

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0154-03

PSA 激活的前体药物疗法治疗前列腺癌研究进展

李斌综述; 郝晓柯, 苏明权 审阅 (第四军医大学西京医院检验科临床分子生物学实验室, 西安 710032)

[摘要] 前列腺特异性抗原(PSA)是前列腺癌特异性的肿瘤标志物,利用 PSA 既具有肿瘤定位特异性,又具有丝氨酸蛋白酶水解活性的特性设计,合成能被 PSA 特异性识别并水解的抗肿瘤前体药物已成为前列腺癌靶向治疗中极具前景的策略,为高效、低毒、特异的治疗前列腺癌提供了新的思路,具有广阔的应用前景。

[关键词] PSA; 前体药物

[中图分类号] R737.25 **[文献标识码]** A

前列腺癌是老年男性生殖系统常见的恶性肿瘤之一。在欧美国家,前列腺癌是男性发病率最高的恶性肿瘤,死亡率仅次于肺癌,位居第二^[1]。我国前列腺癌发病率虽明显低于西方国家,但也呈明显上升趋势,已列居泌尿系肿瘤第三位,成为严重威胁男性健康和生命安全的主要疾病。传统的治疗方法如激素等反应率只有 20% ~ 30%^[2]。而化疗方法的障碍主要是全身的毒副作用大,因而限制了其临床的广泛应用。目前,高选择性肿瘤化疗已成为肿瘤治疗研究的重要课题之一。而前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)激活的前体药物疗法为前列腺癌的治疗提供了新的思路和方法。

1 作用机理

基于 PSA 具有的肿瘤定位特异性和丝氨酸蛋白酶水解活性,根据 PSA 对 seminogelin I 和 seminogelin II 的裂解图谱,设计能被 PSA 特异性水解的多肽^[3]。将此多肽与传统化疗药物共价结合,化学合成无细胞毒性的前体药物,将前体药物注入体内,当到达前列腺癌组织时,前列腺癌细胞分泌的 PSA 能特异地识别并水解连接在前体药物上的载体蛋白,释放出具有细胞毒性的化疗药物,从而达到特异、低毒、高效治疗前列腺癌的目的。在降低药物毒性,减轻对正常组织损伤的同时,提高抗癌药物的靶向性及作用于肿瘤细胞的药物浓度,从而使治疗指数得以提升。

2 PSA 生物学特性

PSA^[4,5]是由前列腺上皮细胞或前列腺癌细胞分泌的单链糖蛋白,为丝氨酸蛋白酶的一种,属激肽释放酶家族蛋白,相对分子量 30 000 ~ 36 000,等电点为 6.8 ~ 7.5,半衰期为 2.2 ~ 3.5 d。PSA 基因位于 19q13.4,可转录成 1.6 kb 的 mRNA。在正常和良性的前列腺上皮细胞内该基因的表达相当均匀。PSA 基因经转录和翻译,首先形成含有 261 个氨基酸的早前期 PSA(preproPSA),N 端含有 17 个氨基酸为疏水的信号肽,可将早前期 PSA 引导至内质网并穿过内质网,去

除其信号肽,形成含有 244 个氨基酸的酶原形式(proPSA)。当酶原 PSA 进入前列腺管腔,其 N 端的 7 个氨基酸残基被切除,最终形成含 237 个氨基酸残基的具有酶活性的 PSA。但在前列腺组织中,PSA 受锌离子的抑制不表现出活性。PSA 为精液中的主要蛋白,其浓度可达 0.5 ~ 2.0 mg/ml,是血中浓度的百万倍。在精液中,由于锌离子浓度下降,PSA 抑制效应被释放,具有酶活性的 PSA 可酶解精液中几种重要的蛋白,如 seminogelin I, II 以及纤维黏合素(fibronectin)等,从而发挥其液化精液凝块的重要生理功能。血清中的 PSA 浓度较低,通常小于 4 ng/ml,并且大多数血清 PSA 与蛋白酶拮抗剂 α_1 -抗糜蛋白酶或 α_2 -巨球蛋白共价结合,形成无活性的形式,血清游离 PSA 仅占总量的 10% ~ 20%,并且主要是 PSA 的酶原形式或是没有任何活性的 PSA 部分分解产物。当发生前列腺癌时,血清 PSA 水平显著升高,且以结合 PSA 增高为主,进而导致血清游离 PSA 与总 PSA 比值降低。故只有在前列腺癌细胞周围微环境中的 PSA 才具有酶活性。

