

Procaspase-3 小分子激活剂的研究进展

倪欣, 黄坤, 马俊杰* (华侨大学医学院, 分子药物教育部工程研究中心, 福建 泉州 362021)

摘要: Caspase-3 作为细胞凋亡通路的下游关键执行蛋白, 在细胞凋亡信号传导中扮演着重要的角色。开发直接通过激活高表达状态的 procaspase-3 成为 caspase-3, 进而重启肿瘤细胞凋亡的小分子药物, 已成为克服中/上游凋亡蛋白突变的有效策略。目前, 以 procaspase-3 为靶点已经报道了一些特异性小分子激活剂, 至今还没有上市药物, 开发直接激活 procaspase-3 的新型药物仍然是一项重要和艰难的挑战。本文介绍了 procaspase-3 与肿瘤之间的关系及小分子 procaspase-3 激活剂的研究进展。

关键词: procaspase-3; 抗肿瘤; 小分子激活剂; 细胞凋亡

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)03-0368-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.03.023

引用本文: 倪欣, 黄坤, 马俊杰. Procaspase-3 小分子激活剂的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3): 368-371.

Research Progress of Procaspase-3 Small Molecule Activators

NI Xin, HUANG Kun, MA Junjie* (Medical College of Huaqiao University, Engineering Research Center of Molecular Medicine of Ministry of Education, Quanzhou 362021, China)

ABSTRACT: Caspase-3 plays a very important role in the apoptotic cascade as the downstream key executioner caspase. Identification of small molecules that restart the apoptosis of tumor cells by directly activating over-expression procaspase-3 to active caspase-3 has become an effective strategy for overcoming the mutation of the middle/upstream apoptotic protein. Currently, some procaspase-3 small molecule activators have been reported, but no marketed drugs are available so far. The development of procaspase-3 activator remains an important and difficult challenge. In this article, the relationship between procaspase-3 and tumor and the research progress of procaspase-3 small molecule activators were introduced.

KEYWORDS: procaspase-3; antitumor; small molecule activator; apoptosis

恶性转化的肿瘤细胞是由于其失控生长、过度增殖引起的, 从细胞凋亡的角度分析, 肿瘤的发生和发展是由于其凋亡机制受到抑制而不能正常进行细胞死亡清除的结果^[1]。因此, 针对细胞凋亡机制设计小分子药物, 特异性激活肿瘤细胞凋亡, 已经成为增加肿瘤敏感性、提高疗效研究的主要内容。

1 procaspase-3 的生物学功能和意义

目前, 细胞凋亡的途径主要有 2 条^[2-3]: 一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase, 又称外部死亡受体途径; 另一条通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 caspase, 又称内部线粒体途径, 两条途径共同作用于凋亡关键执行蛋白——半胱天冬蛋白酶(caspase-3)。正常情况下, caspase-3 以

procaspase-3 形式存在, 当 procaspase-3 接收到凋亡信号后, 被催化裂解成为 caspase-3, 进而诱导细胞凋亡, 见图 1。近年来, 针对细胞凋亡通路的中/上游关键蛋白, 相继报道了大量的凋亡诱导类抗肿瘤小分子化合物, 如 Bcl-2 抑制剂、P53-MDM2 抑制剂、XIAP 抑制剂等。然而, 当上述凋亡蛋白发生突变时, 凋亡信号将不能被正确传送至下游关键执行蛋白 caspase-3 上, 从而引起凋亡机制紊乱, 最终导致不能进行正常细胞凋亡。因此, 寻找小分子化合物直接作用于凋亡通路的下游关键蛋白, 能有效地克服由于中/上游凋亡蛋白突变带来的凋亡抑制, 从而达到重启细胞凋亡的目的。研究已证实, 在很多肿瘤细胞中, 由于凋亡受到抑制, 导致 procaspase-3 呈现高度表达的状态, 如:

基金项目: 国家自然科学基金项目(81602970); 福建省自然科学基金项目(2017J01143); 华侨大学科研启动项目(15BS415)

作者简介: 倪欣, 女, 硕士 Tel: (0595)22690323 E-mail: 317867644@qq.com *通讯作者: 马俊杰, 男, 博士, 硕导 Tel: (0595)22690323 E-mail: majunjie3612@hqu.edu.cn

