

# 细胞因子小分子模拟物研究进展

刘卫京, 吕秋军\*

(军事医学科学院放射医学研究所药理毒理研究室, 北京 100850)

关键词: 细胞因子; 小分子模拟物

中图分类号: R967; R966

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2000)11 - 0874 - 05

细胞因子通过与靶细胞表面特定受体相互作用, 在细胞间及细胞与环境之间扮演传递信息的重要角色。细胞因子在许多重要的生物过程(如调控细胞和体液免疫反应、血细胞生成作用、炎症反应、伤口愈合和细胞程序性死亡)中起关键作用。已有许多细胞因子作为药物用于临床, 如促红细胞生成素(EPO)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、促血小板生成素(TPO)、白细胞介素-11(IL-11)和干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )等。但是, 所有这些蛋白药物有共同的缺点, 即它们在体内不稳定, 易被蛋白水解酶分解, 不能口服, 必须通过 sc, im 或 iv 等方式进入体内。因而, 发现细胞因子小分子模拟物, 特别是有机小分子模拟物作为可供口服的药物是非常有意义的。近年来, 国外对多种细胞因子小分子模拟物的研究较多, 有报道小肽<sup>[1,2]</sup>, 甚至有机小分子<sup>[3,4]</sup>能与细胞因子受体结合并诱导受体形成同源二聚体, 激活相应的信号转导途径, 产生与细胞因子活性相似的体内、外作用。本实验室建立了一系列基于细胞的靶向细胞因子信号转导通路中转录因子的筛药模型, 对多种来源的大量化合物(库存已知结构化合物、微生物发酵产物和海洋生物)进行筛选, 期望得到细胞因子有机小分子模拟物<sup>[5]</sup>。本文以国外有关论文为基础, 结合本实验室的工作, 进行分析、归纳和整理, 综述了激活细胞因子受体的小分子激动剂和阻断细胞因子与其受体或信号转导途径下游部分相互作用的小分子拮抗剂的作用机制, 讨论细胞因子受体的激活与阻断机制, 为发现与优化先导化合物提供可行的方案, 为我国细胞因子小分子模拟物的研究提供参考。

## 1 细胞因子受体激动剂

1.1 配体诱导的受体链二聚体化 配体(L)诱导的受体(R)链寡聚化是许多细胞因子受体激活的发生机制<sup>[6]</sup>。该机制中配体通过以下两步激活受体, 第一步, 配体与受体链细胞外部分结合形成一个二元复合物(R·L); 第二步, 与第二个受体链结合形成一个三元复合物(R·L·R)。三元复合物可诱导蛋白激酶与受体链细胞质部分非共价结合进而激活下游信号分子, 将信号转导到细胞内部。具有上述激活机制的受体包括: 同源二聚体 I 类受体, 如促红细胞生成素受体(EPO-R)<sup>[7]</sup>、粒细胞集落刺激因子受体(G-CSF-R)<sup>[8]</sup>、促血小板生成素受体(TPO-R)<sup>[9,10]</sup>、生长激素受体(GH-R)<sup>[11]</sup>等; 寡聚体细胞因子受体, 包括异源二聚体受体白介素-4受体(IL-4-R)<sup>[12]</sup>、白介素-2受体(IL-2-R)<sup>[13]</sup>和干扰素- $\gamma$ 受体(IFN- $\gamma$ -R)<sup>[14]</sup>等; 其他结构类型受体, 酪氨酸激酶和丝氨酸/苏氨酸激酶生长因子受体如表皮生长因子受体(EGF-R)和转化生长因子- $\beta$ 受体(TGF- $\beta$ -R)<sup>[15]</sup>。由此推论, 大多数细胞因子受体由配体诱导的寡聚化机制激活<sup>[15]</sup>。但在关系密切的受体超家族成员中也存在一些例外或重要的机制变化<sup>[16,17]</sup>。

1.2 细胞因子受体小分子激动剂的特点 细胞因子受体小分子激动剂必须有<sup>[6]</sup>(1)合理的亲和力能够结合到其中一个受体链上;(2)处于需要与第二个受体链接触的趋势;(3)对第二个受体链有足够的亲和力, 明显有利于受体的二聚体状态, 进而转变至受体二聚体平衡状态;(4)受体二聚体的产生使受体链之间有相对的趋向性, 导致受体细胞质区和与其相联系的信号分子产生相互作用;(5)激活的受体有缓慢的解离速度, 使激活受体复合物的存在时间超过有效信号发生所需时间的界限。

