没有检查到该蛋白的存在。其他的IAPs成员虽然在多种正常组织中存在,但也像Survivin一样在多种恶性肿瘤中过量表达。过量表达的IAPs诱导肿瘤细胞对化疗产生耐药性,同时也抑制化疗或放疗引起的细胞凋亡。另一方面,线粒体中释放的Smac/Diablo蛋白可以与IAPs结合,其结合的位点正是IAPs与Caspase-3、-7和Caspase-9结合的位置,从而抑制了IAPs的抗凋亡活性。晶体结构研究表明,Smac和Caspase-9的N-端残基与XIAP-BIR3的结合是关键的作用区域^[69, 70]。XIAP-BIR3的残基K297、V298、K299、L307、T308、W310、E314、Q319、W323和Y324形成一个口袋,其中,E314和E319这两个残基亲水性较强,Smac N-端AVPI和Caspase-9 N-端ATPF的Ala残基上的氨基与E314、Q319存在极性作用的同时,其甲基深埋于由XIAP的L307、W310形成的疏水口袋中;AVPI中的Val残基和ATPF中的Thr残基与T308存在极性作用,但此两个残基的侧链伸向作用区域之外,与活性位点的关键氨基酸无相互作用;L307、W323和Y324组成一个较为平坦的疏水区域,与AVPI和ATPF中的Pro残基产生疏水作用;V298和K297、K299的碳链部分也组成一个疏水性口袋,AVPI中的Ile残基和ATPF中的Phe残基通过疏水作用进入该口袋中。因此,XIAP分别与Smac和Caspase-9作用的关键位点和结构特征几乎完全相同。由于这两种相互作用的结构特征相同,因而Smac能完全去除XIAP对Caspase-9的抑制。根据IAPs与Caspases和Smac相互作用的机制,目前已经发现了多种能阻断IAPs与Caspases相互作用并具有抗肿瘤活性的Smac模拟化合物。

化合物**22**由Abbott实验室发现^[71],该化合物能以高的亲和力($K_d = 5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)与XIAP-Bir3结合,诱导多种癌细胞凋亡并在小鼠的异种移植模型中抑制MDA-MB-231乳腺癌细胞的生长。化合物**23**由Genentech公司研制^[72],该化合物能与XIAP-Bir3、

ML-IAP-Bir、cIAP1-Bir和cIAP2-Bir3结合, K_d 值分别为770、50、50和130 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 是一个全IAPs抑制剂; 该化合物杀死MDA-MB-231乳腺癌细胞的 IC_{50} 值为100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物23(Smac005)^[73]与XIAP-Bir3结合的 IC_{50} 值为0.27 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 抑制HL60白血病细胞系的 IC_{50} 值为0.92 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Smac005与XIAP-Bir3结合的晶体结构(PDB:3CM7)表明, 该化合物与残基T308、D309、E314、W232之间存在氢键相互作用, 苯环进入由V298和K297、K299的碳链部分组成的疏水性口袋, 乙基与W310发生疏水作用。

AEG40826也称为HGS1029, Human Genome Sciences和Aegera Therapeutics联合开发)和Compound C(Genentech公司开发)是小分子Smac模拟物全IAPs抑制剂, 但目前它们的结构没有公开。AEG40826针对早期实体瘤患者正在进行I期临床试验^[74]; Compound C的临床前研究表明, 对乳腺癌、结肠癌和黑色素瘤的人类肿瘤异种移植小鼠模型均有疗效, 目前该化合物也正在进行I期临床试验^[75]。

2.2.3 p53和MDM2蛋白

肿瘤抑制因子p53是一个强的抗增殖和促凋亡蛋白, 它能损害正常细胞。在正常细胞中p53的细胞水平由于MDM2(鼠类双微体2, 人体中称为HDM2)影响而受到精确控制。p53和MDM2蛋白形成一个负反馈回路而相互控制它们在细胞中的水平^[76]。p53与*Mdm2*基因的启动子结合并调控它的表达, 当MDM2水平升高时, MDM2通过直接封闭p53的转录结构域而与p53结合并灭活p53。p53和MDM2通过它们的N-端结构域相互结合^[77], p53 N-端的F19、W23、L26侧链插入由MDM2的残基L54、L57、I61、L82、F86、V93、I99、I103形成的疏水口袋而产生的作用是p53和MDM2的关键作用方式。MDM2在p53上结合的位点与p53的转录结构域部分重叠, 这便是为什么MDM2能有效抑制p53转录活性的原因。另外, MDM2可以作为p53一个E3泛素连接酶, 它与p53的结合能促进p53的蛋白酶解。p53作为转录因子, 通过激活靶基因(如: PUMA、NOXA和Bax)、与死亡受体和凋亡抑制物(如: Bcl-2)结合, 或直接易位到线粒体中, 激活Caspase而诱导凋亡。在几乎百分之五十的人类癌症中, 由于p53基因突变或缺失使得p53功能丧失; 在余下的人类癌症中, p53虽然保持野生型

形态, 但其功能被MDM2抑制。因此, 阻断p53与MDM2蛋白的结合或抑制MDM2泛素连接酶活性是发现新型抗肿瘤药物的重要策略^[78]。

化合物25(Nutlin-3)是以顺式-咪唑啉为基本骨架的MDM2小分子抑制剂的代表物, 其抑制p53与MDM2相互作用的 IC_{50} 值为90 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。MDM2和Nutlin-3复合物晶体结构表明, Nutlin-3结合在MDM2的p53结合位点上, 结合方式与p53同MDM2结合的方式相同^[79]。

