

如:(1)虽然动物模型可以复制 ND 表型的某些行为和病理特征,但是目前还不能确定动物模型体内的凋亡信号转导通路与患者体内是否相同或相似。因为动物模型通常是通过急性损伤造成的,而进行性疾病中的神经元损失是长期暴露于致病因素导致的。(2)临床试验困难,时间长而且费用高。因为抗凋亡的药物不可能立即产生治疗效果,所以研究周期必须足够长,以保证治疗效果检测具有可靠性。另外,由于疾病发展速率的变异性和非线性,需要大量的患者和许多医疗中心参与。(3)生物标志物的重要性。使用不同类型的、合适的生物标志物可以极大地加速抗凋亡药物的开发。对于抗凋亡药物来说,理想的 I 型生物标志物应该是靶蛋白自身或凋亡标志物[如膜联蛋白 V(annexin V)],但是,目前这个领域的研究才刚刚开始。0 型和 II 型生物标志物目前也正在研究之中,特别是与 AD 和 PD 相关的标志物,包括蛋白和生化参数,但是目前所研究的各种

0 型标志物用于药物评价时效果均不甚理想。(4)存在的风险。目前有关抗凋亡药物的风险主要是理论性的,因为能够获得的实际治疗效果的信息非常有限。这些风险包括可能阻碍功能紊乱的细胞发生正常凋亡;阻碍凋亡后可能引起继发坏死,使炎性死亡加重。这些风险主要取决于具体药物的作用机制,但目前动物实验尚未表明存在这些风险。另外一个风险就是可能诱导或促进癌症的发生,因为在某些癌症中的确存在凋亡信号转导因子的调节紊乱,但是,目前对许多化合物进行的长期动物毒性实验同样表明其没有致癌性,尽管如此,仍然需要长期致癌性实验进一步确证。

总之,开发抗凋亡药物用于治疗 ND,是一个非常有前景的领域,尽管目前仍存在一定的困难和限制,但是一旦有药物开发成功,则意味着可以大大减少患者家庭与国家卫生保健费用的开支,同时也将大大提高患者的生存质量和尊严。

JAK/STAT 和激酶抑制剂:一组可能的新药

李 哲, 庞乐君编译

(军事医学科学院卫生勤务与医学情报研究所, 北京 100850)

摘要: JAK/STAT 通过蛋白质酪氨酸位点特异性磷酸化作用传递细胞因子信号。近几年,在癌细胞和转染癌基因的细胞中发现, JAK/STAT 的表达增高,并且发现它们与同种异体移植物的免疫排斥反应及自身免疫疾病的炎症形成过程有关。本文探讨了 JAK/STAT 和激酶抑制剂的筛选和理论设计策略。这些抑制剂有天然的也有合成的,同时也包括其他一些特殊的抑制剂或类似物,可用于不同的适应证。

关键词: Janus 酪氨酸激酶; 信号转导及转录活化蛋白; 激酶抑制剂

中图分类号: R979.1; R979.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)05-0281-04

Janus 酪氨酸激酶(JAK)是许多细胞因子、生长因子及干扰素的重要信号传感器。JAK 包含 7 个不同的结构域, JAK 同源区(JH1)为激酶区域,较近端的激酶类似区域为 JH2,其功能相当于负调控因子,另外还有 5 种 N 端结构域(JH3~JH7),主要参与受体结合。最初是在促红细胞生成素(EPO)介导的造血作用过程中鉴定出 JAK, EPO 用于治疗晚期肾性贫血已有很长一段历史,这暗示着 JAK 有可能参与髓细胞的活化和增殖。因此,抑制 JAK 激酶可能是治疗白血病的一种新方法。JAK 传递细胞外刺激物

经由相关受体产生的信号。受体和(或)JAK 通过识别靠近磷酸化位点的 SH2 区域选择性地活化信号转导及转录活化因子(STAT)蛋白。STAT 为胞质内游离的可溶性蛋白(77~80 ku),它通过磷酸化作用二聚化,随后转移到细胞核,在核内与 DNA 增强子区域结合转录细胞因子应答基因。

