

亚甲基四氢叶酸脱氢酶 2 (MTHFD2) 小分子抑制剂研究进展

孙斌¹, 张磊^{*1,2}

(1. 遵义医科大学 药学院, 贵州 遵义 563000;

2. 凯里学院 大健康学院 黔东南苗侗药现代化研究重点实验室, 贵州 凯里 556011)

摘要: 为了维持增殖, 肿瘤细胞依赖于一碳代谢来支持嘌呤和嘧啶核苷酸的合成。亚甲基四氢叶酸脱氢酶 2 (Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase 2, MTHFD2) 是肿瘤转化过程中上调程度最高的酶之一, 作为线粒体亚甲基四氢叶酸脱氢酶和环水解酶参与一碳代谢。由于 MTHFD2 仅在胚胎发育期间正常表达, 而在正常成人组织不表达或低表达, 因此这为根除肿瘤细胞同时保留正常细胞提供了选择性的治疗靶点。综述了近年来已报道的 MTHFD2 抑制剂的开发、优化和最新进展, 讨论其作为抗肿瘤药物的治疗潜力, 并提出未来开发的潜在挑战。

关键词: 亚甲基四氢叶酸脱氢酶; MTHFD2; 一碳代谢; 抑制剂; 肿瘤

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)08-0025-09

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0096

Recent Advances in the Small-Molecule Inhibitors of Targeting Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase 2 (MTHFD2)

SUN Bin¹, ZHANG Lei^{*1,2} (1. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; 2. Key Laboratory for Modernization of Qiongnan Miao and Dong Medicine, School of Life and Health Science, Kaili University, Kaili 556011, China)

Abstract: To sustain proliferation, tumor cells rely on one-carbon metabolism to support the synthesis of purine and pyrimidine nucleotides. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (MTHFD2) is one of the most highly upregulated enzymes in tumor transformation, and functions as a mitochondrial methylenetetrahydrofolate dehydrogenase and cyclohydrolase involved in one-carbon metabolism. Due to its exclusive expression during embryonic development but minimal or absent expression in normal adult tissues, MTHFD2 provides a selectively targetable therapeutic option for eradicating tumor cells while preserving normal cells. This review summarized the development, optimization, and latest progress of MTHFD2 inhibitors reported to date, discussed their therapeutic potential as anticancer agents and highlights potential challenges for future development.

Key words: methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2; MTHFD2; one-carbon metabolism; inhibitor; tumors

亚甲基四氢叶酸脱氢酶 2 (Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase 2, MTHFD2) 是参与线粒体叶酸一碳代谢的主要酶之一, 包含 350 个氨基酸, 分子量为 37 kDa, 也被称为 NAD 依赖性线粒体亚甲基四氢叶酸脱氢酶环水解酶 (NMDMC)^[1,2]。作为一种线粒体双功能酶, MTHFD2 具有脱氢酶和环水解酶活性。有研究发现, 它是肿瘤细胞增殖所必需的, 并可能在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用^[3,4]。MTHFD2 在各种癌症、转化细胞和发育中的胚胎中上调, 但在大多数分化的正常成年组织中具有低水平或检测不到的水平^[5]。高表达 MTHFD2 与乳腺癌^[6]、结直肠癌 (CRC)^[7]、肾细胞癌 (RCC)^[8] 和肝细胞癌 (HCC)^[9] 的不良预后相关。MTHFD2 的上调也有可能增加膀胱癌的风险^[10]。在多种癌症中, MTHFD2 的缺失可能不利于侵袭性表型并导致细胞死亡^[5]。综上所述, MTHFD2 是一种促癌基因, 与多种癌症细胞关系密切^[11-13], 可能成为癌症靶向药物开发的重要靶点。

目前已有多篇文献报道了靶向 MTHFD2 的小分子抑制剂, 但由于其对 MTHFD2 和 MTHFD1 的选择性较差, 具有潜在的脱靶效应等缺点。针对 MTHFD2 抑制剂的药物开发仍处于临床前研究阶段, 尚未有药物进入临床, 且已报道 MTHFD2 抑制剂的抗肿瘤免疫治疗作用与机制也有待进一步确证^[14]。因此, 靶向 MTHFD2 的小分子抑制剂具有极大的开发潜力。本文综述了目前已报道的小分子 MTHFD2 抑制剂及其抗肿瘤活性, 以期 MTHFD2 抑制剂的进一步结构修饰和活性研究提供思路。

收稿日期: 2024-02-16; 网络首发日期: 2024-05-18

基金项目: 黔科合基础项目 (ZK (2023) 499)。

作者简介: 孙斌 (1997-), 男, 安徽合肥人, 硕士生, 主要研究方向为药物化学。

通讯作者: 张磊, E-mail: lei_chang@yeah.net。

引用本文: 孙斌, 张磊. 亚甲基四氢叶酸脱氢酶 2 (MTHFD2) 小分子抑制剂研究进展 [J]. 化学试剂, 2024, 46(8): 25-33。

1 MTHFD2 与肿瘤的关系

由叶酸循环 (Folate Cycle) 介导的一碳代谢 (One-Carbon Metabolism) 是生物体中重要的一种代谢过程, 其中四氢叶酸 (THF) 通过激活和转移一碳单位 (One-Carbon Units) 以进行核苷酸生物合成和氨基酸稳态和表观遗传学维持等^[15]。而在癌症中, 某些一碳代谢过程中的基因会出现高度的过表达, 其中 MTHFD2 是人类肿瘤中过表达最多的基因之一, 但在生理情况下, MTHFD2 只在胚胎发育的过程中广泛上调, 在成人组织中几乎不表达, 这使得 MTHFD2 具有成为安全有效的癌症治疗靶点的潜力^[5,16,17]。

