

· 综 述 ·

驱动蛋白 Eg5 抑制剂在肿瘤研究中的进展*

罗兴燕¹, 张 梅², 刘 进¹综述, 舒 茂^{1△}审校

(1. 重庆理工大学药学与生物工程学院 400054; 2. 重庆医药工业研究院有限责任公司 400600)

关键词: 肿瘤; 驱动蛋白 Eg5; Eg5 抑制剂

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.26.038

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)26-3172-03

有丝分裂双极纺锤体是癌症化学疗法中一个已证实的药物靶点, 如紫杉烷和长春碱等作用于微管抑制纺锤体形成, 在临床上是一类很成功的抗肿瘤药物。但微管在细胞的高尔基体、突触小泡等细胞器的转运具有重要作用, 对轴突微管也有抑制影响。因此, 作用于微管的抗增殖药物具有不可逆转的神经毒性, 长期使用这类药物会使肿瘤产生抗药性^[1]。寻找有丝分裂纺锤体的其他靶点是目前开发新的抗肿瘤药物的重要途径。纺锤体驱动蛋白家族是纺锤体形成的重要蛋白, 已成为近年来靶向抗癌化学疗法的新靶点^[2]。驱动蛋白在有丝分裂的纺锤体形成、细胞分裂和增殖中发挥关键作用。驱动蛋白家族有 650 个成员, 被分为 14 类亚家族, 主要有细胞分离和蛋白转运两大类主要功能。Eg5 是纺锤体形成中的重要蛋白, 在不发生细胞分裂的细胞中没有表达。因此, Eg5 抑制剂在神经细胞中没有毒性作用, 不具有抗微管药物的作用^[3]。近年来已经成为抗癌药物的研究热点, 本文就 Eg5 参与肿瘤的机制及其抑制剂研究现状综述如下。

1 Eg5 结构和功能

Eg5 也称 KIF11, 是驱动蛋白家族 5 中 BimC 的同源四聚物, 属于 N 型驱动蛋白。Eg5 共有 1 057 个氨基酸残基, 主要有 3 个结构域: N 端的启动区、卷曲螺旋结构的茎干区和 C 端尾巴区。启动区前有 20 个氨基酸残基, 开始于 β_1 折叠结构的 Val21, 终止于 RAK 模序 R6 结构上的 Lys357。Asn358-Pro363 是连接启动区和中间卷曲结构 (Glu364-Val523, Cys684-Lys716, Gln782-Arg826) 的连接子 (linker)。Eg5 的 C 末端区域 (Tyr829-Leu1057) 包含一个 p34cd2 磷酸化位点, 在体内 Thr927 是 p34cd2 蛋白激酶一个主要的磷酸化位点^[4]。Eg5 的二级结构主要由 β 片层和 α 螺旋结构组成^[5]。

Eg5 四聚体形成两两二聚体相互交叉, 棒状末端反向平行在微管上滑动产生外向的力。N-末端驱动蛋白沿着微管 (MTs) 滑动, 主要功能是在中心体分离组装形成双极纺锤体时, 提供一个正向牵力, 并防止双极性纺锤体在染色体分离后期之前崩解^[6]。因此, Eg5 常被人熟知的功能就是形成纺锤体, 参与有丝分裂。研究者通过 RNAi 干扰技术、Eg5 抗体中和及小分子抑制剂抑制 Eg5 均可以阻滞肿瘤细胞在有丝分裂中期, 随后导致细胞死亡^[2]。Bartoli 等^[7]最近研究提出 Eg5 同时可以参与多肽的合成, 其小分子抑制剂可能会影响细胞有丝分裂间期的蛋白合成^[8]。但是目前主流的观点还是集中在 Eg5 对细胞有丝分裂中期的影响, 其中最具有意义的就是抑制剂和 Eg5 作用形成 Monoastral 纺锤体^[9]。Monoastral 纺锤体最初是 Mayer 等学者在 1999 年发现化合物 Monastrol 与 Eg5 形成复合物导致有丝分裂中止, 纺锤体中止在有丝分裂中期的特征结构定义。Monastrol 是第一个发现的 Eg5 蛋白特异性

