

·综述·

以调控 Ras 信号传导为靶标的抗肿瘤药物研究进展

朱一婧, 姜凤超*

(华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030)

摘要: Ras 信号转导途径与肿瘤发生和生长密切相关, 针对此信号通路重要靶点的药物设计是当前抗肿瘤药物研究的热点。本文综述了 Ras 蛋白及与其上下游信号转导途径相关的靶点及其抑制剂的研究现状, 为新型抗肿瘤药物的研究设计提供参考依据。

关键字: Ras 蛋白; 信号转导途径; 抗肿瘤药物

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2009)01-0001-10

Progress in the study of antitumor drug targeting on the Ras signaling pathway

ZHU Yi-jing, JIANG Feng-chao*

(School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Ras signaling pathway is closely related to the formation and growth of tumor. Currently, targeting on this signaling pathway is a hot research point for the design and development of anticancer drugs. In this paper, Ras protein as well as its related targets and inhibitors in signaling pathway were reviewed. It is expected to give research-related reference materials for the design of new anticancer drugs.

Key words: Ras protein; signaling transduction pathway; anticancer drug

近年来, 抗肿瘤药物研究已由传统的细胞毒药物针对肿瘤发生、发展多个环节相关信号转导通路、促进肿瘤细胞快速分化、恢复正常调节机制等方面发展。信号转导通路是细胞对外界刺激作出必要反应的途径, 与肿瘤的发生、发展过程密切相关, 选择性的阻断肿瘤细胞信号转导通路, 破坏其自控性生长调节机制, 已成为极具吸引力的抗肿瘤药物研究热点。本文仅就与Ras蛋白信号转导通路相关的靶点及其在抗肿瘤药物研究中的作用予以介绍。

1 Ras蛋白与肿瘤的关系

研究发现, 大约30%的人类肿瘤均存在Ras基因的突变激活及Ras蛋白表达水平增高的现象, 因此, 调控Ras信号转导途径在以细胞信号转导通路为靶点的抗肿瘤药物设计中起着重要作用。Ras基因家族有三个成员: Ha-Ras、Ki-Ras和N-Ras。成员的生化 and 结构特性非常接近, 前166个氨基酸是维持Ras的功能

所必需的, 羧基末端的四个氨基酸均由CAAX构成(C为半胱氨酸, A为脂肪族氨基酸, X为任意氨基酸)^[1]。

Ras蛋白可以认为是调节细胞生长和增殖的信号通路的重要元件, 是控制外来分子信号的分子开关。Ras蛋白的晶体结构表明它以GDP结合和GTP结合两种形式存在, 当Ras蛋白与GTP结合(Ras-GTP), 形成活化状态(开), 与GDP结合(Ras-GDP), 为失活状态(关), 这种“开关”分别由GTP酶活化蛋白(GTPase activating protein, GAP)和鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)两种调节蛋白决定^[2]。GEF作用于Ras-GDP将Ras蛋白游离出来, Ras再与GTP结合从而将其激活; 存在于正常细胞中的GAP, 主要作用是激活Ras蛋白的GTP酶, 从而将结合在Ras蛋白上的GTP水解成GDP, 成为失活型的蛋白, 见图1^[3]。若Ras蛋白持续处于活化状态, 可与下游的效应蛋白结合, 将信号传递到下游信号元件, 可能引起细胞的异常增殖, 导致肿瘤的发

收稿日期: 2008-08-09.

*通讯作者 Tel: 86-27-83692749, E-mail: fengchao@mails.tjmu.edu.cn

生。Ras 蛋白能被复杂的网络激活,其下游的级联途径同样复杂,对肿瘤的发生发展起重要作用。所以了解 Ras 蛋白的信号通路有助于寻找新的抗癌药物作用靶点。

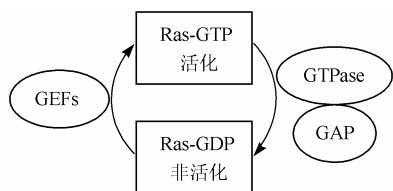


图1 Ras 蛋白复合物的形成与信号传导

2 Ras 蛋白信号转导通路

2.1 Ras 蛋白的上游信号

Ras 蛋白是RTK信号的一个主要汇聚点,由于Ras的活化受GEF和GAP调控,因此任何影响Ras-GEF、Ras-GAP或它们之间平衡的因素均可调控Ras活性^[3]。

2.1.1 联合蛋白Grb-2 生长因子受体-联结蛋白2(Grb-2)在蛋白酪氨酸激酶信号途径中起重要作用,此蛋白由单一的SH2区域及其两侧的SH3区域组成。SH2区域可与一系列磷酸化的酪氨酸激酶受体结合,并且通过SH3区域与其下游靶标鸟苷酸交换因子SOS结合并定位于细胞膜,法尼基化的Ras蛋白也定位于细胞膜上,SOS接近Ras,使Ras蛋白转化为活化状态而引起细胞的增生与分化^[4]。

2.1.2 细胞生长因子受体酪氨酸激酶 绝大多数细胞生长因子,如DGF、FGF、HGF、IGF、PDGF、VEGF等,通过与细胞膜上相应的酪氨酸激酶受体结合,促使受体形成二聚体并激活膜内区的酪氨酸激酶,使得受体自身发生酪氨酸磷酸化,然后与Grb2的SH2区域结合,引发一系列活化Ras蛋白途径。如表皮生长因子受体酪氨酸激酶EGFR,具有一个细胞外配体结合域、一个跨膜域及一个与酪氨酸激酶结合的胞内域,在多数实体瘤中都有表达或高表达。

2.1.3 非受体酪氨酸激酶 这组受体家族,能诱导类似受体酪氨酸激酶反应,但又没有内源性催化活性。募集非受体酪氨酸激酶和接下来的酪氨酸磷酸化通常是形成信号转导复合物的第一步。在肿瘤中非受体酪氨酸激酶常被激活,主要是通过突变,基因重排形成融合蛋白等方式使其处于持续活化状态,从而激活下游信号途径如Ras/MAPK、PI3K/Akt途径,促进细胞增殖,抵抗细胞凋亡^[1]。

2.1.4 其他与 Ras 活化有关的蛋白 接头蛋白 SHC (src homologous and collagen) 可介导 Grb-2 与受体之

间的相互作用;许多非受体蛋白发生酪氨酸磷酸化后也能作为 Grb-2 的锚定位点;许多细胞因子、趋化因子和整合素受体等均可通过上述途径激活 Ras^[1]。

2.2 Ras 的下游信号靶标

活化的 Ras 能结合和激活一系列的效应酶,通过下游的效应因子介导多种生物学功能,调控细胞增殖、生存等细胞应答。

2.2.1 Raf 蛋白激酶家族 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Raf 是目前研究最完善的 Ras 效应因子。Ras 蛋白上含直接结合并激活 Raf 的位点,Ras-GTP 活化形式与 Raf 结合后可使 Raf 重新定位于细胞膜,并引发有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)途径的级联放大作用,从而调控细胞周期进程。

