

文章编号: 1004-0374(2009)04-0508-05

治疗阿尔茨海默病的早老素/ γ -分泌酶抑制剂和调节剂

陈天睿, 黄雪媚, 崔理立, 张应玖*

(吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130021)

摘要: 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD) 又称老年痴呆症, 是一种中枢神经系统(central nervous system, CNS) 退行性疾病。 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β 42) 被认为在阿尔茨海默病(AD) 的发生、发展过程中起核心作用。A β 42 由 APP 经 β - 和 γ - 分泌酶相继切割产生。 γ - 分泌酶是一个蛋白酶复合体, 早老素(presenilin, PS) 是 γ - 分泌酶的催化组分。因此, 抑制 PS/ γ 分泌酶的活性是治疗 AD 的关键, 因而 PS/ γ 分泌酶也是治疗 AD 的主要靶点。根据这些理论, 人们提出了一些治疗 AD 的新方法, 其中 PS/ γ - 分泌酶抑制剂和调节剂成为近年来人们关注的焦点。

关键词: 阿尔茨海默病; 早老素; γ - 分泌酶; 抑制剂; 调节剂

中图分类号: R741.05, R592 **文献标识码:** A

Inhibitor and regulator of presenilin for Alzheimer's disease

CHEN Tian-rui, HUANG Xue-mei, CUI Li-li, ZHANG Ying-jiu*

(Key Laboratory of Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Alzheimer's disease is a central nervous system (CNS) degenerative diseases. Amyloid β -peptide (A β 42) is strongly responsible for the occurrence and development of Alzheimer's disease (AD). A β 42 peptide is resulted from the sequential proteolytic cleavages of amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretases. γ -secretase is a protease complex, and presenilin (PS) is the catalytic component of γ -secretase complex. Therefore, inhibition of PS or γ -secretase activity is the most effective way to treat AD, accordingly, PS or γ -secretase became a major target for AD treatment. Based on these thoughts, some methods of treating AD are put forward, and the inhibitors and regulators of PS or γ -secretase activity are becoming the focus of attention for the treatment of Alzheimer's disease in recent years.

Key words Alzheimer's disease; presenilin; γ -secretase; inhibitor; regulator

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD) 又称老年痴呆症, 是一种中枢神经系统(central nervous system, CNS) 退行性疾病。迄今大量的研究结果显示: 导致 AD 发生、发展的起始原因和共同通路是脑神经细胞外出现了由 42 个氨基酸构成的大量的 β -淀粉样肽(β -amyloid peptide, A β 42)。A β 42 的寡聚体和进一步形成的淀粉样斑块具有神经毒性, 最终导致 AD。A β 42 是由神经细胞跨膜蛋白——淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP) 经过 β - 和 γ - 分泌酶两步酶切形成的(图 1)。 γ - 分泌酶是一种复合物, 其催化组分是早老素(presenilin, PS),

包括 PS1 和 PS2 两种同源物, 但以 PS1 为主^[1]。PS1 是一种多次跨膜的膜蛋白, 其催化基团 Asp257 和 Asp385 分别位于第 6 和第 7 跨膜区内。最早发现 γ - 分泌酶与 AD 有关是由于 PS 的突变导致的。进一步的研究发现, 当 APP 或 PS/ γ - 分泌酶发生突变时, 可导致 A β 42 的产生增加, 最终导致 AD^[2]。

收稿日期: 2009-04-02; 修回日期: 2009-06-17

基金项目: 吉林省科技厅项目(20070926-02); 吉林大学“985 工程”研究生创新基金资助项目(20080226)