化合物26(MI-219)是一个高选择性并可以口服的小分子MDM2-p53抑制剂^[80], 其与MDM2结合的 K_i 值为5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 高出p53多肽与MDM2结合的1000多倍。研究表明, 该化合物模拟了p53残基F19、L22、W23和L26与MDM2的关键作用。对于具有野生型的p53细胞该化合物能阻断MDM2-p53的相互作用并激活p53通路, 导致p53诱导细胞周期停滞并对肿瘤细胞选择性地诱导凋亡; 在异种肿瘤移植组织中, MI-219能快速激活p53, 使得细胞增殖受到抑制、诱导凋亡并完全抑制肿瘤的生长; MI-219也能激活正常组织中的p53并使之有微量积聚, 但对动物无毒性。因此, MI-219有望作为治疗癌症的候选药物进入临床试验。

2.3 与神经退行性疾病相关的蛋白质-蛋白质相互作用抑制剂

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)和帕金森氏病(Parkinson's Disease, PD)是两种最普遍的慢性神经退行性疾病, 在老年人口中两者大约分别占10%和1%。由于当前尚未有治疗AD和PD的特效药物, 因此, 这两种疾病不但给患者造成极大的痛苦, 也给家庭和社会带来沉重的经济负担。AD特征性病理变化是大脑皮质广泛的、弥漫性萎缩, 并在神经元外伴有老年斑(senile plaque, SP)的形成、神经元内有纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)的出现和大量记忆性神经元的缺乏。 β -淀粉样多肽(β -amyloid, β)是老年斑的主要成分, 而神经元纤维缠结由高度磷酸化的微管相关蛋白(tau蛋白)组成。另一方面, 由 α -突触核蛋白(α -Synuclein)形成的存在于残存神经元胞质中的“Lewy小体”是PD患者的标志。尽管AD和PD的病理机制明显不同, 但两者具有相似的细胞和分子机制, 如包括有由于蛋白质-蛋白质相互作用而引起的 β -淀粉样蛋白、tau蛋白和 α -突触核蛋白聚集并进而分别产生老年斑、神经元纤维缠结和Lewy小体。因

此，阻断这些蛋白的聚集可能是发现新型AD和PD治疗药物的有效策略。

2.3.1 β -淀粉样多肽(A β)聚集抑制剂

AD病因非常复杂，一百多年来全世界科研人员进行了广泛的研究。在20世纪90年代，Hardy等^[81]提出了 β -淀粉样肽级联假说(β -amyloid cascade hypothesis)，认为 β -淀粉样多肽(β -amyloid, A β)在大脑皮层异常聚集和沉积形成老年斑(senile plaque)具有神经毒性并发生复杂的级联变化，是AD发病的最主要原因。 β -淀粉样多肽(A β)主要成分为A β 42和A β 40，它们是淀粉样前体蛋白 β -APP经 β -、 γ -分泌酶水解后形成的产物，其中A β 42的神经毒性最强。A β 产生后经历一系列的构象变化，由最初以 α -螺旋为主的构象转变为最后以 β -折叠为主的构象而聚集。目前，人们已经发现了一些可以阻断A β 聚集的小分子化合物^[82]。

化合物**27**(姜黄素)可以抑制A β 纤维的形成和延伸并能促进A β 聚集前态的去稳定化，在体外，该化合物能保护A β 诱导的PC-12细胞和SH-SY5Y神经母细胞瘤的死亡；在TgAPP_{sw}小鼠模型上，该化合物可以降低脑中A β 42和A β 40的浓度。该化合物目前在中国和美国进行治疗AD的临床试验。化合物**28**(EGCG)是存在于绿茶中的多酚化合物，该化合物在毫摩尔浓度下就对A β 诱导的细胞死亡有保护作用，在Tg2576小鼠模型上腹腔注射和脑室内给药，EGCG都可以降低海马和皮质内的A β 42和A β 40浓度并能使得老年斑减少40%~50%。机理研究表明，该化合物不但有抑制A β 聚集的作用，还有抗炎、抗氧化等作用^[82]。化合物**29**可以结合在A β 42寡聚体上，阻断A β 的聚集并能使A β 42寡聚体解聚。转基因小鼠模型研究表明脑室内注射**29**可以使得非-纤维化和纤维化的A β 分别降低40%和50%^[83]。化合物**30**(Alzhemed,或tramiprosate)是一个作为治疗AD的候选药物并通过II期临床研究的A β 聚集抑制剂，虽然该化合物终止于III期临床，但至少可以说明研制小分子A β 聚集抑制剂可以成为发现新型AD治疗药物的策略之一^[84]。化合物**31**(Memoquin)是一个最近发现的A β 聚集抑制剂，该化合物对AD有多种治疗功能，因为该化合物同时也是乙酰胆碱酯酶抑制剂和自由基清除剂^[85]。

2.3.2 微管相关蛋白(tau蛋白)聚集抑制剂

Tau蛋白是脑内神经元细胞支架蛋白之一，其正常功能是促进微管蛋白组成微管，并维持已形成

微管的稳定性，参与维持细胞形态、信息传递、细胞分裂等重要生物学过程，是轴突生长发育和神经元极性形成的不可缺少因素。Tau蛋白有六种亚型，长度在352~441氨基酸残基之间，其中有超过八十个丝氨酸和苏氨酸残基，这些残基是潜在的磷酸化位点。Tau蛋白发生聚集经由磷酸化和从微管分离开等多个步骤，同时没有磷酸化的tau蛋白发生构象变化然后进一步磷酸化，最后这些高度磷酸化的tau蛋白形成纤维并发生聚集而成为神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)^[86]。Tau蛋白聚集也可以在神经轴突树状体中形成神经纤维网线(neuropil threads)。NFTs和神经纤维网线对神经细胞均有毒性，两者都会引起神经细胞的死亡。由于NFTs和神经纤维网线的形成均与tau蛋白聚集相关，因此相应的tau蛋白聚集抑制剂可能能够发展为治疗AD的药物。

