

1. **生物利用度 (Bioavailability)** 又称生理有效性 (physiological availability)，是指药物被机体吸收进入循环的相对量和速率，它是药物动力学研究中一个有重要实用价值的指标，其含义包括：①药物吸收程度：即实际吸收的药量占给药量的百分数；②药物吸收速率：是指血药浓度峰值和达峰时间。生物利用度是影响药物有效性、安全性的一个主要参数，用F表示， $F = (A/D) \times 100\%$ ，A为进入体循环的量，D为口服剂量。影响生物利用度的因素较多，包括药物颗粒的大小、晶型、填充剂的紧密度、赋型剂及生产工艺等。生物利用度是药物制剂质量的一个重要指标。

2. **希佩尔—林道病综合症 (VONHIPPEL-LINDAU SYNDROME)** 是一种以血管不正常生长为特征的多系统障碍疾病。正常血管生长象树状一样，但具VHL疾病的人却不时会有毛细管节出现，这些节称为血管瘤或成血管细胞瘤，可出现在视网膜，大脑某一部位，以及脊柱索，肾上腺和身体其他部位。VHL疾病的基因定位于染色体3上，以显性方式遗传，如果父母一方有一种显性基因，那么他（她）的下一代就有50%的机会遗传该基因。VHL基因是一种肿瘤抑制基因，它在正常细胞中的作用是抑制无控制的生长和增殖。如果VHL基因缺失或突变，能引起癌生长。

3. **纺锤体检查点 (spindlecheckpoint)** 是细胞周期中的一个重要检查点，由Mad2、Bub1等染色体动粒 (kinetochore) 蛋白构成，像“传感器”一样能感知微管与动粒结合情况和张力。纺锤体检查点阻滞细胞进入分裂后期直到所有染色体着丝点正确与微管联接，确保染色体均等分配，维持基因组稳定性。

扩展阅读

《自然》(Nature)曾于2009年4月刊登了由Millennium Pharmaceuticals公司的科学家发表的文章，该文介绍了一种全新的治疗癌症的方式——以“泛素-蛋白酶”为靶位的抗癌新药物。

文中，研究人员指出，他们新发现了一种与癌症相关的蛋白酶体抑制因子，它正成为一种新的抗肿瘤药物。首次报告被用于临床的蛋白酶体抑制因子是“硼替佐米”(Bortezomib)，它可用来治疗多种骨髓瘤和一些淋巴瘤。

这篇文章中Soucy等人报告了MLN4924，它是“NEDD8-激发酶”(NAE)的一个小分子抑制因子，目前正在进行一期临床试验。NAE调控“泛素连接酶”一种亚型(即cullin-RING)的活性，后者又控制各种不同细胞蛋白的降解。MLN4924在小鼠癌症模型中诱导癌细胞死亡和产生抗肿瘤活性。这为抗肿瘤药物的开发开辟了新的道路。

下面，就让我们仔细了解该新药物的研发过程。

一种新型抗癌药物——NEDD8活化酶抑制剂

研究人员通过对细胞蛋白酶体抑制剂的临床研究发现，针对泛素蛋白酶体系统其它组份的药物有望成为治疗人类癌症的新药。NEDD8活化酶（NEDD8-activating enzyme, NAE）是NEDD8信号通路的关键酶，它控制了cullin-RING泛素连接酶（ubiquitin ligases）的活性，因此也就控制了蛋白酶体系统上游蛋白质的去向，同时cullin-RING泛素连接酶的作用底物又在肿瘤细胞生长和存活相关信号通路中起到了极其重要的作用。MLN4924是一种高效的具有选择性的NAE酶抑制剂，它能干扰cullin-RING泛素连接酶介导的蛋白质的转归（protein turnover），从而以一种新型机制（细胞周期S期DNA合成失调）导致肿瘤细胞凋亡。MLN4924能有效抑制移植至小鼠体内的人肿瘤细胞的生长，并且不会引起任何毒副作用。研究表明，NAE酶抑制剂将有望成为一种新型的抗癌药物。

