

· 综述 ·

酪氨酸-DNA 磷酸二酯酶抑制剂的研究进展

黄亚辉,董国强,张万年,盛春泉(第二军医大学药学院,上海 200433)

[摘要] 酪氨酸-DNA 磷酸二酯酶 I (tyrosyl-DNA-phosphodiesterase I, Tdp I) 是一个具有催化 3' 磷酸酪氨酸键水解活性的蛋白质,该键在拓扑异构酶 I (topoisomerase I, Top I) 与 DNA 相互作用时就会形成。由于 Tdp I 具有修复 Top I-DNA 复合物、抵消 Top I 抑制剂作用的功能,因而与 Top I 共同被认作是潜在治疗靶标。Tdp I 抑制剂不仅与 Top I 抑制剂(喜树碱类)起到协同作用,还能增强博来霉素、Top II 抑制剂(依托泊苷、多柔比星)以及 DNA 烷化剂作用。综述目前报道的 Tdp I 抑制剂研究进展,重点介绍其作用机制、生物活性及构效关系。

[关键词] 酪氨酸-DNA 磷酸二酯酶 I (Tdp I); 拓扑异构酶 I (Top I); 抗肿瘤药物; 构效关系

[中图分类号] R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)04-0298-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.04.003

Recent advances of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp I) inhibitors

HUANG Yahui, DONG Guoqiang, ZHANG Wannian, SHENG Chunquan (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp I) is a recently discovered protein that catalyzes the hydrolysis of 3'-phosphotyrosyl bonds. Such linkages form *in vivo* during the interaction of DNA and topoisomerase I (Top I). Tdp I has been regarded as a potential therapeutic co-target of Top I because it has the functions of repairing Top I compound and counteracting the effects of Top I inhibitors. Tdp I inhibitors can not only synergize with Top I-targeting drugs (camptothecins), but also strengthen the function of bleomycin, topoisomerase II (Top II) inhibitors (etoposide, doxorubicin) and DNA alkylating agents. We summarized the researching advance of Tdp I inhibitors and focused on the introduction of the mechanism, bioactivity and structure-activity relationship.

[Key words] tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp I); topoisomerase I (Top I); anti-tumor inhibitors; structure and activity relationship

作为一个生命体众多重要细胞过程中的关键酶,真核生物的拓扑异构酶 I (Top I) 通过解开 DNA 双螺旋结构,将存储的基因信息经由复制、转录和修复过程得以释放并发挥作用^[1,2]。机制研究发现,Top I 上酪氨酸 723 的羟基作为亲核基团进攻 DNA 磷酸二酯键,将 5' 末端替代为 3' 末端,形成所谓的“断键复合物”(Top I complex cleavage, Top I cc)^[3,4]。通常情况下,断裂的 DNA 会被迅速缝合,Top I-DNA 断键复合物也只会短暂存在。然而,一旦该复合物被内源性物质(包括胸腺嘧啶二聚体、碱基配对错误、碱基缺失等)或者外源性物质

(包括喜树碱、依托泊苷等)的 DNA 损伤“抓住”,便将长时间存在于细胞中,进而在复制叉与转录复合物相撞后,造成细胞 DNA 破坏^[4,5]。因此,为保证细胞的生存,就必须修复这些损伤。

Top I cc 的修复机制复杂,涉及若干条通路。其中一条涉及到酪氨酸-DNA 磷酸二酯酶 I (Tdp I),它催化 Top I 上酪氨酸基团与 DNA 的 3' 磷酸之间共价键的水解^[6,7]。此外,最近有研究表明 Tdp I 也是碱基修复通路(base excision repair, BER)的一员^[8,9]。多核苷酸激酶磷酸酶(PNKP)和 XRCC1 蛋白质,加上其他 BER 蛋白质,比如 DNA 聚合酶 β 、DNA 连接酶 III 和 PARP-1,形成一个多蛋白 DNA 修复复合物^[10]。Tdp I 与 XRCC1 复合物一起修复 Top I cc。3' 磷酸末端随后被 PNKP 切除,产生 3' 羟基,接着由 DNA 多聚酶 β 代替缺失的 DNA 片段,最后由 DNA 连接酶 III 重新缝合 DNA (图 1)^[11]。更有研究表明,人类 Tdp I 活性位点上

