

DOI: 10.13376/j.cbls/2017080

文章编号: 1004-0374(2017)06-0589-11

Trk激酶与肿瘤发生的关系 及其小分子抑制剂的研究进展

王 田¹, 毛伟峰¹, 吴燕华^{2*}

(1 上海药明康德新药开发有限公司生物部, 上海 200131; 2 复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

摘 要: Trk 是一类神经生长因子激活的酪氨酸激酶家族, 包括 TrkA、TrkB 和 TrkC 3 个亚型, 分别由 *NTRK1* (neurotrophic receptor tyrosine kinase 1)、*NTRK2* 和 *NTRK3* 基因编码。Trk 激酶被磷酸化后, 能够激活下游信号分子, 从而起到调节细胞增殖、分化、代谢、凋亡等作用。*NTRK* 基因可以与其他基因发生融合, 导致 Trk 激酶的高表达或者 Trk 激酶活性持续升高, 最终可能引起癌症的发生。近几年来, Trk 激酶的小分子抑制剂作为一种新的癌症治疗手段, 进入人们的视线, 这些化合物对 *NTRK* 基因融合的癌症患者有显著的治疗效果。现总结了 Trk 激酶的结构及生理功能, 以及 *NTRK* 基因融合与肿瘤发生的关系; 同时列举了 10 多种近十几年来研究发现的 Trk 激酶抑制剂, 并讨论了其分子抑制的机制以及未来的发展方向。

关键词: 原肌球蛋白相关激酶; Trk 激酶抑制剂; 分子抑制机制

中图分类号: R730.23; R979.19 文献标志码: A

Roles of tropomyosin-related kinases in tumorigenesis and their small molecular inhibitors

WANG Tian¹, MAO Wei-Feng¹, WU Yan-Hua^{2*}

(1 Biology Department, WuXi AppTec, Shanghai 200131, China;

2 School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract: Tropomyosin-related kinases (Trks) are a group of receptor tyrosine kinases which are regulated by neurotrophins, including 3 members TrkA, TrkB and TrkC, encoded by the genes *NTRK1*, *NTRK2* and *NTRK3* respectively. Many cellular functions, for example, cell proliferation, cell differentiation, metabolism and apoptosis are mediated by Trks through phosphorylation and regulation of their downstream substrates. Gene fusions involving *NTRK* genes result in continuous activation or overexpression of these kinases, which increase the risk of tumor genesis. Inhibition of Trks becomes a novel potential cancer therapy. A few of inhibitors have entered clinical trials in recent years and showed significant therapeutic effects in patients harboring *NTRK* gene fusions. In this article, we summarize the structures and biological functions of Trks, their relationship with *NTRK* gene fusions in tumorigenesis. Meanwhile, a couple of small molecular inhibitors against Trks and their molecular mechanism of inhibition are introduced.

Key words: tropomyosin-related kinases (Trks); Trk inhibitor; molecular mechanism of inhibition (MOI)

原肌球蛋白相关激酶 (tropomyosin-related kinase, Trk) 是一类神经生长因子受体, 其家族由高度同源性的原肌球蛋白相关激酶 A (tropomyosin-related kinase A, TrkA)、原肌球蛋白相关激酶 B (TrkB)、原

收稿日期: 2016-11-18; 修回日期: 2016-12-22

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31000558); 上海市教委“晨光”计划(2012年)

*通信作者: E-mail: yanhuawu@fudan.edu.cn

肌球蛋白相关激酶 C (TrkC) 组成, 分别由 *NTRK1*、*NTRK2* 和 *NTRK3* 编码。Trk 激酶与细胞增殖、分化、代谢、凋亡等密切相关。

1 Trk 激酶结构、相关神经因子及组织分布

Trk 激酶都有一个同源保守的结构区域, 该结构区域从 N 末端到 C 末端, 分别包括 5 个细胞外结构域、1 个跨膜结构域和 1 个细胞内的激酶结构域 (图 1A)。在胞外 5 个结构域中, 结构域 1 和 3 为半胱氨酸富集区; 结构域 2 为亮氨酸富集区, 位于结构域 1 和 3 之间; 结构域 4 和 5 都是类似免疫球蛋白的结构, 其中结构域 5 为配体特异性识别的位点^[1-2]。与多数酪氨酸激酶类似, 二聚化导致 Trk 激酶的自磷酸化, 从而被激活, 活性显著上升, 进而磷酸化细胞内的下游分子 (图 1B)。

与 TrkA 结合的神经生长因子以神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 和神经营养因子 7 (neurotrophin-7) 为主, 另外还包括神经营养因子 6 (neurotrophin-6); 与 TrkB 结合的神经生长因子包括脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和神经营养因子 4/5 (neurotrophin-4/5); 而 TrkC 特异性地和神经营养因子 3 (neurotrophin-3) 结合^[3-4]。

TrkA 在交感神经、三叉神经、背根神经节、前脑和终脑皮层的胆碱能神经元中高度表达; TrkB 在整个中枢神经和周围神经系统中都高度表达; 而 TrkC 主要在哺乳动物的神经中枢组织中表达。Trk

激酶受体在人体非神经组织中也广泛分布, 如在唾液腺、胃、肠、胰腺、骨髓、肾上腺、前列腺、卵巢、子宫、骨髓肌等器官中都能发现 TrkA 或者 TrkB 的表达, TrkC 与 TrkA 的分布模式类似, 但是表达量比 TrkA 少很多; 而在神经系统中, TrkC 与 TrkB 的表达分布类似, 所以, TrkC 在神经类和非神经类组织中的表达有明显的差异^[5-6]。

2 信号通路

以 NGF 与 TrkA 结合为例, 阐述 TrkA 的细胞信号通路 (图 2^[7])。TrkA 激酶通过二聚化来自磷酸化特定的酪氨酸位点, 从而被激活, 进而激活下游的信号通路, 包括 Ras/MAPK、PI3K/AKT 和 PLC γ 通路。