*通讯作者 Tel: 86-431-88498104; E-mail: yingjiu@jlu.edu.cn

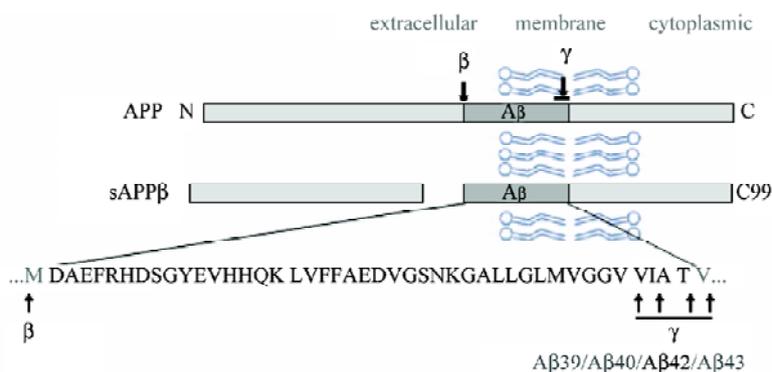


图1 APP经 β -和 γ -分泌酶两步裂解的产物及 γ -分泌酶的裂解位点

阻抑A β 42的产生将有望从根本上治疗AD,因此,与A β 42产生直接相关的 γ -分泌酶被认为是主要的药物靶点。 γ -分泌酶抑制剂是一类能够抑制 γ -分泌酶活性进而抑制其底物在 γ 位裂解的药物。然而,PS/ γ 分泌酶在人体内具有多种生物功能,它的底物除了C99外,还包括如Notch等多种跨膜蛋白,而Notch等的代谢产物是重要的信号分子,单纯抑制PS/ γ -分泌酶的活性部位或催化位点将会引起有害的副反应。因此, γ -分泌酶抑制剂应该是对A β 42的生成具有选择性抑制作用的物质。 γ -分泌酶调节剂是一类能够选择性地调节PS/ γ -分泌酶活性或与底物的结合性,但不抑制其催化活性的物质,近年来已经成为人们研究的主要方向。本文主要阐明了目前已经开发出的 γ -分泌酶抑制剂和调节剂及其性质与功能。

1 治疗AD的PS/ γ -分泌酶抑制剂

第一个对PS/ γ -分泌酶抑制剂体内试验的报道是由Elan和Eli Lilly两家公司发现的双肽化合物DAPT(3,7-二乙酰基-1,3,5,7-四氮杂双环[3,3,1]壬烷)^[3](图2)。这种化合物在细胞中可以有效地抑制A β 42产生,半数抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC₅₀)为115 nmol/L。观察发现,在患有早期AD的APP转基因鼠的脑中,高剂量口服DAPT(100 mg/kg)可以使其A β 42含量下降50%。另有研究发现,皮下注射DAPT 10 mg/kg、30 mg/kg和100 mg/kg时,在血浆和脑脊液中A β 42水平随着化合物浓度的升高而下降,即具有剂量依赖性^[4]。然而,DAPT的缺点是只能使幼鼠脑内A β 42水平有所减少,在成年鼠中仍然能检测到A β 42沉积。

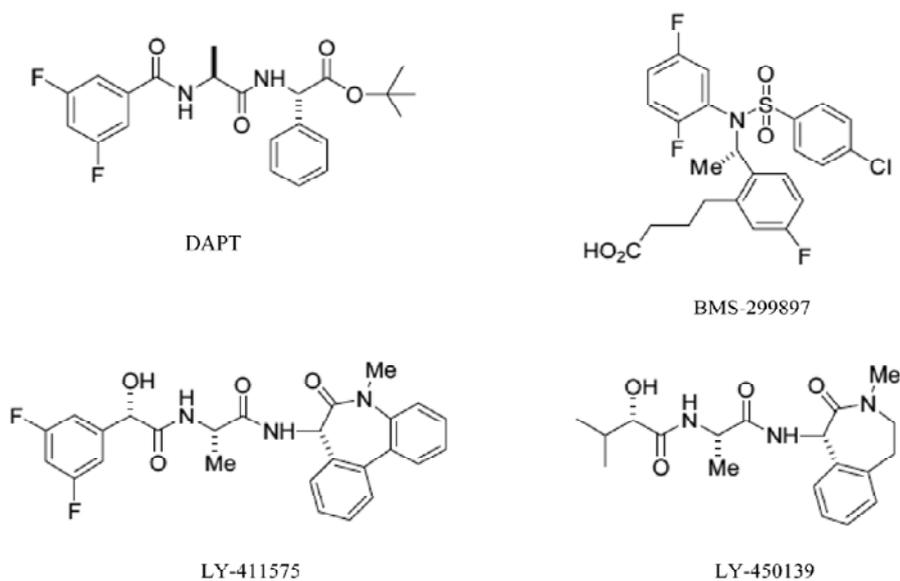


图2 已进行过体内试验的PS/ γ -分泌酶抑制剂^[9]

