

Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China).

Abstract It is very important to produce recombinant proteins for therapy in biopharmaceutical. Chinese hamster ovary cells (CHO cells) have become one of the best eukaryotic expression

systems in recent years. The factors influencing the high-level expression of foreign protein in CHO cells and the core strategies of overexpression of recombinant proteins in CHO cells were discussed.

Key words recombinant protein, CHO cells, high-level expression

促黄体生成激素释放激素类似物的研究进展

高兴明 唐艳春 叶蕴华¹⁾

(北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要 促黄体生成激素释放激素 (LHRH) 激动剂药物已商品化, 用于治疗性激素依赖的癌症, LHRH 拮抗剂的研究还处于试验阶段。近几年, 在寻找高活性, 低组胺释放, 水溶性好, 稳定性高的拮抗剂研究方面, 已取得明显进展。一些较小的环肽及肽模拟物也表现出较好的生物活性。在十肽拮抗剂分子内, 中间四肽的 β II-turn 及 N 端的三肽对活性影响很大。

关键词 LHRH 类似物, 激动剂, 抗癌药, 拮抗剂

学科分类号 Q57

1971 年, Schally 等^[1]从 50 万头猪、羊下丘脑中分离出几毫克的促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH), 又称促黄体生成激素释放激素 (luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH), 并已人工合成确证了 LHRH 的结构, 为 $\text{Pyr-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$ 。LHRH 调控着垂体内促黄体生成激素 (LH) 和促卵泡激素 (FSH) 的分泌。下丘脑 LHRH 的结构阐明和人工合成, 明确了中枢神经系统对垂体的控制作用, 大大推动了神经内分泌学和生殖生理学的发展。为了寻找非甾体避孕药和治疗性激素依赖性的癌症 (如前列腺癌、子宫癌), 人们已合成出 5 000 多种 LHRH 类似物, 其中少部分为激动剂 (agonists), 大部分为拮抗剂 (antagonists)。高活性的 LHRH 激动剂, 用于治疗癌症及用作避孕药, 已有产品在市场上出售。LHRH 拮抗剂的研究几乎与激动剂的研究同时起步, 但经历了复杂得多的过程后才得到超高活性的拮抗剂, 其研究目前处于试验阶段。

LHRH 拮抗剂和激动剂的作用机理不同。最初研究 LHRH 激动剂是为了治疗不孕症, 后来发现大剂量使用时有抗生育作用。LHRH 激动剂占据受体后引起受体微聚, 从而打开钙离子通道, 钙离

子流入细胞后激活细胞内相应的酶系统, 然后刺激促性腺激素的释放。激动剂引起的受体微聚也可导致与钙离子无关的脱敏作用, 在注入体内后开始一段时间促进促性腺激素的分泌, 以后则抑制促性腺激素的分泌^[2], 这是激动剂抗生育作用的原因。LHRH 拮抗剂与内源性 LHRH 竞争受体位点, 但不引起 LHRH 受体微聚, 所以既不能刺激促性腺激素的分泌, 也不引起脱敏作用, 其作用在于纯粹的竞争受体, 抑制由 LHRH 刺激的促性腺激素的分泌。这样, LHRH 拮抗剂就可能比激动剂的作用更专一, 更安全, 也更易于接受。

1 LHRH 激动剂

LHRH 结构阐明后, 人们开始寻找活性更高的 LHRH 类似物, 并在短期内取得突破性进展, 激动剂的活性大大提高^[3]。目前, 世界上 LHRH 激动剂的产值已达每年十几亿美元^[4]。表 1 列出了产量最大的几种激动剂药物, 这些高活性激动剂类似物中, 6 位均为 D 型氨基酸残基, 分子中只有 1 ~ 2 个氨基酸残基与 LHRH 分子不同。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (010) 62761430, E-mail:

收稿日期: 1999-10-13, 修回日期: 2000-04-17

表 1 已上市的 LHRH 激动剂药物

LHRH	Pyr ⁰ -Gly ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -Gly ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -Gly ¹⁰ -NH ₂	
Buserelin	D-Ser (tBu) ⁶	Gly ¹⁰ -NH ₂
Nafarelin	D-(2) Nal ⁶	
Leuprorelin	D-Leu ⁶	Gly ¹⁰ -NH ₂
Goserelin	D-Ser (tBu) ⁶	Azagly ¹⁰ -NH ₂
Histrelin	D-His (Bzl) ⁶	Gly ¹⁰ -NH ₂
Triptorelin	D-Trp ⁶	