2.1 Ras/MAPK 通路

当配体 NGF 与 TrkA 激酶结合后, 连接蛋白 SHC 的 SH2 结构域与 TrkA 蛋白序列 Y490 位点结合, 参与信号的传递。SHC 能够与生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, Grb2) 结合, Grb2 能够同时与 SHC、鸟苷酸交换因子 (son of sevenless, SOS) 结合形成 SHC-Grb2-SOS 复合物, SOS 与受体或者受体底物蛋白上的酪氨酸磷酸化位点结合导致细胞质蛋白 SOS 向膜转位, 并在小 G 蛋白 Ras 附近形成高浓度的 SOS, SOS 与 Ras-GDP 结合, 促使 GTP 取代 Ras 上的 GDP, 使 Ras 由失活态转变为活化态, 启动 Ras 通路。Ras 作为其上游衔接蛋白, 以高亲和力与 Raf N 端的两个区域结合后, 将 Raf 从胞浆转移到胞膜, 在胞膜上 Raf 被

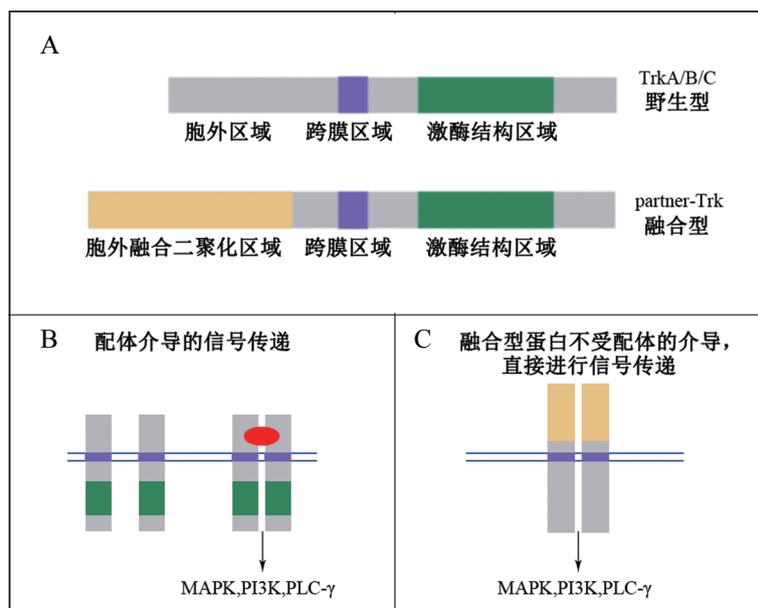


图1 Trk 激酶结构以及信号传递^[2]

激活。Raf 被激活后, 它的 C 端催化区域与 MEK 结合, 并使其催化区域的两个丝氨酸位点磷酸化, 使 MEK 被激活。活化的 MEK 通过其 N 端区域与胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 直接连接, 催化 ERK 的酪氨酸和丝/苏氨酸残基双特异性磷酸化, 激活 ERK。ERK 一旦被激活, 将会继续激活其下游许多位于胞浆和核内的靶蛋白, 其中最重要的胞浆底物是核糖体蛋白激酶 (ribosomal s6 kinase, RSK) 家族。RSK 可作用于多种底物, 包括转录因子 CREB、C/EBP β 和 Fos, 结构蛋白 L1 钙调蛋白, 细胞周期蛋白 Myt1、Bub1 以及参与细胞存活的蛋白 BAD 和调节自身活性的 14-3-3 蛋白、PEA-15 蛋白等。RSK 与这些底物的作用可调节细胞内信号级联反应, 建立胞内结构或直接参与分化过程。接头蛋白 SH2B 与 TrkA 位点 Y674 结合, SH2B 和 APS 蛋白亦可以作用于 Grb2, 激活 Ras-MAPK 信号通路, 诱导细胞分化, 而且这一过程与 TrkA 和 SHC、PLC- γ 1 的结合是独立的^[7-9]。

2.2 PI3K/AKT通路

Gab 蛋白家族 (Grb2-associated binder) 是一类接头蛋白家族, 因能与 Grb2 直接偶联而得名, Gab 能够介导 PI3K-AKT 信号的传递。上游衔接蛋白 Ras 亦可以激活磷脂酰肌醇 3- 激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)。PI3K 能够催化磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 生成磷脂酰肌醇 -3,4 二磷酸 (phosphatidylinositol-3,4-biphosphate, PIP2) 和磷脂酰肌醇 -3,4,5 三磷酸 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PIP3), 它们是细胞内重要的第二信使, 将信号传递给下游蛋白, 如 AKT/PDK1。AKT 又称蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 其 PII 结构域可以与脂质产物 PIP2 及 PIP3 高亲和力结合, 不仅导致 AKT 从细胞质到细胞膜发生转位, 还可促使其构象发生改变, 从而得以在丝氨酸/苏氨酸位点磷酸化被激活。活化的 AKT 进一步激活下游的因子, 如叉头盒转录因子 O 亚家族 (forkhead box protein class O, FoxO)、结节性硬化复合物 (tuberous sclerosis complex 1/2, TSC1/2)、糖原合成激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 等, 参与糖代谢、蛋白质代谢、脂肪代谢、细胞周期调节、细胞侵袭等一系列活动。它还能够影响细胞转化, 加快细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 促进细胞迁移, 与肿瘤、肾脏类和心血管类疾病的发生发展密切相关^[7]。

2.3 PLC γ 通路

PLC- γ 1 作为 NGF 的触发因子, 通过自身结构

域 SH2 与 TrkA 激酶 Y785 氨基酸位点耦合来参与 TrkA 的膜转位和磷酸化激活。TrkA 被激活后, PLC- γ 1 催化 PIP2 水解产生 PIP3 和二酯酰甘油 (diacylglycerol, DAG) 两种分子作为第二信使。PIP3 触发胞浆内钙离子释放, 提高细胞内钙浓度, 在激活 PKC 过程中与 DAG 起协同作用。DAG 可激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC), PKC 可直接磷酸化 Raf-1, 参与不同细胞功能调节, 如基因表达和细胞增殖、凋亡、迁移等^[10]。