Mandelkow等^[87]利用高通量筛选的方法得到了具有抑制tau蛋白聚集的噻唑基胍类先导结构，然后通过结构优化得到化合物**32**。该化合物抑制tau蛋白聚集的IC₅₀值为1.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，在N2A细胞模型上可以降低tau蛋白聚集产生的毒性。Mandelkow等^[88]还报道了另一个tau蛋白聚集抑制剂双苯基罗丹宁衍生物**33**，该化合物在分子水平上抑制tau蛋白聚集的IC₅₀值为170 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，但该化合物在细胞模型上的活性不理想，有待做进一步的结构优化。化合物**34**(MTC)据报道是一个在体内有强活性的tau蛋白聚集抑制剂，II期临床试验表明，该化合物与安慰剂相比较(81%， $p < 0.0001$)能显著改善AD患者的记忆功能^[89]。虽然这些数据是初步的并还需要进一步地证明，但显示了tau蛋白聚集抑制剂作为AD治疗药物的前景。

2.3.3 α -突触核蛋白(Synuclein)聚集抑制剂

帕金森氏症(Parkinson's Disease, PD)是仅次于AD的神经退行性疾病。该病的特征是在大脑的多个部位多巴胺能神经元的丧失，组织病理学的研究表明，PD患者的脑中神经元胞质内有大量的称之为“Lewy小体”的聚集体存在，这种聚集体主要由含140个氨基酸残基的 α -突触核蛋白组成。多种动物模型证明 α -突触核蛋白的过度表达能够引发类似帕金森氏病症状，进一步研究表明 α -突触核蛋白含有一高度淀粉样结构域，但错误折叠时，可以寡聚体化形成一系列的 β -折叠结构最后成为“Lewy小体”^[90]。因此，类似于AD中的A β 寡

聚体, α -突触核蛋白寡聚体也被认为是引起 PD 的病理因素。如何抑制 α -突触核蛋白的聚集也就成为人们寻找新型 PD 治疗药物的策略。

Conway 等^[91]报道儿茶酚胺类化合物 **35** 通过稳定低聚态的 α -突触核蛋白中间体可以抑制 α -突触核蛋白纤维的形成。化合物 **36** 是多巴胺的氧化产物之一, 该化合物具有比其母体化合物多巴胺更强的抑制 α -突触核蛋白纤维形成的活性^[92]。多酚化合物如黄酮已经被证明是有效的 α -突触核蛋白的聚集抑制剂。如化合物 **37** (黄芩素) 是从中国黄芩属的植物 (*Scutellaria baicalensis*) 分离出来的物质, 该化合物以低于微摩尔的亲和性直接结合在 α -突触核蛋白的单个位点上, 从而通过稳定化低聚体而抑制了 α -突触核蛋白纤维的形成, 但黄芩素的这种活性可能主要来自于其氧化产物化合物 **45** 对抑制活性的贡献^[93]。

3 结语

本文主要总结了在病毒进入、细胞凋亡通路和神经退行性疾病等方面的蛋白质-蛋白质相互作用小分子抑制剂的研究进展。这些小分子抑制剂有的作为候选药物已经进入了临床研究, 有的处于临床前研究阶段, 有的是具有活性的先导化合物尚需进一步进行结构优化。靶向蛋白质-蛋白质相互作用已经成为现代发现小分子药物的重要策略之一, 国际上许多大型的制药公司和药物研究单位在这方面的研究都投入了大量的人力和财力, 期待在该领域发现结构新颖、作用机制独特的小分子药物。由于蛋白质-蛋白质相互作用包括于多种生物学功能中以及在人类蛋白质网络中包含了超过三十万种蛋白质-蛋白质相互作用, 使得发现靶向蛋白质-蛋白质相互作用小分子药物的策略充满希望。另一方面, 由于蛋白质-蛋白质相互作用的特殊性, 如相互作用面积大亲和力高、有的存在多个“热点区域”、主要由疏水作用驱动同时也存在氢键和静电相互作用、蛋白在发生蛋白质-蛋白质相互作用前后构象会发生变化、包含于蛋白质-蛋白质相互作用中的结构域与其他蛋白通常具有较高的同源性等, 给发现既具有高亲和力又能具有良好透膜性和高特异性的小分子抑制剂带来挑战。人们一直以“Lipinski 五规则”来判定小分子药物(如相对分子质量小于 500), 但对于以蛋白质-蛋白质相互作用为靶标的药物, 分子过小将会降低其对蛋白结合的亲和力和选择性, 而分子过大又会降低其透膜性。因此,

对于发展靶向蛋白质-蛋白质相互作用的药物人们应该力求平衡上述各因素, 这类药物的相对分子质量可能平均在 650~700 之间、分子中应该包括有疏水基团也有能形成氢键的结构因素^[94]。总之, 在靶向蛋白质-蛋白质相互作用的小分子药物研究中机遇与挑战并存, 相信随着更多评价模型的建立、筛选技术的进步、结构多样性和复杂性的化合物的合成以及基于结构的药物设计方法的发展, 会出现越来越多的能够调控蛋白质-蛋白质相互作用的小分子化合物并最终成为进入临床的药物。

[参 考 文 献]