2.2.2 I 型磷脂酰激醇-3 激酶 (Type I PI3K) 家族 活化的 Ras 能直接结合并激活 PI3K 的 p110 催化亚基,PI3K 活化后将 PtdIns (4, 5) P₂ 转化生成第二信使 PtdIns (3, 4, 5) P₃, 然后通过 Rac/Cdc42 等调控细胞骨架运动及通过激活生存信号激酶 AKT/PKB 等靶蛋白调控细胞生存。

2.2.3 RALGDS (Ral guanine nucleotide dissociation stimulator) 蛋白 它是 Ras 相关蛋白 Ral 的 GTP/GDP 交换因子(GEF),其下游的靶标包括转录因子 Forkhead 蛋白家族(可促进凋亡基因转录)。RALGDS 和 AKT/PKB 都能抑制 Forkhead 族蛋白的活性,阻断促凋亡基因和 CDK 抑制物的转录,使细胞免于凋亡并加速细胞周期进程和细胞生长,引起癌细胞增殖。

2.2.4 磷脂酶 C (PLC) PLC 可催化 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP₂)分解成甘油二酯(DG)和三磷酸肌醇(IP₃),导致蛋白激酶 C (PKC) 的活化和细胞内 Ca²⁺浓度的升高。

2.3 Ras 转导的信号途径

Ras、Raf与MAPK信号途径形成交错的生物信息网,协调蛋白或转录因子磷酸化,调控细胞增殖、分化及凋亡,在肿瘤发生中起重要的作用^[5]。

现今了解比较清楚的有 Raf-MEK-ERK 信号转导途径、JNK-SAPK 信号转导途径和 P38 信号转导途径。这是三条并行的 MAPK 信号转导途径,相互调控,介导着不同的细胞生物学反应,级联途径见图 2^[1, 6]。

这里主要就 Raf-MEK-ERK 和 JNK-SAPK 信号转导途径加以简述。

2.3.1 Ras/Raf/MEK/ERK 信号级联的核心成分是 3 种激酶即蛋白激酶(MAPK, 又称 ERK)、MAPK 激酶(MAPKK 或 MEK)和 MAPKK 激酶(MAPKKK 或 MEKK)。其转导途径是:首先 Ras 在细胞外信号刺激下转化为激活型 Ras,位于细胞质的 Raf 移向细胞膜

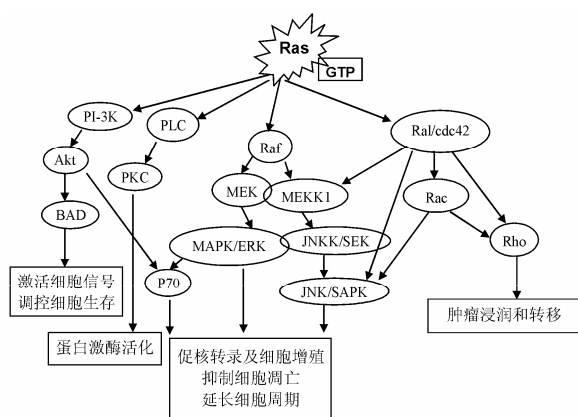


图2 Ras 转导的信号途径

并被活化, 活化了的Raf再活化MAPKK, MAPKK经磷酸化最终激活MAPK, 一旦该通路发生过度激活, 细胞增殖的加速与细胞生存期的延长可导致肿瘤的形成和发展。

2.3.2 Ras和JNK/SAPK 激活变异型Ras活化JNK (c-Jun N-terminal kinase) 的传递通路同Ras至MAPK一样, 在JNK的上游也存在着激酶级联, 研究表明SEK/MKK4/JNKK是磷酸化JNK的活化因子, 而MEKK是激活SEK的激酶, Ras至JNK的传递路径为Ras → MEKK → SEK → JNK^[7]。同样, 此通路过度激活可加速细胞增殖导致肿瘤。

其他通路同样通过信号级联途径可引发蛋白激酶过度活化, 细胞周期紊乱, 细胞过度增殖等, 最终发生肿瘤及其浸润和转移。

3 针对Ras蛋白修饰及其传导途径的抗肿瘤化合物

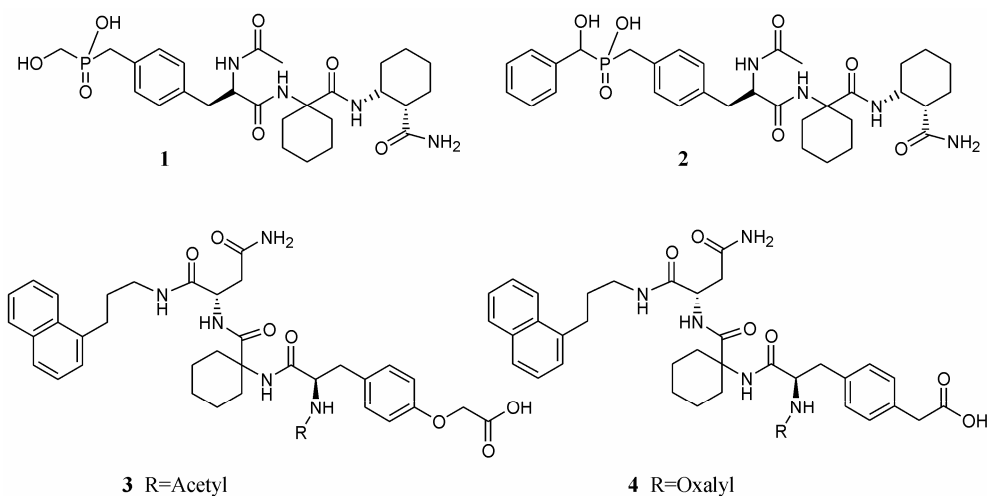
针对Ras蛋白及其信号通路的控制, 已经成为抗肿瘤的有效途径。目前大量的相关抗肿瘤化合物已被发现、设计并合成, 部分已经进入临床研究, 并取得了良好疗效。随着研究的不断深入, 活性好、选择性

高的化合物不断被发现, 已成为现今抗肿瘤药物研究的热点。

3.1 针对Ras蛋白上游通路的抑制剂

3.1.1 Grb2-SH2抑制剂 许多高活性的磷酸酪氨酸Grb2-SH2抑制剂已经被设计和合成出来, 如化合物1 ($IC_{50} = 7.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和2 ($IC_{50} = 0.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[8], 但磷酸基团的高电荷性和易水解性导致其难以进入细胞, 活性较低。于是人们将研究重点转向非磷酸抑制剂, 已有相关的非磷酸基团的拟肽类化合物报道, 如化合物3 ($IC_{50} = 65 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和4 ($IC_{50} = 0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 其萘环及草酰基可能是其良好活性的关键^[9]。