1.3 细胞因子受体与其激动剂的量效关系及钟形剂量反应曲线 在细胞的功能检测中钟形剂量反应

收稿日期: 2000-01-17

作者简介: 刘卫京, 女, 硕士研究生。

吕秋军, 男, 副研究员。

\* 联系人 Tel: (010) 66932201, E-mail: luqj@nic.bmi.ac.cn

曲线是配体诱导的同源二聚体受体激活的显著特征<sup>[7]</sup>。在同源二聚体受体系统中,当受体通过结合激动剂分子诱导受体二聚体化时,无论受体是被小分子激动剂、靶向受体细胞外区域的单克隆抗体还是天然细胞因子激活,都会出现高浓度配体抑制受体激活的现象,其他相关的激活机制也表现钟形剂量反应曲线。因为,当 $[L]$ (配体浓度)非常高时,每一个受体分子都被配体所占据,只有很少量的 $R \cdot L \cdot R$ 三元复合物形成, $R \cdot L \cdot R$ 复合物形成的直接后果是受体激活和信号转导,因而在依赖 $R \cdot L \cdot R$ 复合物形成的功能检测中, $[L]$ 非常高时受体激活水平却很低,受体被高浓度的配体抑制。通过实验观察整体钟形剂量反应曲线非常困难。如果这种抑制只在配体浓度非常高的情况下发生,可以判定这一配体是典型的具有高潜在活性的激动剂。

Perelson 和 DeLisi<sup>[18]</sup>用数学方法处理配体诱导的受体二聚体化机制,根据该方程可计算 $[R \cdot L \cdot R]$ 随 $[L]$ 的变化趋势(严格地讲,不对称平衡激动剂如 hGH 需要一两个因子作统计学校正)。在基于细胞的实验系统中应用这些数学方法非常复杂,依赖 $R \cdot L \cdot R$ 复合物形成的功能反应可能是非线性的,但这不影响应用这一功能数据模型得出大量关于激动剂配体结合特性的结论。因而,这一功能数据模型的适用范围广泛。

Perelson 和 DeLisi 的方程预示钟形剂量反应曲线中点的浓度应等于 $K_1$ (配体与第一受体链结合的亲和力)。配体与受体的最初结合以及在极高浓度时配体发生自身拮抗都是由 $K_1$ 决定,因而在 $[L] = K_1$ 时,以上作用达到平衡且 $[R \cdot L \cdot R]$ 最大,钟形剂量反应曲线围绕 $K_1$ 保持对称性,即 $K_1$ 为剂量反应曲线中点。例如,在基于细胞的功能检测中,配体在钟形剂量反应曲线中点的浓度为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右意味着配体与第一受体链结合的 $K_D$ (解离常数)约为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在依赖 $R \cdot L \cdot R$ 复合物形成的功能检测实验中, $IC_{50}$ 与 $EC_{50}$ 的比率代表 $[R \cdot L \cdot R]$ 达到最高值一半的剂量反应曲线的范围( $IC_{50}$ 为产生自身抑制后 $R \cdot L \cdot R$ 浓度达到最高值 50%时的 $L$ 浓度, $EC_{50}$ 为 $R \cdot L \cdot R$ 浓度达到最高值 50%时的 $L$ 浓度),这一比率可在有关检测中衡量激动剂的剂量范围(EDR)。EDR 还与细胞膜上受体密度有关<sup>[12]</sup>。细胞膜受体总浓度( $[R]_T$ )远远大于 $K_2$ (内在亲和力即 $R \cdot L$ 与 $R$ 结合的亲和力)时, $R \cdot L$ 与 $R$ 结合的亲和力高。内在亲和力大与细胞膜上受体密度高均有助于观察到范

围较宽的剂量反应曲线。因 $R \cdot L \cdot R$ 在热力学上越稳定,形成 $R \cdot L \cdot R$ 所需配体浓度越低,通过自身抑制干扰 $R \cdot L \cdot R$ 形成所需配体的浓度也越高,实验可观察到范围非常宽的剂量反应曲线。