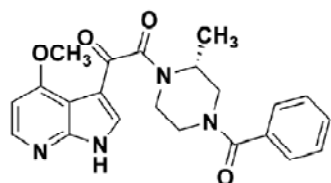
- [1] Ramani AK, Bunesco RC, Mooney RJ, et al. Consolidating the set of known human protein-protein interactions in preparation for large-scale mapping of the human interactome. *Genome Biol*, 2005, 6(5): R40
- [2] Jones S, Thornton JM. Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(1): 13-20
- [3] Conte LL, Chothia C, Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol*, 1999, 285(5): 2177-98
- [4] Bogan AA, Thorn KS. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol*, 1998, 280(1): 1-9
- [5] Clackson T, Wells JA. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science*, 1995, 267(5196): 383-86
- [6] Clackson T, Ultsch MH, Wells JA, et al. Structural and functional analysis of the 1:1 growth hormone: receptor complex reveals the molecular basis for receptor affinity. *J Mol Biol*, 1998, 277(5): 1111-28
- [7] Keskin O, Ma B, Nussinov R. Hot regions in protein-protein interactions: The organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. *J Mol Biol*, 2005, 245(5): 1281-49
- [8] Ma BY, Elkayam T, Wolfson H, et al. Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10): 5772-7
- [9] Dalhus B, Saarinen M, Sauer UH, et al. Structural basis for thermophilic protein instability: structures of thermophilic and mesophilic malate dehydrogenases. *J Mol Biol*, 2002, 318(3): 707-21
- [10] Li X, Keskin O, Ma B, et al. Protein-protein interactions: hot spots and structurally conserved residues often locate in complemented pockets that pre-organized in the unbound states: implications for docking. *J Mol Biol*, 2004, 344(3): 781-95
- [11] Villoutreix B, Bastard K, Sperandio O, et al. In Silico-*In Vitro* screening of protein-protein interactions: towards the next generation of therapeutics. *Curr Pharmaceut Biotechnol*, 2008, 9(2): 103-22
- [12] Fuller JC, Burgoyne NJ, Jackson RM. Predicting druggable binding sites at the protein-protein interface. *Drug Discov*

- Today, 2009, 14 (3/4): 155-61
- [13] Stockwin L, Holmes S. Antibodies as therapeutic agents: Vive la renaissance! *Exp Opin Biol Ther*, 2003, 3(7): 1133-52
- [14] Bottger V, Bottger A, Howard SF, et al. Identification of novel mdm2 binding peptides by phage display. *Oncogene*, 1996, 13(10): 2141-7
- [15] Juliano RL, Astriab-Fisher A, Falke D. Macromolecular therapeutics: Emerging strategies for drug discovery in the Postgenome Era. *Mol Interv*, 2001, 1(1): 40-53
- [16] Wells JA, McClendon CL. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature*, 2007, 450(7172): 1001-9
- [17] Cheng AC, Coleman RG, Smyth KT, et al. Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability. *Nat Biotech*, 2007, 25(1): 71-5
- [18] Kwong PD, Wyatt R, Sattentau QJ, et al. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol*, 2000, 74(4): 1961-72
- [19] Chan DC, Fass D, Berger JM, et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 1997, 89(2): 263-73
- [20] Kwong P D, Wyatt R, Robinson J, et al. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 1998, 393(6686): 648-59
- [21] Wang T, Zhang Z, Wallace OB, et al. Discovery of 4-Benzoyl-1-((4-methoxy-1H-pyrrolo[2,3- β]pyridin-3-yl)oxoacetyl)-2-(R)-methylpiperazine (BMS-378806): A novel HIV-1 attachment inhibitor that interferes with CD4-gp120 interactions. *J Med Chem*, 2003, 46(20): 4236-9
- [22] Wang T, Yin Z, Zhang Z, et al. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) attachment. 5. An evolution from indole to azaindoles leading to the discovery of 1-(4-benzoylpiperazin-1-yl)-2-(4,7-dimethoxy-1H-pyrrolo[2,3- c]pyridin-3-yl)ethane-1,2-dione (BMS-488043), a drug candidate that demonstrates antiviral activity in HIV-1-infected subjects. *J Med Chem*, 2009, 52(23): 7778-87
- [23] Lin P, Blair W, Wang T, et al. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(19): 11013-8
- [24] Kong R, Tan JJ, Ma XH, et al. Prediction of the binding mode between BMS-378806 and HIV-1 gp120 by docking and molecular dynamics simulation. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764(4): 766-72
- [25] Teixeira C, Serradji N, Maurel F, et al. Docking and 3D-QSAR studies of BMS-806 analogs as HIV-1 gp120 entry inhibitors. *Eur J Med Chem*, 2009, 44(9): 3524-32
- [26] Schon A, Madani N, Klein JC, et al. Thermodynamics of binding of a low-molecular-weight CD4 mimetic to HIV-1 gp120. *Biochemistry*, 2006, 45(36): 10973-80
- [27] Si Z, Madani N, Cox JM, et al. Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(14): 5036-41
- [28] Madani N, Perdigo AL, Srinivasan K, et al. Localized changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistance to human immunodeficiency virus entry inhibitors BMS-806 and #155. *J Virol*, 2004, 78(7): 3742-52
- [29] Rusconi S, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, et al. An update in the development of HIV entry inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 2007, 7(13): 1273-89
- [30] Berger E A, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17: 657-700
- [31] Napier K B, Wang Z X, Peiper S C, et al. CCR5 interactions with the variable 3 loop of gp120. *J Mol Model*, 2007, 13(1): 29-41
- [32] Lin G, Baribaud F, Romano J, et al. Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 env proteins. *J Virol*, 2003, 77(2): 931-42
- [33] Cormier E G, Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol*, 2002, 76(17): 8953-7
- [34] Huang CC, Lam SN, Acharya P, et al. Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. 2007, *Science*, 317(5846): 1930-4
- [35] Wang W K, Lee C N, Dudek T, et al. Interaction between HIV type 1 glycoprotein 120 and CXCR4 coreceptor involves a highly conserved arginine residue in hypervariable region 3. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000, 16(17): 1821-9
- [36] Berchanski A, Lapidot A. Computer-based design of novel HIV-1 entry inhibitors: neomycin conjugated to arginine peptides at two specific sites. *J Mol Model*, 2009, 15(3): 281-94
- [37] Kuritzkes DR. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr Opin HIV AIDS*, 2009, 4(2): 82-7
- [38] Dorr P, Westby M, Dobbs S, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(11): 4721-32
- [39] Maeda K, Nakata H, Koh Y, et al. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor, which preserves CC chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 HIV type 1 *in vitro*. *J Virol*, 2004, 78(16): 8654-62
- [40] Strizki JM, Tremblay C, Xu S, et al. Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(12): 4911-9
- [41] Takashima K, Miyake H, Kanzaki N, et al. Highly potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by TAK-220, an orally bioavailable small-molecule CCR5 antagonist. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(8): 3474-82
- [42] Kondru R, Zhang J, Ji C, et al. Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists. *Mol Pharmacol*, 2008, 73(3): 789-800
- [43] De Clercq E. The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(7): 581-7
- [44] Wong RSY, Bodart V, Metz M, et al. Comparison of the potential multiple binding modes of bicyclam, monocyclam,