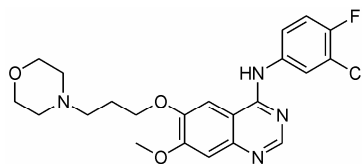
3.1.2 酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR 抑制剂) 已知EGFR是酪氨酸激酶主要成员, 其抑制剂主要分为两大类: 特异性单克隆抗体和小分子化合物。单克隆抗体与配体竞争性结合EGFR, 抑制配体激活EGFR的PTK, 并促进EGFR内吞, 从而产生抗肿瘤效应; 小分子化合物能与EGFR胞内区的ATP结合位点相结合, 抑制蛋白酪氨酸激酶磷酸化, 阻断瀑布式的信号传递^[10]。通过对激酶ATP结合区的研究已成功设计出几类能够特异地与EGFR激酶区结合的酪氨酸激酶抑制剂。最具应用前景的几类化合物都是杂环衍生物, 包括4-氨基喹啉衍生物, 如化合物5 (gefitinib, $IC_{50} = 1.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别于2002年与2003年在日本和美国上市, 用于治疗非小细胞肺癌)、6 (erlotinib, $IC_{50} = 1.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[11], 此类化合物有很强的抑制能力, 而且有较高的选择性; 4-苯基胺基吡咯并嘧啶类化合物(如化合物7, $IC_{50} = 4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 具有选择性高、起效浓度低的特点; 4-芳基酰胺基吡咯并嘧啶类化合物(如化合物8, 尚处于体外实验)。酪氨酸激酶抑制剂研究较为深入, 均具有抑制能力强、选择性高^[12]等优点,



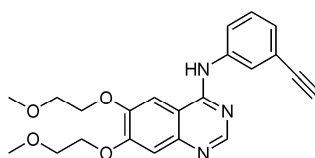
目前, 进入 II 期临床试验的 EGFR 的小分子抑制剂有 CI-1033、PKI166 和 GW572016 等; gefitinib 与 erlotinib 已进入 III 期临床研究。有研究认为, EGFR TK 的 ATP 结合域可分为腺嘌呤结合区、疏水区 I、疏水区 II 等五个区域; 又发现喹唑啉类衍生物与 EGFR 作用时, 其疏水侧链与 ATP 口袋的疏水区域的 832 位的 Phe 之间还存在 π - π 堆积相互作用, 这表明相应配体化合物应具有苯环等疏水基团, 使化合物与 ATP 口袋的疏水区作用时, 不仅存在疏水作用, 还存在芳环 π 键作用, 使化合物与酶的结合力更强; 又有通过对 C-5 位氮甲基取代的吡咯并嘧啶衍生物的 EGFR 抑制活性的研究结果支持了阳离子基团存在的必要性。他们认为, 化合物的 C-5 位取代基伸出 ATP 口袋, 被质子化的 NH 可能与酶表面的 Asp831、Asn818 的侧链和 Arg817 主链上的羰基通过静电力而产生相互作用, 二者之间的

阴阳离子基团的电性作用, 可能影响抑制活性的强弱^[13]。

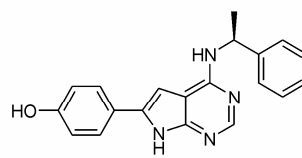
3.1.3 Bcr/Abl 抑制剂 在小分子抑制剂方面, 首先获得成功的是伊马替尼 (imatinib, Gleevec) 口服制剂。临床研究证明可用于慢性髓性白血病 (CML) 及胃肠道基质肿瘤 (GIST) 治疗, 但是长期服用存在耐药性问题。新一代的 nilotinib 由伊马替尼经分子结构改造获得, 其作用强度提高 30 倍, 对 Bcr-Abl 突变引起的伊马替尼耐药肿瘤有效。Dasatinib 也属同一类型的新药, 与 nilotinib 目前均尚在 II 期临床研究中。其他还有 resveratrol (化合物 **15**, $IC_{50} = 123 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in K562 cells), piceatannol (化合物 **16**, $IC_{50} = 126 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in K562 cells)^[14] 等。有研究采用计算机模拟了配体与受体的结合方式^[15], 在此基础上作者对相关抑制剂结构进行分析, 认为化合物应具备苯环、吡



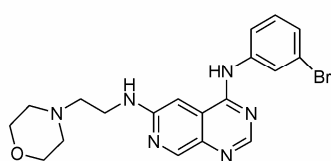
5 Gefitinib



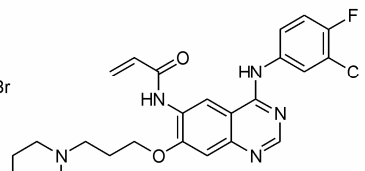
6 Erlotinib



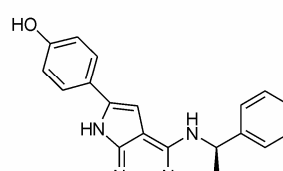
7 PKI-166



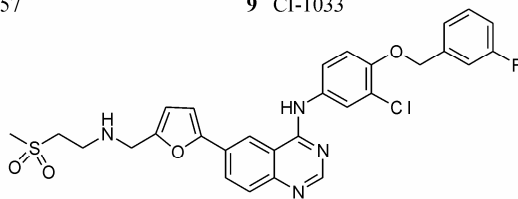
8 PD165557



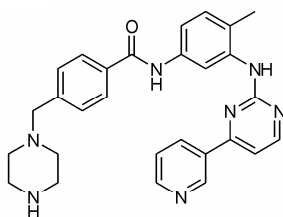
9 CI-1033



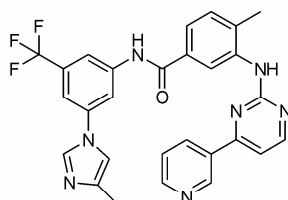
10 PKI166



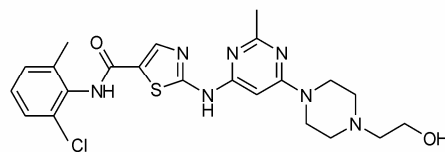
11 GW572016



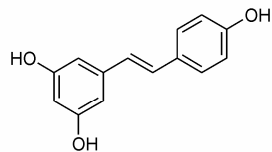
12 Imatinib



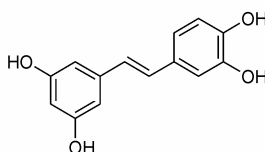
13 Nilotinib



14 Dasatinib



15 Resveratrol



16 Piceatannol

啶等疏水基团以便化合物伸展在受体活性口袋内部时, 可与受体疏水腔相关残基产生范德华及疏水性相互作用, 酰胺键及羰基等基团可与受体形成稳定氢键, 促进受体与配体的结合。在针对此靶点的抑制剂研究中, 可以上述分析为参考开展研究工作, 以提高活性、克服耐药性。