泛素蛋白酶体系统（UPS）主要负责细胞内蛋白质的降解，它广泛地参与到各项细胞功能的调控活动中去。硼替佐米（bortezomib），商品名为万可（Velcade）就是一种针对UPS的蛋白酶抑制剂，它现在已经被批准用于临床治疗多发性骨髓瘤和套细胞淋巴瘤等疾病。bortezomib具有的抗癌活性表明，针对UPS系统内组成酶的抑制剂将有望成为一种新型的抗癌药物。

泛素化途径是这类途径中第一条被发现的通路，随后人们又陆续发现了类似的泛素样蛋白（UBL）调节途径。泛素样蛋白NEDD8就参与了这种调节途径。与泛素蛋白一样，NEDD8也是首先由E1（此处应该是NEDD8活化酶NAE，该酶是由NAE1和UBA3两个亚单位组成的异源二聚体）活化，然后转移到E2（Ubc12也被称作UBE2M），再连接到靶蛋白上。目前，在NEDD8途径中被研究得最清楚的底物就是cullin家族蛋白。Cullin蛋白是E3连接酶亚类cullin-RING连接酶（cullin-RING ligase, CRL）的骨架蛋白，NEDD8可以对CRL酶中的cullin蛋白进行共价修饰。这种修饰对与CRL的酶活性来说至关重要。最近的研究表明，NEDD8蛋白可以通过好几种修饰途径来激活CRL。因此，NEDD8通路有一项重要的功能就是控制依赖于CRL酶的泛素化途径及其蛋白降解过程的速度。

本文中介绍MLN4924这种小分子NAE酶抑制剂，目前该药已经进入I期临床试验。MLN4924能选择性地抑制NAE酶的活性，但不会影响类似的泛素活化酶UAE（也被称作UBA1）以及苏素活化酶（SUMO-activating enzyme, SAE，该酶是由SAE1和UBA2亚单位组成的异源二聚体）的活性（这已经被酶学实验和细胞试验所验证了）。在用多种人肿瘤细胞进行的体外实验中，MLN4924对这些肿瘤细胞表现出明显的杀伤作用。

我们可以发现，在用MLN4924处理过的肿瘤细胞内，CRL底物的量明显增多，这点与bortezomib不同，MLN4924不会明显抑制大多数蛋白的走向（降解）。研究人员在试验中发现，MLN4924针对肿瘤细胞的杀伤作用可能是由于在肿瘤细胞周期——S期中发生了不受控制的DNA合成，进而造成DNA损伤，从而诱导肿瘤细胞发生凋亡。在移植有人肿瘤细胞的小鼠体内试验中，MLN4924同样表现出很好的抗肿瘤活性，而且小鼠对MLN4924具有很好的耐受性。

MLN4924是一种高选择性的NAE酶抑制剂

最初，通过高通量筛选的办法，研究人员找到了N6-苯甲基腺苷（N6-benzyl adenosine）这种NAE酶抑制剂，然后在对N6-苯甲基腺苷进行反复的研究过程当中发现了MLN4924。如图1a所示，MLN4924在结构上与腺嘌呤核苷酸（AMP）非常相似，而AMP和NAE之间又具有很高的亲和力。

AMP与MLN4924分子之间的不同之处在于：

- (1) 在腺嘌呤碱基的N6位置，MLN4924分子中是一个氮杂嘌呤碱基，而AMP中是一个氨基苄基；
- (2) 在核糖部分，AMP分子中的2' 羟基碳位置在MLN4924分子中只是一个碳环，而没有AMP分子中的2' 羟基；
- (3) 在AMP分子中的磷酸基团位置上，在MLN4924分子中的是一个氨基磺酸基团；
- (4) 从立体化学结构上来比较，MLN4924分子中的亚甲基氨基磺酸基团相对氮杂嘌呤碱基来说是一种非天然的反式关系，这一点与AMP分子不同。通过X线结晶衍射试验证实，MLN4924的确就是与NAE酶的核苷酸结合位点结合。