注: 结构式中只写出与 LHRH 不相同的氨基酸残基。

2 多肽类拮抗剂

2.1 线型肽

1988 年, Schally 等研制出 Cetrorelix (SB-75, SB-88) 系列的拮抗剂^[5], 分子中引入 D 型侧链含亲水性基团的弱碱性或非碱性氨基酸 (D-Cit⁶, D-Hci⁶), 具有很高的活性, 组胺释放较以前减少了许多, 标志着第三代拮抗剂的开始, 这类拮抗剂结构上有些共同特征: N 端都含 D-Nal¹-D-Cpa²-D-Pal³ 疏水基团; 6 位是亲水的 D 型氨基酸 (侧链是含有氨基的芳香性或烷基基团); C 端是亲水性基团。

此后, 在氨基酸排列顺序和氨基酸侧链修饰等方面进行了系统研究, 筛选得到高活性的拮抗剂。

Rivier 等^[6]将 3-氨基-1, 2, 4-三唑基修饰的对氨基苯丙氨酸或 Lys 引入 5 位和 6 位, 得到 Azaline 系列拮抗剂, 使拮抗剂研究向前推进了一步。Azaline B 是目前世界上活性最高的拮抗剂之一。

目前许多实验室在高活性的 SB-88 及 SB-75 (Cetrorelix) 系列拮抗剂的基础上, 利用 D 型非蛋白氨基酸, D 型烷基化氨基酸及侧链含活泼基团的氨基酸对分子中 5、6、8 位进行结构改造, 以提高水溶性和体内试验的稳定性^[7]。拮抗剂经强极性亲水性基团 (牛磺酸、古洛糖酸、高瓜氨酸、高精氨酸、维生素 B₁₂) 修饰后可提高水溶性^[8,9]。表 2 列出了最有代表性的第三代 LHRH 拮抗剂。

表 2 第三代 LHRH 拮抗剂

	Ac-D-Nal ¹ -D-Cpa ² -D-Pal ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -D-Cit ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -D-Ala ¹⁰ -NH ₂		
SB-75			
Antide	Lys (Nic) ⁵ ,	D-Lys (Nic) ⁶ ,	Lys (iPr) ⁸
Ganirelix		D-hArg (Et) ⁶ ,	hArg (Et) ⁸
A-75998	Tyr (N-Me) ⁵ ,	D-Lys (Nic) ⁶ ,	Lys (iPr) ⁸
Azaline B	Aph (Atz) ⁵ ,	D-Aph (Atz) ⁶ ,	Lys (iPr) ⁸
Antarelix		D-Hci ⁶ ,	Lys (iPr) ⁸
Detirelix	D-hArg (Et) ⁶		
Ramorelix		D-Ser (Rha) ⁶ ,	Azagly ¹⁰
Tx-44	Mop ⁵ ,	D-Pal ⁶	
ZK-157348	Mop ⁵ ,	D-MorLys ⁶ ,	Morlys ⁸
SB-88		D-Hci ⁶	
Nal-Glu	Arg ⁵ ,	D-Glu (Anis) ⁶	

注: 结构中只写出与 SB-75 不相同的氨基酸残基。hArg (Et₂) = N^ε, N^ε-二乙基-高精氨酸 (homoarginine (N^ε, N^ε-diethyl)), Anis= 苯甲醚基 (anisol), Aph= 对氨基苯丙氨酸 (p-aminophenylalanine), Hci= 高瓜氨酸 (homocitrulline), Mop = 吗啉基甲基苯丙氨酸 (morpholinomethylphenylalanine), Morlys= 吗啉基赖氨酸 (N-morpholinolysine), Rha= 鼠李糖基 (rhamnosyl)。