淋巴瘤^[4]、白血病^[5]、黑色素瘤^[6]、神经母细胞瘤^[7]、肝癌^[8]、肺癌^[9]、乳腺癌^[10]和结肠癌^[11]等。更值得一提的是, caspase-3 属于细胞凋亡的下游关键执行蛋白, 与肿瘤的发生和发展有着密切的关系。因此, 直接激活 procaspase-3 成为 caspase-3, 重启肿瘤细胞凋亡, 不仅能消除中/上游凋亡蛋白突变带来的凋亡抑制作用, 同时还能提高肿瘤治疗的特异性。目前, procaspase-3 已逐渐成为肿瘤治疗的重要候选靶标之一。

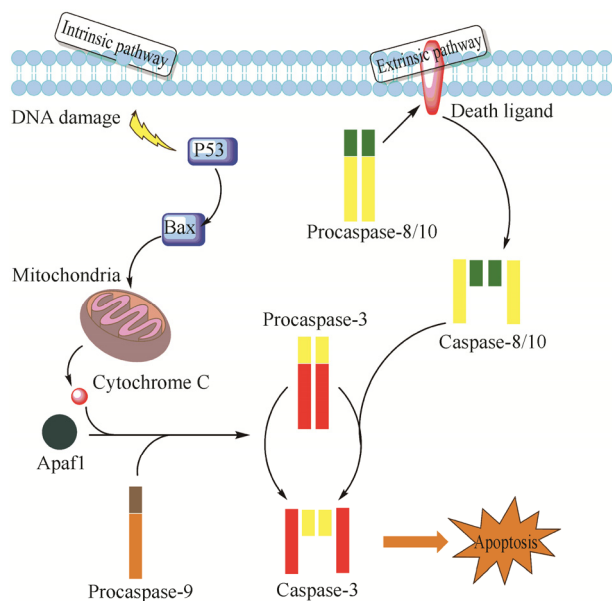


图1 凋亡的主要途径

Fig. 1 Main pathway of apoptosis

2 Procaspase-3 小分子激活剂的分类及研究进展

尽管 caspase-3 与肿瘤治疗关系密切, 但已发现的直接激活 procaspase-3 的小分子化合物较少, 至今仍没有上市药物。近年来, 随着计算化学、结构生物学、细胞生物学等技术的飞速发展, 加速了 procaspase-3 蛋白相关活化机制的研究。目前, 关于小分子化合物激活 procaspase-3 的机制主要阐述为 2 类: I 类是锌离子螯合机制, 即小分子化合物通过与金属锌离子螯合, 以缓解锌介导的凋亡抑制作用, 从而激活 procaspase-3 成为 caspase-3, 诱导肿瘤细胞凋亡, 见图 2(左); II 类是小分子化合物通过与 procaspase-3 蛋白的变构位点结合诱导蛋白变构成为稳定的 procaspase-3 活性构象, 该活性构象不仅能直接诱导细胞凋亡, 同时能促进自身裂解成为成熟的 caspase-3, 进一步诱导细胞凋亡, 见图 2(右), 目前由于其变构位点未详细研究清楚, 限制了变构激活剂的设计与开发。

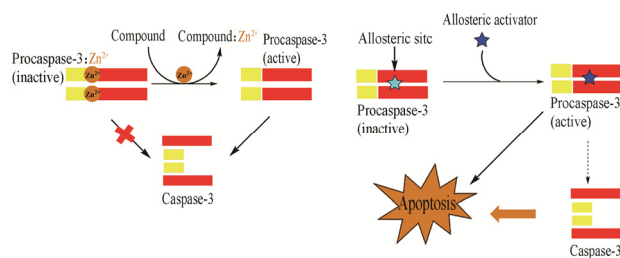


图2 Procaspase-3 激活剂的 2 类主要机制

Fig. 2 Two main mechanisms of procaspase-3 activator

2.1 通过与锌离子螯合的 procaspase-3 小分子激活剂

第一个激活半胱氨酸-天冬氨酸蛋白水解酶原化合物(procaspase-activating compound-1, PAC-1)是 Putt 等^[11]通过高通量筛选得到的第一个直接激活 procaspase-3 成为 caspase-3 的小分子化合物。机制研究表明, PAC-1 能与金属锌离子 1:1 螯合^[12], 以缓解锌介导的凋亡抑制作用, 从而激活 procaspase-3, EC_{50} 值为 $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。目前, PAC-1 处于临床 I 期研究阶段。