[基金项目] 国家优秀青年科学基金(No. 81222044)

[作者简介] 黄亚辉,硕士研究生。Tel: 18521509547; E-mail: xiaohyh@163.com

[通讯作者] 盛春泉,教授,博士生导师。研究方向:抗感染和抗肿瘤药物化学研究。Tel: (021)81871239; E-mail: shengcq@hotmail.com

纯合子 H493R 突变会导致罕见的常染色体神经退行性疾病——伴轴突性神经病小脑萎缩 (SCAN1)^[12], 这也进一步突出 Tdp I 在中央神经系统中的重要性。尽管 SCAN1 患者并没有表现出明显的细胞功能障碍, 但是 Tdp I 敲除小鼠及 SCAN1 突变细胞都表现出对喜树碱 (CPT) 的高度敏感^[13-16]。而当细胞中 Tdp I 过度表达则会导致 CPT 或者依托泊苷介导的 DNA 损伤减少, 甚至出现耐药性^[17, 18]。

除了 Tdp I 之外, 其他通路同样可以修复 CPT 诱导的 DNA 损伤, 比如 DNA 修复 (XPF、ERCC1、Mre11、CtIP), 同源结合 (BRCA1、BRCA2、CtIP、Mre11、Rad52) 和细胞周期检查点信号传导 (Rad9、BRCA1、BRCA2、p53)^[19]。当这些通路失活, 细胞很可能更多地依赖 Tdp I 修复 CPT 介导的 DNA 损伤。由于很多肿瘤细胞在一条或者多条 DNA 损伤修复通路上存在缺陷, 因此, 抑制 Tdp I 依赖通路, 便可选择性地使得肿瘤细胞比正常细胞对 Top I 抑制剂的敏感度高^[2, 20]。

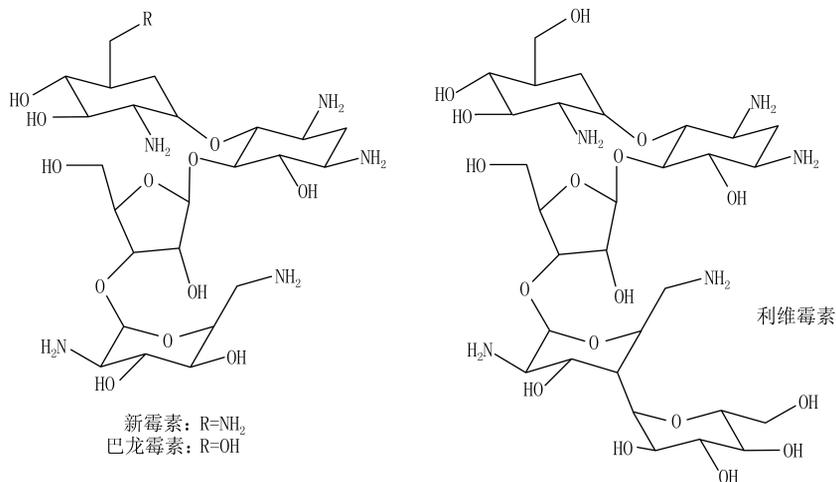


图 1 新霉素、巴龙霉素和利维霉素的结构图

2 四环素类

通过两独立高通量筛选鉴定出包括罗利环素 (rolitetracycline)^[21] 在内的大量四环素化合物, 均可作为 Tdp I 抑制剂的潜在化合物 (图 2)。早期研究结果显示, 四环素类的抑制作用为微摩尔级, 但是缺少明显的构效关系。这类化合物的潜力需要进一步研究。

3 furamidine (NSC 305831)