小分子化合物抑制剂, 主要是与 Eg5 结合后通过构象改变抑制二磷酸腺苷 (ADP) 从 Eg5 中的释放, 是一类三磷酸腺苷 (ATP) 的非竞争性抑制剂^[10]。Kaan 等学者用 Eg5 与 S-三苯甲基-L-半胱氨酸 (S-trityl-L-cysteine, STLC) 结合的晶体复合物 0.2 nm 分辨率来研究抑制剂与 Eg5 结合方式, 抑制剂与 Eg5 结合后使 Eg5 构象改变, 导致 ADP 不能从 Eg5 中释放形成 Monoastral 纺锤体^[5]。

Eg5 与有丝分裂密切相关, 有研究证明了 Eg5 在肿瘤中表达失调, 与肿瘤的发生、发展相关。Nowichi 等^[11]就利用基因芯片分析中发现 Eg5 在慢性粒细胞性白血病中高表达。南开大学的生命科学遗传细胞实验室发现在胰腺癌细胞中 Eg5 也高表达, 导致细胞快速增殖^[12]。这些研究都为 Eg5 可以作为一个潜在的抗肿瘤药物靶点提供了依据, 使 Eg5 的抑制剂开发成为了近年来的热门研究。

2 Eg5 抑制剂

随着 Monastrol 的发现和报道, 寻找 Eg5 新的抑制剂成为许多医药公司和研究者研究开发抗肿瘤药物的热点, Eg5 抑制剂筛选多是基于化合物的高通量筛选和已知化合物的结构改造, 结合多学科的发展如计算机、生物信息学、生物化学、医学等来完成, 抑制剂的种类和数量不断地被研究扩展。如 2004 年发表的 STLC 化合物, 其发现过程是 Debonis 从 NCI 数据库最开始筛选到 2 869 个小分子化合物用于测试他们抑制微管-Eg5 中的 ATP 酶活性, 结果有 154 个化合物具有抑制 Eg5 的 ATP 酶活性, 154 中有 15 个化合物的孔雀绿测试中抑制结果为阳性, 其中, 5 个化合物抑制 HeLa 细胞, 使有丝分裂中止。STLC 是其中活性最好, 能抑制 Eg5 能使纺锤体形成 Monoastral 纺锤体^[13]。STLC 发现后, Debonis 又利用计算机药物设计软件和化学合成对 STLC 结构优化得到了一系列活性更好的化合物, STLC 的抗癌活性在膀胱癌, 前列腺癌等体外实验研究中得到了验证^[3,14]。

参与 Eg5 抑制剂的研究中包含了一些大型的医药公司和研究单位, 由于这些科研工作者的不断努力, 近 10 多年的时间越来越多的 Eg5 抑制剂和研究方法被研究报道, 其中, 活性好的化合物已经进入了临床研究^[13,15-19], 如 Ispinesib、AZD4877 化合物已经进入 I / II 期临床研究。

2.1 Ispinesib/SB-715992 Ispinesib/SB-715992 是属于嘧啶酮类化合物由 GlaxoSmithKline 和 Cytokinetics 公司开发, Ispinesib 的作用机制与 Monastrol 抑制方式相同, 均通过结合 Eg5 形成 Monoastral 纺锤体, 中止细胞有丝分裂, 但比 Monastrol 具有更好的活性, 是第一个进入肿瘤临床试验的驱动蛋白 Eg5 ATP 酶的变构的小分子抑制剂^[20]。在临床前研究中, Ispinesib 抑制人类和小鼠细胞系的 IC₅₀ 为 1.2~9.5 μ M, 在

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31170747); 重庆理工大学研究生创新基金资助项目 (YCX2011205)。 作者简介: 罗兴燕 (1987~), 硕士在读, 主要从事药物设计方面的研究。 △ 通讯作者, Tel: 13114074855; E-mail: sm7507@126.com。