在后续的研究中, 基于 PAC-1 的锌离子螯合机制和抗肿瘤活性中心, PAC-1 类似物相继被报道^[13], 见图 3。如 Peterson 等^[14]针对 PAC-1 的神经毒性, 在 PAC-1 的苯环上引入磺胺基团以增大分子的极性, 降低分子通过血脑屏障的能力, 从而减少其神经毒性, 设计合成得到磺酰胺衍生物 S-PAC-1; Cheng 等^[15]将哌嗪环替换为 1,4-二氮杂庚烷得到 SM-1, 研究表明, SM-1 的渗透性高, 在肠道内吸收良好, 且吸收机制主要以被动扩散为主, 不受转运蛋白外排作用影响; Zaman 等^[16-17]修饰 PAC-1 苄基端合成得到的 B-PAC-1, 研究表明, B-PAC-1 能在耐药和敏感的多发性骨髓瘤细胞株中诱导细胞凋亡; Wang 等保留了抗肿瘤的活性, 在分子两端引入带有柔性链芳杂环结构设计得到的 WF-210^[18]和 WF-208^[19]; Strand 等^[20]为了进一步提高锌离子螯合作用筛选得到的 ZnA-DPA 和 ZnA-Pyr; 近期 Roth 等^[21]针对 PAC-1 的代谢位点报道了一系列 PAC-1 类似物, 其中化合物 1 和 2 不仅延长了半衰期, 同时也提高了生物利用度; 本课题组在前期研究中报道了一类含苯并噻唑结构取代 2-羟基苯甲醛缩氨基脲类小分子化合物^[22-23]。其中, 优选化合物 3 和 4 在体外对 procaspase-3 表现出显著的激活作用, 其 EC_{50} 值均优于阳性对照 PAC-1, 目前正处于进一步的开发中。

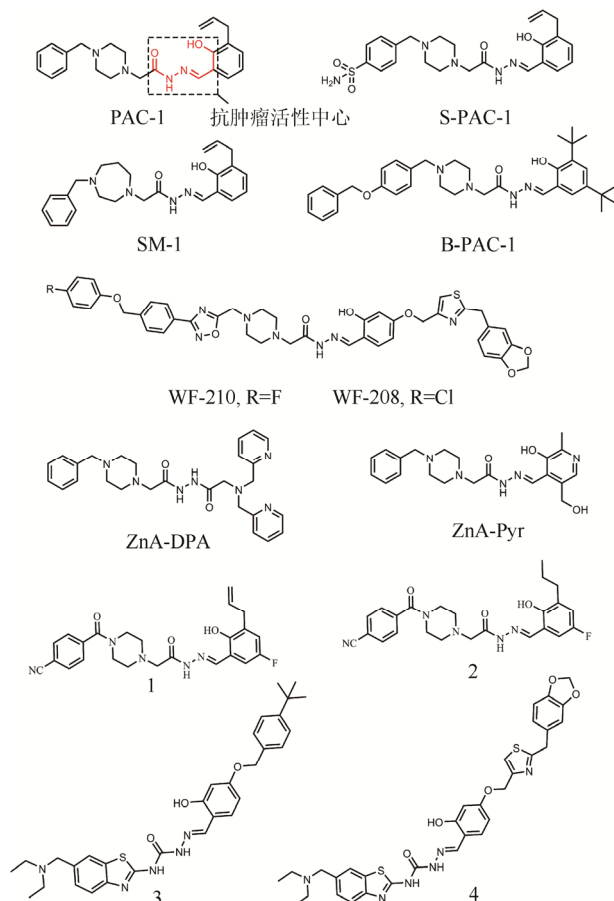


图 3 通过与锌离子螯合的 procaspase-3 激活剂

Fig. 3 Structures of procaspase-3 activators via Chelating with zinc

2.2 通过与 procaspase-3 蛋白靶向结合的小分子激活剂

相比较于锌离子螯合机制类 procaspase-3 激活剂, 直接通过与 procaspase-3 蛋白靶向结合从而激活 procaspase-3, 不仅能够消除与锌离子螯合带来的影响, 同时 procaspase-3 在很多肿瘤细胞中的高表达状态也能增强激活剂对肿瘤细胞的选择性。

Wolan 等^[24]通过高通量筛选得到了一系列显著激活 procaspase-3 的香豆素类衍生物(1541 系列), 见图 4。其中化合物 1541B 活性最强, EC₅₀ 值为 1.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。进一步研究表明, 1541B 能通过自组装形成纳米纤维, 与 procaspase-3 蛋白结合, 进而激活 procaspase-3。同时, 1541B 与 PAC-1 联合给药研究表明, 联合给药后能够有效地整合 2 种激活途径带来的 caspase-3 激活效应, 显著增强肿瘤抑制作用^[25]。

化合物 42 是由 Clark 等^[26]针对 procaspase-3 可能的变构位点进行虚拟筛选时发现的含磺酰胺基团的小分子化合物。体外酶活性研究表明, 化