3.2 针对 Ras 蛋白翻译后修饰的抑制剂

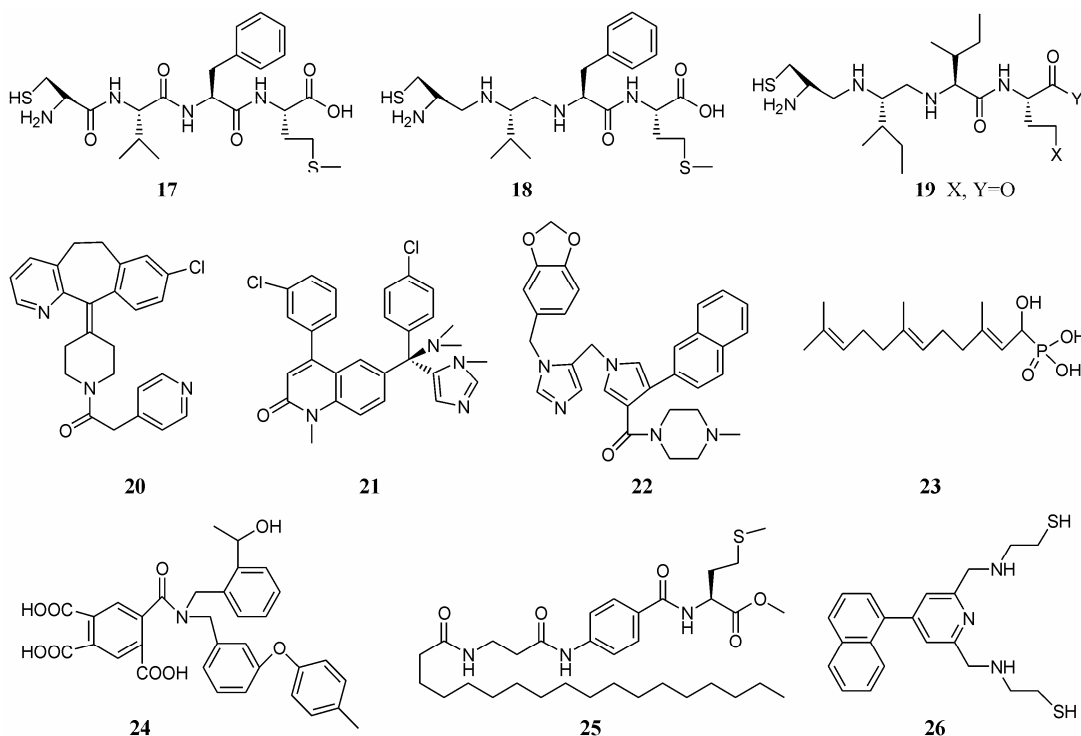
研究表明, Ras蛋白的生物学功能依赖于翻译后的修饰, 只有当Ras蛋白结合到细胞膜内侧后才具有生物活性^[1]。膜定位需要经过法尼基化修饰, 其过程主要有以下三步: Ras蛋白翻译后在法尼基转移酶(farnesyltransferase, Ftase)的催化下, 将胆固醇合成途径中的中间体法尼基焦磷酸酯(FPP)上的一个15碳的类异戊二烯基团即法尼基(farnesyl)转移到Ras蛋白的CAAX四肽结构(C为半胱氨酸, A为脂肪族氨基酸, X为丝氨酸或蛋氨酸等)中的Cys残基上(称作法尼基化修饰); 蛋白外切酶RCE1移去CAAX末端的三个氨基酸残基; 甲基转移酶ICMT(isoprenylcysteinecarboxyl methyltransferase)甲基化新的羧基末端, 最后将Ras蛋白定位于细胞膜, 具有生物活性^[16]。

3.2.1 法尼基转移酶抑制剂 (farnesyltransferase inhibitor, FTI) 此类药物包括CAAX竞争性抑制剂、FPP竞争性抑制剂、双底物抑制剂和金属锌离子螯合物等。其中CAAX竞争性抑制剂又分为肽类、拟肽类、非肽类抑制剂等, 最先发现的CAAX竞争性抑制剂中

的肽类抑制剂(化合物17, $IC_{50} = 25\sim 37 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 由于肽键易水解或酶解, 且羧基的负电性影响药物的细胞透过性, 活性较低; 拟肽类抑制剂(化合物18, $IC_{50} = 21 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和化合物19, $IC_{50} = 18 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)提高了稳定性和细胞内活性, 但药动学特征差; 非肽类抑制剂(如化合物20、21、22, IC_{50} 分别为 $0.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.86 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $250 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)克服了以上缺点, 比较稳定且活性较高, 因此近年来非肽类CAAX竞争性抑制剂发展较快, 已有相关药物进入临床。其他如FPP竞争性抑制剂(化合物23、24, IC_{50} 分别为 $1.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $30 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 双底物抑制剂(化合物25, $IC_{50} = 3\ 800 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 金属锌离子螯合物(化合物26, $IC_{50} = 1.9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[17], 均存在一些问题, 要么活性不高, 要么选择性较差, 如FPP竞争性抑制剂及金属锌离子螯合物易导致较大的毒性、双底物抑制剂极性较大, 难以透过细胞膜且难以合成。所以CAAX竞争性抑制剂仍是研究的热点。

3.2.2 RCE1抑制剂 作用于RCE1的抑制剂, 主要为多酰胺衍生物, 如化合物27、28^[18], 其 IC_{50} 分别为 $15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $11 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 虽然具有一定的活性, 但活性较低, 且相对分子质量过大。目前发展较慢。设计合成相对分子质量较小、细胞透过性好、活性高的抑制剂可成为针对此酶的目标。

3.2.3 甲基转移酶ICMT抑制剂 ICMT抑制剂通过抑制Ras蛋白定位于细胞膜前羧基的甲基化阻止肿瘤细胞生长, 最近报道以ICMT最小底物AFC (*N*-acetyl-