MLN4924是一种高活性的NAE酶抑制剂， IC_{50} 为 $0.004 \mu M$ ，同时它也是一种高选择性的抑制剂，与NAE酶相似的UAE、SAE、UBA6和ATG7等酶的 IC_{50} 分别为 $1.5 \mu M$ 、 $8.2 \mu M$ 、 $1.8 \mu M$ 以及 $>10 \mu M$ （图1b）。同时研究人员使用免疫印迹的方法检测了胞内E2与UBL之间形成的硫酯键，即用细胞试验证明了MLN4924抑制剂对NAE酶的高选择性抑制作用（图1c）。不过，这类分子一般都能抑制转移RNA合成酶（transfer RNA synthetases）。因此，为了排除这种效应的影响，研究人员又用 ^{35}S 标记的甲硫氨酸是否能掺入新合成的蛋白质这种实验方法进行了检测。结果表明，MLN4924没有这种活性，试验也没有发现MLN4924具有ATP使用酶（ATP-using enzyme）抑制活性。

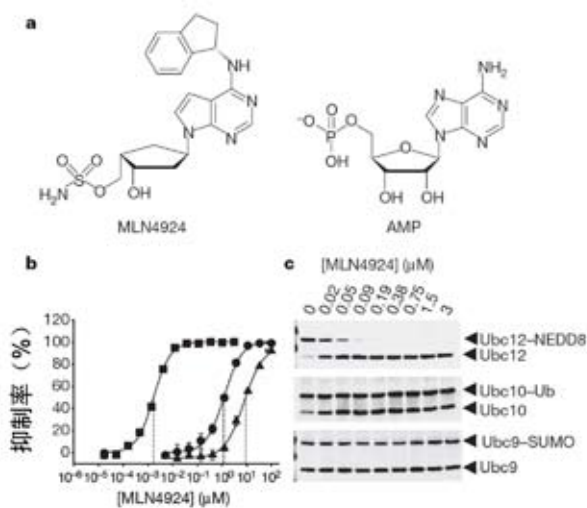


图1 MLN4924是一种高选择性、高活性的NAE酶抑制剂。

a: MLN4924分子和AMP分子的化学结构；b: MLN4924在体外试验中对各种酶的抑制活性，NAE酶（方块所示）的 $IC_{50}=4.7 \pm 1.5$ nM；SAE酶（三角型所示）的 $IC_{50}=8.2 \pm 6.2 \mu M$ ；UAE酶（圆型所示）的 $IC_{50}=1.5 \pm 0.71 \mu M$ ；c: MLN4924能选择性地抑制胞内的NAE酶活性。使用免疫印迹方法分别检测了HCT-116胞内的Ubc12-NEDD8、Ubc9（即UBE21）-SUMO以及Ubc10-Ub的水平，并据此检测了MLN4924对NAE酶、SAE酶和UAE酶的抑制活性。

NAE酶能调控部分UPS底物

多泛素化修饰蛋白一般都会被细胞蛋白酶体所降解，因而蛋白酶体活性抑制剂就能阻止胞内大部分蛋白质的降解。不过，NAE酶抑制剂只能阻止由CRL途径介导的泛素化修饰的蛋白质的降解途径。研究人员使用体外培养的HCT-116细胞，分别检测了NAE酶抑制剂（MLN4924）和蛋白酶体抑制剂（bortezomib）对胞内代谢标记蛋白质降解途径的影响情况。给药15分钟之后，就可发现bortezomib抑制了胞内蛋白质的降解，但此时MLN4924还没有表现出明显的抑制活性（图2中左上角小图）。不过随后，MLN4924表现出了抑制活性，抑制了胞内约9%的蛋白质的降解（ $P=0.023$ ），而bortezomib则抑制了胞内约50%的蛋白质的降解（ $P<0.001$ ）。该实验结果表明，在HCT-116细胞内，被蛋白酶体途径降解的蛋白质中，大约有20%是经CRL途径进行泛素化修饰的。

