

mor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-Jun N-terminal kinase [J]. *Oncogene* , 2004 , [Epub ahead of print].

[12] Armeanu S , Lauer UM , Smirnow I , et al . Adenoviral gene transfer of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand overcomes an impaired response of hepatoma cells but causes severe apoptosis in primary human hepatocytes [J]. *Cancer Res* , 2003 , 63(10) 2369 – 2372 .

[13] Mundt B , Kuhnel F , Zender L , et al . Involvement of

TRAIL and its receptors in viral hepatitis [J]. *FASEB J* , 2003 , 17(1) 94 – 96 .

[14] Higuchi H , Yoon JH , Grambihler A , et al . Bile acids stimulate cFLIP phosphorylation enhancing TRAIL-mediated apoptosis [J]. *J Biol Chem* , 2003 , 278(1) 454 – 461 .

[15] Pettersen I , Figenschau Y , Olsen E , et al . Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human articular chondrocytes *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2002 , 296(3) 671 – 676 .

Bcl-2 蛋白的小分子抑制剂

李 杨编译

(军事医学科学院放射医学研究所 , 北京 100850)

摘要 : Bcl-2 蛋白家族在调节细胞凋亡中发挥重要作用 , 人类恶性肿瘤细胞高表达 Bcl-2 和 Bcl-XL , 而高表达这些抗凋亡分子的细胞对于化疗药物有抗性 , 因此 , 以 Bcl-2 家族蛋白为靶点的小分子抑制剂成为很有潜力的可用于多种肿瘤治疗的药物 , 通过下调 Bcl-2 和 Bcl-XL 的表达直接影响肿瘤细胞的存活及其对化疗药物的抗性。

关键词 : Bcl-2 ; 凋亡 ; 肿瘤 ; 抑制剂

中图分类号 : R979.1 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-0971(2005) 01-0010-04

凋亡是一种程序性细胞死亡 , 其在组织器官发育及维持机体内环境稳定中发挥重要作用。而细胞抗凋亡与某些疾病的发生相关 , 包括恶性肿瘤。细胞逃避凋亡存在多种机制 , 与肿瘤形成相关的主要是细胞过表达抗凋亡蛋白 Bcl-2。因此 , 阻断 Bcl-2 的活性发挥成为可能的肿瘤治疗措施。本文对一些 Bcl-2 抑制剂及其在肿瘤治疗中的应用作一综述。

1 凋亡的机制

凋亡有两种直接途径 , 一是线粒体调控途径 , 癌基因活化、DNA 损伤、低氧或生长因子缺乏等可导致该途径活化 , 在其活化过程中 , Bcl-2 被抑制 , 而 Bax 和 Bak 等凋亡效应分子释放 , 导致线粒体释放细胞色素 C , 激活 Apaf-1 , 进而激活半胱天冬酶 (caspase)-9 和 caspase-3 , 最终导致细胞形态学改变。该途径在大多数肿瘤发生过程中是不能被活化的 , 因而导致肿瘤细胞增殖活跃。肿瘤细胞逃避线粒体调控的凋亡机制主要是其过表达 Bcl-2 和 Bcl-XL , 也有一些肿瘤细胞过表达凋亡蛋白抑制剂 (IAP)。另一条途径是死亡受体途径 , 该途径的活化是通过胞

外配体与死亡受体结合 , 受体的活化导致 caspase-8 及 caspase-3 的活化而致细胞凋亡。在肿瘤发生过程中该途径的不能活化与前一途径相比较少发生。

2 凋亡抵抗肿瘤发生和化疗抵抗

细胞凋亡抵抗促进肿瘤发生 , 抗凋亡蛋白的过表达是肿瘤发生的最主要促进因素。肿瘤细胞不能通过凋亡而清除 , 其增殖不依赖于激素和生长因子、营养供给及细胞周期校正 , 并且对免疫攻击等有抵抗性 , 从而导致侵袭性疾病的发生发展 , 并且对药物诱导的凋亡也具有抵抗性。