钟形剂量反应曲线的最大值,是衡量激动剂诱导 $R \cdot L \cdot R$ 复合物形成和受体激活效率的另一方法。当 $[R]_T$ (细胞膜受体总浓度)相对于 $K_2$ 较高时,即使在剂量反应曲线的中点处, $R \cdot L$ 与 $R$ 的亲合力足以诱导大多数受体二聚体化。例如,当 $[L] = K_1$ 时,约 80%受体分子二聚体化, $[R]_T/K_2$ 等于 80。即使 $R \cdot L$ 与 $R$ 有非常强的结合力,如果 $R \cdot L \cdot R$ 复合物的几何形状使受体链处于与产生有效信号不相对应的方向,那么检测到的反应也会很低或无,这类情况可以通过分析剂量反应曲线形状得到线索。

通过分析 Perelson 和 DeLisi 的方程可以得出结论,钟形剂量效应曲线能够有效地用于具有激动剂活性的小分子先导化合物的发现和设计,并且使这些化合物性能得以优化,至少达到或接近天然细胞因子活性的水平。

1.4 已报道的肽类及非肽类细胞因子小分子激动剂 细胞因子有机小分子模拟物 SB24746(图 1a),是一个多苯环化合物,分子量约为 500 u,能够激活 $\mu\text{G-CSF-R}^{[3]}$ 及其信号转导通路,这一小分子是用基于 $\mu\text{G-CSF}$ 依赖细胞的报告基因检测法从化合物库中筛选得到。SB24746 的一个明显特征是在多种基于细胞的功能检测中表现出钟形剂量反应曲线<sup>[3,19]</sup>,该分子有双倍旋光对称性,已知 $\text{G-CSF-R}$ 激活后会发生二聚体化,因而 SB24746 是通过与受体形成 1:2 复合物激活 $\text{G-CSF-R}$ 。实验表明,SB24746 最大程度激活受体所需的浓度高于 $\mu\text{G-CSF}$ 最大程度激活受体所需的浓度。此外,在一些检测中 SB24746 的活性较 $\mu\text{G-CSF}$ 低数倍,说明这一有机小分子结构尚需优化。为了有效地进行分子结构优化,需深入研究配体分子和靶受体相关作用的定量关系及其在依赖于 $R \cdot L \cdot R$ 复合物形成的功能检测中观察到的钟形剂量反应曲线。

20 个残基的环状肽 EMP-1(图 1c)能够模拟 EPO 在体内、外的一些生物学活性<sup>[20]</sup>,可使 EPO-R 同源二聚体化,与 EPO-R 形成 2:2 复合物。小肽 AFI3948(图 1d)能够激活 TPO-R,进而激活其信号转导通路<sup>[21]</sup>。同 EMP-1 一样,该小分子以共价二聚体形式识别受体,AFI3948 在配体功能检测反应中所能达到的最大效应值和 $EC_{50}$ 与 TPO 的相同,表明 AFI3948 同 TPO 一样可有效激活受体同源二

聚体化。因此理论上以上两个小分子在功能检测实验中均应表现出钟形剂量反应曲线的特征。

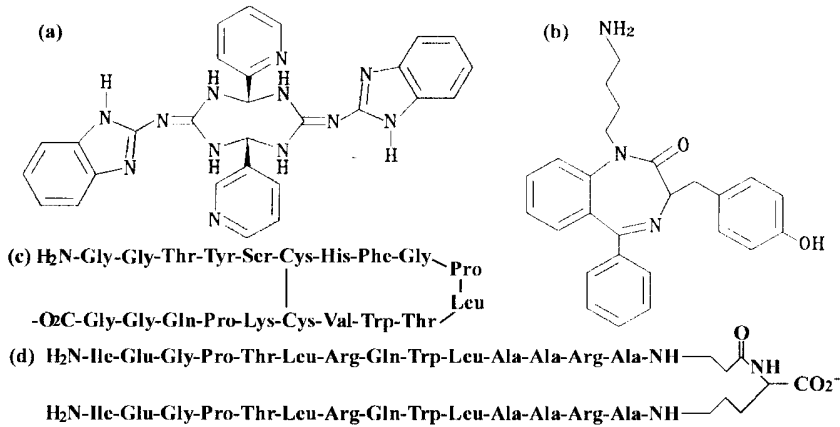


Fig 1 Structures of SB24746 (a), TM41 (b), EMP-1 (c) and AF13948 (d)