1 Src 同源区

Src 同源(SH)区域有激酶的磷酸化作用位点和 STAT 的停泊位点。酪氨酸激酶主要包括 SH1, SH2, SH3 和 SH4 区域。SH1 为激酶结构域, SH2 结构域

则用于结合磷酸酪氨酸(p-Y)残基,SH3区域参与和富含脯氨酸结构域间的相互作用,SH4区域是靠近N端的小区域,包含脂酰化作用信号。Src激酶,如磷酸激酶和Bruton酪氨酸激酶(BTK),有一个特殊结构域(UD)和一个SH4-UD-SH3-SH2-激酶结构域序列。蛋白酪氨酸磷酸酯酶的结构域序列主要是SH2-SH2-激酶。在JAK蛋白中,SH2位于JH2和埃兹蛋白、根蛋白、膜蛋白(FERM)之间,而在STAT中,SH2位于转录激活区(TAD)和C端的DNA结合区域之间。

2 JAK/STAT 协同作用

JAK家族包括JAK1, JAK2, JAK3, 酪氨酸激酶2(TYK2)及后续的信号复合物, STAT1 ~ STAT5, STAT5a, STAT5b 和 STAT6。它们的结构与功能相似,但是具有不同的基因图谱位点。STAT分布于不同的染色体和不同的基因图谱位点。与哺乳动物细胞受体大量的细胞因子及其超家族相比, JAK/STAT与不同的受体复合物相互协调。干扰素(IFN)- γ 信号通过JAK1和JAK2传播,而IFN- α 或IFN- β 通过JAK1和TYK2传播。JAK和STAT的结合在细胞调控中体现了经济与效率。JAK3主要在造血细胞中表达,并且是一个重要的药物靶标。

3 JAK/STAT 的负调控

细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)蛋白广泛分布于细胞因子-刺激细胞中。SOCS-1为JAK的负调控因子。白介素(IL)-6上调SOCS-1的表达,这使JAK/STAT的活性受到抑制。SOCS能有效抑制由各种癌基因引发的增殖信号或者其他异常信号。JAK/STAT通路的第二个抑制子是Bcl-6,它主要通过STAT6结合作为转录抑制物。第三个负调控点是假激酶, JAK蛋白的JH2结构域。蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)也可以对JAK/STAT进行负调控。例如,包含PTP1(SHP1, SHP2)和CD45的SH2结构域,以及被激活的STAT核蛋白抑制子(PIAS)。

4 JAK/STAT 的抑制机制

4.1 JAK/STAT 和淋巴细胞分化

JAK/STAT受体介导的激活导致胸腺或炎症位点中的T细胞分化。类似的模式, IL-4和IL-6影响Th2的优先转化,但是IL-12影响Th1的优先转化。另外, IL-6可以使单核细胞转化为巨噬细胞。在许

多类型的免疫和自身免疫疾病中,细胞因子的失调常常导致炎症反应。胰岛中过量的Th1(相对于Th2)常被认为是胰岛炎的前兆。一个有效的吡啶-嘧啶(PP)抑制剂PP1提高了来自卵白蛋白-特异T细胞受体(TCR)-转基因BALB/c小鼠脾细胞培养中IL-4的表达水平,降低IL-2和IFN的表达。PP1通过对Lck, Fyn或者Hck激酶的直接抑制而发挥作用,这些激酶参与TCR细胞信号转导和后续的T细胞活化。PP1在体外抑制JAK1激酶,但是它是细胞质内可溶性细胞因子Lck激酶更为有效的抑制子,在与抗原呈递细胞(APC)协同刺激T细胞活化的过程中, Lck激酶使细胞内的多组分区域磷酸化。因此, PP1及其同功异质体和具有相同活性的分子是自身免疫疾病的潜在治疗性药物。