采用高通量电化学发光分析方法, 对美国国立癌症研究所 (NCI) 发展治疗项目中 1 981 个化合物

在此, 针对目前已记录的 Tdp I 抑制剂, 我们作一简要总结, 并说明该领域需要进一步研究的问题。

1 氨基糖苷类抗生素和核糖体抑制剂

出于 Tdp I 属于磷酸酶 D 超家族一员的缘故, 首先进行 Tdp I 抑制活性测试的便是该家族其他成员的抑制剂 (图 1), 比如新霉素 (neomycin)^[21]。测试重组 Tdp I 酶体外生化活性结果显示, 新霉素能抑制 Tdp I, 但是要求高浓度。其抑制活性比钒酸盐 (公认的磷酸酶常规抑制剂) 还要弱一些。此外, 还测试了新霉素的 2 个衍生物——巴龙霉素 (paromomycin) 和利维霉素 (lividomycin) 的活性^[21], 结果表明它们只有轻微的 Tdp I 抑制活性。考虑到这些氨基糖苷类化合物都是抑制细菌核糖体, 因此对其他的核糖体抑制剂以同样方法进行筛选。所有经测试的氨基糖苷类和非氨基糖苷类抗生素在毫摩尔级均显示出弱的抑制活性。尽管活性并不理想, 机制也不清楚, 但是这为其他 Tdp I 抑制剂的鉴定建立了一个可靠的体外分析系统。

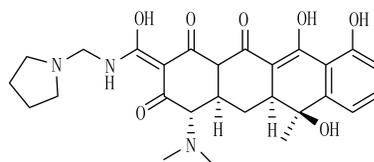


图 2 罗利环素的结构图

进行筛选, 发现了 furamidine (NSC 305831) 在微摩尔浓度下具有 Tdp I 抑制活性 (图 3)^[22]。目前该药作为抗非洲锥虫病正在进行 III 期临床试验。其对单链和双链底物均有效, 不过对双链 DNA 的活性更强一些。表面等离子共振研究表明, furamidine 能够连接 DNA 单链和双链, 尽管单链连接更弱。因

此,对 Tdp I 的抑制活性部分可能是由于 furamidine 连接到 DNA 所致。但是, furamidine 对 Tdp I 的抑制作用依赖底物 DNA 序列。其动力学与药物连接到酶的反应速度和持续时间有关。

另外 2 个联脒化合物——贝尼尔(berenil)和戊烷脒(pentamidine)则活性更弱(图 3)。两者与 furamidine 享有相似的整体弯曲结构,只是中间的连接基团不一样, furamidine 所含的是呋喃环,这暗示呋喃基团对 Tdp I 抑制活性很重要。

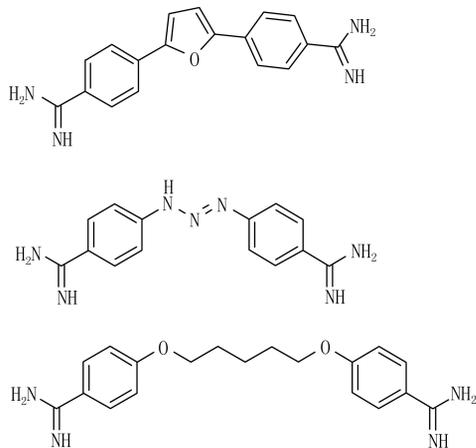


图 3 furamidine、贝尼尔和戊烷脒的结构图

4 磷酸酪氨酸类似物

经高通量筛选得到 2 个有潜在抑制活性的化合物——甲基-3, 4-dephostatin^[23] 和甾体化合物 NSC88915^[24], 作为磷酸酪氨酸底物, 两者具有相似的结构特征(图 4)。前者是芳香胺类衍生物, 带有羟基取代的苯环, 与 Tdp I 底物中连接到酪氨酸基团的磷酸非常相似。后者及其衍生物包含一个连接至甾体的芳磺酰酯基团, 该基团模拟磷酸基, 一边连接到酪氨酸基团, 另一边连接 DNA 寡核苷酸。

构效关系研究表明, dephostatin 与甲基-3, 4-dephostatin 的区别只是芳香环上一个羟基的位置不同, 尽管甲基-3, 4-dephostatin 在亚微摩尔浓度下具有 Tdp I 抑制活性, 但是 dephostatin 则表现出在相同浓度下几乎没有活性。同样, NSC88915 及其 5 个衍生物在结构上只是芳香环对位取代基不同。这 6 个化合物之间的活性差异在 10 倍以内, 但是其他不含芳香环的相关衍生物却完全没有活性。

随后便有研究者运用包括 NSC88915 及其衍生物在内的 14 个人类 Tdp I 抑制剂中的药效团特征作为筛选条件, 对化学导航艾瑞图书馆(Chem Navigatori Research Library)中 2 700 万个可购买样品进行筛选。一共有 46 个化合物符合药效团特征的三维排列, 图 5 列出了其中 8 个^[25]。通过高通量筛