MTHFD2 属于亚甲基四氢叶酸脱氢酶 (MTHFD) 家族, 于 1960 年首次发现于 Ehrlich 腹水肿瘤细胞, 其在叶酸代谢中以 NADP^+ 为氢受体催化亚甲基四氢叶酸生成甲酰基四氢叶酸并生成 NADPH , 在哺乳动物的胚胎发育中起到重要作用^[18]。但近年来, MTHFD2 的非酶功能逐渐被报道, 其定位于细胞核中的 DNA 复制位点, 在癌症的增殖过程中起到驱动作用^[19]。有研究表明, MTHFD2 通过维持氧化还原稳态促进 CRC 细胞 (结直肠癌细胞) 生长和转移, 且 MTHFD2 抑制剂 LY345899 能够在免疫缺陷小鼠体内对 CRC 的人源细胞系移植瘤模型和 PDX 模型起到显著的治疗作用^[7]。而在其他类型的癌症中, MTHFD2 通过激活 AKT 信号通路在乳腺癌恶性肿瘤中发挥促进作用^[20]。在膀胱癌中, MTHFD2 参与细胞周期调节, 通过激活 CDK2 并依次激活 E2F1 来促进细胞周期进程^[21]。在卵巢癌中, MTHFD2 通过激活 STAT3 和 STAT3 诱导的上皮-间质转化信号通路来促进肿瘤细胞的增殖和侵袭^[22]。在 AML 细胞中, MTHFD2 的敲降抑制了 AML 细胞的生长并诱导细胞分化以及使得集落形成受损; 此外, 敲降 MTHFD2 会抑制人类 AML 细胞原位种移植瘤模型中白血病的发生进展^[23]。在 HCC 细胞中, 敲降 MTHFD2 可抑制与癌症转移相关的细胞特征, 包括细胞迁移、侵袭和上皮间质转化, 但在细胞增殖、凋亡或细胞周期分布方面无显著差异^[9]。还有大量研究表明, MTHFD2 通过影响癌症中嘌呤合成^[24,25]、ROS 的产生^[26]以及表观遗传修饰^[27]等影响肿瘤的增殖与发展, 而 MTHFD2 的下调可能促进癌细胞死亡并抑制癌症的增殖、侵袭、迁移和转移^[28,29]。

2 MTHFD2 小分子抑制剂

2.1 底物类似物抑制剂

2017 年, Gustafsson 等^[30]报道了第一种底物类似物 MTHFD2 抑制剂 LY345899 (化合物 1, 图 1), 并且揭示了 MTHFD2 与底物抑制剂、酶辅因子 NAD^+ 和无机磷酸盐配合物的第一个晶体结构。底物抑制剂化合物 1 在体外抑制 MTHFD2 和 MTHFD1 的 DC-结构域, 测定结果显示 IC_{50} 值分别为 663、96 nmol/L。

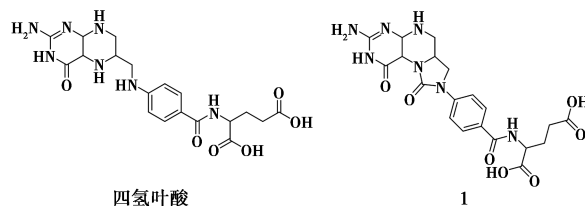
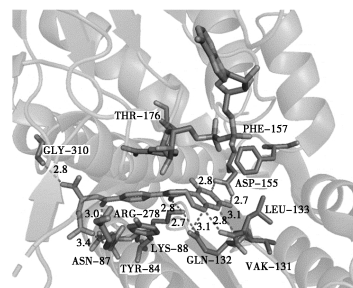


图 1 四氢叶酸和化合物 1 结构式

Fig.1 Structures of THF and compound 1

MTHFD2 与化合物 1、 NAD^+ 和 Pi 配合物的 X 射线共晶结构显示, 抑制剂化合物 1 结合在 MTHFD2 蛋白 N-和 C-末端结构域之间的大裂缝中, 蛋白质桥接在抑制剂上形成隧道 (图 2)。化合物 1 的蝶呤部分与 MTHFD2 形成了显著的氢键网络, 其中 Asp155 通过两根直接氢键对化合物 1 的结合有很大贡献。MTHFD2 蛋白的 Tyr84 残基通过与对氨基苯甲酸酯部分的 π 堆积, 有助于底物类似物的结合。蛋白质 Lys88 残基的疏水环境是保守的, 降低该残基的 PKa 以保持其去质子化, 可能是活性所需的。化合物 1 的末端谷氨酸部分延伸通过 MTHFD2 的隧道并到达溶剂区。化合物 1 的整体结合模式在 MTHFD1 和 MTHFD2 之间是保守的, 亲和力的差异可能取决于 Ser83、Asn87、Phe157、Ala175、Asn204、Leu289 这些与该抑制剂相互作用有关的蛋白质残基, 在 MTHFD1 和 MTHFD2 之间是非保守的。



PDB:5TC4

图 2 MTHFD2、 NAD^+ 和化合物 1 复合物的晶体结构图

Fig.2 Crystal structure of MTHFD2 in complex with NAD^+ and compound 1

综上所述,化合物 1 是基于四氢叶酸修饰得到的一种底物类似物抑制剂,从抑制效力来看,更准确的来说其是一种 MTHFD1 ($IC_{50} = 96 \text{ nmol/L}$) 抑制剂。而抑制 MTHFD1 将构成潜在的安全风险,因为与 MTHFD2 不同,MTHFD1 在正常组织中广泛表达。但化合物 1 可作为先导化合物进一步结构优化,为继续开发用于癌症治疗的强效和选择性 MTHFD2 抑制剂奠定基础。

2022 年, Bonagas 等^[31] 采用底物引导的先导化合物优化策略,报道了具有高效力和选择性的 MTHFD2 抑制剂 TH9619(化合物 2,图 3)。实验证明,抑制剂在体外和体内降低了急性髓系白血病细胞的复制分叉速度,诱导了复制应激,随后出现 S 期阻滞和凋亡,与非致瘤细胞相比,其治疗窗口跨越了 4 个数量级。

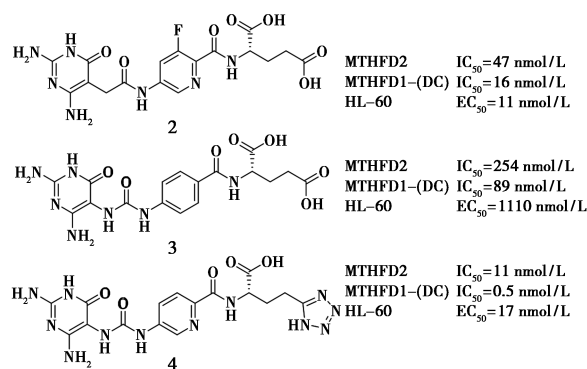
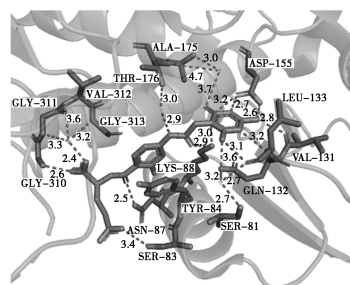