4.2 JAK/STAT 和同种异体移植物的免疫排斥

T细胞在特定位点对同种异体移植物进行应答反应。淋巴细胞的应答反应被一系列受体和配体之间复杂的相互作用所调控。急性免疫物排斥反应由细胞因子(如IL-2)趋化。抗IL-2R α 单克隆抗体给药后引起的全信号转导阻滞,证明异型抗原的耐受性。但是, IL-10是高效的免疫抑制配体,影响T细胞、B细胞和APC的功能。通常情况下, IL-10下调免疫反应与IL-6通过JAK/STAT和各种SOCS分子下调免疫反应的模式相同。最近发现, 抗生素十一烷基灵菌红素族的一个变体, PNU156804, 在环孢素A抑制子的协同作用下可以延长移植物的寿命; 在西罗莫司(也称雷帕霉素)协同作用下, 通过JAK3靶标阻滞移植物排斥反应, 可以增加这种效应。此外, 单独应用FK778, 可通过抑制JAK3延长移植物的寿命。虽然已证明细胞因子和JAK参与免疫排斥反应, 但是抑制作用范围、特异靶标位点和单个JAK的具体作用还有待于进一步研究。

5 JAK/STAT 抑制剂和酪氨酸激酶

异常表达或活化激酶的准确抑制, 以及受体的拮抗作用, 可能为化疗的发展带来新的策略。通过随机选择性地排序筛选, 一些经过验证的JAK/STAT候选抑制剂进入下一阶段的研究。利用ELISA的高通量筛选(HTS)法和计算机筛选(VS)法已经用于鉴定候选抑制剂。ELISA和VS各有优缺点, 在药物开发的早期可以互为补充。

5.1 通过高通量筛选鉴定激酶的随机小分子抑制剂

目前,通过不同的 HTS 法已经发现许多 JAK/STAT 激酶的抑制剂。几个非选择性 JAK 激酶抑制剂已经通过 HTS 鉴定。AG490(tyrphostin B42)通过激酶测定得到验证,并且发现 0.5 和 $12.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IC_{50} 可以分别抑制 ErbB1 和 ErbB2 的自磷酸化作用。另外,AG490 及其类似物 A25 能抑制 JAK2 和 JAK3,从而阻滞下游类似底物例如 STAT1, STAT3, STAT5a 和 STAT5b。起初,AG490 被认为是特异性的 JAK2 激酶抑制剂,然而,实际上 AG490 在 D10 和 CTLL-2 T 细胞系中以剂量依赖模式通过抑制 JAK3 来进一步抑制 IL-2 诱导的 T 细胞增殖。二甲氧基喹唑啉衍生物 WHI-P154 和 WHI-P131 抑制 JAK3 而对 JAK1 和 JAK2 没有影响。有趣的是,WHI-P131 诱导表达 JAK3 的人白血病细胞系 NALM-6 的凋亡。基于细胞的分析表明,STI571 选择性地抑制慢性髓性白血病(CML)相关激酶。最近发现,STI571 对血小板衍生生长因子受体(PDGF-R)及 c-kit(一种受体酪氨酸激酶)的受体有抑制作用。目前,STI571 在临床试验中作为辅助治疗因子用于治疗非小细胞肺癌,因为它能抑制肺癌细胞的生长。AG490, PP1 及其类似物能抑制 JAK-STAT 通路,该通路参与人气管平滑肌细胞 PDGF 的刺激性增殖。

5.2 计算机筛选激酶小分子抑制剂的合理设计

高清晰度 3D 蛋白结构测定,是利用对接软件设计选择性和可逆性抑制剂的第一步。在通常情况下,该方法有利于对接的可逆性及抑制剂与酶或受体结合的高亲和性。内部协调技术(ICM)是 VS 中应用到的方法之一。这些方法使部分配体在对接过程中自动趋化到预定位置。此外,还产生多构型的受体和酶,它们可以利用小分子自由对接。刺激可以显示蛋白表面潜在的键合部位及其他交互作用属性。对接脚本放在网格框架下修饰易曲侧链,围绕后诱导装配。分子模型效用的一个典型例子是激酶抑制剂 GlivecTM。GlivecTM通过对 BCR-Abl 酪氨酸激酶的 ATP-竞争性抑制发挥作用,而它的化学结构设计依据 c-Abl 激酶区域的晶体结构及对接研究结果。它在体内有效阻止 CML,并且在临床试验中疗效显著。2001 年, GlivecTM 上市,成为第一个抑制蛋白激酶的药物。一些挑战也同样存在,例如,目前还未解决 JAK 的 3D 结构和个性区域(包括激酶区域),这对于缺失高分辨率结构情况下开展计算机辅助药物设计是一个实质性的挑战。