许多抗肿瘤药物的作用机制为干扰 DNA 复制和细胞代谢 , 但由于其缺乏肿瘤细胞特异性 , 对于一些细胞增殖较快的正常组织 (如骨髓和肠道) 也有损伤 , 因而限制了药物的用量。此外 , 化疗药物的快速代谢及机体固有的或获得性的药物抵抗也限制了化疗药物效应的发挥。成功的肿瘤治疗应该既考虑到肿瘤类型 , 也考虑到药物的作用机制 , 并且在诱导肿瘤细胞凋亡的同时避免损伤正常细胞。化疗诱导凋亡的有效发挥依赖于细胞中凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的平衡 , 而 Bcl-2 和 Bcl-XL 的过表达与肿瘤细胞对化疗药物的抗性相关 , 因此 , 新的治疗措施应以过表

达 Bcl-2 的肿瘤细胞为靶点,直接诱导其凋亡。

3 Bcl-2 蛋白的小分子抑制剂

Bcl-2 同源结构域 3(Bcl-2 homology domain 3, BH3)与 Bcl-2 和 Bax 及 Bak 等相互作用相关,因此其成为药物设计的新靶点。小分子化合物可以模拟 BH3 结构域,易于进入细胞内,并有可能仅选择性地导致高表达 Bcl-2 的细胞死亡。BH3 结构域蛋白及小分子模拟物已经被成功地用于某些肿瘤的治疗。

Bcl-2 和 Bcl-XL 仅有 3 个氨基酸不同,但此不同使两者与 BH3 结合的静电力显著不同,据此,可以设计与 Bcl-2 和 Bcl-XL 都能结合的抑制剂,可用于两者均呈高表达的肿瘤的治疗,或者是优先与两者之一结合的抑制剂,用于只有其一呈高表达的肿瘤的治疗。此外,蛋白结合时所需发生的构象改变在设计药物时也必须考虑到,才能成功地通过干扰 BH3 介导的蛋白相互作用,从而削弱不同类型肿瘤的凋亡抵抗。

寻找可与靶蛋白高特异性的稳定结合的化合物,下述因素必须予以考虑:如相互作用区域的空间互补性、静电相互作用、氢结合,以及溶解动力学在稳定相互作用中的作用。化合物一旦被选择,还必须确定配体识别底物及与底物结合的能力。

4 Bcl-2 翻译的反义寡核苷酸抑制剂

反义寡核苷酸是化学合成并纯化的单链 DNA 序列,15~25 个碱基,与 mRNA 的特异靶序列互补,进入细胞后,与靶序列杂交,引起细胞 mRNA 的降解,进而导致靶蛋白翻译的减少。

Bcl-2 反义治疗已经用于淋巴瘤的治疗,部分有效,其副作用主要包括贫血、血小板减少症及局部皮肤感染,并且其对正常 B 细胞和 T 细胞等无影响。其他以 Bcl-XL 和 Bcl-2 mRNA 为靶点的反义寡核苷酸的应用也取得了一定效果。但是这种方法也存在明显缺陷,如体外实验的理想结果常不能在体内实验得到重复,并且不能保证反义寡核苷酸被输送至所有的肿瘤细胞,也没有确定其确实发挥抗肿瘤效应的方法。

5 Bcl-2 蛋白的小肽抑制剂

小肽已经被用于抑制蛋白之间的相互作用,包括抑制 Bcl-2 与凋亡蛋白形成异二聚体。应用仅包含某蛋白特定结构域的小肽优于完整蛋白。应用小

肽的最大问题是如何将其输送至肿瘤细胞、如何使其穿过细胞膜及如何定位并作用于胞内靶分子。

目前,所应用的设计合成肽的方法存在的问题是如何刺激体内环境使天然存在的蛋白被暴露,如活化后构象改变。在体内正常情况下,折叠的蛋白识别其配体需要发生构象改变。由于 BH3 结构域结构松散,在其与 Bcl-2 结合发生折叠时所需消耗的能量降低了其亲和力及效力。理想的合成配体应该具有较高的亲和力及特异性。