体外用 20 μM 的 Ispinesib 作用于 SKOV3 卵巢癌细胞可导致有丝分裂中止。对裸鼠移植瘤模型,如结肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌,腹腔注射 Ispinesib 30 mg/kg,均发现肿瘤的生长延迟。2003 年 Glaxo Smith Kline 公司进入非小细胞肺癌 II 期临床研究,至今 Ispinesib 有 16 个项目进入了临床 I/II 研究,随后多个研究机构进行多种肿瘤的临床研究,所有的研究中没有明显的药物毒性产生,剂量限制性毒性(DLT)表现为中性粒细胞减少,没有观察到明显的神经毒性^[21-22]。但是在恶性黑色素瘤、头颈部肿瘤、前列腺癌、肝癌 II 期临床研究中作用效果不好,可能原因是由于在动物移植瘤中瘤细胞分裂占大部分而人肿瘤分裂相对少,药物的半衰期短,作用于靶点位置的时间不够,造成在人的肿瘤中效果不佳^[23]。临床研究中的 14 个项目已经完成,其中,2 个还在继续研究。

2.2 AZD4877 AZD4877 由 Astra Zeneca 研究开发,也属于嘧啶酮类化合物。AZD4877 是从一系列新颖的驱动蛋白纺锤体蛋白(KSP)抑制剂筛选出的抑制 Eg5 活性的化合物,兼具优异的生化性质和药物特性的适合于临床开发的 Eg5-ATP 酶的变构的小分子抑制剂^[24]。AZD4877 研究对很多来源于实体瘤和血液瘤的细胞株都有抑制作用^[16]。裸鼠移植瘤模型的原发性膀胱肿瘤模型、利妥昔单抗不敏感非霍奇金淋巴瘤模型(DoHH2T53)中,在 AZD4877 剂量的耐受范围,25 mg/kg 可以检测到 Monoastral 纺锤体,这些均为 AZD4877 临床研究提供了依据。AZD4877 在西方和日本实体瘤患者的 I 期临床研究都有很好的耐受性和安全性,但是并没有观察到高的抗癌活性^[17]。目前进入临床的 6 个项目都因为 AZD4877 在 II 期临床研究中没有作用而中止研究^[16-17,25]。

2.3 SB-743921/ARRY-520 嘧啶酮类化合物 Ispinesib 和 AZD4877 在多种肿瘤 II 期临床研究结果显示效果不好,抗肿瘤活性不高。第二代嘧啶酮类化合物 SB-743921 与前 2 种化合物相比,它的临床前研究结果显示活性更好,在 Holen 报道的 SB-743921 的药代动力学和生物学效应得到令人满意结果,推荐 II 期临床研究的剂量为 4 mg/m²,每天静脉滴注 1 h 并持续 21 d。以 Ispinesib 结构改造的 Eg5 抑制剂还有 ARRY-520 等多个嘧啶酮类化合物衍生物,也进入了临床研究,目前,还没有临床数据报道,他们的活性比 Ispinesib 更高^[26]。

2.4 MK-0731 二氢吡啶类、二氢吡咯类化合物是 Merck 公司研究实验进行高通量筛选和结构改造合成的一批具有良好活性的 Eg5 抑制性的化合物,其作用机制与 Monoastral 一样,与 Eg5 结合后通过构象改变抑制 ADP 从 Eg5 中的释放,也属于一类 ATP 的非竞争性抑制剂^[27]。其中,化合物 MK-0731 是优化改造后具有良好的化学特性和生物特性,在体内外表现出低毒性和好的药代动力学性质。化合物能抑制对紫杉醇药物依赖的肿瘤生长。临床前实验研究表现出良好的最大剂量耐受,不良反应小,安全性好,MK-0731 在实体瘤的 I 期临床实验中并没有观察到明显的肿瘤减小^[28]。

虽然 Eg5 抑制剂在临床前研究结果取得好的进展,但是在临床中的研究的结果大多数都是不尽人意,进入人体的安全性好但是基本也没有活性。通过上面几种化合物的分析研究,临床前期在动物模型有药物作用,但在临床研究中患者的体内没有作用,可能原因在动物模型中进行有丝分裂的肿瘤细胞的比例比肿瘤患者的肿瘤细胞比例高,抑制剂作用患者时间不足以造成肿瘤细胞有丝分裂中止,抑制剂作用的肿瘤细胞株不敏感等,造成在动物模型中的效果好。这也需要研究者的继续研究来突破这些缺点。