3 Trk激酶与肿瘤发生发展的关系

3.1 Trk激酶与肿瘤发生、增殖的关系

Trk 激酶最初被认为与神经元细胞的生长、分化、凋亡等相关。然而, 近几十年的研究结果表明, Trk 激酶与多种肿瘤的发生、转移和恶化也有密切的关系, 如 Trk 激酶在黑色素瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、甲状腺癌、恶性骨髓白血病 (AML)、恶性胶质瘤、星形细胞瘤、结肠癌等中都存在过表达, 且这种过表达与肿瘤细胞的迁移有密切的关系^[11]。Trk 激酶在恶性肿瘤中通过多种机制激活, 主要是结构重排和表达的改变。Trk 激酶的编码基因 *NTRK* 重排产生嵌合癌基因, 导致 Trk 激酶组成型激活, 不再受到神经生长因子配体的调节和控制, 具有致癌的风险^[2] (图 1C), 如在结肠癌 KML12 细胞中, 位于 1 号染色体长臂上的原肌球蛋白 -3 基因 *TPM3* 与 *NTRK1* 就发生了基因片段重排, *TPM3* 在第 7 号和 8 号外显子之间断裂, *NTRK1* 在第 8 号外显子内部断裂, 然后, *TPM3* 直接和表达胞内结构区域的 *NTRK1* 连接, 异常表达 TPM3-TRKA 嵌合蛋白。这种基因的改变破坏了细胞中配体 NGF 与 TrkA 的相互作用, 胞内 TRKA 处于过度表达和持续激活状态, 而下游的 PI3K/AKT、Ras/MAPK 和 PLC γ 三条信号通路也处于异常活跃状态^[12]。TrkA 抑制剂能够有效抑制 TPM3-TRKA 的自磷酸化, 阻断 MAPK 通路强有力的存活信号^[13]。在分泌性乳腺癌、先天性纤维肉瘤和急性骨髓白血病 (AML) 中, *ETV6-NTRK3* 型的基因融合高频发生。*ETV6* 基因编码 ETS 转录因子家族中的抑制因子, 位于 12 号染色体短臂上, 由 5 个外显子组成。*ETV6-NTRK3* 的基因融合发生在 12 号染色体和 15 号染色体之间, *ETV6* 外显子 1~5 和 *NTRK3* 外显子 15~20 直接拼接在一起。转录因子 ETV6 由螺旋环区域 (HLH) 和中心区域组成, 负责协调同型的 ETV6 分子的寡聚化和蛋白与蛋白之间的相互作用。ETV6 能够激发融

合型 *ETV6-NTRK3* 基因过度表达,使细胞形状改变,出现表面突起,为细胞的迁移提供动力,所以,这种染色体易位导致的基因融合是肿瘤发生的直接原因^[14-15]。类似这样的基因融合还有 *LMNA-NTRK1*、*SQSTM1-NTRK1*、*BCAN-NTRK1*、*NFASC-NTRK1*、*CD74-NTRK1*、*NACC2-NTRK2*、*PAN3-NTRK2*、*VCL-NTRK2*、*AFAP1-NTRK2* 和 *BTBD1-NTRK3* 等^[16]。

越来越多的研究表明,Trk 激酶选择性抑制剂对人类肿瘤细胞的增殖具有明显的抑制作用,而对正常细胞抑制作用较低,Trk 激酶可以作为肿瘤治疗的有效靶点。

3.2 Trk 激酶与肿瘤血管生成的关系

肿瘤血管生成是肿瘤转移发生发展,并最终转移的必要条件。新生成的微血管基底膜不完善,通透性高,不仅为肿瘤组织提供营养,而且为瘤细胞再转移提供了条件。肿瘤血管生成是一个复杂的过程,包括血管内皮基底膜溶解,内皮细胞向肿瘤组

织迁移,内皮细胞沿着迁移路径增生,内皮细胞管化、分支并形成血管袢,形成新的基底膜^[17]。在嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 中进行的体内外研究发现,血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达及在培养介质中的积累显著促进内皮细胞增殖,而 NGF 能够提高 PC12 细胞内 VEGF 的 mRNA 表达水平和蛋白堆积量,NGF 介导的内皮细胞迁移可被 TrkA 抑制剂完全阻断,却不能被 VEGFR 抑制剂所阻断,NGF 通过提高 VEGF 的作用间接促进肿瘤的血管生成,NGF 通过激活 TrkA 受体对内皮细胞迁移具有直接效应^[18]。在腺样囊性癌 (adenoid cystic carcinoma, ACC) 组织中,NGF、VEGF 具有较高阳性表达,且在腺样管状型中的表达率低于实性型,ACC 高表达的 NGF 促进神经纤维周围毛细血管新生,为肿瘤的生长提供营养物质,具有较强的侵袭性^[19]。