图 3 化合物 2~4 结构图

Fig.3 Structures of compounds 2~4

将化合物 1 的三环核心母核简化为二氨基嘧啶头部基团得到 TH7299(化合物 3,图 3)。化合物 3 先前被报道为细菌 FolD 抑制剂 9L9^[32],随后研究发现其对 MTHFD2 具有较高的活性。对化合物 3 结构-活性关系(SAR)研究,结果表明:(1)二氨基嘧啶酮结构不耐受任何衍生化修饰;(2)尿素连接体和中心苯环显示出高度特异性的 SAR;(3)谷氨酸部分可以被多种氨基酸和同位体取代。最终优化得到表现出低纳摩尔亲和力的化合物 2 和 4(图 3)。分析化合物 2 与 MTHFD2 复合物的晶体结构(图 4),发现化合物 2 与 MTHFD2 的结合模式与化合物 1 相似,占据了底物结合口袋,化合物 1 与 MTHFD2 之间复杂的氢键网络被二氨基嘧啶酮基团所取代,这可能是导致化合物 2 具有优异抑制活性的重要原因。

在 HL-60 细胞中,进行了药物亲和靶标稳定性实验(DARTS)和细胞热位移测定(CETSA),分别测定了针对蛋白水解和热蛋白降解的靶标稳定



PDB:6S4F

图 4 MTHFD2、NAD⁺和化合物 2 复合物晶体结构图

Fig.4 Crystal structure of MTHFD2 in complex with NAD⁺ and compound 2

性,实验结果证明了化合物 2 能够在细胞内直接作用靶标。在 AML(白血病)小鼠疾病模型中,皮下给药 10 mg/kg,化合物 2 能够被全身快速吸收,最大血浆浓度(C_{max})为 26 $\mu\text{mol/L}$,半衰期为 1.7 h,并且化合物 2 耐受性良好,治疗期间体重没有显著下降。

先导化合物 2、3、4 均靶向 MTHFD2、MTHFD2L、MTHFD1,虽然靶向正常人体内广泛表达的 MTHFD1 可能存在潜在的安全风险,但在小鼠体内实验中并没有显著的体重减轻和明显的行为变化,且这种无选择性抑制可能有利于防止出现耐药性。综上所述,化合物 2、3、4 是一类具有低纳摩尔细胞效力的 MTHFD2 抑制剂,具有一定的肿瘤治疗潜力。

2.2 三环香豆素骨架抑制剂

2019 年, Kawai 等^[33]公开了一种新型具有三环香豆素骨架的选择性 MTHFD2 抑制剂 DS44960156(化合物 5,图 5)。首先,通过高通量筛选(HTS)发现了代表性化合物 6(图 5),其对

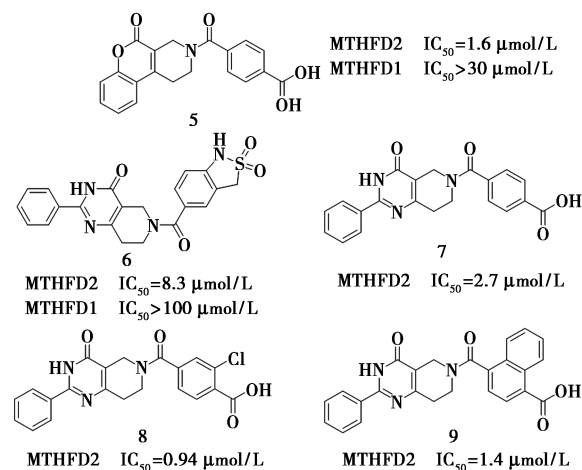
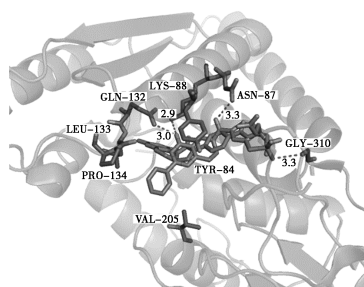


图 5 化合物 5~9 结构图

Fig.5 Structures of compounds 5~9

MTHFD2 脱氢酶具有抑制活性($IC_{50} = 8.3 \mu\text{mol/L}$),而对 MTHFD1 没有表现出抑制活性($IC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$)。随后利用基于结构的合理药物设计(SBDD)进行优化,最终优化得到化合物 5,显示出 MTHFD2 的选择性是 MTHFD1 的 18 倍以上,分子量 <400 且具有良好的配体效率(LE)。

MTHFD2-化合物 6 复合物的 X 射线晶体结构图清晰地揭示了其结合模式(图 6)。化合物 6 占据 MTHFD2 的叶酸结合位点,其结合模式与化合物 1 略有不同。化合物 6 不占据化合物 1 蝶呤部分所形成的氢键网络区域,除了末端苯环,其余部分与化合物 1 共享相同的口袋。MTHFD2-化合物 6 复合物的关键相互作用如下:4 个氢键(Gln/Lys88 与嘧啶-4-酮的 $C=O$; Asn87 与连接酰胺的 $C=O$; Gly310 与内磺酰胺的 $S=O$)和 Tyr84、嘧啶-4-酮之间的 $\pi-\pi$ 相互作用。基于嘧啶-4-酮所具有的关键相互作用,核心嘧啶-4-酮结构被认为在很大程度上有助于亲和力。另一方面,研究发现 Asn87 与连接酰胺的 $C=O$ 的相互作用对同工酶选择性是重要的。化合物 6 的苯环被几个疏水残基包围,苯环和残基之间的疏水相互作用可能部分有助于提高亲和力,但是这种贡献有限。基于这些结构特征,对先导化合物 6 进行结构优化。



PDB:6JID

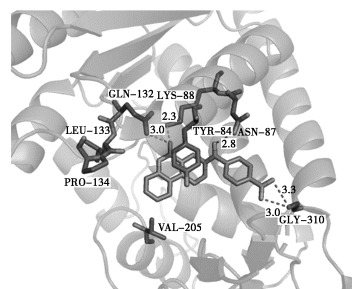
图 6 MTHFD2、 NAD^+ 、化合物 1 和化合物 6 复合物晶体结构图