5.3 基于假底物肽抑制剂的药效基团的药物设计

除了常规理论药物设计方法外,基于假底物的肽抑制剂也开始用于药效基团图谱研究,这些研究将最终对抑制剂的设计带来影响。这样的理论设计是可行的,因为已经知道许多激酶序列,并且 ATP 结合区域是相对保守的。肽模拟策略较为困难,但是该方法有利于获取小分子药物设计的信息。SH2 区域在集合相关信号转导复合物中起到重要作用。阻滞或灭活基于 SH2 结构域的信号转导,这是开发治疗因子的有效策略。因为它们与激酶结合区域底物具有相似性,三肽和四肽是模拟底物与 SH2 结构域表面交互作用的最佳尺寸。Src 和 Lck 的 SH2 结构域肽抑制剂研究表明,这些区域明显偏好序列 pY EEIE。包含这个序列的短肽表现出对 Src 家族 SH2 结构域的高亲和性。有趣的是,迷迭香酸(RosA)显著抑制 Lck SH2-pY EEIE 的交互作用,已表明此过程中用到了 ELISA,说明 RosA 是 Lck SH2 结构域的抑制剂。当 RosA 添加一个带负电的氨基酸,如 Asp 或 Glu,可观察到抑制效应增加 3 倍。它的类似物也可以成为新的非磷酸 SH2 抑制剂。RosA 抑制 TCR 诱导的 Ca^{2+} 迁移及 IL-2 催化激活,但是对 12-十四烷酰佛波醇-13-乙酸酯(PMA)诱导的 IL-2 催化激活没有影响,这说明抑制作用发生在 TCR 信号转导的膜近端位点。

6 潜在治疗性激酶抑制剂的作用模式

所有激酶均具有某一结构的相似性。构象的灵活性或可塑性及与其他配体、受体之间的交互作用,使激酶抑制剂的设计变得更为复杂。这里重点介绍与 ATP-结合抑制有关的两个重要方面。

6.1 非 ATP 竞争性激酶抑制剂

在非 ATP 竞争性抑制中,抑制剂与激酶 ATP 结合裂口外环状或袋状结构结合。非 ATP 竞争性抑制使高选择性和高效性成为可能,因为这些抑制剂只与纳摩尔浓度的蛋白质底物竞争。小分子杂环 TDZD(thiadiazolidinones)是第一个糖原合酶激酶(GSK)-3 β 的非 ATP 竞争性抑制剂。在体外只需 IC_{50} 值达到纳摩尔范围,它们就可成为相对有效的抑制剂。目前,已知 GSK-3 β 参与多种细胞功能的调节。GSK-3 β 的结构包含一个环结合位点,用于启动磷酸化作用。这给开发非 ATP 竞争性抑制剂提供了机会。TDZD 已被用于治疗神经变性、2 型糖尿病等多种疾病。共结晶结构已揭示 PP1 结合于 Lck ATP 袋状结构上。然而,在分析中降低 ATP 浓度并

不提高 PP1 和 Src 激酶间的亲和性。Src, Hck 及 Lck 之间的同源性分析表明,三者结构在 ATP 键合部位外有显著区别,但在 ATP 结合结构域内则较为相似,这说明抑制剂是结合于 ATP 结合裂口外的。因为活化的 Src 是多数癌症的一个标记,了解 PP1 对活性 Src 的抑制机制将有助于选择性 Src 激酶抑制剂的发现。目前,已经存在几种 MEK-1 的 ATP 竞争性抑制剂,但是,最近 Serono 发现在 MEK-1 分析范围内,AS701173 的抑制活性不依赖于 ATP 浓度。同样,PP1 抑制 Lck 时为 ATP 竞争性的,但是,在抑制 pp60^{src}时却为非 ATP 竞争性的。筛选非 ATP 竞争性激酶抑制剂是一个特殊的挑战,因为分子结合机制目前还不清楚,这给合理设计带来一定困难。