另一种由BMS (Bristol-Myers Squibb)公司和SIBIA公司生产的A β 42抑制剂氨苯磺胺抑制剂(BMS-299897)(图2),在稳定表达APP的HEK293细胞中可以抑制A β 42地产生,IC₅₀值为7 nmol/L^[5,6]。单独口服这种化合物能使APP转基因鼠脑内A β 42的含量下降,在给药(16 mg/kg)3 h后,血浆中A β 42的含量明显降低。BMS-299897最大的优点是不影响Notch信号途径,而只是选择性地抑制APP的切割过程。对脑内自然产生高水平A β 42的豚鼠(豚鼠被认为与人的A β 42肽具有相同的序列)进行腹腔注射,发现可以减少其脑、血浆和脑脊液中A β 42的含量,在给药3 h后,其半数有效量(50% effective dose, ED₅₀)为30 mg/kg。

近年来发现由Eli Lilly公司根据苯二氮卓类似物发展出来的 γ -分泌酶抑制剂LY-411575和LY-450139(图2)在体内具有很好的抑制PS/ γ -分泌酶的能力^[3,7]。LY-411575是迄今报道的最有效的PS/ γ -分泌酶抑制剂。在过量表达APP的HEK293细胞中抑制A β 42产生的IC₅₀值为119 pmol/L。进一步给鼠单纯口服这种化合物,4 h后发现它可以减少鼠脑脊液和脑中A β 42的含量,ED₅₀值为1.3 mg/kg。在给药10 mg/kg后,发现鼠脑和脑脊液中的A β 42已被完全清除,并且在给药24 h后没有发现A β 42再生。LY-411575虽然能有效降低APP转基因鼠模型中脑、脑脊液和血浆中的A β 42含量,但是同时也可导致胸腺萎缩,以及干扰淋巴细胞和结肠细胞分化,还导致肠上皮细胞坏死和炎症细胞浸润等一系列副作用。

LY-450139的抑制能力比LY-411575低2个数量级(IC₅₀值为15 nmol/L)。虽然如此,但鉴于LY-411575的副作用,LY-450139已经率先进行到临床试验阶段,并且到目前为止,它是惟一一种进行了人体试验的PS/ γ -分泌酶抑制剂。通过对5月龄的APP转基因鼠进行长期的LY-450139给药,发现这种抑制剂可以使全脑的A β 42含量减少,并且减慢A β 42斑块形成的速度,但没有分析脑脊液中A β 42数量的变化。在对健康自愿者进行人体试验时发现,LY-450139的含量达到140 mg时,血浆中A β 42含量减少到原来的72.6%,并且没有引起其他的副作用^[3,8]。由于没有测量脑脊液中A β 42含量的变化,所以还不知道更高剂量的药物是否能降低脑内A β 42含量。将于2012年完成的LY-450139的III期临床试验将最终决定该药物是否能用于阿尔茨海默病的治疗。另外,Eli Lilly公司将通过生物标志物来显示该药物的疗效。采用生物标志物方法可以在

阿尔茨海默病症状出现之前,或对不同的治疗方法进行疗效评定时发挥显著的作用。

2 治疗AD的PS/ γ -分泌酶调节剂

Notch信号转导途径是人和哺乳动物体内一种重要的途径,对许多种细胞的分化至关重要。Notch敲除鼠在胚胎期即死亡^[10]。虽然PS/ γ -分泌酶抑制剂在治疗AD方面有显著的效果,但这些抑制剂也同时抑制了PS/ γ -分泌酶对Notch的加工和Notch信号传导,进而导致毒副作用。由此限制了PS/ γ -分泌酶抑制剂在临床上的应用。对小鼠使用PS/ γ -分泌酶抑制剂LY-411575(10 mg/kg/day)15 d,可引起小鼠严重的胃肠道毒性,并且干扰B和T淋巴细胞的成熟。这些症状事实上是由于抑制了Notch信号途径的结果^[11,12]。基于上述原因,人们开始寻找既能够减少脑内A β 42的产生,从而抑制A β 42寡聚体和纤维结构的形成,同时又不干扰Notch信号途径的PS/ γ -分泌酶调节剂。