Fig.6 Crystal structure of MTHFD2 in complex with NAD^+ , compound 1 and compound 6

首先,通过构-效关系研究发现,内酰胺结构会影响 MTHFD2 的抑制活性,采用生物电子等排体四氮唑和羧酸(化合物 7)替代,化合物 7 的抑制活性是化合物 6 的 3 倍,而四唑衍生物的活性较低。随后考察苯甲酸附近取代基对活性的影响,邻位 Cl 代化合物 8 显示出较好的抑制活性($IC_{50} = 0.94 \mu\text{mol/L}$)。空间体积较大的萘环(化合物 9)代替苯环则抑制活性提高两倍($IC_{50} = 1.4 \mu\text{mol/L}$)。而对核心支架的改造,如环酰胺和嘧

啶-4-酮有时会表现出较差的物理化学性质,这可能由于存在未掩蔽 N—H 的弱酸性所导致。去除嘧啶-4-酮的 N—H 有望改善 ADME 性质。根据晶体复合物结构,化合物 1 羰基的存在和核心支架的 $\pi-\pi$ 堆叠相互作用是抑制 MTHFD2 的必要条件;另一方面嘧啶-4-酮的两个氮原子没有与蛋白质或水分子形成任何关键的相互作用。苯环的电子密度不明显,表明了苯环没有很好地填充到蛋白质口袋中,因此可以被其他单元取代。基于这些结构特征,采用“基于结构的骨架跃迁”策略,最终获得具有新型香豆素骨架的 MTHFD2 抑制剂化合物 5。

MTHFD2-化合物 5 复合物的 X 射线晶体结构显示(图 7),其结合方式与化合物 1 的结合方式相同,所有关键相互作用(4 个氢键和 $\pi-\pi$ 堆叠)仍然存在。并且末端羧酸盐通过氢键与 Gly310 的主链 N—H 具有明显相互作用,这可能是 DS44960156 效能增强的原因之一。综上所述,DS44960156 可作为先导化合物,用于选择性 MTHFD2 抑制剂的开发。



PDB:6JIB

图 7 MTHFD2、 NAD^+ 和化合物 5 复合物晶体结构图

Fig.7 Crystal structure of MTHFD2 in complex with NAD^+ and compound 5

同年,Kawai 等^[34]报道了基于化合物 5 优化得到的一种口服有效的、具有同工酶选择性的 MTHFD2 抑制剂 DS18561882(化合物 11,图 8)。相对于化合物 9,化合物 11 的 MTHFD2 抑制活性提高 250 倍以上,并且在口服给药的小鼠异种移植模型中显示出强烈的抗肿瘤作用。

基于对化合物 5-MTHFD2 复合物的 X 射线晶体结构的分析,三环香豆素骨架与 MTHFD2 蛋白之间的相互作用对抑制活性和同工酶选择性是必须的。另一方面,X 射线分析表明香豆素骨架的苯环周围存在相对较大的空间,该空间主要被疏水性残基(如 Leu133、Pro134 和 Val205)包围,并且该区域周围的蛋白质口袋是开放的,配体可

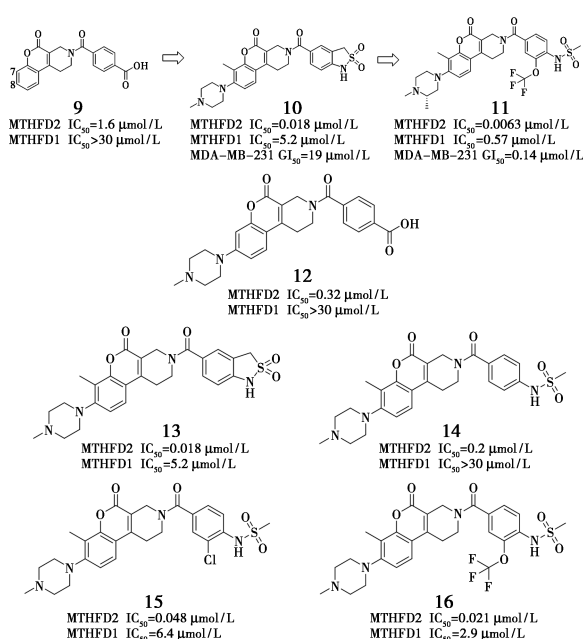


图 8 化合物 10~16 结构图

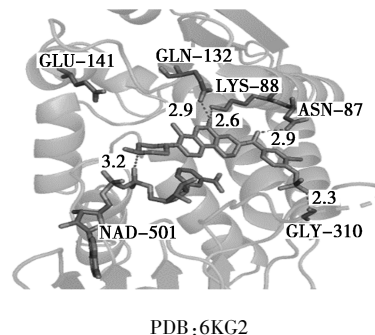
Fig.8 Structures of compounds 10~16

以被远端的残基接近,特别是香豆素骨架上的 8 位或者 9 位具有更大的空间,该位置指向蛋白质的溶剂可及区域。因此,首先研究了苯环上的取代基对活性的影响,在香豆素骨架 8 位引入各种胺,预计可与蛋白质残基 Glu141 形成远端静电相互作用,以增加亲和力。优化中发现,4-甲基哌嗪(化合物 12)的引入,显示出对 MTHFD2 良好的抑制活性($IC_{50} = 0.32 \mu\text{mol/L}$),并且对 MTHFD1 的抑制活性也明显较弱($IC_{50} > 30 \mu\text{mol/L}$)。分析 MTHFD2 复合物的 X-射线单晶衍射结构发现,香豆素骨架的苯环没有很好的堆积在蛋白质表面上,在 7 位引入甲基抑制活性明显提高,表明 7 位甲基可以适合亲脂性蛋白质表面。HTS 命中一个子结构苯并内磺酰胺,引入该结构后的组合对 MTHFD2 具有相当或更好的抑制活性。其中化合物 13 不但活性最高($IC_{50} = 18 \text{ nmol/L}$),而且选择性最高(289 倍)。基于化合物 13 良好的抑制活性,在人乳腺癌来源的 MDA-MB-231 细胞系进行了基于细胞的生长抑制实验。结果表明,化合物 13 的 GI_{50} 值为 $19 \mu\text{mol/L}$,比其酶活性 IC_{50} 高出 1 000 多倍,研究者认为是其内磺酰胺结构呈酸性,在生理条件下容易电离,导致细胞渗透性较差。