6.2 ATP 竞争性激酶抑制物

与非 ATP 结合位点的序列变化相比,激酶的活性位点具有高度的保守性。关于底物的结合位点,酪氨酸激酶相对于丝氨酸/苏氨酸激酶具有更深的环和较小的相同区域。因此,大量的激酶抑制剂是基于妨碍底物结合的 ATP 竞争性抑制剂。它们相当于非选择性的 ATP 模拟分子或普遍存在的激酶抑制剂。ZM449829 是 ATP 竞争性 JAK3 抑制剂之一,它除了在一定程度上抑制酪氨酸激酶外,还可以抑制 T 细胞增殖。目前,还未有 JAK 激酶 ATP 结合

位点的结构信息。已经获得胰岛素受体激酶(IRK)和 BTK 等一些激酶的 ATP 结合位点结构信息。这些信息表明,一些重要的组分与活性状态构型有关,包括两裂片的闭合及 c-螺旋相对于 N 端裂片的位置。BTK 结构中的两裂片在 ATP 结合区域内采用关闭的构型。BTK 中 c-螺旋与活性位点的距离大于其在 IRK 三级复合物结构内的距离。

7 结语

JAK/STAT 抑制剂推动了作为抗癌、抗炎和抗移植植物排斥药物(酪氨酸激酶抑制剂)基础和临床研究的发展。目前,有几个酪氨酸激酶抑制剂已进入临床试验,但是还没有 JAK 激酶抑制剂进入临床试验的报道。一些有潜力的抑制剂,如 JAK3 抑制剂来氟米特(FK778)正处于临床前开发阶段。目前,用于 3D 结构分析的一种可选方案也为从基因组序列到直观知识的信息转换搭建平台,这可以在常规交叉性相关关系的基础上促进药物开发。抑制剂和靶标之间的结构和功能几乎没有相关性。这些相似的复合物不能通过相似的途径与靶标大分子相互作用。但是,人们期望当今快速发展的结构信息环境能为靶标蛋白结构的理论和试验性 3D 分析开创条件,这必将使药物设计变得更为轻松。

血小板糖蛋白 I b α 上血管性血友病因子结合域的研究进展

赵 莲, 苏 丽综述 王字玲审校
(军事医学科学院输血研究所, 北京 100850)

摘要:血小板糖蛋白(GP) I b-IX-V 复合物与其配体、血管性血友病因子(vWf)的结合是止血和血栓形成的始动环节。GP I b-IX-V 复合物的 vWf 结合域存在于 GP I b 的 α 亚单位的 N 端。至少有三个区域对 vWf 的结合有着重要的影响:富含亮氨酸重复序列、阴离子化的酪氨酸硫酸化序列和由 Cys209 和 Cys248 形成的二硫键环。了解 vWf 结合域对血小板代用品和抗血栓药的研究有着重要的意义,本文综述了此方面的研究进展。

关键词:血小板糖蛋白 I b-IX-V 复合物; 血小板糖蛋白 I b α ; 血管性血友病因子结合域

中图分类号:R331.1;Q71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0971(2004)05-0284-04

在血管受损处形成血栓防止血液流失是机体的重要保护机制,而病理条件下的血栓形成则是不稳定性心绞痛、急性心肌梗死和中风等疾病发生的基

础。血栓形成包括两个基本过程:血小板粘附于受损血管的内皮组织及血小板的聚集。血小板糖蛋白(glycoprotein, GP) I b-IX-V 复合物与内皮组织中的血管性血友病因子(von Willibrand factor, vWf)的相互作用是以上过程的始动环节。GP I b-IX-V 复合物

收稿日期:2004-02-24

基金项目:国家“863”基金资助项目(2001AA216051)