NGF 能刺激内皮细胞增殖和迁移,重塑细胞

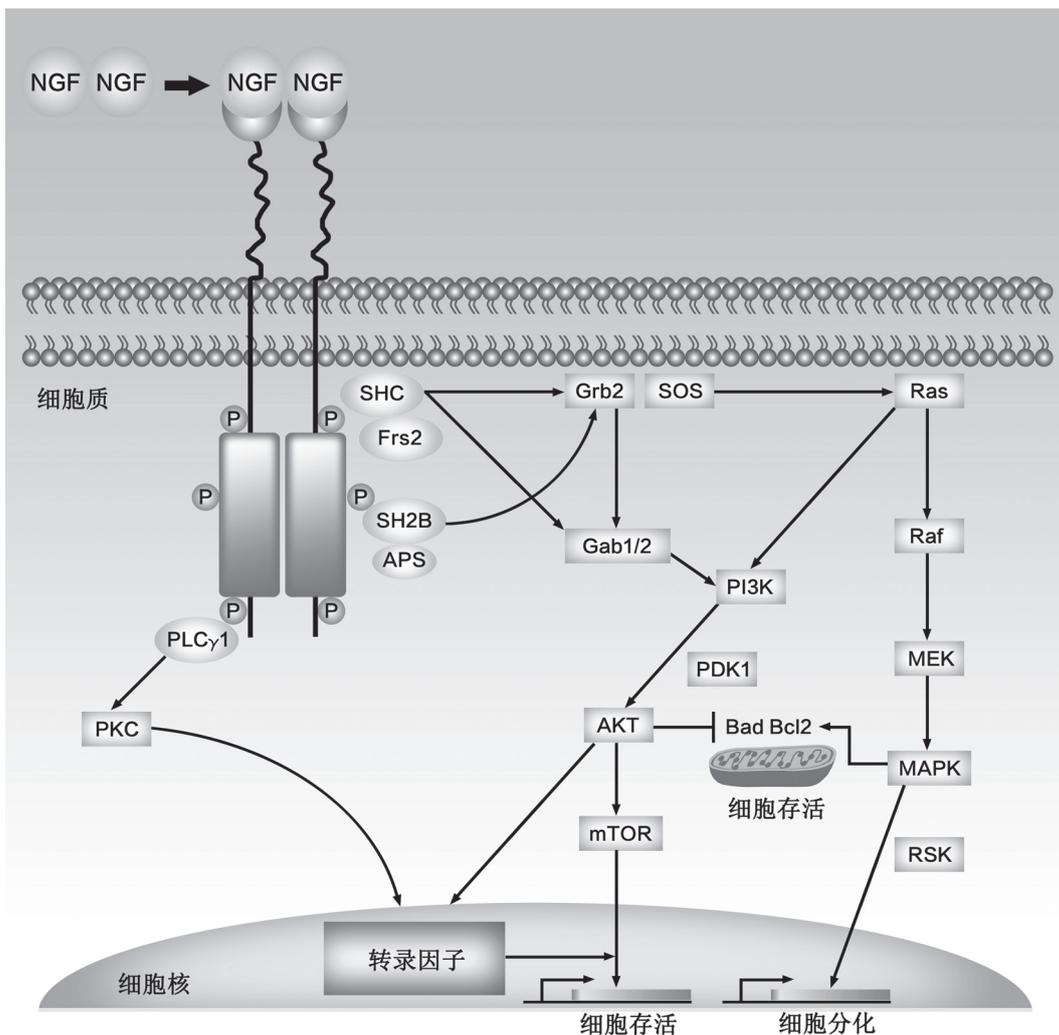


图2 TrkA的信号通路^[7]

外基质和促进新生血管的功能性成熟, 在肿瘤和心血管等疾病等病理性血管生成中起关键作用。

3.3 Trk激酶与肿瘤浸润、转移的关系

神经组织中含有丰富的神经营养因子, 可为肿瘤细胞迁移提供趋化引导信号, 癌细胞的迁移经常沿着神经进行。神经周浸润 (perineural invasion, PNI) 是肿瘤细胞浸润神经间隙或穿破神经外膜进入神经束膜内, 沿着束膜扩展的过程, 通常与肿瘤的不良预后有关^[20]。NGF/TrkA 的作用主要是参与中枢神经系统的分化、发育、生长和修复。在癌细胞中, NGF 其高亲和力受体 TrkA 表达于神经束膜上, 两者之间形成化学趋化和吸引作用, 促进癌细胞向神经迁移, 为癌细胞向 PNI 提供了某种驱动力。有研究发现, 胰腺癌细胞和胰腺癌周神经高表达 NGF/TrkA, 并且有 PNI 组 NGF/TrkA 的表达明显高于无 PNI 组, 提示 NGF/TrkA 参与 PNI 的发生。NGF/TrkA 可形成旁分泌或自分泌信号通路环, 通过激活下游 MAPK 通路, 增强癌细胞有丝分裂, 促进癌细胞增殖、生长, 增强癌细胞的 PNI^[21-22]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 通过降解细胞基底膜, 为癌细胞的浸润和转移提供先决条件, 胰腺癌细胞分泌的 NGF 与神经鞘上的受体 TrkA 相结合导致 MMP-2 高表达并降解基底膜, 促进癌细胞离开原发灶, 增强癌细胞浸润至神经周间隙^[18]。因此, PNI 的机理被认为是: NGF/TrkA 促进癌细胞生长, 抑制癌细胞和神经细胞凋亡; NGF/TrkA 特异性结合诱导癌细胞和神经相向生长, 促进 PNI 的发生。

3.4 Trk激酶的其他作用

Trk 激酶除了作为抗肿瘤药物的靶点之外, 在疼痛的研究治疗中也是一个炙手可热的靶点。研究表明, 抑制 NGF/TrkA 信号通路可以阻断疼痛信号, 已经有相应的药物进入了临床试验阶段, 如辉瑞的 NGF 单抗 Tanezumab 在临床上用于治疗类风湿关节炎痛、慢性背痛等^[23]。

4 Trk激酶抑制剂的分子机制

酪氨酸激酶都拥有一个高度保守的催化核心区域——与 ATP 结合的催化裂口 (catalytic cleft), 由多个亚基折叠成形成一个铰链结构, ATP 的腺嘌呤环通过氢键与铰链区域结合。核糖具有高疏水性, 磷酸基则极易变曲变形, 是亲水且与溶剂结合的区域。Trk 激酶抑制剂的设计思路大部分是通过模仿 ATP 的结构, 与 ATP 竞争结合位点达到抑制激酶催

化活性的目的。

本文总结了近年来临床研究或者基础科学中有代表性的 12 种 Trk 激酶抑制剂, 表 1 中列出了这些抑制剂的名称、分子机构式、靶点及报道的 IC₅₀ 值。

4.1 AZ-23

AstraZeneca 公司的高效选择性 Trk 激酶抑制剂 AZ-23 具有良好的水溶性、口服生物活性。如图 3a 所示, AZ-23 通过吡啶环上的 N 原子与 TrkA 的骨架结构 Glu590 和 Met592 形成氢键, 异丙氧基结构正对着守门氨基酸 Phe589 侧链。吡啶环与侧链上 Leu657 接触, F 原子与骨架结构上 Asn665 C 和 α 螺旋链上 Gly667 N 末端结合, 从而靠近 DFG 结构域。咪啶环 N1 原子在水的作用下与 ATP 结合区域侧链上 Asp596 的 NH 结合, 并没有直接与 TrkA 激酶侧链相连接。AZ-23 中的这种杂环可能是通过吡啶基和咪啶环的部分结构与激酶侧链结合, 以此与 ATP 竞争性结合 ATP 的结合位点^[24]。从数据结果来看, AZ-23 对 Trk 激酶的抑制作用很显著, 在药代动力学研究中, AZ-23 在药物代谢、清除和生物利用率方面结果都让人满意^[25]。希望 AZ-23 吡啶并咪啶的结构可以为 Trk 激酶抑制剂的设计提供一个思路。