选分析, 鉴定出一个吡啶-3-乙酸衍生物作为潜在的 Tdp I 抑制剂, 其 IC₅₀ 值为 7.94 μmol/L。

总之, 这些结构及其衍生物表现出新的化学结构类型, 并为研发更高活性的 Tdp I 抑制剂提供了骨架。

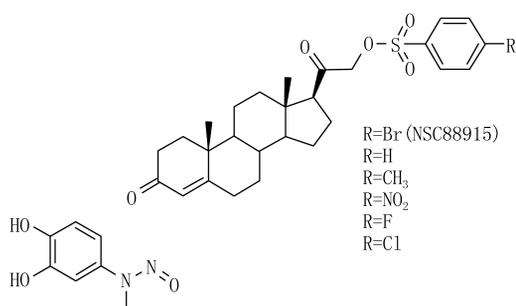


图 4 甲基-3, 4-dephostatin, NSC88915 及其衍生物的结构图

5 JBIR-21

在一种变形的真菌(RF-I3305)培养中, 发现了一个新化合物——JBIR-21(图 6)^[26]。该化合物不仅对 Tdp I 有抑制作用(IC₅₀ = 18 μmol/L), 还对癌细胞株具有毒性作用(IC₅₀ = 3.5~13 μmol/L)。此外, JBIR-21 在小鼠移植瘤模型中还显示出抗肿瘤活性, 而且没有发现副作用。

6 首个 Tdp I-Top I 双重抑制剂

上述介绍的抑制剂均是单靶标抑制剂, 鉴于 Top I 抑制剂的使用容易产生耐药性, 设计合成出一个同时对 Top I 和 Tdp I 具有双重抑制作用的化合物的设想, 在一个多氨基双吡啶异喹啉分子(IC₅₀ = 1.52 ± 0.05 μmol/L)上得以实现(图 7)^[27]。这也是目前已知的第一个具有 Tdp I 和 Top I 双重抑制的分子, 其中化合物 145 是目前已知活性最高的 Tdp I 抑制剂。但是, 构效关系研究发现, 对 NSC88915 活性至关重要的磺酰酯基团在该类分子上不起作用。对先导化合物的优化可以推导出以下结论: ①质子化的氨基和 Tdp I 活性位点之间的电荷互补可能对高效能有用; ②连接氨基和杂环之间的多亚甲基的疏水性对活性也有贡献。

这激动人心的结果具有以下重大意义: ①吡啶异喹啉类分子证明了将 Top I 和 Tdp I 抑制作用融合到一个小分子是可能的, 并且是第一个证据; ②这类化合物的独特结构特征赋予其巨大的操作空间, 使得药动学的可调节性大于其他类 Tdp I 抑制剂; ③为新的双重 Top I-Tdp I 抑制剂提供了先导化合物; ④促进了基于结构的药物设计方法。