3 用于 PSA 激活的前体药物疗法的化疗药物

利用 PSA 既具有肿瘤定位特异性,又具有丝氨酸蛋白酶水解活性的特性,使其作为活化酶特异性的激活前列腺癌细胞周围的抗肿瘤前体药物,已成为前列腺癌靶向治疗中极具前景的策略。目前报道的已合成的前体药物包括多肽-阿霉素前体药物、多肽-长春新碱前体药物及多肽-5-氟脱氧尿嘧啶核苷。多肽-阿霉素前体药物 L-377202 已进入临床实验阶段。

4 前体药物的设计

根据前体药物的性质^[6],改变药物的理化特性,调整药物的生物体内分布和药动学属性,随着前体药物的水解或酶解,产生活性药物,在局部病灶发挥作用,可提高其在特定部位的生物利用度。设计前体药物^[7],主要是设计抗癌药物与酶的底物之间的连接官能团。同时遵循前体药物设计的基本原理(结构稳定,是酶的良好底物)。抗癌药物结构中已知

的活性必需基团,应该是首先选择连接位置,这样可以屏蔽活性官能团,达到降低毒性的目的。连接官能团的连接键应在正常生理条件下稳定,以减少原形药物的非特异性释放。设计合理的前体药物应该具有化学性质稳定、无毒或毒性较低等特点。

多肽^[8]是一种生物活性物质,无毒,具有良好的生物降解性,将其应用于前体药物,利用肿瘤细胞的选择性激活机制,用于癌症治疗,已受到学者们的关注并取得了长足的进展。Denmeade^[3,9]等设计了 His-Ser-Ser-Lys-Leu-Glu-Leu 7 肽序列,并将其羧基与阿霉素的氨基共价结合形成无活性的前体药物 Mu-HSSKLQ-Leu-Dox,可被 PSA 水解释放出具有细胞毒性的亮氨酸-阿霉素和阿霉素。Deborah DJ^[2,10-12]等基于 seminogelin I 第 349 位的谷氨酰胺(Glu)和第 350 位的丝氨酸(Ser)之间的肽键最容易被 PSA 裂解的特点,将这一位点周围的氨基酸进行修饰并合成了易被 PSA 快速水解的 7 肽 N-glutaryl-(4-hydroxyprolyl) AlaSer-cyclohexaglycyl-GluSerLeu-CO₂H。并与阿霉素共价结合形成多肽-阿霉素前体药物 L-377,202。根据这一特性^[13-14],他们还设计了易被 PSA 快速水解的 8 肽与去乙酰-长春碱的 4 位共价结合,合成了 4-O-(Ac-Hyp-Ser-Ser-Chg-Glu-Ser-Ser-Pro)-desacetyl-Vinblastine 前体药物。Mhaka^[15]等通过一个自裂解的 2 肽 H-Leu- Aib-OH(Aib 代表甲基丙氨酸)把活性药物 FudR 与 PSA 作用靶序列相连接,设计成 MuHSSKLQ-Leu-Aib-FudR 前体药物。