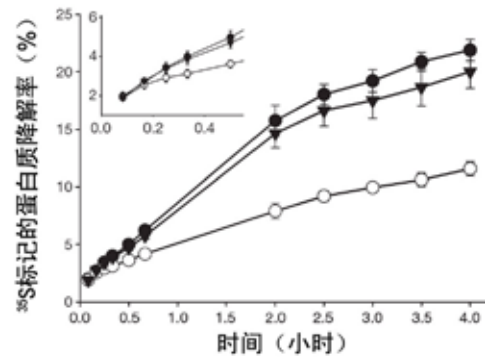


图2 与蛋白酶体抑制剂相比，NEDD8通路抑制剂只能影响胞内少部分蛋白质的降解。HCT-116细胞在含有³⁵S标记的甲硫氨酸培养基中培养20分钟以标记胞内蛋白质，然后再换以含有普通甲硫氨酸的新鲜培养基培养，分别加入DMSO（实心圆）、3 μM的MLN4924（实心三角）和3 μM的bortezomib（空心圆），通过检测培养基中的放射强度来衡量蛋白降解的程度。左上角小图表示早期的蛋白降解情况。

NAE酶抑制会导致细胞复制S期紊乱

使用MLN4924后引起的NAE酶抑制作用及其导致的胞内Ubc12-NEDD8的减少会进而引起胞内NEDD8-cullin含量的降低。而且，这条通路如果被抑制还会引起CRL活性的降低，从而使受CRL途径调控的靶蛋白在胞内蓄积。对HCT-116细胞使用MLN4924作用24小时后，可以发现一种剂量依赖性的Ubc12-NEDD8和NEDD8-cullin减少， $IC_{50} < 0.1 \mu M$ （图3a）。理所当然，胞内CRL的底物CDT1、p27、NRF2（即NFE2L2）、c-Jun、HIF1 α 、cyclin E、CDC25A、EM1（即FBXO5）以及磷酸化修饰的I κ B α 等的含量增高。

在被MLN4924处理过的HCT-116细胞中，大部分CRL靶蛋白的水平都会有所增高，不过，对于不同的细胞来说，这种NAE酶抑制剂造成的蛋白降解受阻效应对细胞生理功能造成的影响是不同的，这取决于具体是哪些CRL靶蛋白受到了影响。对于HCT-116细胞来说，MLN4924造成的最主要的影响就是干扰了细胞复制周期中的S期，导致细胞死亡（图3b）。

在试验中，研究人员采用0.3 μM的MLN4924处理HCT-116细胞，该剂量足以抑制80%的NEDD8-cullin复合物形成（图3a中虚线框所示）。他们使用流式细胞仪监测细胞中DNA含量来判断细胞周期进行情况。经MLN4924处理8小时后，细胞开始停滞在S期（图3b）。药物作用24小时后，可观察到有一大部分的细胞中蓄积了 $\geq 4N$ DNA（图3b虚线框所示）。同时，研究人员未能检测到磷酸化的H3组蛋白（phosphohistone H3, pH3），这说明细胞并未进入有丝分裂期（图3a）。药物作用48小时后，可观察到含有2N DNA的细胞数开始增多，这说明含有异常4N DNA的细胞开始凋亡，这也与图3a中所示细胞中裂解的caspase 3酶以及多聚ADP核糖聚合酶（PARP）的含量升高相吻合。

研究人员在经MLN4924处理后的细胞中观察到的现象与在发生“再复制（re-replication），即细胞周期停滞但DNA反复进行复制”的细胞中观察到的一样。虽然这种“再复制”的现象可以由好几种不同的机制引起，但他们发现，胞内CRL1^{SKP2}和CRL4-DDB1^{CDT2}的底物CDT1蛋白（该蛋白能阻止DNA复制起始）蓄积可能是引起经MLN4924处理后的细胞S期紊乱的重要原因（图3a）。在细胞中高表达CDT1或者使用RNAi抑制细胞内源性的CDT1抑制剂geminin的表达也能引起DNA再复制现象的发生。