3 Eg5 研究趋势

Monoastral 是第一个被发现的 Eg5 驱动蛋白抑制剂,与

Eg5 结合形成 Monoastral 纺锤体后使有丝分裂中止造成细胞凋亡后死亡。Eg5 在稳定的细胞中不表达,不对神经细胞造成毒性,克服了目前抗微管肿瘤药物造成的不良反应和耐药性。因此,Eg5 成为了热门研究靶点,国内外大型医药公司和顶尖实验室都努力寻找最优的 Eg5 抑制剂并希望开发新一代抗癌药物,用以克服现在抗微管药物出现的不良反应,其中,一些化合物已进入了临床试验抗癌研究阶段。至今有 30 多种化合物进入了临床研究,但是没有一种化合物成为药物上市。这些化合物虽然不良反应小,但因在体内抗癌药物活性不高而没有继续被研究。Eg5 抑制剂开发面临着几个问题:Eg5 抑制剂对什么类型肿瘤敏感?在体内如何提高药物和肿瘤作用时间来中止有丝分裂?目前研究显示,Eg5 抑制剂单一疗法效果不佳,联合用药虽然有研究报道,但没有发现协同作用。

Eg5 是一个很吸引人的药物靶点,但其药物抑制剂要用于抗癌药物治疗仍需要研究人员的不懈努力。现阶段亟待解决的主要问题是:Eg5 的研究应走向何方;如何开发新的筛选方法寻找新的 Eg5 抑制剂;如何建立高通量筛选方法为抑制剂快速找到敏感的肿瘤株;如何同现有的肿瘤抑制剂联合用药,以发挥不同的药物作用以及改变药物的剂型以提高在体内的时间,在 Eg5 中寻找新的抑制方式,发现新的抑制剂。还有,Eg5 属于驱动蛋白的一个大家族,找寻其他的驱动蛋白靶标也成为现在抗肿瘤药物发展的新方向。

参考文献:

- [1] Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(3): 194-204.
- [2] Wood KW, Cornwell WD, Jackson JR. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2001, 1(4): 370-377.
- [3] Kaan HY, Weiss J, Menger D, et al. Structure-activity relationship and multidrug resistance study of new S-trityl-L-cysteine derivatives as inhibitors of Eg5[J]. *J Med Chem*, 2011, 54(6): 1576-1586.
- [4] DeBonis S, Simorre JP, Crevel I, et al. Interaction of the mitotic inhibitor monastrol with human kinesin Eg5[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(2): 338-349.
- [5] Kaan HY, Ulaganathan V, Hackney DD, et al. An allosteric transition trapped in an intermediate state of a new kinesin-inhibitor complex[J]. *Biochem J*, 2010, 425(1): 55-60.
- [6] Nakai R, Iida S, Takahashi T, et al. K858, a novel inhibitor of mitotic kinesin Eg5 and antitumor agent, induces cell death in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(9): 3901-3909.
- [7] Bartoli KM, Jakovljevic J, Woolford JL, et al. Kinesin molecular motor Eg5 functions during polypeptide synthesis[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(18): 3420-3430.
- [8] Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function[J]. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(9): 467-476.
- [9] Kwok BH, Yang JG, Kapoor TM. The rate of bipolar spindle assembly depends on the microtubule-gliding velocity of the mitotic kinesin Eg5[J]. *Curr Biol*, 2004, 14(19): 1783-1788.
- [10] Maliga Z, Kapoor TM, Mitchison TJ. Evidence that

- monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5[J]. *Chem Biol*, 2002, 9(9): 989-996.
- [11] Nowicki MO, Pawlowski P, Fischer T, et al. Chronic myelogenous leukemia molecular signature [J]. *Oncogene*, 2003, 22(25): 3952-3963.
- [12] Liu M, Wang X, Yang Y, et al. Ectopic expression of the microtubule-dependent motor protein Eg5 promotes pancreatic tumorigenesis [J]. *J Pathol*, 2010, 221(2): 221-228.
- [13] DeBonis S, Skoufias DA, Lebeau L, et al. In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimetabolic and antitumor activities [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(9): 1079-1090.
- [14] Debonis S, Skoufias DA, Indorato RL, et al. Structure-activity relationship of S-trityl-L-cysteine analogues as inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(5): 1115-1125.
- [15] Kantarjian HM, Padmanabhan S, Stock W, et al. Phase I/II multicenter study to assess the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD4877 in patients with refractory acute myeloid leukemia [J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(3): 1107-1115.
- [16] Infante JR, Kurzrock R, Spratlin J, et al. A Phase I study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of AZD4877, an intravenous Eg5 inhibitor in patients with advanced solid tumors [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(1): 165-172.
- [17] Esaki T, Seto T, Ariyama H, et al. Phase I Study to Assess the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of AZD4877 in Japanese Patients with Solid Tumors [J]. *Arch Drug Inf*, 2011, 4(2): 23-31.
- [18] Luo X, Shu M, Wang Y, et al. 3D-QSAR studies of dihydropyrazole and dihydropyrrole derivatives as inhibitors of human mitotic kinesin Eg5 based on molecular docking [J]. *Molecules*, 2012, 17(2): 2015-2029.
- [19] Jiang C, Yang L, Wu WT, et al. De novo design, synthesis and biological evaluation of 1, 4-dihydroquinolin-4-ones and 1, 2, 3, 4-tetrahydroquinazolin-4-ones as potent kinesin spindle protein (KSP) inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19(18): 5612-5627.
- [20] Lad L, Luo L, Carson JD, et al. Mechanism of inhibition of human KSP by ispinesib [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(11): 3576-3585.
- [21] Purcell JW, Davis J, Reddy M, et al. Activity of the kinesin spindle protein inhibitor ispinesib (SB-715992) in models of breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(2): 566-576.
- [22] Burris HA, Jones SF, Williams DD, et al. A phase I study of ispinesib, a kinesin spindle protein inhibitor, administered weekly for three consecutive weeks of a 28-day cycle in patients with solid tumors [J]. *Invest New Drugs*, 2011, 29(3): 467-472.
- [23] Knox JJ, Gill S, Synold TW, et al. A phase II and pharmacokinetic study of SB-715992, in patients with metastatic hepatocellular carcinoma: a study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG IND. 168) [J]. *Invest New Drugs*, 2008, 26(3): 265-272.
- [24] Theoclitou ME, Aquila B, Block MH, et al. Discovery of (+)-N-(3-aminopropyl)-N-[1-(5-benzyl-3-methyl-4-oxo-1,2-thiazolo[5,4-d]pyrimidin-6-yl)-2-methylpropyl]-4-methylbenzamide (AZD4877), a kinesin spindle protein inhibitor and potential anticancer agent [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(19): 6734-6750.
- [25] Gerecitano JF, Stephenson JJ, Lewis NL, et al. A Phase I trial of the kinesin spindle protein (Eg5) inhibitor AZD4877 in patients with solid and lymphoid malignancies [J]. *Invest New Drugs*, 2013, 31(2): 355-362.
- [26] Rath O, Kozielski F. Kinesins and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(8): 527-539.
- [27] Cox CD, Coleman PJ, Breslin MJ, et al. Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors 9: Discovery of (2S)-4-(2,5-difluorophenyl)-N-[(3R, 4S)-3-fluoro-1-methylpiperidin-4-yl]-2-(hydroxymethyl)-N-methyl-2-phenyl-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxamide (MK-0731) for the treatment of taxane-refractory cancer [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(14): 4239-4252.
- [28] Holen K, Paola R, Liu G, et al. A phase I trial of MK-0731, a kinesin spindle protein (KSP) inhibitor, in patients with solid tumors [J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(3): 1088-1095.

(收稿日期: 2013-01-08 修回日期: 2013-03-22)

• 综 述 •

细菌疫苗的发展历史及研究现状

傅国平 综述, 张雪梅[△] 审校

(重庆医科大学临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室 400016)

关键词: 疫苗; 细菌; 综述

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.26.039

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)26-3174-04

细菌感染性疾病是一类严重危害人类健康的疾病, 目前,

临床上用于治疗细菌感染性疾病的药物主要为抗菌药物, 但抗