4.2 Cpd5n、EX429和GW2580

Cpd5n 是异噻唑系类的衍生化合物, 图 2b 所示是 Cpd5n 与 TrkB 激酶的晶体结构示意图。Cpd5n 以 DFG-in 的构象模式与激酶甘氨酸富集环紧紧结合, 当其与激酶结合之后, 甘氨酸富集环像个盖子一样关闭结合到化合物上, 然后, 通过激酶侧链 Phe565 形成一个强疏水的内部结构。Cpd5n 通过其噻唑甲酰胺被紧紧地固定在 TrkB 的铰链区域, 苯并环庚烯夹在守门氨基酸 Phe633 和甘氨酸富集侧链 Phe565 之间, 这样的结构可能有利于 TrkB 的 DFG-in 结构的稳定性^[26]。Cpd5n 的 R 型对映异构体对 TrkA/B 的抑制效果比 S 型强百倍, 晶体结构能解释这样的结果, S 型结构可能仍然是与 TrkB 的铰链结构结合, 原因是侧链 Phe565 与苯并环庚烯结构可能存在冲突, 使得化合物与 Phe565 不能有利地叠加, 从而很大程度上减弱了抑制作用^[27]。

EX429 与 TrkB 激酶属于 DFG-out 构象的结合方式, 抑制剂通过其噻吩并咪啶的部分结构与 TrkB 的铰链区域结合。EX429 的苯基结构夹在由守门氨基酸 Phe633 和 DFG 结构中的 Phe711 形成的疏水

表1 常见的Trk激酶抑制剂的结构式、靶点及IC₅₀值

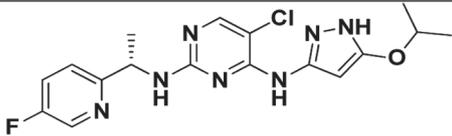
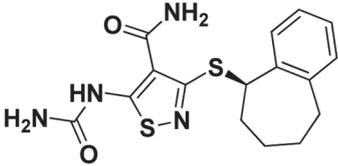
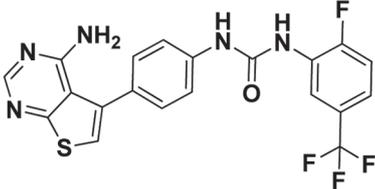
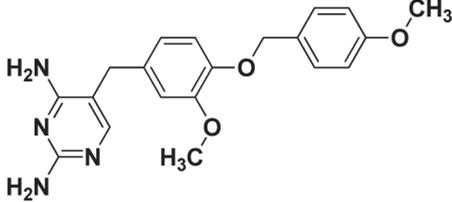
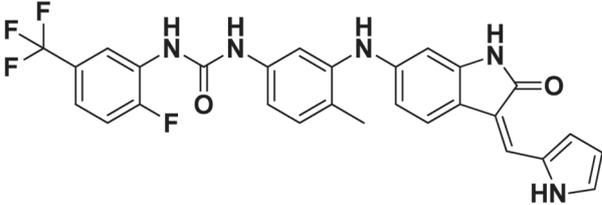
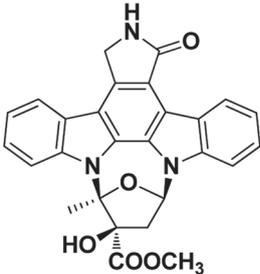
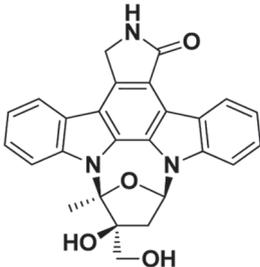
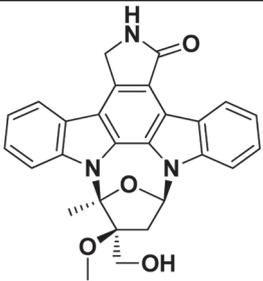
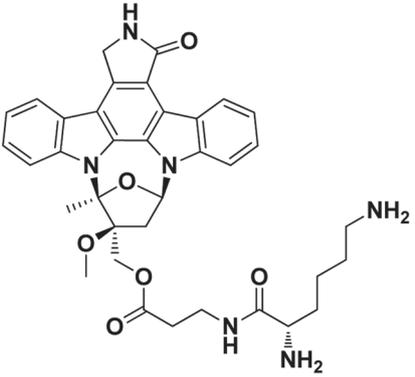
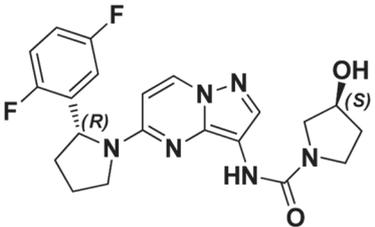
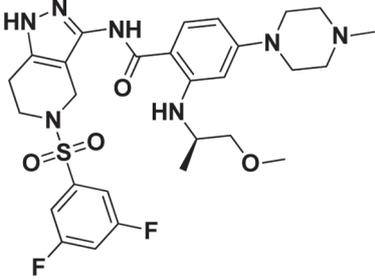
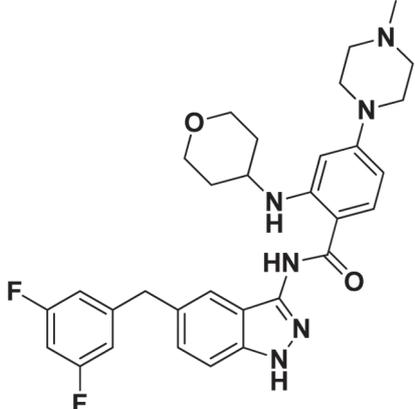
抑制剂	结构式	靶点及IC ₅₀ 值
AZ-23		TrkA: 2 nmol/L TrkB: 8 nmol/L
Cpd5n		TrkA: 4 nmol/L TrkB: 4 nmol/L TrkC: 8 nmol/L
EX429		TrkA: 59 nmol/L TrkB: 12 nmol/L TrkC: 9 nmol/L
GW2580		TrkA: 162 nmol/L TrkB: 38 nmol/L TrkC: 41 nmol/L
GNF-5837		TrkA: 8 nmol/L TrkB: 12 nmol/L TrkC: 7 nmol/L
k252a		TrkA: 25 nmol/L
CEP-701		TrkA: 4 nmol/L TrkB: 4 nmol/L TrkC: 4 nmol/L