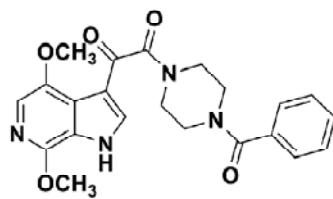
- and noncyclam small-molecule CXC chemokine receptor 4 inhibitors. *Mol Pharmacol*, 2008, 74 (6): 1485–95
- [45] Mehellou Y, De Clercq E. Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: Where do we stand and where do we go? *J Med Chem*, 2010, 53 (2): 521–38
- [46] Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, et al. The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53 (7): 2940–8
- [47] Chan D C, Fass D, Berger J M, et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 1997, 89 (2): 263–73.
- [48] Jiang S, Lu H, Liu S, et al. N-substituted pyrrole derivatives as novel human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors that interfere with the gp41 six-helix bundle formation and block virus fusion. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48 (11): 4349–59.
- [49] Katritzky AR, Tala SR, Lu H, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationship of a novel series of 2-Aryl 5-(4-Oxo-3-phenethyl-2-thioxothiazolidinylidene)methyl furans as HIV-1 entry inhibitors. *J Med Chem*, 2009, 52 (23): 7631–9
- [50] Lawless-Delmedico MK, Sista P, Sen R, et al. Heptad-repeat regions of respiratory syncytial virus F1 protein form a six-membered coiled-coil complex. *Biochemistry*, 2000, 39 (38): 11684–95
- [51] Zhao X, Singh M, Malashkevich VN, et al. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (26): 14172–7
- [52] Cianci C, Meanwell N, Krystal M, et al. Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 55 (3): 289–92
- [53] Bonfanti JF, Meyer C, Doublet F, et al. Selection of a respiratory syncytial virus fusion inhibitor clinical candidate. 2. Discovery of a morpholinopropylaminobenzimidazole derivative (TMC353121). *J Med Chem*, 2008, 51 (4): 875–96
- [54] Roymans D, De Bondt HL, Arnoult E, et al. Binding of a potent small-molecule inhibitor of six-helix bundle formation requires interactions with both heptad-repeats of the RSV fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107 (1): 308–13
- [55] Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. Harrison. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (12): 6986–91
- [56] Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. Harrison. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 2004, 427 (6972): 313–9
- [57] Li Z, Khaliq M, Zhou Z, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of antiviral agents targeting flavivirus envelope proteins. *J Med Chem*, 2008, 51 (15): 4660–71
- [58] Wang QY, Patel SJ, Vangrevelinghe E, et al. A small-molecule dengue virus entry inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53 (5): 1823–31
- [59] Hayden FG, Hay AJ. Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, 176: 119–30
- [60] de Jong MD, Tran TT, Truong HK, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med*, 2005, 353 (25): 2667–72
- [61] Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, et al. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (46): 17736–41
- [62] Chen J, Skehel JJ, Wiley DC. N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA (2) subunit to form an Ncap that terminates the triple-stranded coiled coil. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (16): 8967–72
- [63] Vanderlinden E, Göktaş F, Cesur Z, et al. Novel inhibitors of influenza virus fusion: structure-activity relationship and interaction with the viral hemagglutinin. *J Virol*, 2010, 84 (9): 4277–88
- [64] Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, et al. Structure of bcl-XL-bak peptide complex: Recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 1997, 275 (5302): 983–6
- [65] Lee EF, Czabotar PE, Smith BJ, et al. Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-XL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ*, 2007, 14 (9): 1711–3
- [66] Park C-M, Bruncko M, Adickes J, et al. Discovery of an orally bioavailable small molecule inhibitor of pro-survival b-cell lymphoma 2 proteins. *J Med Chem*, 2008, 51 (21): 6902–15
- [67] Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*, 2008, 68 (9): 3421–8
- [68] Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7 (12): 989–1000
- [69] Chai J, Du C, Wu JW, et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 2000, 406 (6798): 855–62
- [70] Shiozaki EN, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29 (9): 486–94
- [71] Oost TK, Sun CH, Armstrong RC, et al. Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer. *J Med Chem*, 2004, 47 (18): 4417–26
- [72] Zobel K, Wang L, Varfolomeev E, et al. Design, synthesis, and biological activity of a potent Smac mimetic that sensitizes cancer cells to apoptosis by antagonizing IAPs. *ACS Chem Biol*, 2006, 1 (8): 525–33
- [73] Mastrangelo E, Cossu F, Milani M, et al. Targeting the X-linked inhibitor of apoptosis protein through 4-substituted azabicyclo[5.3.0]alkane Smac mimetics. Structure, activity, and recognition principles. *J Mol Biol*, 2008, 384 (3): 673–89
- [74] LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, et al. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 2008, 27 (48): 6252–75
- [75] Vucic D, Fairbrother W J. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (20): 5995–6000
- [76] Wu X, Bayle JH, Olson D, et al. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, 1993, 7 (7A): 1126–32
- [77] Kussie PH, Gorina S, Marechal V, et al. Structure of the mdm2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor

- transactivation domain. *Science*, 1996, 274(5289): 948-53
- [78] Shangary S, Wang S. Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(17): 5318-24
- [79] Vassilev LT, Vu BT, Cayvajal D, et al. *In vivo* activation of the p53 pathway by small molecule antagonists of mdm2. *Science*, 2004, 303(5659): 844-8
- [80] Shangary S, Qin D, McEachern D, et al. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(10): 3933-8
- [81] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's diseases: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 1992, 256(5054): 184-5
- [82] Hawkes CA, Ng V, McLaurin J. Small molecule inhibitors of A β -aggregation and neurotoxicity. *Drug Dev Res*, 2009, 70(2): 111-24
- [83] Hong HS, Rana S, Barrigan L, et al. Inhibition of Alzheimer's amyloid toxicity with a tricyclic pyrone molecule *in vitro* and *in vivo*. *J Neurochem*, 2009, 108(4): 1097-108
- [84] Blazer LL, Neubig RR. Small molecule protein-protein interaction inhibitors as CNS therapeutic agents: current progress and future hurdles. *Neuropsychopharmacology*, 2009, 34(1): 126-41
- [85] Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A, et al. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative Diseases. *J Med Chem*, 2008, 51(3): 347-72
- [86] Kuret J, Congdon EE, Li G, et al. Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microsc Res Tech*, 2005, 67(3-4): 141-55
- [87] Larbig G, Pickhardt M, Lloyd DG, et al. Screening for inhibitors of tau protein aggregation into Alzheimer paired helical filaments: a ligand based approach results in successful scaffold hopping. *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4(3): 315-23
- [88] Bulic B, Pickhardt M, Khlistunova I, et al. Rhodanine-based tau aggregation inhibitors in cell models of tauopathy. *Angew Chem Int: Ed Engl*. 2007, 46(48): 9215-9
- [89] Haydar SN, Yun H, Staal RGW, et al. Small-molecule protein-protein interaction inhibitors as therapeutic agents for neurodegenerative diseases: recent progress and future directions. *Annu Rep Med Chem*, 2009, 44: 51-66
- [90] Norris EH, Giasson BI, Lee VM. α -synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol*, 2004, 60: 17-54
- [91] Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, et al. Kinetic stabilization of the α -synuclein protofibril by a dopamine- α -synuclein adduct. *Science*, 2001, 294(5545): 1346-9
- [92] Li J, Zhu M, Rajamani S, et al. Rifampicin inhibits alpha-synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem Biol*, 2004, 11(11): 1513-21
- [93] Hong DP, Fink AL, Uversky VN. Structural characteristics of α -synuclein oligomers stabilized by the flavonoid baicalein. *J Mol Biol*, 2008, 383(1): 214-23
- [94] Zinzalla G, Thurston DE. Targeting protein-protein interactions for therapeutic intervention: A challenge for the future. *Future Med Chem*, 2009, 1(1): 65-93

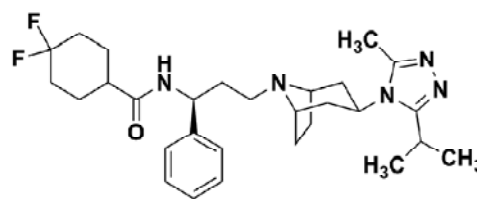
附录 1



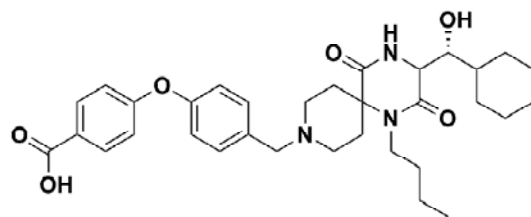
1 (BMS-378806)



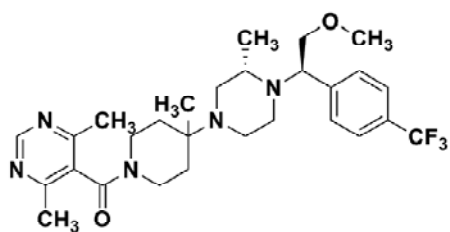
2 (BMS-488043)



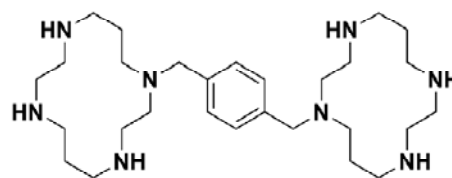
3 (Maraviroc)



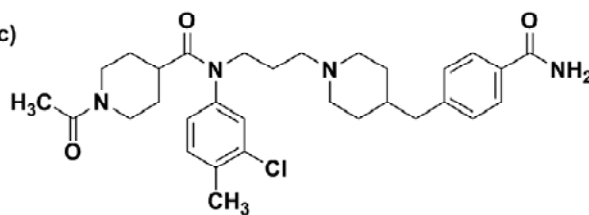
4 (Aplaviroc)