最近的研究结果表明某些非固醇类抗炎药(non steroidal anti inflammatory drug, NSAIDs),如布洛芬(ibuprofen)、吲哚美辛(indomethacin)和舒林酸硫化物(sulindac sulfide)(图3),能够抑制A β 42的大量聚集,同时增加A β 38的形成^[13]。

虽然这类药物的作用机制还不清楚,但是它们调节APP蛋白水解、降低A β 42的生成量和增加A β 38生成量的效果已经得到广泛的证实^[14]。基于这个原因,相对于阻断活性位点或停泊位点的抑制剂而言,这些化合物用于治疗AD显得更安全。最近,一种名为R-flurbiprofen(R-氟比洛芬)的化合物已在美国进入III期临床试验阶段。然而,这种非常有潜力的药物和其他能降低A β 42生成量的药物目前所面临的问题是缺少对它们准确药效的评价,这对更好地了解这些化合物如何发挥作用是十分重要的^[15]。

近年来的研究发现PS/ γ -分泌酶包含一个核苷酸结合部位,并且这个部位允许PS/ γ -分泌酶调节APP和Notch的加工。尽管这个规律在生理学方面的机理还不明确,但是它在药理学方面具有广泛的应用前景。根据这个研究成果,人们开发出另一类PS/ γ -分泌酶调节剂,它可以和PS/ γ -分泌酶复合物上的核苷结合位点(nucleotide binding site)相互作用。(Gleevec)(格列卫)就是其中很具有代表性的药物,它可以在细胞中选择性地抑制A β 42产生而不影响Notch蛋白水解^[16]。研究者发现这类药物可以选择性地增加以APP为底物的蛋白水解而不影响Notch及其类似物的蛋白水解^[17]。

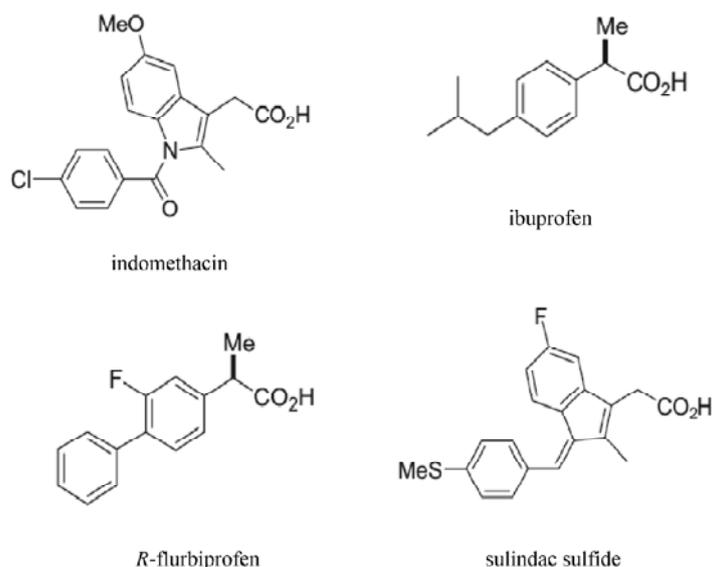


图3 能够选择性调节 $A\beta_{42}$ 产生的非固醇类抗炎症药(NSAIDs)^[9]

过去几年里, 两种此前被寄予厚望、原本预计能够治疗阿尔茨海默病的药物最终却以失败告终。2007年8月, Neurochem公司宣布, 此前设计用来与 $A\beta_{42}$ 蛋白酶结合, 阻止斑块形成的药物Tramiprosate, 在美国所做的最后一期临床试验中以失败告终^[18]。2008年6月, Myriad Genetics公司宣布, 由于III期临床数据显示Tarenflurbil对阿尔茨海默病患者没有任何效果, 因此暂缓了Tarenflurbil的开发^[19]。