5 体外活性研究

Denmeade^[3]等合成了前体药物,结果表明前体药物杀死 50% 的 LNCaP 系细胞的剂量(LD₅₀)为 70 nmol/L,而不产生 PSA 的 TSU 细胞,即便是前体药物高达 1 μmol/L 也未见细胞毒性效应的发生。Deborah^[10]等合成了多肽-阿霉素前体药物 L-377,202。针对分泌 PSA 的 LNCaP 细胞系和不分泌 PSA 的 DuPRO-1 和 PC3 细胞系的实验表明:对于不合成 PSA 的 Hct116,MDA-MB435S 和 T24 细胞系,L-377,202 杀死 50% 的肿瘤细胞所需要的量(EC₅₀)均远大于 100 μmol/L,然而阿霉素和亮氨酸-阿霉素对于上述细胞系的 EC₅₀ 只需极低的剂量。对于 3 个正常的细胞系 MRC-5,NHBE 和 NHME,L-377,202 的杀伤作用只相当于阿霉素的 1%。而根据 Dipala^[11,12]的报道,L-377,202 在体外的对于分泌 PSA 的人前列腺癌细胞的活性是不分泌 PSA 的人前列腺癌细胞的至少 20 倍,不分泌 PSA 的人正常细胞的 100 倍。Defeo-Jones^[13]等合成的多肽-长春碱前体药物,针对分泌 PSA 的 LNCaP 细胞系实验表明:前体药物对于分泌 PSA 的 LNCaP 细胞具有很强的杀伤力,而对不分泌 PSA 的 T-47D 细胞、NHME 及 NHBE 没有细胞毒性。Mhaka^[15]等合成了多肽-5-氟尿嘧啶前体药物 MuHSSKLQ-Leu-Aib-FudR,其对于分泌 PSA 的前列腺癌细胞系 LNCaP 的细胞毒性是不分泌 PSA 的肿瘤细胞系 TSU 的 60 倍。

以上实验均表明,合成的能被 PSA 特异性水解的前体药物对分泌 PSA 的肿瘤细胞的杀伤力极强,为动物体内实验打

下了基础。

6 体内活性研究

Khan^[3]等合成的前体药物 Mu-HSSKLQ-Leu-Dox 注入种植了 PC-82 细胞的荷瘤裸鼠的实验表明:前药治疗组肿瘤体积的平均变化($\text{volume}_{\text{day40}} / \text{volume}_{\text{day0}}$),降低了(11 ± 10)%,而对照组增加了(66 ± 18)%。前药治疗组肿瘤重量比对照组低 57%。Deborah DJ^[10]等合成的多肽-阿霉素前体药物 L-377,202 注入老鼠体内,他们在裸鼠上种植 2 种分泌 PSA 的人前列腺癌细胞 LNCaP 和 CWR22,实验表明:每隔 1 天连续 5 d 给药后,L-377,202 治疗组裸鼠的血清 PSA 在 L-377,202 剂量为 21.5,14.3 和 7.2 μmol/kg 时分别平均下降 97%,96% 和 83%;肿瘤重量分别平均下降 87%,84% 和 83%。亮氨酸-阿霉素组血清 PSA 平均下降 10%,肿瘤重量升高 5%。阿霉素组血清 PSA 平均下降 16%,肿瘤重量降低 6%。Garsky^[12]等的实验也证明了这一点。Deborah^[13]等合成的多肽-长春碱前体药物(15.3,9.2,4.9,2.4,1.2 μmol/kg)处理 LNCaP 荷瘤裸鼠,其血清 PSA 浓度分别下降 99%,92%,83%,68%,43%,而肿瘤重量分别下降 85%,77%,68%。而用 4-O-(Prolyl)- desacetyl-vinblastine (MTD = 4.6 μmol/kg) 和 desacetyl-vinblastine(MTD = 0.26 μmol/kg)处理后,血清 PSA 浓度分别下降 33%,14%(有统计学意义);肿瘤重量分别下降 60%,16%(无统计学意义)。用此前体药物(12.2 μmol/kg)处理另一分泌 PSA 的 CWR22 荷瘤裸鼠,血清 PSA 浓度下降接近 100%,肿瘤重量下降 89%。