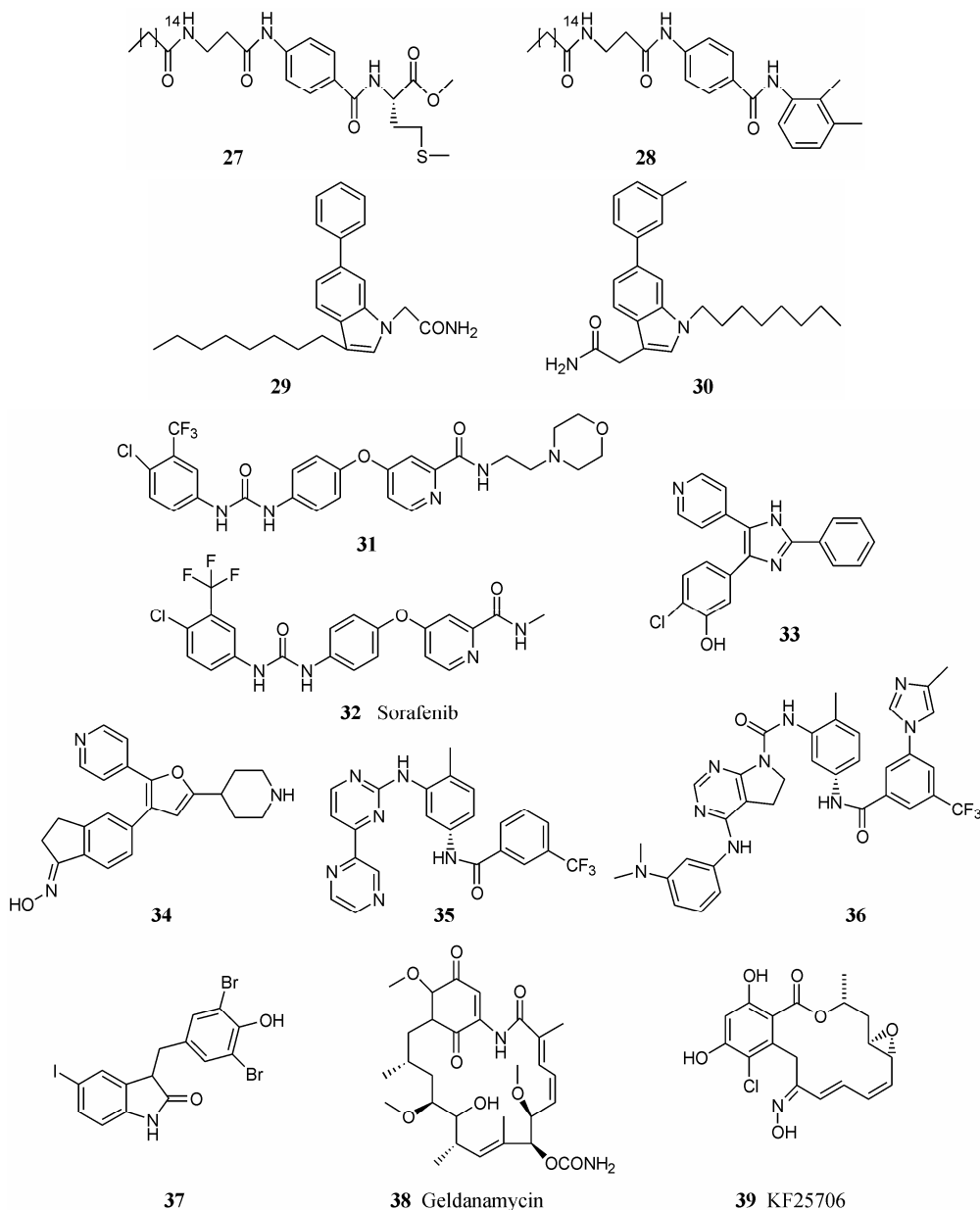
S-farnesyl-*L*-cysteine) 改造的咪唑类化合物对ICMT具有相应的抑制活性, 如化合物 **29** ($IC_{50} = 0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、**30** ($IC_{50} = 2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[19, 20]。由于AFC发现相对较晚, 相应的抑制剂类型较少, 但由于其作用的特殊性, 有望成为抗肿瘤的有效靶点之一。

3.3 针对Ras下游信号通路抑制剂

针对Ras下游信号通路各靶点的化合物很多, 其中以Raf抑制剂和PKC抑制剂的研究较为深入, 有些已经进入临床研究。

3.3.1 Raf 抑制剂 Raf 激酶抑制剂从结构上基本可以分为四类: 脲类化合物及其生物电子等排体、双苯基咪唑类化合物、苯甲酰胺类化合物和咪唑酮类化合物。其中脲类化合物是所有 Raf 激酶抑制剂中研究最多的一个类型 (化合物 **31**, $IC_{50} = 73 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。有研

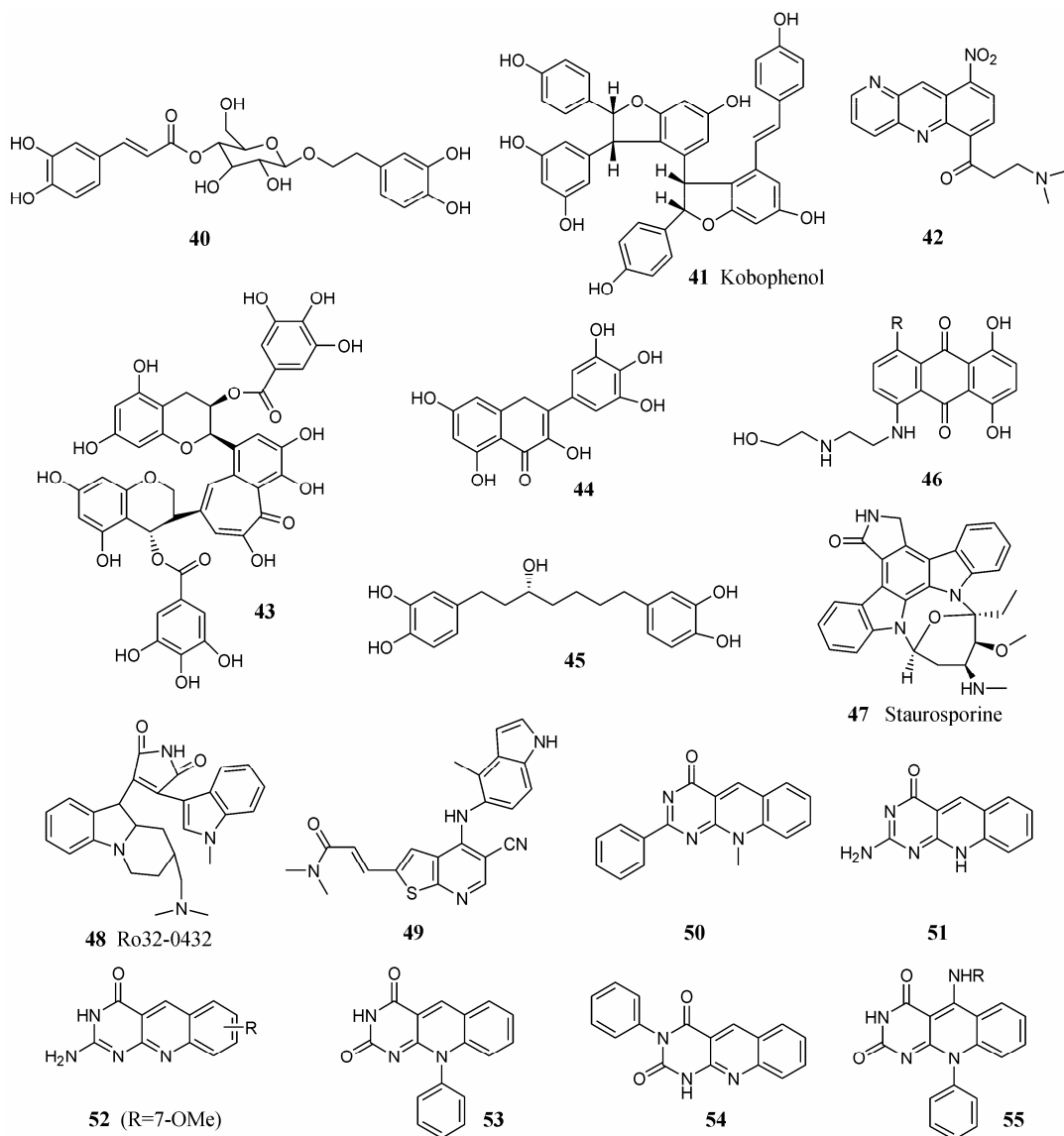
究以 X-射线衍射方法测定了化合物 **25** 的类似物 Sorafenib, 其吡啶环占据了 ATP 结合口袋并与 3 个芳香残基作用, 吡啶环上的 N 与 Cys531 中的 NH 形成氢键, 酰胺取代基中的 NH 与 Cys531 骨架上的羰基形成另外一个氢键, 其他重要的氢键还包括 Sorafenib 中的脲基团与 Glu500 侧链上的酯基以及 Asp593 骨架上的 NH 形成的氢键, Sorafenib 中的三氟甲基基团占据着另外一个口袋, 这个口袋在 Raf 被活化时通常是由 Phe594 占据的。但此类化合物的水溶性较差, 影响了其药效的发挥, 如果能在不影响生物活性的前提下增加药物的水溶性将会提高其应用价值。双苯基咪唑类化合物对 Raf-1 激酶的抑制活性具有很高的选择性, 如化合物 **33** 即 L-779450, 能抑制多种细胞的增殖, 具有很高选择性。用咪唑异构体以及吡咯替代结构中