但是这些挫折并没有阻止其他公司继续努力, 他们通过其他途径来开发治疗AD的药物。英国牛津大学的Gordon Wilcock教授认为: “虽然已经完成的临床试验数据是消极的, 但这并不是阿尔茨海默病中淀粉样蛋白这项研究的终点, 因为我们在临床试验中正采取其他的策略治疗AD。”

Bapineuzumab就是其中之一, Bapineuzumab为人源化抗 $A\beta_{42}$ 的单克隆抗体, 可结合并消除AD患者脑内沉积的 $A\beta_{42}$ 。Elan和Wyeth公司在ICAD上提交了一份让人喜忧参半的报告。这两家公司所提交的报告称, 在有229名患者参加的II期临床试验中, Bapineuzumab这一原本被设计用来清除脑中的 $A\beta_{42}$ 的人源化单克隆抗体在改善人的认知功能方面显现出了绝对的优势。但是, 对数据分析之后发现, 该药物能导致载脂蛋白E4(Apolipoprotein E4, ApoE4)缺失, 而这种蛋白的缺失, 能增加阿尔茨海默病发作的风险。美国哈佛医学院神经病学家Dennis Selkoe说: “我的看法是, Bapineuzumab的

II期临床数据强有力地支持了III期临床试验的设计。III期临床试验是4组大规模的临床试验, 4100名ApoE4基因型阿尔茨海默病患者将参与这项临床试验。” III期临床试验结果将于2010年公布。

除了对Bapineuzumab的疗效存在疑问之外, 该药物的安全性也值得关注。与空白组的零发生率相比, 对照组中有12名患者发生了血管源性水肿。美国神经疾病中心、哈佛大学医学部、布里格姆女子医院的Selkoe认为这并不是一个严重的问题。他认为: “安全性已经足够了, 因为血管源性水肿是可以控制的, 而且这种不良反应在ApoE4阴性的患者中发生率更低, 而且这些在极少数患者身上体现出的副作用并不是永久的, 在这些患者的磁共振成像中只出现了一次性的血管源性水肿。” 但仍有许多分析家对于该药物能否克服疗效和安全性问题持怀疑态度^[20]。

Prana生物技术公司的PBT2同样获得了令人瞩目的结果^[21]。该药物主要是通过干扰 $A\beta_{42}$ 与锌和铜地结合, 从而阻止淀粉样斑块的形成。在有78名患者参加的为期12周的II期临床试验中, PBT2组患者脑脊液中的斑块明显减少, 并且与空白对照组相比, 那些服用高剂量药物的患者的认知功能有了显著的改善。