线性磺胺是一种酸性较低的结构,引入后得到 MTHFD2(化合物 14, $IC_{50} = 0.2 \mu\text{mol/L}$),其酶活性降低 11 倍,但观察到渗透性显著增加

(PAMPA; $5.4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$)。随后,在磺胺的邻位引入吸电子基团,发现抑制活性恢复到与化合物 13 相当的水平,而具有最大取代基(OCF_3)的化合物 16 显示出最佳的活性($IC_{50} = 21 \text{ nmol/L}$),与母体化合物 14 相比,氯代化合物 15 酶活性和细胞渗透性都显著增加。最后,对香豆素骨架的 8 位哌嗪基进行进一步优化,在哌嗪基的 3 位引入(S)-甲基,最终得到了活性最高的 MTHFD2 抑制化合物 11,其对 MDA-MB-231 细胞株的 GI_{50} 值最低,为 140 nmol/L 。化合物 11 对 MTHFD2 的选择性仍然是 MTHFD1 的 90 倍。

化合物 11 与 MTHFD2 配合物的共晶结构尚未报道。MTHFD2/ NAD^+ /化合物 15 复合物的 X 射线单晶衍射结构分析显示(图 9),化合物 15 的结合模式与化合物 5 几乎相同,位于 8 位的 4-甲基哌嗪的外层氮原子与 NAD^+ 辅因子的带负电荷的二磷酸相互作用,这个盐桥应该有助于增加亲和力。而没有如预计的那样与 MTHFD2 的 Glu141 相互作用。7 位的甲基似乎与蛋白质表面贴合,导致亲和力增加。而化合物 15 磺胺部分的 1 个氧原子与 Gly310 发生了类似于化合物 5 的羧酸盐的相互作用。



PDB:6KG2

图 9 MTHFD2、 NAD^+ 和化合物 15 复合物晶体结构图Fig.9 Crystal structure of MTHFD2 in complex with NAD^+ and compound 15

对化合物 15 和化合物 5 进行小鼠体内的药代动力学和体外 ADME 性质研究,发现这两种化合物都具有良好的渗透性、水溶性和代谢稳定性。因此,该化合物在小鼠体内观察到良好的口服暴露。化合物 5 在口服时表现出比化合物 15 更高的血浆浓度,化合物 5 和化合物 15 的游离血浆浓度($C_{p, \text{free}}$)几乎相同,而全身暴露均显示出 $10 \sim 300 \text{ mg/kg}$ 的剂量依赖性。但是在高剂量下,24 h 后它们血浆浓度几乎为零,为了维持全天的高血浆浓度,选择一天两次(BID)给药方式。在 MDA-MB-231 小鼠异种移植瘤模型中,口服给药

300 mg/kg BID 剂量下,化合物 15 显示出中度肿瘤生长抑制 ($TGI = 43\%$)。更有效的抑制剂 11, 在 30、100 和 300 mg/kg BID 剂量下观察到剂量依赖性 TGI , 在 300 mg/kg BID 剂量下,肿瘤生长几乎完全被抑制 ($TGI = 67\%$)。在研究过程中,几乎没有观察到小鼠体重明显下降。综上所述,化合物 11 是一种口服的高活性和选择性 MTHFD2 抑制剂,具有优异的体内体外活性。但较差的代谢稳定性,导致大剂量下才能有明显的抗肿瘤效果,都限制了化合物 11 进一步的临床研究。但这些发现将加速 MTHFD2 抑制剂作为抗癌药物的进一步研究。

2023 年, Jha 等^[35]通过利用 MTHFD2 与三环香豆素类抑制剂的共晶结构,在 MTHFD2 的底物结合位点上进行了基于结构的药物设计,其中涉及 R-基团计数、生物电子等排体替换、分子对接、ADME 预测、MM-GBSA 结合自由能计算和分子动力学模拟,从而获得了一系列能够选择性抑制 MTHFD2 的潜在化合物(图 10)。

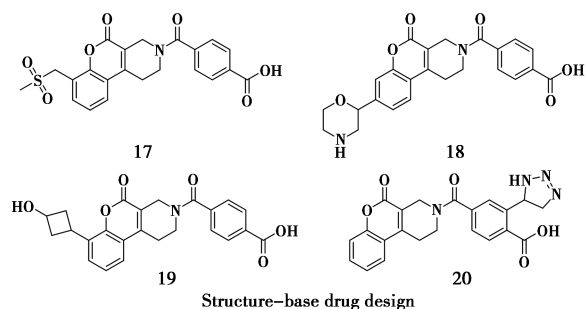


图 10 通过基于结构的药物设计获得的潜在 MTHFD2 抑制剂

Fig.10 Potential MTHFD2 inhibitors from structure-based drug design

基于已报道得化合物 11 具有良好的选择性和高效的生物活性,首先对三环香豆素类化合物的晶体结合模式和相应的蛋白质-配体相互作用进行了详细研究。此外,还对现有 MTHFD2 抑制剂的 MTHFD1 结合位点进行了比较对接、结合自由能计算和 MD 模拟,以验证选择性。该研究结果可为药物化学家提供有用的指导,以合理地基于结构设计高效和选择性 MTHFD2 抑制剂用于癌症治疗。

2.3 大环内酯酮羧酸抑制剂

天然产物一直是新药先导化合物的重要来源,但对其中许多活性天然产物来说,其作用机制 (MoA) 仍然未知^[36,37]。2017 年, Fu 等^[38]报道了

一种天然产物 Carolacton (化合物 21, 图 11), 由黏菌 *Sorangium Cellulosum* 产生的大环内酯酮羧酸。发现其能够靶向细菌叶酸依赖性一碳代谢的关键酶 FdID, 并且揭示了 FdID-化合物 21 复合物的晶体结构, 化合物 21 以纳摩尔亲和力与 FdID 结合。叶酸依赖的一碳代谢在生命的所有领域都是高度保守的^[15,39], 研究发现人类 FdID 同源物 MTHFD1 和 MTHFD2 在低纳摩尔范围内也被抑制, 并且微摩尔浓度的化合物 21 能够抑制癌细胞的生长。