六肽及八肽类似物用于 LHRH 拮抗剂也有报道, 其结构与 LHRH 的 4~9 位结构相似, N 端用不同的酰基修饰。到目前为止, 世界上几千种 LHRH 拮抗剂中绝大多数是线型十肽, 其结构设计是在 LHRH 的基础上进行有目标的氨基酸替换, 修饰或大量引入非蛋白氨基酸, 活性明显提高, 水溶性也在增大, 组胺释放量已减少到很低水平。许

多拮抗剂, 如 Cetrorelix 系列, 正在进行临床试验^[10~13]。

2.2 环肽类

环肽类化合物抗酶降解的能力比线型肽要强, 且活性持续时间较长。另外环肽化合物分子构象相对比较稳定, 有利于构效关系的研究。人们将部分线型十肽环化并研究了它们对受体的亲和能力和生

物活性. 环化有多种形式, 如: C 端、N 端首尾相接环化, C 端或 N 端与肽链分子中氨基酸侧链成键环化, 还有些十肽可形成两个环. 大部分环十肽的生物活性都低于相应的线型肽, 只有一些分子中 5 位和 8 位氨基酸侧链相互连接环化所得到的环十肽生物活性高于相应的线型肽.

与环十肽不同, 首尾相接的较小的环肽 (环五肽、环六肽), 具有较高的活性, 对 LHRH 受体有亲和性 ($IC_{50} = 0.07 \mu\text{mol/L}$) 并表现出拮抗剂作用^[14, 15]. 环六肽及环五肽比其他较大的环肽构象稳定, 有利于结构改造研究, 以提高其生物活性. 目前, 具有应用前景的环肽类拮抗剂报道的还不多.

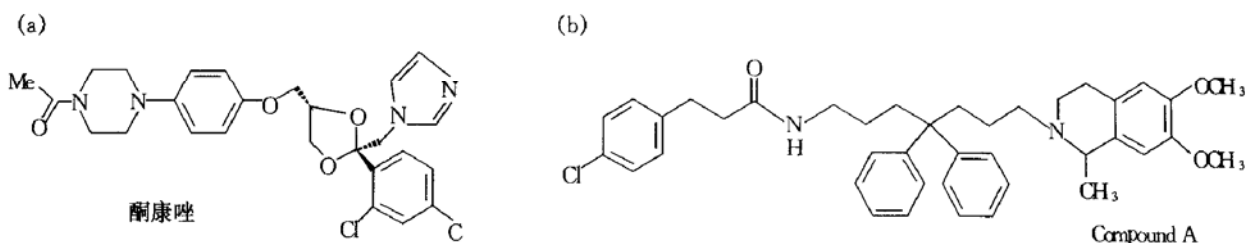


图 1 二种非肽类化合物的 LHRH 拮抗剂

其他含氮杂环化合物如苯并二氮杂茂、噻吩羧酸衍生物、异喹啉衍生物及吡啶衍生物等, 也可用作拮抗剂^[17-19], 其中图 1b 所示化合物具有代表性^[19], 这些化合物在 10^{-6} mol/L 浓度以下就能抑制促性腺激素的分泌, 有些化合物正在进行药理学试验, 以用于治疗激素依赖性的癌症^[6].

4 构效关系

构效关系的研究对于设计新的高活性 LHRH 类似物非常重要. Nikiforich 等系统研究了 LHRH 类似物的构象, LHRH 及各种激动剂肽链骨架构象很相似, 5~8 位存在一个 β II-turn, (Tyr^5) CO...HN (Arg^8) 氢键使 β II-turn 构象稳定. (His^2) CO...HN (Tyr^5) 和 (pGlu^1) CO...HN (Ser^4) 两个氢键使两个 β -turn 的相对位置处于稳定状态^[4]. [D-Ala^6] -LHRH 激动剂的活性高于 LHRH, 原因之一是 6 位的 D 型氨基酸有利于 β II-turn 的形成, 分子动力学模拟计算也证明了 β II-turn 的存在, 将 $\text{Tyr}^5\text{-Gly}^6\text{-Leu}^7\text{-Arg}^8$ 片段中的肽链用一个立体构象相对固定且有利于形成 β II-turn 的 β -内酰胺片段代替后, 体内、体外活性均明显提高^[4]. 拮抗剂分子中 5~8 位也存在一个 β II-turn, 但构象与激动