有机小分子 TM41 (图 1b) 是用竞争结合 ELISA 法筛选得到的, 它可抑制 TPO 与  $c$ -MPL (细胞因子受体超家族成员) 结合, 能刺激 TPO-R 依赖细胞株的增殖并激活转录因子 STAT5<sup>[4]</sup>, 在功能检测实验中 TM41 表现出了钟形剂量反应曲线的特征, 但曲线的具体数据和 EDR 未明确。

通过以上分析可知由于自身拮抗的发生, 许多配体不能有效激活受体, 须比较不同激动剂对相同受体的钟形剂量反应曲线的形状及曲线的重要参数, 使小分子结构得以优化, 以获得性能较好的小分子激动剂。

## 2 细胞因子受体拮抗剂

2.1 细胞因子受体小分子拮抗剂的特征<sup>[6]</sup> 应具备以下特征: (1) 与第一受体链有高亲和力, 结合并占据受体; (2) 没有足够的亲和力结合第二个受体链; (3) 阻碍细胞因子与天然配体结合, 从而抑制受体的二聚体化与激活。用细胞因子定点突变的方法已得到了具有以上特性的肽类小分子<sup>[22]</sup>。

2.2 细胞因子受体小分子拮抗剂的筛选 已用许多常规方法对一些细胞因子受体进行筛选却难以发现小分子拮抗剂。这一现象表明细胞因子受体具有多个配体结合位点, 发现能够结合受体并阻断细胞因子与受体链结合的小分子拮抗剂非常困难。依据前面论述, 有两种方法筛选靶向细胞因子受体的拮抗剂。一是建立特异地阻断受体二聚体化的筛选方法<sup>[6]</sup>。该法与典型的竞争结合 ELISA 法不同, 例如在功能性检测中高浓度细胞因子活性被小分子所抑制, 可知该分子是通过直接与细胞因子竞争结合受体, 阻断受体二聚体化, 进而阻断受体激活, 这有助于筛选出阻断细胞因子与受体最初结合的小分子。选

择基于细胞的受体竞争结合法<sup>[6]</sup>, 可检测到小分子拮抗剂的存在。将标记的细胞因子浓度设定于  $K_1$  至  $EC_{50}$  之间, 如果有细胞因子拮抗物存在, 将阻断细胞因子与其受体结合。二是发现能同时结合两个受体链的小分子作为发展小分子拮抗剂的研究方向, 这类分子象激动剂一样, 对受体有强亲和力, 可使两受体链排列, 但其空间方位不利于受体链产生激活信号, 而阻断细胞因子信号转导通路。

2.3 已报道的细胞因子小分子拮抗剂 基于 TNF 与受体复合物晶体结构和抗 TNF $\alpha$  单抗模型的原子特征, 利用计算机分子模型设计程序 Quanta 4.0 设计和合成了与 TNFR 的 3 个关键结合位点对应的的外环小分子模拟肽。外环小分子模拟肽 YCWSQYL CY 在受体结合实验中  $IC_{50}$  等于  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 功能上能有效抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 诱导的细胞凋亡和细胞毒作用<sup>[23]</sup>。

基于 IL-1 配体 X 射线晶体结构和定点突变得到的不连续的结合决定部位的三维结构, 以 2,4-二羟基苯甲醛为模板, 利用 BioCad CATALYST 程序设计产生化合物, 在受体结合实验中其  $IC_{50}$  等于  $89 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 通过化合物结构优化, 获得一小分子模拟物, 它能有效抑制 IL-1 $\alpha$  与 I 型受体结合, 在受体结合实验中  $IC_{50}$  等于  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 为 IL-1 R 的小分子拮抗剂<sup>[24]</sup>。

## 3 具有细胞因子样活性化合物的筛选与设计

根据结构类型不同, 小分子模拟物可分为肽类小分子模拟物和非肽类有机小分子模拟物。根据模拟天然配体的机理不同尚可分为 3 种类型<sup>[25,26]</sup>。I 型为肽类模拟物, 模拟配体主要结构; II 型为非肽类