表1 常见的Trk激酶抑制剂的结构式、靶点及IC₅₀值(续)

抑制剂	结构式	靶点及IC ₅₀ 值
CEP-751		TrkA: 3 nmol/L
CEP-2563		TrkA: 2 nmol/L TrkB: 8 nmol/L
LOXO-101		TrkA: 2~20 nmol/L TrkB: 2~20 nmol/L TrkC: 2~20 nmol/L
NMS-P626		TrkA: 8 nmol/L TrkB: 7 nmol/L TrkC: 3 nmol/L
Entrectinib (RXDX-101)		TrkA: 1 nmol/L TrkB: 3 nmol/L TrkC: 5 nmol/L

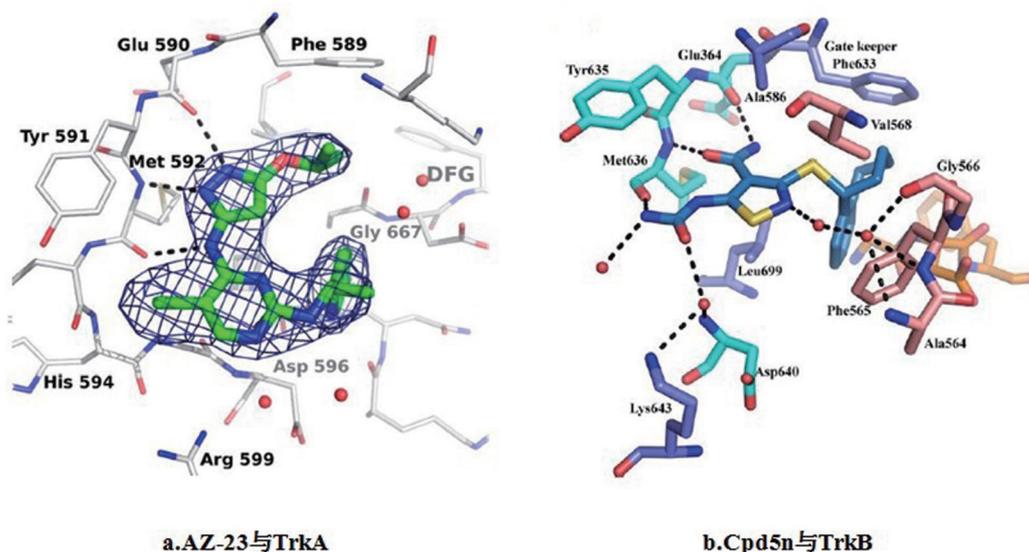


图3 化合物与Trk激酶的晶体结构图^[23,25]

环境区域中，抑制剂苯环上的氟原子与激酶后方的口袋区域结合，三氟原子的苯环直接嵌入由侧链形成的疏水环境中，然而，氟原子指向溶剂结构区域从而形成了很大的极性作用，一个直接的影响就是 α -C螺旋上的Glu604^[26,28]。卤族元素在生物学研究中得到了广泛的应用，这些卤族原子有点类似氢键的作用，因此，EX429中的多元氟原子对其抑制效果有很大的提高。

GW2580与TrkB激酶也是属于DFG-out构象的结合方式，抑制剂苯甲基上的二甲氨基取代苯基从而堆叠在Val617和Phe711侧链之间，与守门氨基酸Phe633形成了T型堆叠的相互作用，两个氧原子同时与Asp710主链相互作用。抑制剂的二氨基嘧啶与铰链残基Glu634和Met636之间形成氢键，并且堆放在Ala586和Leu699之间^[26,29]。

4.3 GNF-5837

GNF-5837是羟吡啶抑制剂的衍生物，能高效抑制TrkA、TrkB和TrkC，对高表达TrkA和NGF的RIE肿瘤小鼠模型有明显的抑制肿块生长，加速肿瘤萎缩变小的效果。在动物体内的药代动力学实验中，采用静脉给药的方法将GNF-5837注射到Balb/c小鼠和Sprague-Dawley大鼠中，数据表明，GNF-5837的药物清除率偏低，药物分布容量在大鼠中比小鼠中的数值高；而采取填喂法口服给药时，GNF-5837在小鼠和大鼠中都表现出稳健的生物利用度。在小鼠脑中发现GNF-5837药物含量低于定量限，表明GNF-5837无法高效穿过血脑屏障。体内药代动力学分析表明，GNF-5837对RIE肿瘤小

鼠模型在100 mg/kg的口服给药量下，可以达到100%抑制肿瘤生长的效果^[30]。由于GNF-5837低渗透、溶解性差从而使药物的吸收效果不理想，科学家们正在尝试改变分子的结构和组成来改善这一不理想的状态，进一步地研究还在进行中。

4.4 K252a、CEP-701、CEP-751和CEP-2563

Cephalon是最早对Trk激酶作为肿瘤药物进行研究的的公司之一，最早进入临床试验阶段的有CEP-701(lestaurtinib)和CEP-751。k252a是在1985年从微生物中分离出来的一种含呋喃糖的吡啶并咪唑类生物碱，对PKC、NGF和cMET均具有抑制活性。Cephalon对k252a的糖环进行修饰得到了一系列具有临床前景的化合物。从临床研究发现，CEP-751能够诱导前列腺癌细胞周期瞬态退化导致癌细胞死亡，而且CEP-751为激素依赖性和激素非依赖性两种前列腺癌治疗方法提供了一个新颖的思路^[31]。CEP-701是CEP-751的口服活性类似物，更适合用于临床研究。在临床研究中，CEP-701主要招募和治疗前列腺癌晚期患者，和促性腺激素释放激素抑制剂联合用药取得了很卓越的临床效果，CEP-701耐受性很好，但有恶心、腹泻、厌食、乏力、便秘和呕吐等不良反应，且不良反应与剂量有关^[32]。CEP-751水溶性很差，将其成酯衍生化得到了CEP-2563，CEP-2563不仅是一种水溶性很好的Trk激酶抑制剂，同时对血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)受体酪氨酸激酶也有抑制作用。目前，CEP-2563已经完成了治疗难治的实体瘤I期临床试验，正在申请II期临床研究，推荐的