再复制现象会导致DNA损伤，激活细胞DNA损伤修复机制。研究人员发现在胞内，有MLN4924浓度依赖性的磷酸化CHK1（即CHEK1）蛋白蓄积现象，这说明DNA损伤修复机制是依赖ATM/ATR信号通路的。胞内其它与DNA损伤有关的分子标志物的水平也会增高。不过，细胞凋亡究竟是由DNA损伤导致还是因为NAE酶抑制造成的其它改变而导致的还需要进一步的实验研究加以证实。

研究人员观察到的细胞S期紊乱现象很有可能是MLN4924特异性的抑制NAE酶造成的，因为使用siRNA抑制胞内NAE酶的表达也能引起细胞同样的S期变化。更重要的是，虽然NAE酶抑制剂和蛋白酶体抑制剂都能引起细胞凋亡，但蛋白酶体抑制剂不会造成DNA再复制或DNA损伤。使用MLN4924处理其它细胞，例如人肺癌细胞Calu-6及H460、人卵巢癌细胞SKOV-3、人结肠癌细胞DLD-1、人前列腺癌细胞CWR22和人淋巴瘤细胞OCI-LY19等，都会造成细胞S期紊乱现象的发生。虽然各种细胞对MLN4924的敏感程度不同，但MLN4924对各种细胞作用的机制都是相同的。值得注意的是，未发生转化的乳腺上皮细胞MCF10A增殖时就会对MLN4924表现出极高的敏感性，这与进入复制周期的细胞对NAE酶抑制剂造成的再复制现象更加敏感的理论是非常吻合的。

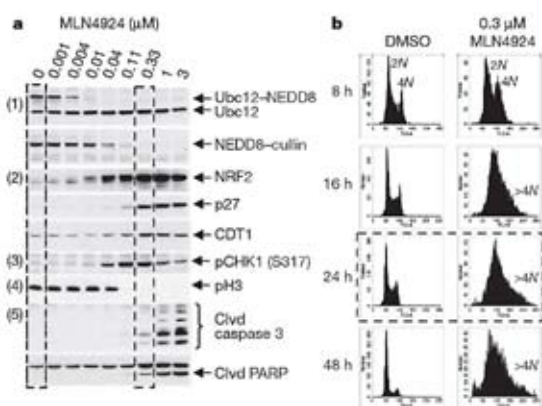


图3 NEDD8信号通路被抑制会引起细胞S期紊乱、DNA损伤以及细胞凋亡。
a: 用免疫印迹的方法检测经MLN4924处理24小时后的HCT-116细胞裂解液中：（1）Ubc12-NEDD8、NEDD8-cullin；（2）CRL底物、NRF2、p27和CDT1；（3）DNA损伤分子标志物磷酸化CHK1；（4）有丝分裂分子标志物pH3；（5）凋亡分子标志物，剪切的caspase 3和PARP等的含量。b: 使用流式细胞仪检测经DMSO或0.3 μM的MLN4924分别处理8小时、16小时、24小时和48小时后含有>4N DNA的HCT-116细胞数。

体内试验中MLN4924同样表现出NAE酶抑制活性

为了检测MLN4924能否在体内同样表现出对NAE酶的抑制活性，研究人员使用移植有HCT-116肿瘤细胞的小鼠进行了实验。他们采用皮下给药方式，分别使用10mg/kg、30 mg/kg和60 mg/kg剂量的MLN4924进行试验，在给药后24小时内的不同时间点收取肿瘤细胞进行检测。研究人员分别检测了细胞中的NEDD8-cullin、NRF2和CDT1蛋白的水平（图4a-c），结果发现在给药后1~2小时内药效是最强的。同时还发现，就药效来说，使用10mg/kg的用药剂量和使