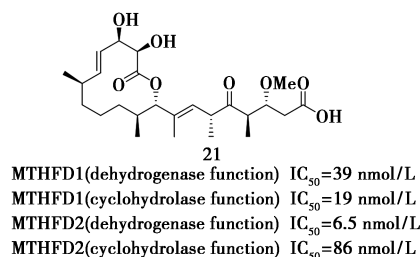


图 11 化合物 21 结构图

Fig.11 Structures of compound 21

由于人类的 FdID 同源基因受到化合物 21 的强烈抑制, 所以接下来研究了化合物 21 是否会在人类癌细胞系上显示出活性。当对 HCT-116、KB-3.1 和 KBV.1 细胞进行检测时, 化合物 21 的 EC_{50} 分别为 25、11、42 $\mu\text{mol/L}$ 。化合物 21 对人表皮样癌 KB3.1 细胞的抑制作用比相应的耐多药 (MDR) 细胞系 KB-V.1 强 4 倍。在 U937 细胞的情况下, 化合物 21 在高达 100 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下没有表现出活性。然而, 当该细胞系在叶酸缺乏的培养基中生长时, EC_{50} 为 42 $\mu\text{mol/L}$ 和 70% 的最大抑制作用。U-937 细胞上这种明显的叶酸依赖性活性, 支持 MTHFD2 是人癌症细胞中的化合物 21 的细胞靶点。

综上所述, 化合物 21 对几种癌症细胞系显示出中等活性, 但尚未有化合物 21 体内活性和蛋白质-配体相互作用等报道。化合物 21 的报道进一步拓展了 MTHFD2 的抑制剂库, 叶酸依赖的一碳代谢在所有生命中高度保守, 而从叶酸依赖的一碳代谢中 MTHFD2 同源酶中发现新型抑制剂, 为新型 MTHFD2 抑制剂的发现提供了新见解。

2.4 黄嘌呤衍生物变构抑制剂

2021 年, Lee 等^[40]报道了一种黄嘌呤衍生物 MTHFD2 抑制剂化合物 22 (图 12)。并且得到了 MTHFD2-黄嘌呤衍生物-化合物 22 配合物的共晶结构, 化合物 22 被发现占据了一个新的结合位点, 完全不同于典型的底物和辅因子所占据的位

点。它结合 MTHFD2 变构位点,并与底物类似物共存。通过动力学研究表明,化合物 22 是一种非竞争性 MTHFD2 抑制剂,并且在结合时会观察到化合物 22 的构象变化,进而阻碍了辅因子和磷酸盐与 MTHFD2 的结合。

化合物 23、24^[41] 是一种黄嘌呤衍生物 MTHFD2 抑制剂,结构由 Raze Therapeutics 公司公开,其 IC_{50} 值分别为 4.0、0.69 $\mu\text{mol/L}$ 。对这些黄嘌呤衍生物进行结构修饰,探究其构-效关系(SAR)。采用基于骨架的分子设计^[42] 方法进行优化。以往的生化、酶学和结构研究表明,化合物结构中的谷氨酸片段在抑制 MTHFD 家族等酶发挥了重要的作用。因此,在黄嘌呤核心中引入谷氨酸片段并评估其抑制作用,并引入与谷氨酸结构相似的天冬氨酸到黄嘌呤核心骨架以探索 SAR。用 4-氨基苯甲酸取代化合物 23 的反式-4-氨基环己醇基团得到化合物 25(图 12),其对 MTHFD2 抑制活性降低($IC_{50}>10 \mu\text{mol/L}$)。天冬氨酸、谷氨酸与 4-氨基苯甲酸的羧基缩合得到化合物 26、22,其抑制活性相比于化合物 10 有显著提高(IC_{50} 值分别为 0.91 和 0.78 $\mu\text{mol/L}$),且都具有高度选择性,对 MTHFD1 均无抑制作用($IC_{50}>10 \mu\text{mol/L}$)。

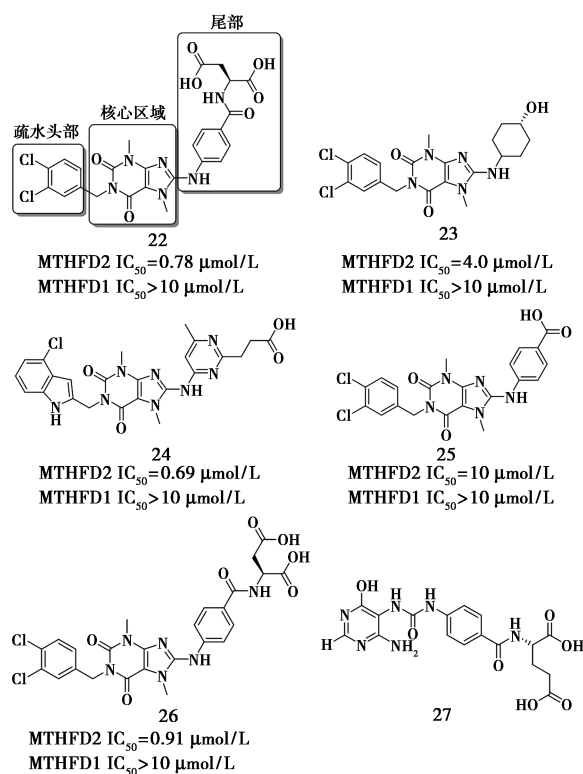
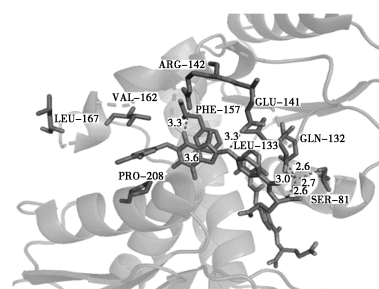


图 12 化合物 22~27 结构图

Fig.12 Structures of compounds 22~27

化合物 27(图 12)是一种叶酸类似物,具有较弱的 MTHFD2 抑制作用($IC_{50}=8.33 \mu\text{mol/L}$),并与底物结合位点结合。MTHFD2 与化合物 22 复合物晶体结构图显示(图 13),化合物 22 占据底物结合位点附近的口袋并与 26 共存。化合物 22 结合后观察到构象变化,这些变化随后阻碍了辅因子 NAD^+ 和磷酸盐与 MTHFD2 的结合。