3 肽的模拟物拮抗剂

多肽化合物有易被酶降解、稳定性差、生物利用率低及专一性太强等缺点. 近年来, 科学家们一直在寻找肽的模拟物用作 LHRH 拮抗剂以克服这些缺点. 理想的肽模拟物应当稳定性高, 对受体有较强的亲和力, 同时, 具有良好的药理学性能, 并可口服使用. Plattner 等^[16]偶然发现抗菌素酮康唑 (ketokonazole, 结构式见图 1a) 注入体内后, 可使血液中的睾丸酮含量降低, 并使前列腺癌细胞消失. 进一步的体内、体外生物活性试验表明酮康唑及其类似物在 10^{-6} mol/L 浓度时能抑制促性腺激素分泌, 这是第一个非肽类化合物的 LHRH 拮抗剂.

剂的构象稍有不同. 分子中 β II-turn 的存在有利于提高拮抗剂与受体之间的亲和作用^[4]. 根据这一结果化学家们开始设计有利于形成 β II-turn 的拮抗剂^[20]. 一般认为 D 型氨基酸与 L 型氨基酸相邻有利于 β II-turn 的形成.

线型十肽两个末端处于自由状态有利于分子与受体的作用. 许多线型十肽经首尾相接或末端与分子中氨基酸侧链成键形成环十肽后, 分子中存在 2 个 β II-turns, 活性及与受体的结合能力都小于相应的线型肽. 将线型十肽拮抗剂分子中 5 位和 8 位氨基酸侧链连接环化, 抑制排卵的生物活性高于相应的线型肽, 十肽分子中间 5 位和 8 位氨基酸成键环化, 使 β II-turn 结构稳定性增强, 同时肽链的 C 端、N 端都处于自由状态, 有利于分子与受体之间的作用. N 端的三肽片段对活性影响很大, 将激动剂 N 端的三个 L 型氨基酸残基用 D 型芳香氨基酸残基代替后, 会使激动剂变为拮抗剂, β II-turn 的一个重要作用在于使 N 端三肽片段和 C 端氨基酸残基与受体的结合更容易, 更牢固.

构效关系研究结果表明, 高活性的十肽拮抗剂中均有 β -turn 存在 (5~8 位或 3~6 位), 并且分子中 C 端、N 端都均处于自由状态. 在使 C 端、N

端自由的前提下, 提高 β II-turn 构象的稳定性, 有利于生物活性的提高. 近年来, 随着核磁共振和分子动力学模拟实验的发展, LHRH 拮抗剂构象与活性关系研究取得了很大进展, 但由于线型肽分子在溶液中结构的柔韧性, 存在许多不同构象, 现在还没有分离出 LHRH 或其类似物与受体的结合物, 无法确切地知道 LHRH 及其类似物与受体之间精确的结合点与结合方式, 因此给构效关系的研究带有一定的盲目性. 较小的环肽 (环五肽、环六肽) 及肽的模拟物分子构象相对较稳定, 有利于构象关系的研究, 尽管目前这方面的报道较少, 很可能是将来构效关系研究的重要方向.

5 结论与展望

近几年, LHRH 类似物的研究已取得很大进展, LHRH 激动剂已有产品出售, 用作抗癌药和避孕药, 活性很高的拮抗剂在微克剂量条件下可抑制促性腺激素的分泌, 组胺释放量也明显降低, 并已研制出一些较小的多肽及多肽模拟物 LHRH 拮抗剂, 构效关系的研究进展对设计新的拮抗剂发挥了重要作用, LHRH 受体的信息传递机理已基本清楚.

但 LHRH 拮抗剂的研究还处于试验阶段, 至今尚没有商品化的拮抗剂药物, 今后的研究方向是探索同时具有高活性、稳定性好、水溶性高又无组胺释放的拮抗剂; 确定 LHRH 受体的精确结构; 阐明拮抗剂与受体的结合方式以及结合后构象的变化; 同时发展简便、易操作、成本低的合成方法与构象分析方法.