II 期临床剂量为 256 mg/(m²·d)^[33]。

4.5 LOXO-101

LOXO-101 是 ARRY-470 的硫酸氢盐化合物, 是一类口服的 ATP 竞争性的小分子 Trk 激酶抑制剂。该抑制剂在激酶谱中选择性好、特异性强。在体外肿瘤细胞研究中, LOXO-101 对 NTRK 基因融合型细胞系 CUTO-3.29 (*MPRIP-NTRK1*)、KM12 (*TPM3-NTRK1*) 和 MO-91 (*ETV6-NTRK3*) 有抑制增殖的作用。在 CUTO-3.29 中, IC₅₀ 小于 100 nmol/L; 在 KM12 和 MO-91 细胞中, IC₅₀ 均小于 10 nmol/L, 结果与 LOXO-101 对 Trk 激酶的抑制活性一致。在 CUTO-3.29 中, LOXO-101 能够抑制 MPRIP-TrkA 和 ERK1/2 的磷酸化; 在 KM12 和 MO-91 细胞中, LOXO-101 分别抑制 TPM3-TrkA 和 TEL-TrkC(由 *ETV6-NTRK3* 编码) 蛋白表达, 对两种细胞下游信号通路中的 AKT、ERK1/2 的磷酸化都有抑制作用。在动物试验研究中, 将 KM12 细胞 (5 × 10⁵) 注射到裸鼠的背部皮下组织, LOXO-101 口服给药, 每天 60 mg/kg 和 200 mg/kg, 给药 2 周。结果显示, LOXO-101 能明显地抑制肿瘤的生长, 在 200 mg/kg 剂量下, 肿块不生长, 且有回缩的现象。在临床研究中, LOXO-101 对 *LMNA-NTRK1* 基因融合型软组织肉瘤转移患者进行治疗, 剂量为 100 mg, 每天 2 次给药。在 4 周时间内, 肺部扫描图像显示, 肉瘤体积明显变小, 癌细胞的转移扩散减缓, 同时患者的呼吸困难也有所改善, 不用辅助提供氧气。4 个月后, 肺部的肿块基本上完全消失, 且在临床治疗期间, 并未发现 LOXO-101 有明显的不良反应^[34]。LOXO-101 在出现 *NTRK* 基因融合的癌症患者中具有持续的效用, 如软组织恶性肿瘤、甲状腺癌、唾液腺癌、胃肠癌、非小细胞癌等, 且该药物不受癌症类型的限制, 令人感到振奋。根据 Loxo Oncology 公司的消息, 截至 2015 年 10 月份, LOXO-101 在治疗 55 名 *NTRK* 基因融合型患者的临床 I 期研究中, 有 30 名患者对 LOXO-101 表现出很好的耐受性, 其余的患者则表现出一些不良反应, 如头晕、恶心、贫血、精神错乱及昏厥等。从 2015 年 10 月开始, LOXO-101 药物的临床 II 期招募 *NTRK* 基因融合的癌症患者, 计划共 151 名, 预计于 2019 年 4 月完成。

4.6 NMS-P626和Entrectinib

NMS-P626 是吡唑嘧啶类的 Trk 激酶抑制剂, 对 TrkA/B/C 的 IC₅₀ 值均小于 10 nmol/L, 对其他的非靶点激酶的抑制作用不明显 (IC₅₀ > 500 nmol/L), 表现出很好的选择性。在 *TPM3-TrkA* 基因融合型的

KM12 细胞中, NMS-P626 的 IC₅₀ 值为 19 nmol/L, 对其他非靶点肿瘤细胞的抑制作用很弱^[12]。NMS-P626 是 entrectinib (RXDX-101, NMS-E628) 的先导化合物, 体内抗肿瘤活性试验中, entrectinib 对由 Trk 激酶、ROS1 或 ALK 驱动的多种人肿瘤荷瘤小鼠模型均有较好的抗肿瘤活性和生物利用度, 且能有效透过血脑屏障^[35-36]。在临床研究中, entrectinib 是目前研究最前沿、效果最显著的 Trk 激酶抑制剂。对 18 名具有 *NTRK1/2/3*、*ROS1* 或 *ALK* 基因重排的实体肿瘤患者进行临床试验研究, 结果表明 72% 的患者对 entrectinib 都有反应, 该统计数据引起了轰动; 2015 年 10 月, entrectinib 已经开始在全球范围内招募 300 名组织病理学或者细胞学明确诊断为局部晚期或者转移性实体肿瘤, 并具有 *NTRK1/2/3*、*ROS1* 基因重排或者 *ALK* 基因突变的患者^[37-38]。在临床研究中, 有一位非小细胞肺癌 4 期的患者体内发现了 *SQSTM1-NTRK1* 基因融合, 且患者体内的癌细胞已经转移到了大脑组织中。在治疗过程中, 该患者每天口服 entrectinib, 剂量为 400 mg/m², 给药 3 周后发现, 患者的呼吸困难和癌性疼痛都有所缓解, 不再需要插管供氧, 血氧饱和度提高, 血浆中的肿瘤标记物指标明显降低; 第 26 天 CT 结果显示, RECIST (response evaluation criteria in solid tumors, 实体瘤的疗效评价标准) 部分缓解 (肿瘤最大直径减少 47%), 脑组织中转移的肿瘤也有部分缓解; 第 155 天肺部的肿瘤缩小了 77%, 且转移的肿瘤完全消失。在连续给药治疗期间, 患者对 entrectinib 未表现出明显的不良反应^[39]。

5 总结与展望

Trk 激酶作为一类神经生长因子受体, 自磷酸化后能够激活下游信号分子, 从而起到调节细胞增殖、分化、代谢、凋亡等作用。*NTRK* 基因融合与多种恶性肿瘤的发生、转移有着密切的关系。Trk 激酶的小分子抑制剂已经在临床上用于肿瘤的研究, 治疗效果显著, 如 LOXO-101 和 entrectinib。这些成果给科学家们更大的信心, Trk 激酶小分子抑制剂在肿瘤治疗方面有着巨大的潜力。相信在今后的研究中, 人们会对 Trk 激酶细胞内信号通路有进一步的认识, 对抑制剂的作用机制有更深入的了解。相信在不远的未来, 会有更多的 Trk 激酶抑制剂进入临床研究, 并且有相关的药物获得新药审批并进入市场。

[参 考 文 献]