的咪唑环,也得到了较好的活性,如化合物 **34** (对 Colo-205、Colo-201 和 A375 的 IC_{50} 值分别为 10、10 和 43 $nmol \cdot L^{-1}$)。近年来发现苯甲酰胺类化合物 (化合物 **35**、**36**) 和吡啶酮类化合物 (化合物 **37**, $IC_{50} = 11 nmol \cdot L^{-1}$) 也具有一定的活性,并发现采取前药策略明显有助于改善这类化合物的细胞活性^[21]。某些大环类化合物也显示出较为明显的抑制活性,如化合物 **38** ($IC_{50} = 1 nmol \cdot L^{-1}$), **39** ($IC_{50} = 25 nmol \cdot L^{-1}$)^[22]。

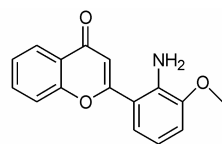
3.3.2 PKC 抑制剂 目前已经在植物、微生物和动物的次生代谢物中筛选到很多具有 PKC 抑制活性的化合物,如苯乙醇苷类 (化合物 **40**, $IC_{50} = 14.8 \mu mol \cdot L^{-1}$)、二苯乙烯 (常要求两个游离的酚羟基在同一个环上,化合物 **41**, $IC_{50} = 52 nmol \cdot L^{-1}$)、生物碱类 (化合物 **42**, $IC_{50} = 0.66 \mu mol \cdot L^{-1}$)、多酚类 (化合物 **43**, $IC_{50} = 16 \mu mol \cdot L^{-1}$)、黄酮类 (化合物 **44**)、二芳基庚

烷类 (化合物 **45**, $IC_{50} = 1.4 \mu mol \cdot L^{-1}$) 和醌类 (化合物 **46**, $IC_{50} = 4 \mu mol \cdot L^{-1}$) 等^[23]。化合物 **47** ($IC_{50} = 1 nmol \cdot L^{-1}$)、**48** ($IC_{50} = 10 nmol \cdot L^{-1}$)^[24] 活性较高。另外,某些合成化合物也具有较好的抑制活性,如化合物 **49** ($IC_{50} = 1.6 nmol \cdot L^{-1}$)^[25]、化合物 **50** ($IC_{50} = 1.6 \mu g \cdot mL^{-1}$)^[24]。Ali 等^[24] 对此靶点的构效关系进行了较为详细的研究,如化合物 **51**、**52**, 可伸入结合位点穴内, C-2 位的氨基可结合于 Arg12、Glu35、Arg32, 形成 4~5 个氢键, 并由于范德华力增强了结合作用; N-3 位无取代或以苯环取代的衍生物也有较好活性, 如化合物 **53**、**54**, 其活性与 N-3 取代富电子的苯环与结合位点空穴产生静电吸引力或 N-3 位氢键的形成有关, 所以 C-2、N-3、N-10 位的取代有利于活性的提高; 化合物 **55** 的活性较低可能因为 N-3 及 N-10 位疏水性取代基的存在影响了配体与空穴的结合; C-7, 8, 9 位疏水基团也会影

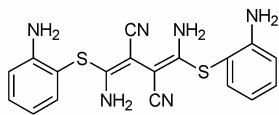


响其与受体结合, 而亲水基团由于可以形成氢键而提高活性; N-7 位有 H 或苯环, C-8 位有氧原子或苯环将有利于活性, 同样与氢键的形成有关。

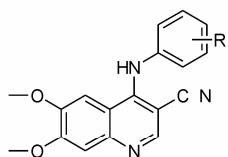
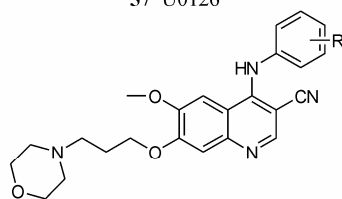
3.3.3 MEK 抑制剂 化合物 **56** (PD098059, $IC_{50} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、**57** (U0126, $IC_{50} = 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[22], 已进入临床。有研究^[26]对 4-苯胺基-3-氰基-6,7-双烷氧基喹啉类化合物进行了构效分析, 化合物**58**中 4-苯胺基上对位以苯氧基取代有较好活性 ($IC_{50} = 0.006 2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 以氮原子替换苯氧基中的氧, 活性明显降低, 如化合物**59** ($IC_{50} = 0.16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 而以亚甲基替换苯氧基中的氧, 活性可保持同样水平, 如化合物**60** ($IC_{50} = 0.003 6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 这说明氢键给体的存在对活性不利; 苯胺基上有取代时, 两个苯环之间构象应有一定刚性, 两个苯环直接相连, 活性远大于两苯环间以柔性基团相连的化合物; 苯胺基上取代基团的大小对活性也至关重要, 如以甲氧基、羟基、甲基替换苯氧基, 活性明显降低; 苯氧基从对位换至间位时, 活性也会降低, 换至邻位降低更明显; 苯胺基上取代基以不饱和基团为优, 如化合物**61** ($IC_{50} = 0.002 4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、化合物**62** ($IC_{50} = 0.002 7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、化合物**63** ($IC_{50} = 0.001 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 取代基分别为苯氧基、苯基和苯硫基, 其活性明显高于化合物**64** ($IC_{50} = 0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。



56 PD098059



57 U0126

58 (R=*para*-Phenoxy)59 (R=*para*-Phenylamino)60 (R=*para*-Benzyl)