合物 42 能轻度激活 procaspase-3 活性。进一步分子模拟研究表明, 化合物 42 的磺酰基能与蛋白上的酪氨酸形成氢键作用, 同时, 分子一端的二乙基实体能嵌入到结合位点一侧的疏水口袋中, 另一端的二乙基实体则向疏水空腔外伸展, 见图 5(左)。

近期研究发现, PAC-1 在锌离子缺失的体系中, 也能增强成熟 caspase-3 蛋白的催化活性^[27]。这一证据表明, PAC-1 不仅能通过与锌离子螯合来激活 procaspase-3 成为 caspase-3, 并且还有可能通过与 caspase-3 蛋白变构结合位点作用变构调节 caspase-3, 稳定其活性状态以增强其活性。分子模拟研究表明, PAC-1 的酰胺和哌嗪结构上的氮原子可能与 caspase-3 蛋白变构结合位点上的关键氨基酸残基 Glu124 形成氢键作用进而诱导蛋白变构, 最终增强 caspase-3 的催化活性, 见图 5(右)。

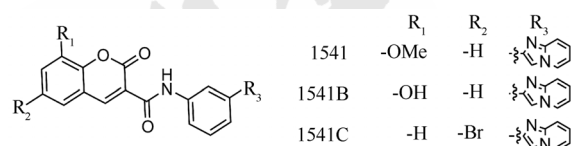


图 4 1541 系列化合物的结构

Fig. 4 Structures of 1541 series

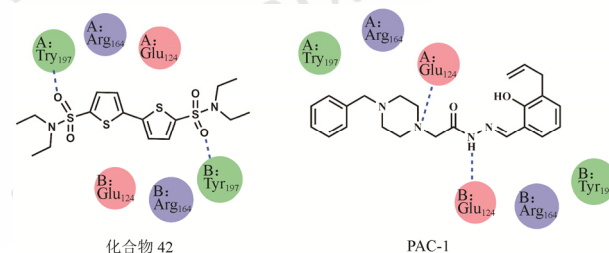


图 5 化合物 42 和 PAC-1 与 procaspase-3 蛋白的分子对接模型

Fig. 5 Structures and molecular docking of compound 42 and PAC-1 with procaspase-3 protein

3 结语与展望

Caspase-3 作为凋亡通路的下游关键蛋白, 在肿瘤的发生发展中扮演着非常重要的角色, 由于肿瘤细胞中的 caspase-3 被抑制, 无法进行正常细胞凋亡, 导致酶原 procaspase-3 呈现高表达状态。基于此, 开发 procaspase-3 激活剂, 重启细胞凋亡已是一条切实有效的肿瘤治疗策略。目前, 针对激活 procaspase-3 的 2 种机制, 其中锌离子螯合机制, 已经报道了大量相关的激活剂; Procaspase-3 蛋白靶向结合机制, 尽管 caspase-3 的生物学功能和意义已经被研究得很清晰, 但是针对 procaspase-3

的变构结合位点依然还没有最终被确定和详细阐述。一些可以直接激活 procaspase-3 的小分子化合物已经被发现，但是这些小分子化合物与 procaspase-3 蛋白的共结晶结构无法得到，导致了配体-受体的作用方式依然还不清晰，这也限制了 procaspase-3 变构激活剂的设计与开发。随着计算化学，结构生物学等学科的飞速发展，procaspase-3 的变构位点将会逐渐被详细阐述，这必将大大推动 procaspase-3 变构激活剂的研究，届时将会出现更多特异性更强的 procaspase-3 小分子变构激活剂，为肿瘤治疗提供一条高效可行的治疗途径。