用60mg/kg的用药剂量差别是非常明显的， $P<0.01$ 。而使用10mg/kg的用药剂量和使用30mg/kg的用药剂量差别就没有这么明显， $P=0.11$ ；同样，使用30mg/kg的用药剂量和使用60mg/kg的用药剂量差别也没有这么明显， $P=0.24$ 。MLN4924会引起胞内时间、剂量依赖性的NRF2蛋白和CDT1蛋白水平增高（图4b和c）。对于所有3种不同的给药剂量来说，NRF2蛋白的峰值出现在给药后2~4小时，在给药后4~8小时峰值开始下降。相比之下，CDT1蛋白出现峰值的时间稍晚，出现在给药后4小时左右（图4c）。在用30mg/kg的用药剂量和使用60mg/kg的用药剂量给药后8小时，胞内代表DNA损伤的磷酸化CHK1蛋白含量开始增高（图4d）。值得一提的是，MLN4924也能减少正常小鼠组织内（小鼠骨髓细胞）的NEDD8-cullin含量。总体来说，上述实验结果表明，MLN4924在体内和体外试验中都表现出了很好的NAE酶抑制剂活性。

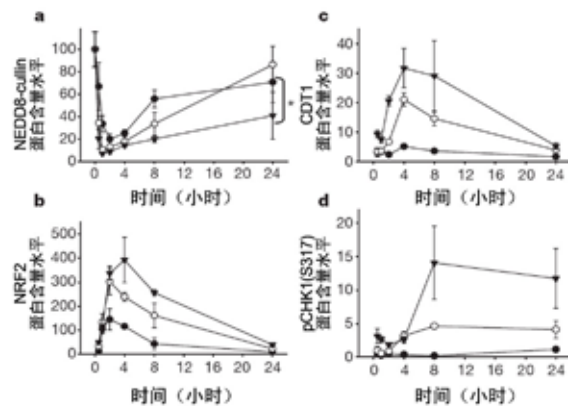


图4 在抑制有人肿瘤细胞的小鼠体内，MLN4924也能抑制NEDD8信号通路，导致人肿瘤细胞DNA损伤。分别给予移植有HCT-116肿瘤细胞的小鼠10mg/kg（实心圆）、30 mg/kg（空心圆）和60 mg/kg（实心三角）剂量的MLN4924进行试验，如图中所示时间点收取肿瘤细胞。使用定量免疫印迹法检测每20ug肿瘤细胞裂解液中的NEDD8-cullin水平（a）和NRF2水平（b），使用免疫组化法检测细胞中CDT1蛋白（c）和磷酸化CHK1蛋白（d）水平。

MLN4924能抑制抑制肿瘤细胞的生长

为了评价MLN4924的抗肿瘤活性，研究人员采用皮下移植了人肿瘤细胞的裸鼠进行了实验，检测给药后其对肿瘤生长速率造成的影响。他们采取皮下给药的方式，对移植有HCT-116人肿瘤细胞的小鼠一天一次（QD）或一天两次（BID）给予MLN4924进行治疗，在治疗结束时评价药物对肿瘤生长率的影响（即T/C，用经药物治疗后的肿瘤平均体积/对照组肿瘤平均体积）（图5）。一天两次给药，给药剂量为30mg/kg和60mg/kg的T/C值分别为0.36和0.15（ $p<0.001$ ）（图5a）。一天给药一次，给药剂量为30mg/kg和60mg/kg同样也能起到明显的抑癌作用，T/C值分别为0.49（ $p<0.001$ ）和0.3（ $p<0.001$ ）。值得注意的是，每天给药总剂量相同，产生的抗癌效应就相同，例如按60mg/kg剂量，每天给药一次和按30mg/kg剂量，每天给药两次，即每天给药总剂量均为60mg/kg，这两种方法得到的抑癌作用是相似的。试验还发现，减少给药次数也不会减弱抗癌效果。如图5b中所示，研究人员使用两种给药方法，一种是给药两天，停药5天，共治疗3个周期；另一种是给药5天，停药5天，共治疗2个周期。这两种疗法的T/C值分别为0.36（ $p<0.001$ ）和0.23（ $p<0.001$ ）。以60mg/kg剂量，每天给药一次，给药两天，停药5天，共治疗3个周期这种疗法也能取得不错的抗癌效果，T/C值为0.57， $p<0.01$ 。试验小鼠对在试验中使用的各种给药剂量以及给药方法都表现出了非常好的耐受性，所有小鼠用药治疗结束后平均体重减少都不到10%。