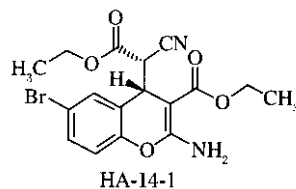
小肽抑制剂应用所存在的其他问题,包括不易口服、不稳定和(或)费用高。

6 Bcl-2 蛋白的有机小分子抑制剂

有机分子及其衍生物是 Bcl-2 和 Bcl-XL 的抑制剂开发的很有前途的资源。这些低分子量化合物($< 750 \text{ u}$),通常具有较高的膜通透性,更易于体内应用,比反义寡核苷酸和小肽具有更好的费用-效果比。

6.1 HA-14-1

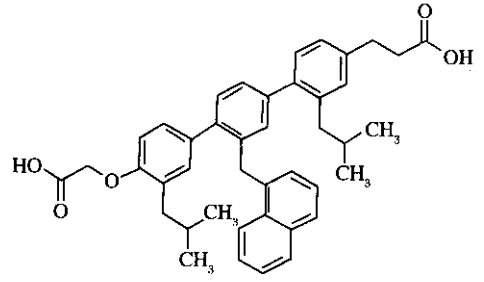
化合物 HA-14-1 可以直接与 Bcl-2 结合,抑制其与 Bak 的结合,在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时就可诱导 90% 的 HL-60 细胞凋亡,诱导细胞产生 caspase-9 和 caspase-3 活化聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)。但是,HA-14-1 对于高表达 caspase 抑制剂的肿瘤不是好的选择。HA-14-1 通过线粒体信号转导途径起作用。HA-14-1 诱导凋亡的机制提示其适于在联合治疗中应用,协作诱导凋亡。但 HA-14-1 与其他化疗药物联合应用时,应用方式不同(如用药的先后)有不同的效果,因此联合应用时必须很好地依据其各自不同的作用机制选择应用方式。对于不同肿瘤细胞或表达 Bcl-2 水平不同的细胞,应用 HA-14-1 诱导有效凋亡的浓度也不同,因此,HA-14-1 应用于患者时,其治疗剂量必须小心计算,以确保不超过安全浓度。



6.2 tetrocarcin A (TC-A)

TC-A 由放线菌产生,可抑制 Bcl-2 的功能。 $2.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TC-A 可以降低转染了 Bcl-2 的 HeLa 细胞的存活能力,引起细胞色素 C 的释放和线粒体跨膜电压降低。对于转染了 Bcl-XL 的 HeLa 细胞也有

相似的作用。TC-A 可以使细胞对各种死亡刺激因素(如 FAS 配体、TNF α 及 Bax 活化等)更敏感。有研究认为,TC-A 诱导凋亡其实是通过结合并活化凋亡蛋白而不是通过抑制 Bcl-2。最近发现,TC-A 可能是直接作用于线粒体,降低其跨膜电压,而不依赖于 Bcl-2 的过表达。TC-A 与其他细胞毒药物联合用于肿瘤治疗比其单独应用更有效。TC-A 的衍生物也正在研究之中。



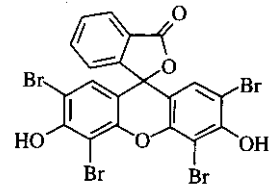
化合物 6

6.6 氯化白屈菜赤碱

氯化白屈菜赤碱通过抑制蛋白激酶 C 间接诱导细胞凋亡。最近,在对 10 万种植物提取化合物的高通量筛选中,氯化白屈菜赤碱被确定为 Bak 的 BH3 结构域与 Bcl-XL 相互作用的抑制剂。其对细胞的效果及体内应用是否能导致肿瘤生长延迟尚有待研究。