61 (R=Phenoxy)

62 (R=Benzyl)

63 (Phenylsulfanyl)

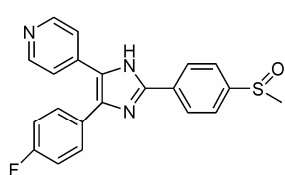
64 (Cyclohexylmethyl)

3.3.4 p38 MAPK抑制剂 目前p38 MAPK抑制剂已发展到第二代, 且具有广泛的用途, 选择性更高, 效力更强, 以咪唑类衍生物为主。咪唑类化合物均含有 4-芳基-5-(吡啶-4-基)咪唑结构, 靠近吡啶基团的N上及C-2位取代不影响活性 (如SKF 86002, SB220025, SB203580), 而靠近芳环的N上的取代则相反; 咪唑基可以呋喃、吡咯、吡啶基替换, 以吡咯基团活性最好; 将C-4位吡啶基 (如SB203580, $IC_{50} = 48 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 替换为噻啶, 有利于提高体外及体内活性(如SB220025,

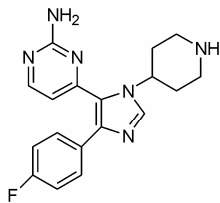
$IC_{50} = 19 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[27]。

3.3.5 JNK抑制剂 JNK抑制剂较早从天然产物中分离改造得到, 如化合物CEP-1347 (化合物**68**, $IC_{50} = 20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[28], 发展到现在已设计合成了大量小分子化合物。针对JNK不同亚型, 抑制剂也有不同, 如针对 JNK3 的 2-乙腈苯并噻唑衍生物 (化合物**69**, $IC_{50} = 250 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和**70**, $IC_{50} = 9 400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。噻唑基附近有吸电子基团可提高活性, 将噻唑基上的N替换成C则活性降低, 乙腈基也可以替换为其他具有一定体积的吸电子基团; 苯并噻唑上的-NH附近连接给电子基有利于活性^[29]。2'-苯胺基-4, 4'-双吡啶类化合物也是针对JNK3的抑制剂, 如化合物**71** ($IC_{50} = 32 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 2'-苯胺基部分结合于激酶的选择性口袋内, Met146的甲基硫代乙基链移开以便配体的苯环与受体的结合, 吡啶环上的N以及苯胺基旁的NH键可与Met149形成氢键^[30]。另有杂环醌类化合物如SP600125 (化合物**72**, $IC_{50} = 40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[28]。

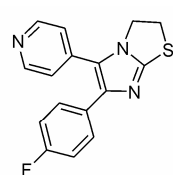
3.3.6 PI3K抑制剂 在PI3K的抑制剂中, 主要有靶向 PI3K 的催化亚基 p110 的抑制剂, 以 Wortmannin (化合物**73**, $IC_{50} = 3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 LY294002 (化合物**74**, $IC_{50} = 1 400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 为代表^[31], 但由于水溶性差且毒性较强等原因, 限制了其进一步开发。另外一种亚基异构型特异性抑制剂, 可特异性针对 p110 δ 催化亚基的异构型。其他几类化合物分别以 PI-103、PIK-93、PIK-39 等为代表^[32]。有研究^[32]分析 LY294002 的 1,4-氮氧六环是活性的关键, 环上的氧原子可以与 Val882 主链酰胺基团形成氢键, 替换氧原子则使活性降低, 其他几类含 1,4-氮氧六环的化合物, 如 PI-103、KU-55933 同样证明氧原子存在的重要性。PIK-39 作为喹啉酮类化合物的代表, 其构效关系与其他化合物有所不同, 其噻唑啉部分可与 PTA 活性口袋结合, 并且可以旋转折叠附于 ATP 腺嘌呤的平面结构上, 由于上述构型可使 PIK-39 与 Val882 及 Glu880 之间形成氢键, 与其他 PI3K 抑制剂相比, PIK-39 基团并不深入受体活性位点内部, 反而其噻唑啉部分伸展至 ATP 活性口袋的入口处, 在这个部位, 激酶通过一系列构象变化, 使 Met804 从 ATP 活性口袋顶部转移至底部以调节与抑制剂的结合方式, 从而在 ATP 活性口袋入口处的 Met804 和 Trp812 间形成新的疏水口袋, 这个诱导形成的口袋结构可使 PIK-39 与受体更好地结合。总体来说, 两个结构特征是此靶点抑制剂的活性必须基团: ① 平面结构。以结合至 ATP 口袋内相应区域; ② 可伸展基团。以伸入活性口袋。虽然 PI3K 抑制剂并未在临床



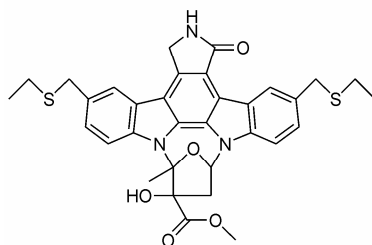
65 SB203580



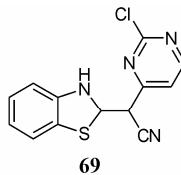
66 SB220025



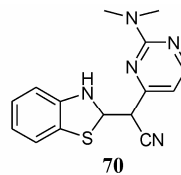
67 SKF 86002



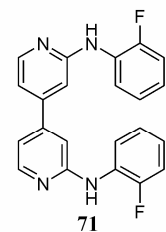
68 CEP-1347



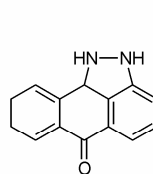
69



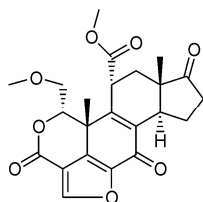
70



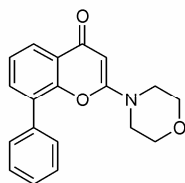
71



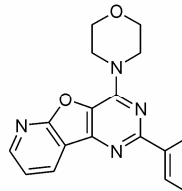
72 SP600125



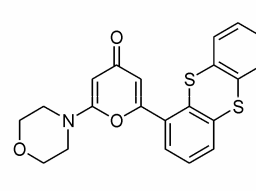
73 Wortmannin



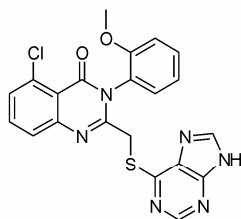
74 LY294002



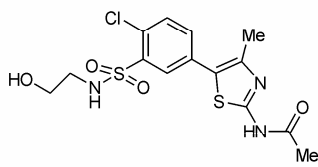
75 PI-103



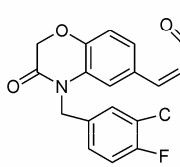
76 KU-55933



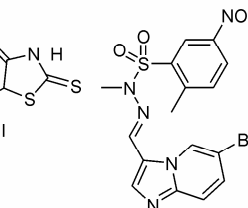
77 PIK-39



78 PIK-93



79 PIK-124



80 PIK-75

研究中表现出明显的优势,但是作为非ATP结合类型抑制剂,进一步的研究也许会发现更加高效、特异、低毒的抑制剂。

综上所述,调控 Ras 信号转导途径在癌症治疗中占有重要地位,调节其上游相关酶系,可避免 Ras 蛋白的激活;抑制传导途径中的关键靶点,作用于 Ras 蛋白翻译后修饰的法尼基转移酶等,对于控制肿瘤至关重要;作用于 Ras 蛋白下游途径的靶点在肿瘤发生、发展中起重要作用,并且与 Ras 蛋白紧密联系,在提高活性、降低毒副作用方面有优势,但由于其通路复杂,回路较多,因此针对单个靶点抑制的同时,往往会导致其他通路的过度激活,通过旁路效应从而降低抑制剂疗效。可以看出,直接作用于 Ras 蛋白的药物是整个信号传导通路的关键,而无论是其上游还是下游都存在着多通路问题。如果从多靶点作用