以上实验表明前体药物治疗组模型在血清 PSA 下降及肿瘤体积、重量下降等方面均优于对照组。表现出了良好的应用前景。

7 前体药物的稳定性及特异性

前体药物要具有高肿瘤靶向性,就必须减少在体内循环中的非特异性水解,而在肿瘤部位被快速、完全水解,从而提高肿瘤部位的药物浓度。

Mhaka^[15]等设计的 MuHSSKLQ-Leu-Aib-FudR 前体药物,120 h 时,加入 LNCaP 细胞培养液中的前体药物 75% 被水解,而在平行对照组中,非特异性的水解不足 1%。与前列腺组织及全血一起孵育 60 min 后,经 HPLC 测定,其结构未发生变化。多肽-阿霉素前体药物^[16]在人血浆中 37℃ 孵育 3 h,大多数前体药物水解 0.7% ~ 4.8%,主要是分解为阿霉素。在人新鲜血浆中 4℃,25℃ 孵育 4 h,均表现出很好的稳定性。Bradley^[2]等设计的 L-377,202 前体药物加入 LNCaP 细胞中,60 min 后,前体药物被完全水解,只表现为亮氨酸-阿霉素,90 min 后只有极少的阿霉素形成,24 h 后,只有阿霉素被检测到;而对于 DuPRO-1 细胞,L-377,202 的新陈代谢非常小。24 h 后,肿瘤组织部位的阿霉素浓度较同剂量的传统阿霉素疗法的浓度高 3 倍。

8 前体药物的安全性

前体药物进入体内后对正常组织要无毒性或毒性低,而

在被 PSA 水解产生具有细胞毒性后,应局限在肿瘤组织周围,从而降低传统化疗法对正常组织的细胞毒性损伤。

实验表明^[2],在种植了 LNCaP 的裸鼠身上注入 L-377, 202 在 4 h 和 24 h 后,肿瘤组织部位的阿霉素浓度较同剂量的传统阿霉素疗法的浓度高得多;而对心脏的毒性要小很多,其水解后的阿霉素的浓度峰值是传统阿霉素疗法的 1/5。在肝脏、肾脏及脑组织也得到了近似的结果^[8]。而对不同剂量处理的荷瘤裸鼠的组织学观察,未发现任何心脏毒性。其他组织均未发现细胞毒性。临床实验发现^[11],19 例患者均未有心脏毒性表现,11 例患者经多通路血管造影术测定,左室射出部分的基线没有明显变化。没有病人出现不正常的凝结及变态性反应。Deborah^[10]等的实验表明裸鼠对 L-377, 202 的最大耐受剂量(MTD)比阿霉素高出 790% ~ 1 000%。Deborah DJ^[13]等合成的多肽-长春碱前体药物经测定,其 MTD 比去乙酰-长春碱高出 >8 000%。用此前药处理 LNCaP 荷瘤裸鼠,去乙酰-长春碱在肿瘤部位的峰浓度增高了 2 200%。组织学检测证明,前体药物治疗组有很好的抗肿瘤效果,但对脊髓、神经组织的毒性极轻微,引起睾丸变形退化的作用也极轻微,且没有长期的影响。实验在犬的身上得到了进一步证实,前药会引起一过性的白细胞计数降低,20 d 后会恢复。对坐骨神经、骨骼肌肉及睾丸的毒性作用非常轻微。

9 展望

综上所述,PSA 激活的前体药物在体外细胞培养、荷瘤裸鼠及临床实验均取得了良好的效果,达到了低毒、高效、特异的预期目的,为以后的临床应用打下了坚实的基础,对前列腺癌的治疗具有重要的理论和应用价值。

[参考文献]

[1] Jemal A, Murray T, Samuels A, et al. Cancer statistics, 2003 [J]. CA, 2003, 53(1): 5-26.

[2] Bradley KW, Deborah DJ, Raymond EJ, et al. PSA-specific and non-PSA-specific conversion of a PSA-targeted peptide conjugate of doxorubicin to its active metabolites [J]. Drug Metab Dispos, 2001, 29: 313-318.