6.7 化合物 A5

化合物 A5 可以阻断 Bax 和 Bcl-XL 的相互作用,但是它也抑制了 Bax 的同源二聚体的形成,而后者是凋亡过程中的一个重要步骤。因此,需要研究化合物 A5 的类似物,检测其阻断 Bax 和 Bcl-XL 相互作用的能力,及其对 Bax 的同源二聚体的形成的影响,以期其能够成为高表达 Bcl-XL 肿瘤的有效治疗药物。



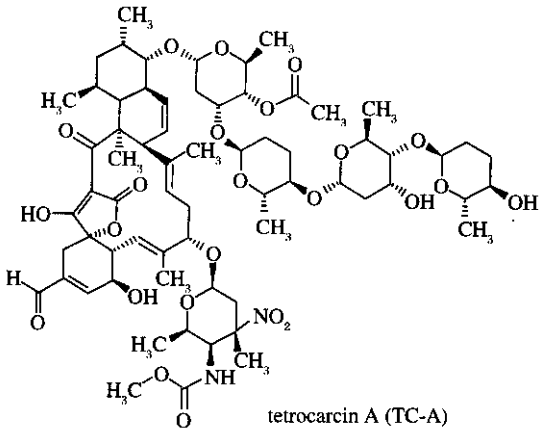
化合物 A5

7 BL-193 和 TW-37 的临床前试验

80% 以上的淋巴瘤过表达 Bcl-2/Bcl-XL,因此,非肽的、能进入细胞并可与 Bcl-2/Bcl-XL 的 BH3 结构域结合的小分子抑制剂也可用于淋巴瘤的治疗。离体和在体实验证明,小分子抑制剂棉酚(gossypol, BL-193)和 TW-37 具有抗肿瘤活性,两者可诱导淋巴瘤细胞凋亡,对外周血细胞无细胞毒性,在体对 WSU-DLCL₂ 淋巴瘤模型也有抑制肿瘤生长的作用, TW-37 比 BL-193 毒性小。两者单独或与细胞毒药物联合用于淋巴瘤病人的治疗还有待进一步研究。

8 小分子 Bcl-2 抑制剂作为抗肿瘤药物的潜力

小分子抑制剂在肿瘤治疗中的应用很有前景的原因之一是其与细胞毒药物和放射治疗的作用靶点



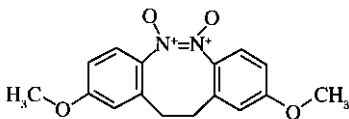
tetrocarcin A (TC-A)

6.3 抗霉素 A

抗霉素 A 可模拟不同凋亡蛋白的 BH3 结构域,它可与 Bak 的 BH3 结构域竞争结合 Bcl-2 和 Bcl-XL。抗霉素 A 用于高表达 caspase 抑制剂的肿瘤更有效。实验证明,其对于表达变异的 Bcl-XL 的肿瘤效果不好,并推测其对表达野生型 Bcl-2 的肿瘤比表达变异 Bcl-2 的肿瘤效果更好。抗霉素 A 的衍生物保留了对 Bcl-2 家族蛋白的抑制作用而无线粒体毒性。

6.4 化合物 4

实验证明,化合物 4 通过诱导细胞凋亡,显著抑制细胞的存活,其效应与 Bcl-2 的表达量相关,并具有 Bcl-2 特异性,提示化合物 4 可以单独或与细胞毒药物及放疗联合用于治疗。



化合物 4

6.5 化合物 6

化合物 6 以三联苯为骨架,带有模拟 Bak 螺旋外部疏水特性的取代基。该化合物可竞争性取代 Bak 蛋白的一段与 Bcl-XL 结合的肽链,并且其亲和力较高。关于该化合物抑制凋亡抵抗的有效性等还有待进一步研究。

和机制不同,因此其可与其他治疗措施联合应用,而不增加其毒性。Bcl-2小分子抑制剂应用的最大障碍是其作用于肿瘤细胞的特异性及亲和力尚需提高。目前,新方法已经被用于新的有效药物的发现。