多肽模拟物具有成本低, 稳定性好, 可以口服的优点, 较小的环肽 (如环六肽、环五肽) 构象相对稳定, 且抗酶降解能力强, 因此多肽模拟物及较小的环肽 LHRH 拮抗剂将有很大的研究潜力.

尽管 LHRH 激动剂已商品化, 并已用作抗癌药和避孕药, 但激动剂进入体内后, 开始的一段时间 (约 2 周) 会刺激促性腺激素的分泌, 会使性激素依赖性的癌症出现“暂时恶化”, 而拮抗剂进入体内后即可抑制促性腺激素的分泌, 因此拮抗剂最终会代替激动剂. LHRH 类似物不仅可用作避孕药和治疗性激素依赖性疾病, 还可用于畜牧业和养殖业, 以提高产量并改进肉类的质量.

参 考 文 献

- Schally A V, Arimura A, Kastin A J. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*, 1971, **173** (4001): 1036~1038
- 周美华, 杨 隼, 林加宝, 等. 丙氨瑞林对下丘脑-垂体-性腺轴作用的研究. *中国医药工业杂志*, 1997, **28** (1): 18~22
Zhou M H, Yang J, Lin J B, *et al.* *Chinese J Pharmaceutics*, 1997, **28** (1): 18~22
- Funk K W, Greer J, Adjei A L, *et al.* LHRH agonists. *Pharm Biotechnol*, 1998, **11** (2): 151~182
- Kutscher B, Bernd M, Beckers T, *et al.* Chemistry and molecular biology in the search of new LHRH antagonists. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1997, **36** (20): 2148~2161
- Bajusz S, Csernus V J, Janaky T, *et al.* New antagonist of LHRH II inhibition and potentiation of LHRH by closely related analogues. *Int J Pept Protein Res*, 1988, **32** (6): 425~435
- Rivier J E, Jiang G. Gonadotropin-releasing hormone antagonists: novel members of the azaline B family. *J Med Chem*, 1995, **38** (11): 2649~2662
- Semple G, Jiang G C. Preparation of GnRH antagonists modification in position 5 and 6. Word patent, WO 98 46, 634. 1998-10-22
- Russell-Jones G J (Biotech Australia Pty). LH-RH antagonists. Word patent, WO 94/28015. 1994~12~08
- Jiang G, Rivier C L. Betidamino acid scan of the GnRH antagonist acylide. *J Med Chem*, 1997, **40** (23): 3739~3748
- Haviv F, Bush E N, Knittle J, *et al.* LHRH antagonists. *Pharm Biotechnol*, 1998, **11** (1): 131~149
- Maiwaring P N, Dowsett M. LHRH super agonists and antagonists in the treatment of breast cancer. *Contemp Endocrinol*, 1999, **11** (3): 313~328
- Comarur-Scally A M, Brannan W, Schally A V, *et al.* Efficacy and safety of luteinizing hormone releasing hormone antagonists. Cetrorelix in the treatment of symptomatic prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, **83** (11): 3826~3831
- Kutscher B, Bernd M, Gunther E, *et al.* New LHRH antagonists with enhanced biological activity: preclinical results. 16th Am Pept Symp, Minneapolis: American Peptide Society, 1999. 158
- Veber D F, Freidinger R M. Cyclic hexapeptide LHRH antagonists. European patent, EP 190946 A2. 1986-08-13
- Kitada C (Takeda Chemical Industries). Cyclic pentapeptide LH-RH antagonists. Word patent, WO 96/34012A1. 1996-04-25
- De B, Plattner J J, Bush E N, *et al.* LH-RH antagonists: design and synthesis of a novel series of peptidomimetics. *J Med Chem*, 1989, **32** (9): 2036~2038
- Chu L, Gault M T S, Walsh T F, *et al.* Preparation of aminoalkylindoles as GnRH antagonists. Word patent, WO 99 21, 557. 1999-05-06
- Cho N, Harada M, Imaeda T. Discovery of a novel, potent and orally active nonpeptide antagonist of the human LHRH receptor. *J Med Chem*, 1998, **41** (22): 4190~4195
- Haviv F, Dwight W, Crawford B, *et al.* The design of LHRH antagonist mimetics. 16th Am Pept Symp, Minneapolis: American Peptide Society, 1999. 143
- Rizo J, Sutton R B, Breslau J. A novel conformation in a highly potent, constrained gonadotropin-releasing hormone antagonist. *J Am Chem Soc*, 1996, **118** (5): 970~976

Progress in the Study of Analogs of Luteinizing Hormone-releasing Hormone. GAO Xing-Ming, TANG Yan-Chun, YE Yun-Hua (College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China).