功能模拟物,能与受体结合并模拟配体功能,但不必模拟原配体结构;III型为非肽类结构模拟物,能够模拟原配体与受体相互作用的关键结合位点的骨架结构。

通过分析细胞因子小分子模拟物的结构特点、作用机理及其与细胞因子受体的量效关系,可建立以下方法获得细胞因子样活性化合物。

(1) 药物筛选是获得细胞因子样活性化合物的有效方法。用基于细胞因子信号转导通路中转录调节因子的报告基因检测法建立筛药模型从化合物库或天然产物中进行筛选,有可能发现细胞因子小分子模拟物<sup>[3]</sup>。本实验室建立了靶向细胞因子受体信号转导通路中转录因子(STATs)的筛药模型,并利用这些模型试图从多种来源的化合物中筛选具有细胞因子样活性的先导化合物。用基于细胞因子受体的竞争结合检测法也可筛选出细胞因子小分子模拟物<sup>[4]</sup>。此外,一种非细胞的、非同位素的高通量检测方法<sup>[27]</sup>(由可溶性受体与固定化配体组成的筛选方法)亦可用于小分子模拟物的筛选,该方法可弥补基于细胞筛选的缺陷,如限制有机溶剂最大浓度、干扰细胞膜物质存在、同位素问题等,但不足之处是许多筛选出的化合物无生物学作用。高通量筛选、基因芯片等技术的应用也为化合物筛选提供了广阔的空间。

(2) 可以通过药物设计产生细胞因子样活性先导化合物。①基于生物大分子靶标三维结构知识,通过计算机辅助药物设计软件模拟药物、受体相互作用,将配体对接受体的结合部位去,根据生物大分子结构进行新配体的设计与合成。②利用分子的三维特征,在三维结构数据库中进行三维结构搜索,是发现先导化合物的快捷而有效的方法。③利用计算机全程药物自动化设计程序,基于特定靶标的结合位点,通过分子生长得出具有新结构的分子。近几年发展起来的组合化学技术也为发现和优化先导化合物提供了高效率的方法<sup>[28]</sup>。

随着高通量筛选的应用,计算机辅助药物设计以及生物信息学的发展,特别是人类基因组计划为人们提供了更多的治疗靶标,预计未来研究和开发细胞因子小分子模拟物作为新的治疗药物将会有更加广阔的前景。

## REFERENCES:

[1] Cwirla SE, Dower WJ. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine

- [J]. *Science*, 1997, **276**(5319):1696 - 1699.
- [2] Kimura T, Kaburaki H, Miyamoto S, *et al.* Discovery of novel thrombopoietin mimic agonist peptide [J]. *J Biochem*, 1997, **122**(5):1046 - 1051.
- [3] Tian SS, Rosen J. A small nonpeptidyl mimic of granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Science*, 1998, **281**(5374):257 - 259.
- [4] Kimura T, Kaburaki H, Tsujino T, *et al.* A non-peptide compound which can mimic the effect of thrombopoietin via c-Mpl [J]. *FEBS Lett*, 1998, **428**(3):250 - 254.
- [5] Lu QJ, Sun Z, Wen LQ, *et al.* Cell-based transcriptional assay for the discovery of small molecule cytokine mimetics [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 2000, **35**(Suppl):92 - 93.
- [6] Whitty A, W Borysenko Ch. Small molecule cytokine mimetics [J]. *Chem Biol*, 1999, **6**(4):R107 - R118.
- [7] Schneider H, Giebel LB. Homodimerization of erythropoietin receptor by a bivalent monoclonal antibody triggers cell proliferation and differentiation of erythroid precursors [J]. *Blood*, 1997, **89**(2):473 - 482.
- [8] Young DC, Zhan H, Cheng QL, *et al.* Characterization of the receptor binding determinants of granulocyte colony stimulating factor [J]. *Protein Sci*, 1997, **6**(6):1228 - 1236.
- [9] Abe M, Masuho Y. Surrogate thrombopoietin [J]. *Immunol Lett*, 1998, **61**(2):73 - 78.
- [10] Deng B, Avraham H. An agonist murine monoclonal antibody to the human c-Mpl receptor stimulates megakaryocytopoiesis [J]. *Blood*, 1998, **92**(6):1981 - 1988.
- [11] Wells JA, de Vos AM. Hematopoietic receptor complexes [J]. *Annu Rev Biochem*, 1996, **65**:609 - 634.
- [12] Whitty A, Burkly LC. Interaction affinity between cytokine receptor components on the cell surface [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(22):13165 - 13170.
- [13] Nakamura Y, Leonard WJ. Heterodimerization of the IL-2 receptor  $\beta$  and  $\gamma$  chain cytoplasmic domain is required for signalling [J]. *Nature*, 1994, **369**(6478):330 - 333.
- [14] Walter MR, Narula SK. Crystal structure of a complex between interferon  $\gamma$  and its soluble high-affinity receptor [J]. *Nature*, 1995, **376**(6537):230 - 235.
- [15] Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction [J]. *Cell*, 1995, **80**(2):213 - 223.
- [16] Woodcock JM, McClure BJ, Stomski FC, *et al.* The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor exists as a preformed receptor complex that can be activated by GM-CSF, interleukin-3, or interleukin-5 [J]. *Blood*, 1997, **90**(8):3005 - 3017.
- [17] Karpusas M, Whitty A, Runkel L, *et al.* The structure of human interferon  $\beta$ : implications for activity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1998, **54**(11):1203 - 1216.