9 发现和设计 Bcl-2 小分子抑制剂的技术

最常用的高通量的扫描方法是FP分析,该方法已经用于小分子肽、HA-14-1和化合物4等Bcl-2抑制剂的研究。该方法的缺陷是耗时多,并且假阳性太多。FP分析与虚拟的计算机扫描技术相结合可以弥补各自的缺陷。

最近应用的一项高通量的扫描技术为构-效关系(SAR),应用NMR数据将小分子抑制剂的结构与其抑制效应相联系,并确定底物结合域的拓扑学。SAR是进行发现性分析的一项有前景的技术。

10 除 Bcl-2 之外的其他蛋白靶点

对于一些类型的肿瘤,抑制除Bcl-2之外的其他蛋白可能是更有效的治疗方法。如不管Bcl-2是处于活化或抑制状态,caspase活化的抑制剂Smac或IAP可以使某些肿瘤细胞不发生凋亡,因此对于某些肿瘤细胞,需要同时抑制Bcl-2和caspase以诱导

其凋亡。对于以线粒体非依赖性凋亡途径发生凋亡的细胞,需要发现可以活化线粒体非依赖性凋亡途径中的蛋白的小分子,或抑制在阻断细胞死亡过程中发挥作用的蛋白。此外,在许多肿瘤细胞中,生长因子的过表达及其受体的活化促进细胞增殖、抑制凋亡并且对激素和细胞毒治疗抵抗。有研究应用ZD-1839通过抑制表皮生长因子(EGF)受体介导的存活途径及活化Akt发挥抗肿瘤活性。而针对PI₃K及Akt介导的存活途径,应用了非特异性酪氨酸抑制剂,但由于其副作用较多,尚需改进。Ras蛋白是另一个可能的治疗靶点。

11 结语

细胞的凋亡抵抗显著促进了肿瘤的发生并导致化疗抵抗。可以诱导肿瘤细胞凋亡并且不损伤局部或全身正常细胞的药物的应用对于肿瘤治疗是一个重要的贡献。实验资料证实,Bcl-2抑制剂尤其是小分子有机化合物的应用可以在多种肿瘤细胞中发挥促进凋亡的作用。尽管关于抑制Bcl-2和Bcl-XL的机制还有待进一步阐明,仍可望设计出更有效和特异性更高的Bcl-2的小分子抑制剂,单独或与其他细胞毒药物联合用于顽固性恶性肿瘤的治疗。

改善癌症治疗的单克隆抗体

黄世杰编译

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘要:单克隆抗体已成为治疗许多人类疾病包括癌症的药物。医药史上,没有足够数量又高特异靶向实体瘤的单克隆抗体的存在,已妨碍成为有效治疗药的障碍。本文着重报道在直接改善基于抗体的治疗药物的靶向和加强药物靶向肿瘤后的疗效的抗体工程学研究方面的新进展。

关键词:癌症;单克隆抗体;单链Fv;免疫治疗

中图分类号:R979.1 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2005)01-0013-03

与人类免疫系统相容,治疗性抗体的生产能力已得到改善,单克隆抗体已在肿瘤疾患治疗中起较大作用。到2002年12月,FDA已批准5个单克隆抗体用于治疗癌症,另有10多个单克隆抗体处于临床后期试验阶段。FDA批准的治疗非何杰金淋巴瘤的利妥昔单抗(rituximab)又批准用于血癌。曲妥珠单抗(trastuzumab)批准用于治疗转移性乳腺癌,也是

唯一批准用于实体瘤的抗体治疗药物。制造靶向肿瘤有足够数量和特异性的单克隆抗体是很困难的。抗体工程学通过构建分子较小,多价抗体的方法改善了药物对肿瘤的穿透性。新近研究集中于解决药物的靶向性和增强药物靶向后的疗效。

1 改善药物对肿瘤的靶向性

抗体工程学的发展已促进许多新的具有独特生理性质和药代动力学特性的抗体组分的开发。