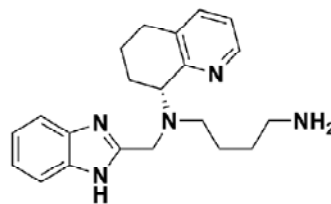
5 (Vicriviroc)



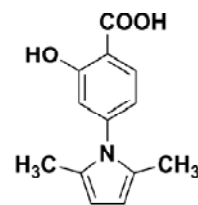
7 (AMD3100)



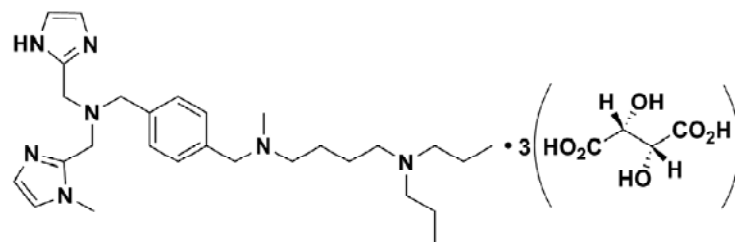
6 (TAK-220)



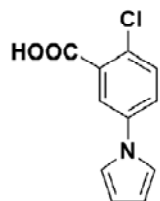
8 (AMD070)



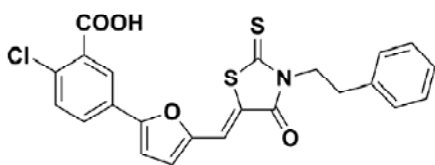
10 (NB-2)



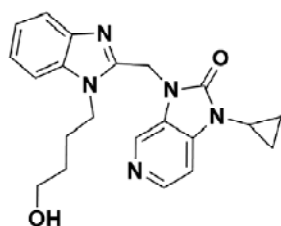
9 (KRH-3855)



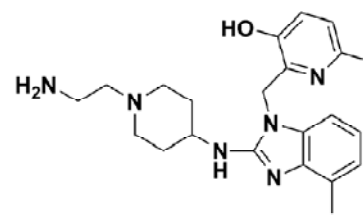
11 (NB-64)



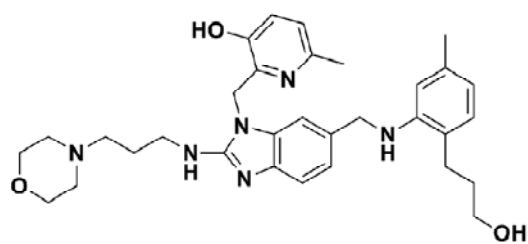
12



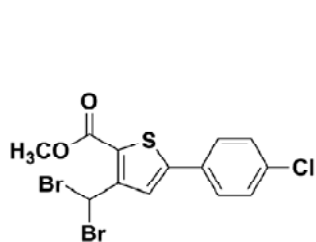
13 (BMS-433771)



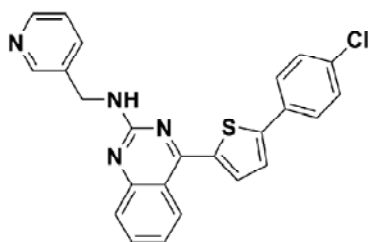
14 (JNJ-2408068)



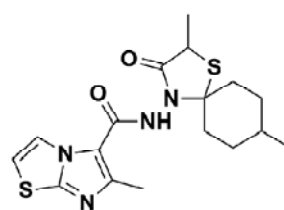
15 (TMC353121)



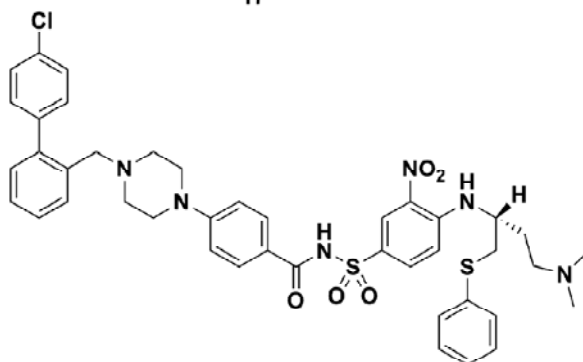
16



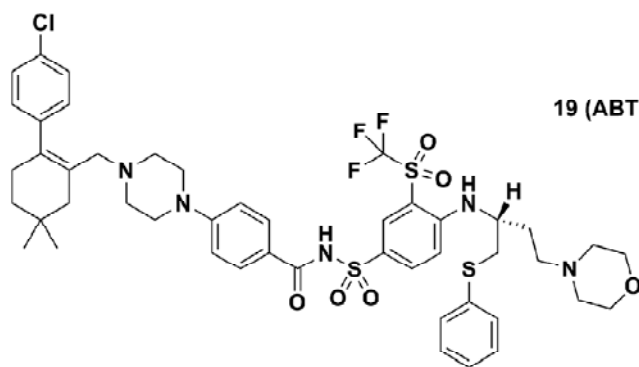
17



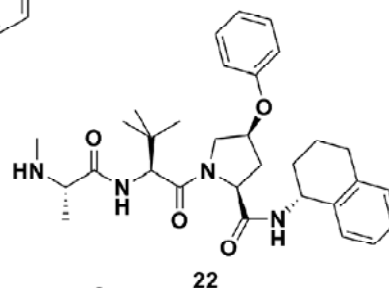
18



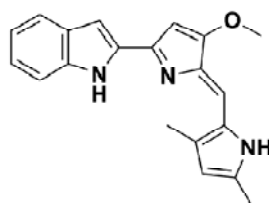
19 (ABT-737)