- [18] Perelson AS, DeLisi C. Receptor clustering on a cell surface. 1. Theory of receptor cross-linking by ligands bearing two chemically identical functional groups [ J ]. *Math Biosci* , 1980 ,**48**(1) :71 - 110 .
- [19] Miller SG. Identification of small molecule mimics of cytokines using reporter based screens in mammalian cells [ C ]. *4th Annual Conference of the Society for Biomolecular Screening* , New Jersey , USA , 1998 .61 - 73 .
- [20] Livnah O, Wilson IA. Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å [ J ]. *Science* , 1996 ,**273**(5274) :464 - 471 .
- [21] Kimura T, Kaburaki H, Tsujino T, *et al.* Signal transduction by the peptide which mimics the activity of thrombopoietin [ J ]. *Biochem Mol Biol Int* , 1998 ,**44** (6) :1203 - 1216 .
- [22] Fuh G, Gunningham BC, Fukunaga R, *et al.* Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor [ J ]. *Science* , 1992 ,**256**(5064) :1677 - 1680 .
- [23] Takasaki W, Kajino Y, Kajino K, *et al.* Structure-based design and characterization of exocyclic peptidomimetics that inhibit TNF $\alpha$  binding to its receptor [ J ]. *Biotechnology* , 1997 ,**15**(12) :1266 - 1270 .
- [24] Sarabu R, Cooper JP, Cook CM, *et al.* Design and synthesis of small molecule interleukin-1 receptor antagonists based on a benzene template [ J ]. *Drug Design Discov* , 1997 ,**15**(3) :191 - 198 .
- [25] Freidinger RM. Nonpeptidic ligands for peptide and protein receptors [ J ]. *Curr Opin Chem Biol* , 1999 ,**3** (4) :395 - 406 .
- [26] Ripka AS, Rich DH. Peptidomimetic design [ J ]. *Curr Opin Chem Biol* , 1998 ,**2**(5) :441 - 452 .
- [27] Sarubbi S, Yanofsky SD, Barrett RW, *et al.* A cell-free, nonisotopic, high-throughput assay for inhibitors of type-1 interleukin-1 receptor [ J ]. *Anal Biochem* , 1996 ,**237**(1) :70 - 75 .
- [28] Kirkpatrick DL, Watson S, Ulhaq S. Structure-based drug design: combinatorial chemistry and molecular modeling [ J ]. *Comb Chem High Throu Screening* , 1999 ,**2**(4) :211 - 221 .

## PROGRESS IN STUDIES ON SMALL MOLECULE CYTOKINE MIMETICS

LIU Weijing, LU Qirjun

( Beijing Institute of Radiation Medicine , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100850 , China )

**KEY WORDS:** cytokine ; small molecule mimetic