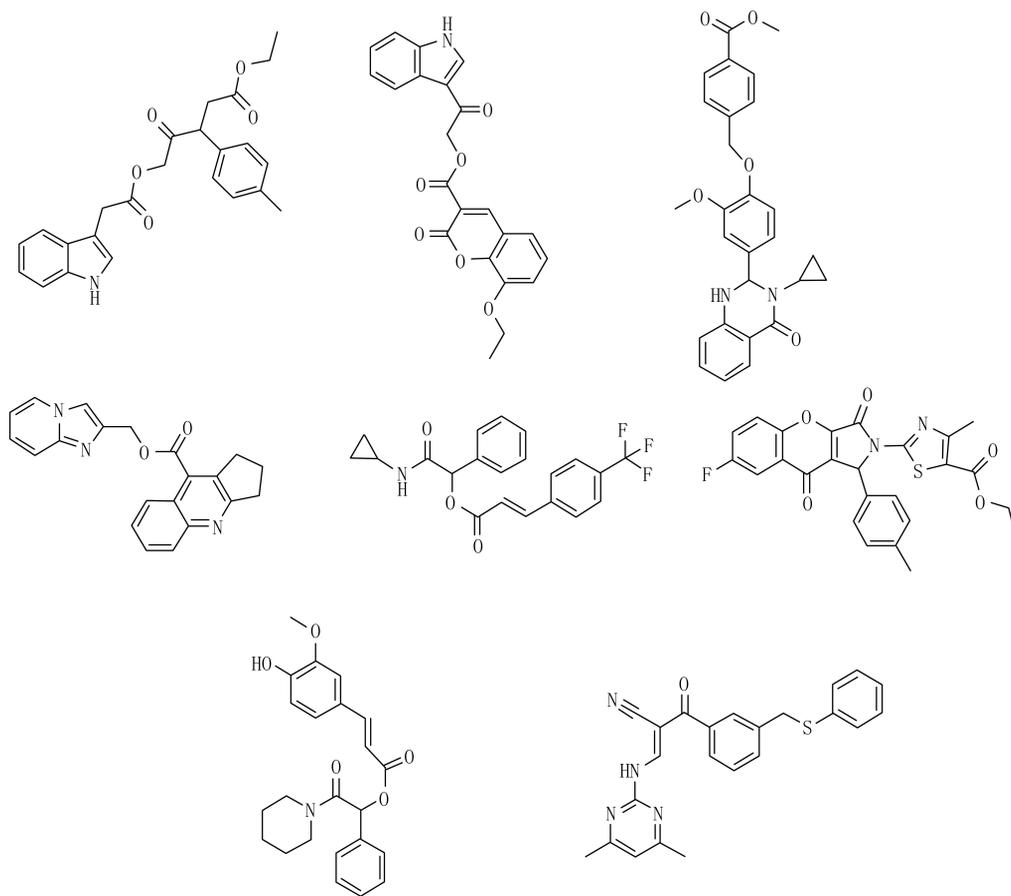


图5 虚拟筛选得到的部分化合物结构图

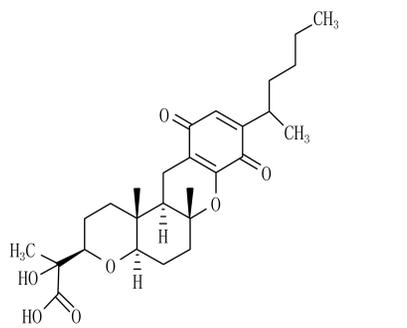


图6 JBIR-21的结构图

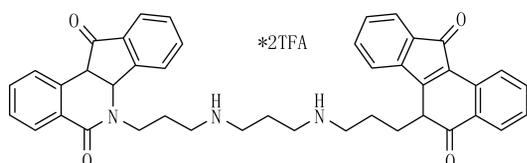


图7 多氨基双吲哚异喹啉的结构图

7 5-亚芳基硫代噻唑烷二酮类

Wang 等^[28]通过筛选一个自身的酪氨酸磷酸化抑制剂化合物库,找到化合物 8(图 8),并在此基础上发现了 5-亚芳基硫代噻唑烷二酮类作为 Tdp I

抑制剂的全新骨架。经过构效关系(SAR)研究,发现其中化合物 50(图 8)对 Tdp I 的抑制活性达到亚微摩尔级($IC_{50} = 0.87 \mu\text{mol/L}$)。一些衍生物对全细胞提取物中的 Tdp I 存在抑制活性。这为 Tdp I 抑制提供了进一步的解释。

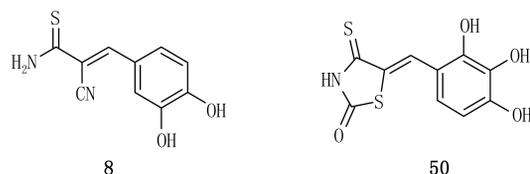


图8 化合物 8 和 50 的结构图

8 总结与展望

从 Tdp I 抑制剂的发展来看,其设计与合成经历了从盲目到合理,从单靶点到多靶点的过程。抑制活性逐步提高,有效浓度从当初的毫摩尔级提升到微摩尔级。毫无疑问,目前活性最高的属 5-亚芳基硫代噻唑烷二酮类($IC_{50} = 0.87 \mu\text{mol/L}$)。