- [1] Schneider R, Schweiger M. A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic *trk* and *trkB* tyrosine kinase receptors. *Oncogene*, 1991, 6: 1807-11
- [2] Holden PH, Asopa V, Robertson AG, et al. Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the *TrkA* receptor. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 668-72
- [3] Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*, 1994, 77: 627-38
- [4] Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, et al. The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, 1991, 252: 554-8
- [5] Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the *trk* proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*, 1991, 350: 158-60
- [6] Huang EJ, Reichardt LF. *Trk* receptors: roles in neuronal signal transduction. *Anal Rev Biochem*, 2003, 72: 609-42
- [7] Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, et al. *Trk* receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 3244-50
- [8] Bongarzone I, Pierotti MA, Monzini N, et al. High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene*, 1989, 4: 1457-62
- [9] Rui L, Herrington J, Carter-Su C. SH2-B is required for nerve growth factor-induced neuronal differentiation. *J Biol Chem*, 1999, 274: 10590-4
- [10] Kaplan DR, Stephens RM. Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9: 213-21
- [11] Nakagawara A. *Trk* receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett*, 2001, 169: 107-14
- [12] Ardinia E, Bosottia R, Borgia AL, et al. The *TPM3-NTRK1* rearrangement is a recurring event in colorectal carcinoma and is associated with tumor sensitivity to *TRKA* kinase inhibition. *Mol Oncol*, 2014, 8: 1495-507
- [13] Créancier L, Vandenberghe I, Gomes B. Chromosomal rearrangements involving the *NTRK1* gene in colorectal carcinoma. *Cancer Lett*, 2015, 365: 107-11
- [14] Drilon A, Li G, Dogan S. What hides behind the MASC: clinical response and acquired resistance to entrectinib after *ETV6-NTRK3* identification in a mammary analogue secretory carcinoma (MASC). *Anal Oncol*, 2016, 27: 920-6
- [15] Skálová A, Vanecek T, Simpson RH. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands: molecular analysis of 25 *ETV6* gene rearranged tumors with lack of detection of classical *ETV6-NTRK3* fusion transcript by standard RT-PCR: Report of 4 cases harboring *ETV6-X* gene fusion. *Am J Surg Pathol*, 2016, 40: 3-13
- [16] Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. *NTRK* gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *BMJ*, 2016, 1: 1-9
- [17] Nico B, Mangieri D, Benagiano V, et al. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res*, 2008, 75: 135-41
- [18] Romon R, Adriaenssens E, Lagade C, et al. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol Cancer*, 2010, 9: 3723-31
- [19] Dolle JP, Rezvan A, Allen FD, et al. Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 315: 1220-7
- [20] Marchesi F, Piemonti L, Mantovani A, et al. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21: 77-82
- [21] Liebig C, Ayala G, Wilks JA, et al. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*, 2009, 115: 3379-91
- [22] Indo Y, Mardy S, Miura Y, et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): novel mutations of the *TRKA (NTRK1)* gene, a putative uniparental disomy, and a linkage of the mutant *TRKA* and *PKLR* genes in a family with CIPA and pyruvate kinase deficiency. *Hum Mutat*, 2001, 18: 308-18
- [23] Shun LK, Yan L, Guang ZN, et al. Tanezumab for patients with osteoarthritis of the knee: a meta-analysis. *PLoS One*, 2016, 11:1-17
- [24] Wang T, Lamb ML, Block MH, et al. Discovery of disubstituted imidazo[4,5-b]pyridines and purines as potent *TrkA* inhibitors. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3: 705-9
- [25] Thress K, Macintyre T, Wang H, et al. Identification and preclinical characterization of AZ-23, a novel, selective, and orally bioavailable inhibitor of the *Trk* kinase pathway. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8:1818-27
- [26] Bertrand T, Kothe M, Liu J, et al. The crystal structures of *TrkA* and *TrkB* suggest key regions for achieving selective inhibition. *J Mol Biol*, 2012, 423: 439-53
- [27] Lippa B, Morris J, Corbett M, et al. Discovery of novel isothiazole inhibitors of the *TrkA* kinase: structure-activity relationship, computer modeling, optimization, and identification of highly potent antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 3444-8
- [28] Lu Y, Wang Y, Zhu W. Nonbonding interactions of organic halogens in biological systems: implications for drug discovery and biomolecular design. *Phys Chem Chem Phys*, 2010, 12: 4543-51
- [29] Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 127-32
- [30] Albaugh P, Fan Y, Mi Y, et al. Discovery of GNF-5837, a selective *TRK* inhibitor with efficacy in rodent cancer tumor models. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3: 140-5
- [31] Wang T, Yu D, Lamb ML. *Trk* kinase inhibitors as new treatments for cancer and pain. *Expert Opin Ther Pat*, 2009, 19: 305-19
- [32] Marshall JL, Kindler H, Deeken J, et al. Phase I trial of orally administered CEP-701, a novel neurotrophin receptor-linked tyrosine kinase inhibitor. *Invest New Drugs*, 2005, 23: 31-7

- [33] Undevia SD, Vogelzang NJ, Mauer AM, et al. Phase I clinical trial of CEP-2563 dihydrochloride, a receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with refractory solid tumors. *Invest New Drugs*, 2004, 22: 449-58
- [34] Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A, et al. An oncogenic NTRK fusion in a patient with soft-tissue sarcoma with response to the tropomyosin-related kinase inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov*, 2015, 5: 1049-57
- [35] Sartore-Bianchi A, Ardini E, Bosotti R, et al. Sensitivity to entrectinib associated with a novel *LMNA-NTRK1* gene fusion in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108: 1-6
- [36] Drilon A, Li G, Dogan S, et al. What hides behind the
MASC: clinical response and acquired resistance to entrectinib after *ETV6-NTRK3* identification in a mammary analogue secretory carcinoma (MASC). *Ann Oncol*, 2016, 27: 920-6
- [37] Sciavolino PJ. Tropomyosin receptor kinase (TRK): another promising target in metastatic colorectal cancer. *J Target Ther Cancer*, 2015, 12: 34-7
- [38] Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. *NTRK* gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open*, 2016, 1: 1-9
- [39] Farago AF, Le LP, Zheng Z, et al. Durable clinical response to entrectinib in *NTRK1*-rearranged non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2015, 10: 1670-4