3 展望

在过去的十年里, 我们对于PS/ γ -分泌酶及其在AD中所扮演的角色的认识有了显著提高。PS的调节位点可使我们选择性地抑制或者调解APP的水

解过程,而不影响 Notch 信号转导途径,寻找到这样的抑制剂是一种治疗 AD 的有效方法。目前已上市的治疗 AD 的药物已有 20 多种,III 期临床试验的药物将近 20 种,可见世界各国对开发治疗 AD 药物的重视。我国在开发 AD 药物方面,主要从中草药入手,已取得了可喜的成绩;但与国际上关于天然药物对 AD 疾病的研究仍有很大的差距。中药复方研究与西药比较仍面临不少困难,如化学分子结构、稳定性不明确,有效成分监测手段未建立,药理疗效不能量化,毒副作用无定量测定等等。但近年来的研究已取得相当的进展,相信不久的将来能推出一批有效的中药复方,并且中药复方的药效学研究能与国际接轨。由于 AD 是多因素复杂性疾病,任何一种西药可能只具有有限的作用,而复方中药具有药物多靶位作用,其治疗效果可能更好。相信随着研究手段的发展、动物模型的完善以及众多科学家的参与,预计在不远的将来,人们对 AD 相关分子机理的研究将取得重大的突破,从而为预防和治疗 AD 奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Xu GW. Transmembrane structure and catalytic mechanism of presenilin 1. *Chn J Biochem Mol Biol*, 2007, 23(11): 894-8
- [2] XU GW, Wang JP, Huang XM. Assembly of γ -secretase for production of β -amyloid. *Chn Bull Life Sci*, 2007, 19(2): 214-9
- [3] Siemers ER, Quinn JF, Kaye J, et al. Effects of a γ -secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology*, 2006, 66(4): 602-4
- [4] Lanz TA, Himes CS, Pallante G, et al. The γ -secretase inhibitor N-[N-(3, 5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester reduces A β levels *in vivo* in plasma and cerebrospinal fluid in young (plaque-free) and aged (plaque-bearing) Tg2576 mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 305(3): 864-71
- [5] Barten DM, Guss VL, Corsa JA, et al. Dynamics of β -amyloid reductions in brain, cerebrospinal fluid, and plasma of β -amyloid precursor protein transgenic mice treated with a γ -secretase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(2): 635-43
- [6] Anderson JJ, Holtz G, Baskin PP, et al. Reductions in β -amyloid concentrations *in vivo* by the γ -secretase inhibitors BMS-289948 and BMS-299897. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(4): 689-98
- [7] Best JD, Jay MT, Otu F, et al. Quantitative measurement of changes in amyloid- β (40) in the rat brain and cerebrospinal fluid following treatment with the γ -secretase inhibitor LY-411575[N²-[(2S)-2-(3, 5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N¹-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6, 7-dihydro-5H-dibenzo[b, d]azepin-7-yl]-L-alaninamide]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 313(2): 902-8
- [8] Siemers ER, Dean RA, Friedrich S, et al. Safety, tolerability, and effects on plasma and cerebrospinal fluid amyloid- β after inhibition of γ -secretase. *Clin Neuropharmacol*, 2007, 30(6): 317-25
- [9] Wolfe MS. Inhibition and modulation of γ -secretase for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 2008, 5(3): 391-8
- [10] Shen J, Bronson RT, Chen DF, et al. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell*, 1997, 89(4): 629-39
- [11] Searfoss GH, Jordan WH, Calligaro DO, et al. Adipsin, a biomarker of gastrointestinal toxicity mediated by a functional γ -secretase inhibitor. *J Biol Chem*, 2003, 278(46): 46107-16
- [12] Wong GT, Manfra D, Poulet FM, et al. Chronic treatment with the γ -secretase inhibitor LY-411, 575 inhibits β -amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 12876-82
- [13] Weggen S, Rogers M, Eriksen J. NSAIDs: small molecules for prevention of Alzheimer's disease or precursors for future drug development? *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28(10): 536-43
- [14] Okochi M, Fukumori A, Jiang J, et al. Secretion of the Notch-1 A β -like peptide during Notch signaling. *J Biol Chem*, 2006, 281(12): 7890-8
- [15] Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, et al. NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target γ -secretase and lower A β 42 *in vivo*. *J Clin Invest*, 2003, 112(3): 440-9
- [16] Netzer WJ, Dou F, Cai D, et al. Gleevec inhibits β -amyloid production but not Notch cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(21): 12444-9
- [17] Fraering PC, Ye W, LaVoie MJ, et al. γ -secretase substrate selectivity can be modulated directly via interaction with a nucleotide-binding site. *J Biol Chem*, 2005, 280(51): 41987-96
- [18] Santa-Maria I, Hernández F, Del Rio J, et al. Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. *Mol Neurodegener*, 2007, (2): 17
- [19] Wilcock GK, Black SE, Hendrix SB, et al. Efficacy and safety of tarenflurbil in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomised phase II trial. *Lancet Neurol*, 2008, 7(6): 483-93
- [20] Grundman M, Black RE. 03-04-05: Clinical trials of bapineuzumab, a β -amyloid-targeted immunotherapy in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dementia*, 2008, 4: T166
- [21] Lannfelt L, Blennow K, Zetterberg H, et al. Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting A β as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 2008, 7(9): 779-86