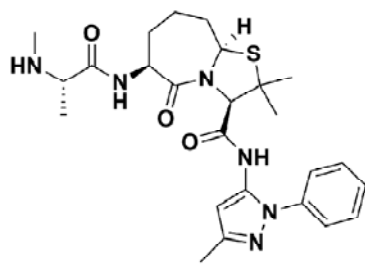
20 (ABT-263)



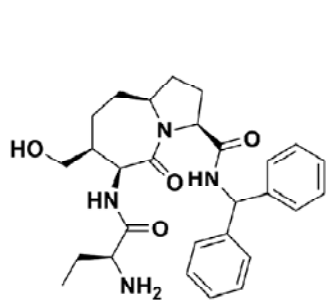
22



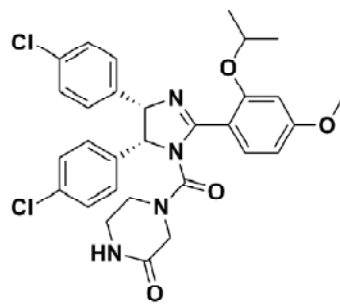
21 (Obatoclax)



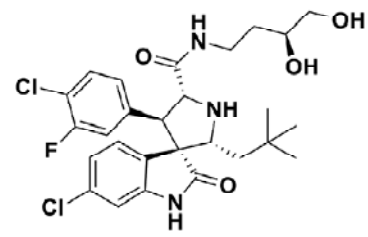
23



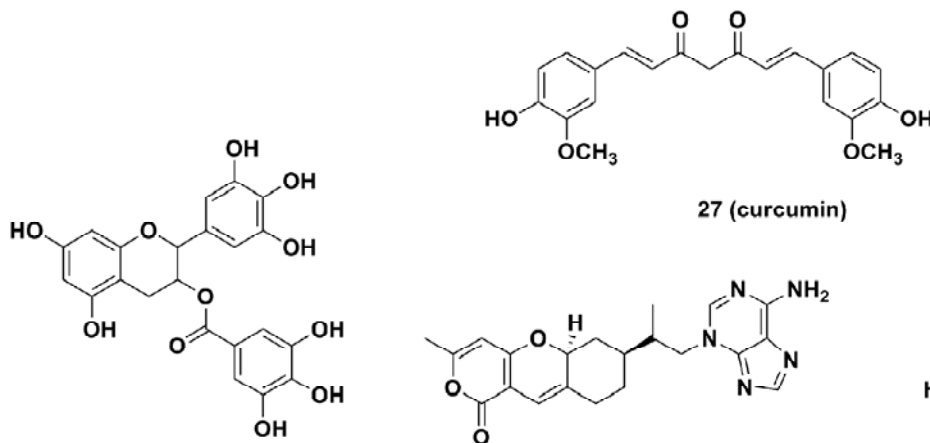
24 (Smac005)



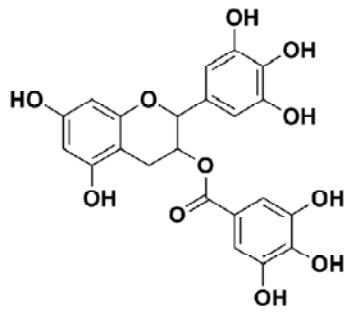
25 (Nutlin-3)



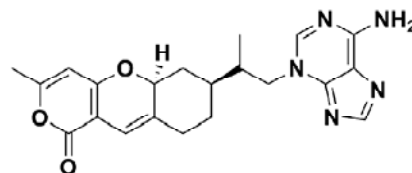
26 (MI-219)



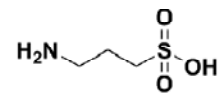
27 (curcumin)



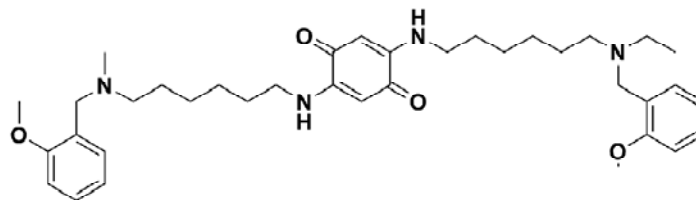
28 (EGCG)



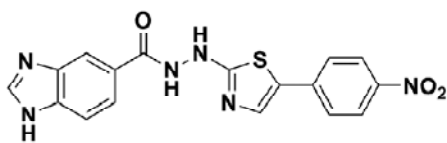
29



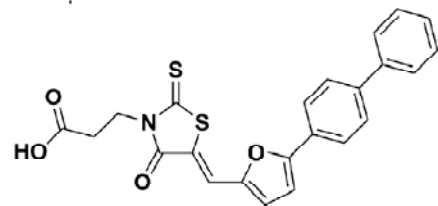
30 (tramiprosate)



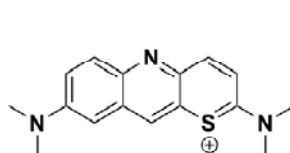
31 (Memoquin)



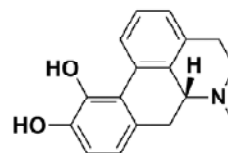
32



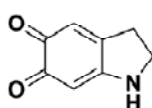
33



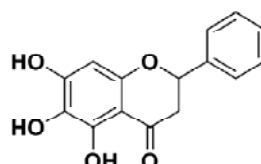
34



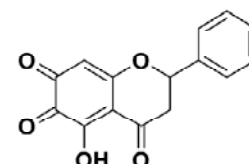
35



36



37



38