[3] Knan SR, Denmeade SR. *in vivo* activity of PSA-activated doxorubi-

bicin prodrug against PSA-producing human prostate cancer xenografts [J]. The Prostate, 2000, 45(1): 80-83.

[4] Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(2): 383-391.

[5] 王志刚,沈瑞林,等. 前列腺癌特异性抗原的表达及临床应用 [J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2002, 23(5): 285-286.

[6] 李凤前,胡晋红,等. 肝靶向给药系统的新进展 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(5): 321-325.

[7] 赵临襄,王永峰,等. 抗体导向的酶催化前体药物疗法的研究进展 [J]. 国外医学药学分册, 2000, 20(2): 69-74.

[8] 王士斌,刘源岗,等. 多肽在前体药物与药物载体方面的应用 [J]. 国外医学生物医学工程分册, 2002, 25(3): 139-142.

[9] Denmeade SR, Sokoll LJ, Chan DW, et al. Concentration of enzymatically active prostate-specific antigen (PSA) in the extracellular fluid of primary human prostate cancers and human prostate cancer xenograft models [J]. Prostate, 2001, 48(1): 1-6.

[10] Deborah DJ, Grasky VM, Wong BK, et al. A peptide-doxorubicin prodrug activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen *in vivo* [J]. Nat Med, 2000, 6(11): 1248-1252.

[11] Robert SD, John R, John N, et al. Characterization of a novel prostate-specific antigen-activated peptide-doxorubicin conjugate in patients with prostate cancer [J]. J Clin Oncol, 2002, 20(7): 1874-1879.

[12] Grasky VM, Lumma PK, Feng DM, et al. The synthesis of a prodrug of doxorubicin designed to provide reduce systemic toxicity and greater target efficacy [J]. J Med Chem, 2001, 44(24): 4216-4224.

[13] Deborah DJ, Brady SF, Feng DM, et al. A prostate-specific antigen (PSA)-activated vinblastine prodrug selectively kills PSA-secreting cells *in vivo* [J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(7): 451-459.

[14] Brady SF, Pawluczuk JM, Lumma PK, et al. Design and synthesis of a pro-drug of vinblastine targeted at treatment of prostate cancer with enhanced efficacy and reduced systemic toxicity [J]. J Med Chem, 2002, 45: 4706-4715.

[15] Mhaka A, Denmeade SR, Yao W, et al. A 5-fluorodeoxyuridine prodrug as targeted therapy for prostate cancer [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2002, 12(17): 2459-2461.

[16] Schwartz MS, Matuszewski BK. Determination of a peptide-doxorubicin antigen activated prodrug, and its active metabolites in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection stabilization of the peptide prodrug with EDTA [J]. J Chromatogr, 2002, 780: 171-182.

[收稿日期] 2003-10-13 [修回日期] 2003-12-15

《中华医学实验杂志》征稿

《中华医学实践杂志》是由中华临床医学药学会主办,具有 ISSN/CN 标准刊号,已被《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中文科技期刊数据库》、万方数据库及中文生物医学期刊文献数据库等收录。主要反映各地医疗医药研究成果,传播医药新理论,交流医学新技术,帮助医疗卫生技术人员更新知识。读者对象主要为各级医务工作者。

本刊栏目设有:论著、医疗医药新进展、讲座与综述、临床医学、中西医结合、药物与临床、中医中药、检验与临床医学影像、经验交流、病例报告、病理(病例)讨论、临床护理、技术改进、预防医学、医院管理、读者·作者等。欢迎广大医务工作者投稿、赐教,来稿出版周期短,免收审稿费,录用稿件颁发论文证书。

来稿请寄:山东省济南市北园大街 598-1 号《中华医学实践杂志》编辑部

邮编: 250031 电话: 0531-5922668 传真: 0531-5822998