他们还使用移植了人肺癌细胞H522细胞的小鼠检测了MLN4924的抗癌活性（图5c）。每天给药两次，分别使用30mg/kg、60mg/kg和90mg/kg的给药剂量，在治疗后的第14天，T/C值分

别为0.36、0.04和0.02, $p < 0.001$ 。其中给药剂量为60mg/kg和90mg/kg的所有试验小鼠体内的肿瘤细胞均完全消退。使用人肺癌Calu-6细胞进行的实验也得到了类似的结果。所有这些实验都证明, MLN4924对于移植有人肿瘤细胞的小鼠均具有治疗作用, 采用不同的给药剂量或给药次数也不会影响疗效。

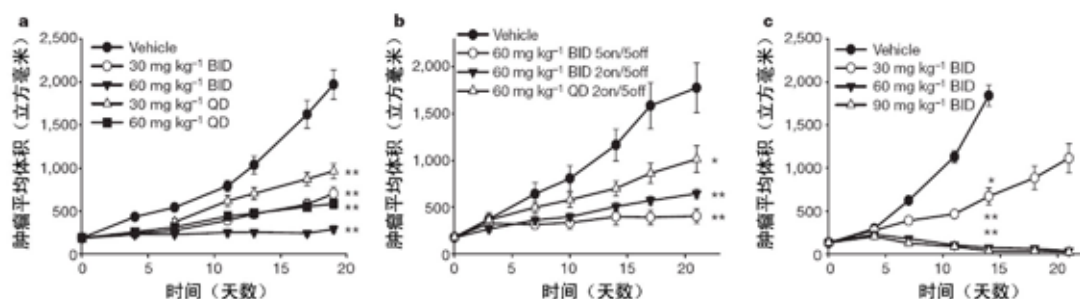


图5 使用移植有各种人肿瘤细胞的小鼠检测MLN4924的抗癌效果。a, b使用的是HCT-116细胞, c使用的是H522细胞, 分别按照图中所示的给药方案皮下给予对照试剂和MLN4924。(5on/5off: 给药5天再停药5天, BID: 一天给药两次, QD: 一天给药一次, vehicle: 对照。)

结论

本文介绍了MLN4924这种新型的小分子NAE酶抑制剂, 它能特异性地针对UPS系统, 具有治疗癌症的作用。MLN4924能完全阻断细胞内目前可检测到的各种NAE通路, 干扰CRL底物的转归(降解), 对于细胞周期进程和细胞存活具有非常重要的影响力。研究发现, 特异性地阻断NAE酶通路相比阻断蛋白酶体通路而言, 能更加特异性地干扰肿瘤细胞的内环境稳态, 这一点对于临床治疗以及用药安全性来说至关重要。持续的NAE通路抑制能导致细胞发生细胞周期依赖性的DNA再复制, 最终激活细胞凋亡机制, 导致肿瘤细胞死亡。这种再复制可能是由胞内CRL底物CDT1蛋白因为降解障碍从而在胞内蓄积造成的, 这一点通过胞内高表达CDT1蛋白也能诱导再复制发生试验所证实。同样, 使用RNAi抑制NAE酶的表达或者通过温度敏感突变细胞株抑制NAE酶的活性也能造成类似现象的发生。

在体内试验中, 研究人员发现MLN4924能抑制移植至小鼠体内的人体肿瘤细胞的生长, 并且小鼠对MLN4924表现出了很好的耐受性。他们用实验证实了MLN4924的这种抗癌效应是由于NEDD8通路被抑制而造成的, 这提示我们, 可以借助该通路中的标志物监测使用MLN4924治疗的患者体内NAE酶受抑制的情况。所有这些发现都有助于尽快将MLN4924这种新型抗癌药推向临床, 造福更多的患者。

原文出处:

Teresa A. Soucy, Peter G. Smith, Michael A. Milhollen etc. (2009) An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*, Vol 458:732-737.

 YORK/编译

注: 更多关于蛋白质泛素化的内容, 请登陆生命奥秘网页www.lifeomics.com阅读。