PDB:7EHM

图 13 MTHFD2 与化合物 22 复合物晶体结构图

Fig.13 Crystal structure of MTHFD2 and compound 22 complex

化合物 22(图 12)由疏水头部(1,2-二氯苯)、核心区域(1,3,7-三甲基-3,7-二氢嘌呤-2,6-二酮)和尾部((4-氨基苯甲酰)-L-谷氨酸)组成。疏水头部延伸至二聚体界面的疏水口袋中。化合物 22 的疏水头部在该口袋内形成形状互补接触,与单体 A 中的 Val162、Pro208 和单体 B 中的 Leu167 发生疏水相互作用。核心区的 6-羰基与 Arg142 侧链形成氢键,靠近核心区的氨基与 Glu141 侧链形成氢键。核心的嘌呤部分也与 Phe157 形成广泛的 $\pi-\pi$ 相互作用。尾部由氨基苯甲酰部分与谷氨酸相连组成。尾部的苯甲酰部分与 Leu133 发生疏水相互作用。谷氨酸的 α -羧基与 Ser81、Gln132 的侧链和 Leu133 的主链形成广泛的氢键网络,并由水分子桥接。

在同源家族酶中,变构结合位点通常比底物结合位点更保守,因此变构抑制剂通常比非变构抑制剂更具有选择性,并且与更少的脱靶副作用相关^[43,44]。其次,变构抑制可以提供一种破坏性较小的方式来影响途径的功能,并可能克服耐药性问题,耐药性通常是由底物结合位点的突变引起的^[45,46]。综上所述,化合物 22 是第一个通过结构生物学研究,鉴定出靶向 MTHFD2 家族的变构抑制剂,虽然其活性相较于已报道的化合物 4 和化合物 11 等抑制剂较弱,但该研究结果有望对 MTHFD 蛋白家族的抑制机制研究有所帮助,并为

开发用于癌症治疗的新型 MTHFD 抑制剂提供新见解。

3 结论与展望

由于 MTHFD2 具有在肿瘤细胞中高表达、与肿瘤细胞生长及代谢增殖密切相关,对正常细胞毒性可能较低的特点,MTHFD2 酶被认为是一个可靠的抗肿瘤药物研究的新靶点,引起很多学者的浓厚兴趣。目前 MTHFD2 抑制剂开发仍处于进行时,化合物的优化空间较大,开发亲和力更强,选择性更好的化合物仍然是开发人员的重要工作。同时潜在适应症的选择,临床前验证体系的开发也是重要的研究方向。MTHFD2 新型抑制剂有望在肿瘤新药开发、克服药物潜在毒副作用方面取得好的成果,具有重要的理论和实践意义。

参考文献:

- [1] ZHU Z, LEUNG G K K. More than a metabolic enzyme: MTHFD2 as a novel target for anticancer therapy? [J]. *Front Oncol.*, 2020, **10**: 658.
- [2] SHANG M, YANG H, YANG R, et al. The folate cycle enzyme MTHFD2 induces cancer immune evasion through PD-L1 up-regulation [J]. *Nat. Commun.*, 2021, **12**(1): 1 940.
- [3] CUTHBERTSON C R, ARABZADA Z, BANKHEAD A, et al. A review of small-molecule inhibitors of one-carbon enzymes: SHMT2 and MTHFD2 in the spotlight [J]. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, 2021, **4**(2): 624-646.
- [4] RAMOS L, HENRIKSSON M, HELLEDAY T, et al. Targeting MTHFD2 to exploit cancer-specific metabolism and the DNA damage response [J]. *Cancer Res.*, 2024, **84**(1): 9-16.
- [5] ROLAND N, MOHIT J, NIKHIL M, et al. Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer [J]. *Nat. Commun.*, 2014, **5**(1): 3128.
- [6] FENG L, YANG L, CHUAN H, et al. Increased MTHFD2 expression is associated with poor prognosis in breast cancer [J]. *Tumour. Biol.*, 2014, **35**(9): 8 685-8 690.
- [7] JU H, LU Y, CHEN D, et al. Modulation of redox homeostasis by inhibition of MTHFD2 in colorectal cancer: Mechanisms and therapeutic implications [J]. *J. Nat. Cancer Inst.*, 2019, **111**(6): 584-596.
- [8] LIN H, HUANG B, WANG H, et al. MTHFD2 overexpression predicts poor prognosis in renal cell carcinoma and is associated with cell proliferation and vimentin-modulated migration and invasion [J]. *Cell Physiol. Biochem.*, 2018, **51**(2): 991-1 000.
- [9] LIU X, HUANG Y, JIANG C, et al. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 overexpression is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Dig. Liver. Dis.*, 2016, **48**(8): 953-960.
- [10] ANDREW A S, GUI J, SANDERSON A C, et al. Bladder cancer SNP panel predicts susceptibility and survival [J]. *Hum. Genet.*, 2009, **125**(5/6): 527-539.
- [11] PIKMAN Y, PUISSANT A, ALEXE G, et al. Targeting folate metabolism in acute myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 2013, **122**(21): 3 798.
- [12] MIYO M, KONNO M, COLVIN H, et al. The importance of mitochondrial folate enzymes in human colorectal cancer [J]. *Oncol. Rep.*, 2017, **37**(1): 417-425.
- [13] SHI L, ZHANG Q, SHOU X, et al. Expression and prognostic value identification of methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (MTHFD2) in brain low-grade glioma [J]. *Int. J. Gen. Med.*, 2021, **14**: 4 517-4 527.
- [14] SUGIURA A, ANDREJEVA G, VOSS K, et al. MTHFD2 is a metabolic checkpoint controlling effector and regulatory T cell fate and function [J]. *Immunity*, 2021, **55**(1): 65-81.
- [15] DUCKER G S, RABINOWITZ J D. One-carbon metabolism in health and disease [J]. *Cell Metab.*, 2017, **25**(1): 27-42.
- [16] JAIN M, NILSSON R, SHARMA S, et al. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation [J]. *Science*, 2012, **336**(6 084): 1 040-1 044.
- [17] LEE G Y, HAVERTY P M, LI L, et al. Comparative oncogenomics identifies PSMB4 and SHMT2 as potential cancer driver genes [J]. *Cancer Res.*, 2014, **74**(11): 3 114-3 126.
- [18] PIETRO E D, SIROIS J, TREMBLAY M L, et al. Mitochondrial NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase is essential for embryonic development [J]. *Mol. Cell Biol.*, 2002, **22**(12): 4 158-4 166.
- [19] COSTAS K, ROLAND N. Protein interaction and functional data indicate MTHFD2 involvement in RNA processing and translation [J]. *Cancer Metab.*, 2018, **6**(1): 12.
- [20] HUANG J, QIN Y, LIN C, et al. MTHFD2 facilitates breast cancer cell proliferation via the AKT signaling pathway [J]. *Exp. Ther. Med.*, 2021, **22**(1): 703.
- [21] LIN X, LIU S, PIAO C, et al. Non-metabolic function of MTHFD2 activates CDK2 in bladder cancer [J]. *Cancer Sci.*, 2021, **112**(12): 4 909-4 919.