REFERENCES

- [1] STOREY S, Targeting apoptosis: selected anticancer strategies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(12): 971-972.
- [2] 李敏, 林俊. 细胞凋亡途径及其机制[J]. *国际妇产科学杂志*, 2014(2): 103-107.
- [3] REN L P, LI X J, JING S J. Influence of sophoridine on proliferation and caspase-3/bcl-2/bax signaling pathway of human pancreatic cancer cell line capan-1 cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2017, 34(3): 325-328.
- [4] IZBAN K F, WRONE SMITH T, HSI ED, et al. Characterization of the interleukin-1 β -converting enzyme/ced-3-family protease, caspase-3/cpp32, in hodgkin's disease: lack of caspase-3 expression in nodular lymphocyte predominance hodgkin's disease [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(5): 1439-1447.
- [5] SVINGEN P A, LOEGERING D, RODRIQUEZ J, et al. Components of the cell death machine and drug sensitivity of the national cancer institute cell line panel [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20): 6807-6820.
- [6] FINK D, SCHLAGBAUER WADL H, SELZER E, et al. Elevated procaspase levels in human melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2001, 11(4): 385-393.
- [7] NAKAGAWARA A, NAKAMURA Y, IKEDA H, et al. High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 β converting enzyme(ICE) and CPP32 in favorable human neuroblastomas [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(20): 4578-4584.
- [8] PERSAD R, LIU C, WU T T, et al. Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas [J]. *Mod Pathol*, 2004, 17(7): 861-867.
- [9] KREPELA E, PROCHÁZKA J, LIU X Y, et al. Increased expression of Apaf-1 and procaspase-3 and the functionality of intrinsic apoptosis apparatus in non-small cell lung carcinoma [J]. *Biol Chem*, 2004, 385(2): 153-168.
- [10] O'DONOVAN N, CROWN J, STUNELL H, et al. Caspase 3 in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2): 738-742.
- [11] PUTT K S, CHEN G W, J M PEARSON, et al. Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy [J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(10): 543-550.
- [12] PETERSON Q P, HSU D C, GOODE D R, et al. Procaspase-3 activation as an anti-cancer strategy: structure-activity relationship of procaspase-activating compound 1 (PAC-1) and its cellular co-localization with caspase-3 [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(18): 5721-5731.
- [13] ROTH H S, HERGENROTHER P J. Derivatives of procaspase-activating compound 1 (PAC-1) and their anticancer activities [J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(3): 201-241.
- [14] PETERSON Q P, HSU D C, NOVOTNY C J, et al. Discovery and canine preclinical assessment of a nontoxic procaspase-3-activating compound [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(18): 7232-7241.
- [15] JI S, LI M Z, WEN Z, et al. Development and validation of a simple HPLC assay for the quantitation of SM-1, a novel derivative of the PAC-1 anticancer agent, and an initial pharmacokinetics study in rats [J]. *Anal Meth*, 2015, 7(22): 9562-9567.
- [16] ZAMAN S, WANG R, GANDHI V. Targeting executioner procaspase-3 with the procaspase-activating compound B-PAC-1 induces apoptosis in multiple myeloma cells [J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(11): 951-962.
- [17] SARKAR A, BALAKRITHNAN K, CHEN J, et al. Molecular evidence of Zn chelation of the procaspase activating compound B-PAC-1 in B cell lymphoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 3461-3476.
- [18] WANG F Y, WANG L H, ZHAO Y F, et al. A novel small-molecule activator of procaspase-3 induces apoptosis in cancer cells and reduces tumor growth in human breast, liver and gallbladder cancer xenografts [J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(8): 1640-1652.
- [19] WANG F, LIU Y, WANG L, et al. Targeting procaspase-3 with WF-208, a novel PAC-1 derivative, causes selective cancer cell apoptosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(8): 1916-1928.
- [20] ÅSTRAND O A H, AZIZ G, ALI S F, et al. Synthesis and initial *in vitro* biological evaluation of two new zinc-chelating compounds: comparison with TPEN and PAC-1 [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(17): 5175-5181.
- [21] ROTH H S, BOTHAM R C, SCHMID S C, et al. Removal of metabolic liabilities enables development of derivatives of procaspase-activating compound 1 (pac-1) with improved pharmacokinetics [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(9): 4046-4065.
- [22] MA J, CHEN D, LU K, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of novel benzothiazole derivatives bearing the ortho-hydroxy N-carbamoylhydrazone moiety as potent antitumor agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 86: 257-269.
- [23] MA J, ZHANG G, HAN X, et al. Synthesis and biological evaluation of benzothiazole derivatives bearing the ortho-Hydroxy-N-acylhydrazone moiety as potent antitumor agents [J]. *Archiv der Pharmazie*, 2014, 347(12): 936-949.
- [24] WOLAN D W, ZORN J A, GRAY D C, et al. Small-molecule activators of a proenzyme [J]. *Science*, 2009, 326(5954): 853-858.
- [25] BOTHAM R C, FAN T M, IM I, et al. Dual small-molecule targeting of procaspase-3 dramatically enhances zymogen activation and anticancer activity [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(4): 1312-1319.
- [26] SCHIPPER J L, MACKENZIE S H, SHARMA A, et al. A bifunctional allosteric site in the dimer interface of procaspase-3 [J]. *Biophys Chem*, 2011, 159(1): 100-109.
- [27] MATSUO T, YAMADA K, ISHIDA M, et al. Effect of a procaspase-activating compound on the catalytic activity of mature caspase-3 [J]. *Bullet Chem Soc Japan*, 2015, 88(9): 1221-1229.

收稿日期: 2018-04-21

(本文责编: 李艳芳)