但是,这其中还存在很多不足,比如活性分子整体数量较少,且大部分化合物的活性不尽如人意。其发现存在很大的偶然性,没有形成较为系统的构

效关系。当然这与 Tdp I 自身的底物不明确和作用机制尚了解不全存在密切关系。

【参考文献】

- [1] Wang JC. DNA topoisomerases [J]. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65:635-692.
- [2] Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(10):789-802.
- [3] Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism [J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70:369-413.
- [4] Pourquier P, Pommier Y. Topoisomerase I-mediated DNA damage [J]. *Adv Cancer Res*, 2001, 80:189-216.
- [5] Pourquier P, Pilon AA, Kohlhagen G, et al. Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. Importance of DNA end phosphorylation and camptothecin effects [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(42):26441-26447.
- [6] Yang SW, Burgin AB, Huizenga BN Jr, et al. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(21):11534-11539.
- [7] Pouliot JJ, Yao KC, Robertson CA, et al. Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes [J]. *Science*, 1999, 286(5439):552-555.
- [8] El-Khamisy SF, Saifi GM, Weinfeld M, et al. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1 [J]. *Nature*, 2005, 434(7029):108-113.
- [9] Plo I, Liao ZY, Barcelo JM, et al. Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2003, 2(10):1087-1100.
- [10] Whitehouse CJ, Taylor RM, Thistlethwaite A, et al. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair [J]. *Cell*, 2001, 104(1):107-117.
- [11] Pommier Y, Redon C, Rao VA, et al. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage [J]. *Mutat Res*, 2003, 532(1-2):173-203.
- [12] Takashima H, Boerkoel CF, John J, et al. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy [J]. *Nat Genet*, 2002, 32(2):267-272.
- [13] El-Khamisy SF, Katyal S, Patel P, et al. Synergistic decrease of DNA single-strand break repair rates in mouse neural cells lacking both Tdp1 and aprataxin [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2009, 8(6):760-766.
- [14] Das BB, Antony S, Gupta S, et al. Optimal function of the DNA repair enzyme TDP1 requires its phosphorylation by ATM and/or DNA-PK [J]. *EMBO J*, 2009, 28(23):3667-3680.
- [15] Katyal S, el-Khamisy SF, Russell HR, et al. TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective *in vivo* [J]. *EMBO J*, 2007, 26(22):4720-4731.
- [16] Hirano R, Interthal H, Huang C, et al. Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy: consequence of a Tdp1 recessive neomorphic mutation? [J]. *EMBO J*, 2007, 26(22):4732-4743.
- [17] Barthelme HU, Habermeyer M, Christensen MO, et al. TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(53):55618-55625.
- [18] Nivens MC, Felder T, Galloway AH, et al. Engineered resistance to camptothecin and antifolates by retroviral coexpression of tyrosyl DNA phosphodiesterase-I and thymidylate synthase [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 53(2):107-115.
- [19] Pommier Y, Barcelo JM, Rao VA, et al. Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2006, 81:179-229.
- [20] Dexheimer TS, Antony S, Marchand C, et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase as a target for anticancer therapy [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8(4):381-389.
- [21] Liao Z, Thibaut L, Jobson A, et al. Inhibition of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase by aminoglycoside antibiotics and ribosome inhibitors [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(1):366-372.
- [22] Antony S, Marchand C, Stephen AG, et al. Novel high-throughput electrochemiluminescent assay for identification of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors and characterization of furamidine (NSC 305831) as an inhibitor of Tdp1 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(13):4474-4484.
- [23] Marchand C, Lea WA, Jadhav A, et al. Identification of phosphotyrosine mimetic inhibitors of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase I by a novel AlphaScreen high-throughput assay [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(1):240-248.
- [24] Dexheimer TS, Gediya LK, Stephen AG, et al. 4-Pregnen-21-ol-3, 20-dione-21-(4-bromobenzenesulfonate) (NSC 88915) and related novel steroid derivatives as tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(22):7122-7131.
- [25] Weidlich IE, Dexheimer T, Marchand C, et al. Inhibitors of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase (hTdp1) developed by virtual screening using ligand-based pharmacophores [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(1):182-189.
- [26] Takagi M, Ueda JY, Hwang JH, et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibitor from an anamorphic fungus [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(4):764-767.
- [27] Nguyen TX, Morrell A, Conda-Sheridan M, et al. Synthesis and biological evaluation of the first dual tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp1)-topoisomerase I (Top1) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(9):4457-4478.
- [28] Sirivolu VR, Vernekar SK, Marchand C, et al. 5-Arylidene-thiothiazolidinones as inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(20):8671-8684.

【收稿日期】 2014-07-14 【修回日期】 2014-10-27

【本文编辑】 李睿旻