角度出发,设计同时作用于 Ras 信号传导通路不同关键点的药物,在不同的区域,调控或阻滞信号的传导过程,将更有可能研制出具有开发价值的新的抗肿瘤药物。

References

- [1] Huang WL, Zhu XF. Signal Transduction [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 20-100.
- [2] Margarit SM, Sondermann H, Hall BE, et al. Structural evidence for feedback activation by Ras. GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS [J]. Cell, 2003, 112: 685-695.
- [3] Graham DL, Eccleston JF, Chung CW, et al. Magnesium fluoride-dependent binding of small G proteins to their GTPase-activating proteins [J]. Biochemistry, 1999, 38: 14981-14987.
- [4] Kim SK, Novak RF. The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing

- enzyme gene and protein expression [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 113: 88-120.
- [5] Barault L, Veyrie N, Jooste V, et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers [J]. *Int J Cancer*, 2008, 122: 2255-2259.
- [6] Haluska P, Dy GK, Adjei AA. Farnesyl transferase inhibitors as anticancer agents [J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38: 1685-1700.
- [7] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773: 1263-1284.
- [8] Furet P, Caravatti G, Denholm AA, et al. Structure-based design and synthesis of phosphinate isosteres of phosphotyrosine for incorporation in Grb2-SH2 domain inhibitors. Part 1 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10: 2337-2341.
- [9] Burke TR Jr, Luo J, Yao ZJ, et al. Monocarboxylic-based phosphotyrosyl mimetics in the design of Grb2 SH2 domain inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9: 347-352.
- [10] Shen YJ, Zhu J. Process in anti-cancer drugs of new targets [J]. *World Clin Drugs (世界临床药物)*, 2007, 28: 288-292.
- [11] Kitano Y, Suzuki T, Kawahara E, et al. Synthesis and inhibitory activity of 4-alkynyl and 4-alkenylquinazolines: identification of new scaffolds for potent EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 5863-5867.
- [12] He W, Ling X. Advances in the study of EGFR small molecule inhibitors [J]. *Chin Pharma J (中国药学杂志)*, 2007, 42: 1685-1687.
- [13] Chen X, Liu XX, Jiang FC, et al. Construction of pharmacophore model of EGFR TK inhibitor [J]. *Acta Phys Chim Sin (物理化学学报)*, 2008, 24: 281-288.
- [14] Tolomeo M, Grimaudo S, Cristina AD, et al. Pterostilbene and 3-hydroxypterostilbene are effective apoptosis-inducing agents in MDR and BCR-ABL-expressing leukemia cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37: 1709-1726.
- [15] Peng H, Qi J, Huang N, et al. Molecular design and biological activity of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors [J]. *Acta Acad Med Sin (中国医学科学院学报)*, 2004, 26: 145-149.
- [16] Krzysiak AJ, Rawat DS, Scott SA. Combinatorial modulation of protein prenylation [J]. *ACS Chem Biol*, 2007, 2: 385-389.
- [17] Ge YL, Jiang FC. Advances in the study of farnesyltransferase inhibitors [J]. *Chin New Drugs J (中国新药杂志)*, 2004, 12: 1226-1231.
- [18] Schlitzer M, Winter-Vann AM, Casey PJ. Non-peptidic, non-prenyl inhibitors of the prenyl protein-specific protease Rce1 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 425-427.
- [19] Henriksen BS, Anderson JL, Hrycyna CA, et al. Synthesis of desthio prenylcysteine analogs: sulfur is important for biological activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15: 5080-5083.
- [20] Winter-Vann AM, Baron RA, Wong W, et al. A small-molecule inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase with antitumor activity in cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 4336-4341.
- [21] Jiao Y, Lu T. Advances in the research of the anti-cancer agent — Raf kinase inhibitor [J]. *Strait Pharm J*, 2007, 19: 1-5.
- [22] Weinstein-Oppenheimer CR, Blalock WL, Steelman LS, et al. The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors [J]. *Pharmacol Ther*, 2000, 88: 229-279.
- [23] Liang PF, Gu Y, Yang DM, et al. Progress on protein kinase C inhibitors from natural products [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2007, 17: 254-262.
- [24] Ali HI, Tomita K, Akaho E, et al. Antitumor studies Part 2: structure-activity relationship study for flavin analogs including investigations on their *in vitro* antitumor assay and docking simulation into protein tyrosine kinase [J]. *Eur J Med Chem*, 2008, 43: 1376-1389.
- [25] Nathan TL, Boschelli DH, Lee J, et al. 2-Alkenylthieno [2, 3-b] pyridine-5-carbonitriles: potent and selective inhibitors of PKC [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 4420-4423.
- [26] Zhang N, Wu B, Eudy N, et al. MEK (MAPKK) inhibitors. Part 2: structure-activity relationships of 4-anilino-3-cyano-6, 7-dialkoxyquinolines [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 1407-1410.
- [27] Lee JC, Kassis S, Kumar S, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitors—mechanisms and therapeutic potentials [J]. *Pharmacol Ther*, 1999, 82: 389-397.
- [28] Bogoyevitch MA, Boehm I, Oakley A, et al. Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1697: 89-101.
- [29] Shaikh AR, Ismael M, Del Carpio CA, et al. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) and docking studies on (benzothiazole-2-yl) acetonitrile derivatives as c-Jun N-terminal kinase-3 (JNK3) inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 5917-5925.
- [30] Swahn BM, Xue Y, Arzel E, et al. Design and synthesis of 2'-anilino-4, 4'-bipyridines as selective inhibitors of c-Jun N-terminal kinase-3 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 1397-1401.
- [31] Galetic I, Andjelkovic M, Meier R, et al. Mechanism of protein kinase B activation by insulin / insulin-like growth factor-1 revealed by specific inhibitors of phosphoinositide 3-kinase — significance for diabetes and cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 1999, 82: 409-425.
- [32] Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, et al. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110a in insulin signaling [J]. *Cell*, 2006, 125: 733-747.