- [22] LI Q, YANG F, SHI F, et al. MTHFD2 promotes ovarian cancer growth and metastasis via activation of the STAT3 signaling pathway[J]. *FEBS Open Bio.*, 2021, **11**(10): 2 845-2 857.
- [23] PIKMAN Y, PUISSANT A, ALEXE G, et al. Targeting MTHFD2 in acute myeloid leukemia[J]. *J. Exp. Med.*, 2016, **213**(7): 1 285-1 306.
- [24] YU C, YANG L, CAI M, et al. Down-regulation of MTHFD2 inhibits NSCLC progression by suppressing cycle-related genes[J]. *J. Cell Mol. Med.*, 2020, **24**(2): 1 568-1 577.
- [25] BEN-SAHRA I, HOXHAI G, RICOULT S J H, et al. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle[J]. *Science*, 2016, **351**(6 274): 728-733.
- [26] WAN X, WANG C, HUANG Z, et al. Cisplatin inhibits SIRT3-deacetylation MTHFD2 to disturb cellular redox balance in colorectal cancer cell[J]. *Cell Death. Dis.*, 2020, **11**(8): 649.
- [27] GREEN N H, GALVAN DBADAL S S, et al. MTHFD2 links RNA methylation to metabolic reprogramming in renal cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2019, **38**(34): 6 211-6 225.
- [28] YANG C, ZHANG J, LIAO M, et al. Folate-mediated one-carbon metabolism: A targeting strategy in cancer therapy[J]. *Drug Discov. Today*, 2020, **26**(3): 817-825.
- [29] 施洋峰, 应可净, 王利民. 一碳代谢酶 MTHFD2 在肿瘤中的研究进展[J]. *浙江医学*, 2022, **44**(15): 1 678-1 682.
- [30] GUSTAFSSON R, JEMTH A S, GUSTAFSSON N M S, et al. Crystal structure of the emerging cancer target MTHFD2 in complex with a substrate-based inhibitor[J]. *Cancer Res.*, 2017, **77**(4): 937-948.
- [31] BONAGAS N, GUSTAFSSON N M S, HENRIKSSON M, et al. Pharmacological targeting of MTHFD2 suppresses acute myeloid leukemia by inducing thymidine depletion and replication stress[J]. *Nat. Cancer.*, 2022, **3**(2): 156-172.
- [32] EADSFORTH T C, MALUF F V, HUNTER W N. Acinetobacter baumannii FolD ligand complexes-potent inhibitors of folate metabolism and a re-evaluation of the structure of LY374571[J]. *FEBS J.*, 2012, **279**(23): 4 350-4 360.
- [33] KAWAI J, OTA M, OHKI H, et al. Structure-based design and synthesis of an isozyme-selective MTHFD2 inhibitor with a tricyclic coumarin scaffold[J]. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2019, **10**(6): 893-898.
- [34] KAWAI J, TOKI T, OTA M, et al. Discovery of a potent, selective, and orally available MTHFD2 inhibitor (DS18561882) with in vivo antitumor activity[J]. *J. Med. Chem.*, 2019, **62**(22): 10 204-10 220.
- [35] JHA V, HOLMELIN F L, ERIKSSON L A. Binding analysis and structure-based design of tricyclic coumarin-derived MTHFD2 inhibitors as anticancer agents: Insights from computational modeling[J]. *ACS Omega*, 2023, **8**(16): 14 440-14 458.
- [36] CRAGG G M, NEWMAN D J. Natural products: A continuing source of novel drug leads[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1 830**(6): 3 670-3 695.
- [37] ZHAO W, CHEN K, LIU M, et al. Investigation of targets and anticancer mechanisms of covalently acting natural products by functional proteomics[J]. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2023, **44**(8): 1 701-1 711.
- [38] FU C, SIKANDAR A, DONNER J, et al. The natural product carolacton inhibits folate-dependent C1 metabolism by targeting FolD/MTHFD[J]. *Nat. Commun.*, 2017, **8**(1): 1 529.
- [39] BORYANA P, MAYNARD A G, WANG P, et al. Regulatory mechanisms of one-carbon metabolism enzymes[J]. *J. Biol. Chem.*, 2023, **299**(12): 105 457.
- [40] LEE L C, PENG Y H, CHANG H H, et al. Xanthine derivatives reveal an allosteric binding site in methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (MTHFD2)[J]. *J. Med. Chem.*, 2021, **64**(15): 11 288-11 301.
- [41] MAINOLFI N, MOYER M P, SAIH E, et al. Caffeine inhibitors of MTHFD2 and uses thereof: US2 023 067 237[P]. 2023-03-03.
- [42] LIM J, HWANG S Y, MOON S, et al. Scaffold-based molecular design with a graph generative model[J]. *Chem. Sci.*, 2019, **11**(4): 1 153-1 164.
- [43] CHENG X, JIANG H. Allostery in drug development[J]. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, **1 163**: 1-23.
- [44] 姚华良, 曾宪霞, 张洁, 等. 酪氨酸激酶 2 抑制剂的研究进展[J]. *化学试剂*, 2023, **45**(2): 43-53.
- [45] WANG J, WEI S, ZHAO T, et al. Approach in improving potency and selectivity of kinase inhibitors: Allosteric kinase inhibitors[J]. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 2021, **21**(8): 991-1 003.
- [46] LI L, LIU H, XING G, et al. Accurate calculation of absolute free energy of binding for SHP2 allosteric inhibitors using free energy perturbation[J]. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2022, **24**(17): 9 904-9 920.