Abstract Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists as antitumor agents for hormone-dependent tumor have been on the market for about ten years, while the LHRH antagonists that have been developed furthest are still in clinical trial.

Significant progress has been made in searching for LHRH antagonists with high activity, low histamine releasing, good aqueous solubility. Smaller linear or cyclic peptides and peptidomimetics showed antagonistic activity both *in vitro* and *in vivo*. The β II-turn in the central tetrapeptide and the N-terminal tripeptide segment of decapeptide LHRH antagonists play an important role in receptor binding.

Key words LHRH analogues, agonists, antitumor drugs, antagonists

单胺氧化酶

陈剑峰 王恩多¹⁾

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 是生物体内一种十分重要的酶, 它在大脑和周围神经组织中催化一些生物体产生的胺, 氧化脱氨产生过氧化氢 (H_2O_2)。单胺氧化酶 A 和 B 基因的克隆清楚地证明了这些酶是由不同的多肽组成的。单胺氧化酶 A 和 B 的基因定位于 X 染色体 (Xp11.23), 都由 15 个外显子组成, 而且它们的内含子-外显子组织是完全一致的。这些事实表明单胺氧化酶 A 和 B 的基因很可能从同一个祖先进化而来。单胺氧化酶 A 和 B 具有不同的底物和抑制剂专一性, 在生物神经递质代谢和行为方面具有不同的作用。

关键词 单胺氧化酶, 神经递质, 行为

学科分类号 Q556

单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO, EC 1.4.3.4), 全名为单胺: O_2 氧化还原酶, 它在大脑和周围神经组织中催化一些生物体产生的胺, 氧化脱氨产生过氧化氢^[1]。根据底物选择性和对抑制剂的灵敏度, 单胺氧化酶被分为 A 和 B 两种^[2]。单胺氧化酶 A 对底物血清素 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 和抑制剂 clorgyline 具有高亲和性; 而单胺氧化酶 B 则对苯乙基胺 (PEA)、苯甲胺和抑制剂 deprenyl 具有高亲和性。单胺氧化酶 A 和 B 分别由不同的基因编码^[3]。有文献报道荷兰一个家庭的 8 个男子的行为表现出异常的攻击性, 原因是编码单胺氧化酶 A 基因的一个点突变导致单胺氧化酶 A 的缺陷^[4]; 单胺氧化酶 B 活力的变化则与帕金森氏综合症有关。本文主要综述单胺氧化酶 A 和 B 基因的结构和功能的研究进展, 酶与行为和疾病的关系, 以及利用基因剔除小鼠开展进一步研究的展望。

1 单胺氧化酶 A 和 B 的分类

1968 年, Johnston^[2]根据单胺氧化酶对其不可逆抑制剂 clorgyline 的敏感度将其分成 A 和 B 两个亚类, 单胺氧化酶 A 对 clorgyline 敏感, 而单胺氧化酶 B 不敏感。进一步研究表明单胺氧化酶 B 比单胺氧化酶 A 对 pargyline 和 deprenyl 更敏感。90 年代初, Fowler 等发现单胺氧化酶 A 的偏爱底物是血清素和去甲肾上腺素, 而单胺氧化酶 B 则为苯乙基胺和苯甲胺。多巴胺是单胺氧化酶的一个较特殊的底物: 在人体内被单胺氧化酶 B 催化; 而在啮齿类动物中是由单胺氧化酶 A 氧化^[2, 5]。但是对于大多数物种, 多巴胺既可被单胺氧化酶 A, 也可被单胺氧化酶 B 氧化。以上是单胺氧化酶分类的一般规则。因为单胺氧化酶的底物专一性与底

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (021) 64374430-241, E-mail: wed@server.shnc.ac.cn

收稿日期: 1999-10-14, 修回日期: 2000-02-24