

## · 综述 ·

## 肿瘤坏死因子受体选择性拮抗剂的研究进展

江海龙<sup>1</sup>, 王宁远<sup>1,2</sup>, 陆一鸣<sup>1</sup> (1. 第二军医大学药学院微生物与生化药学教研室, 上海 200433; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108)

**[摘要]** 肿瘤坏死因子(TNF)信号通路是很有价值的治疗靶标, 抗 TNF 药物已成功治疗自身免疫和炎症疾病, 但传统的抗 TNF 药物完全封闭 TNF 信号通路, 导致影响自身的免疫调节和监视功能而增加感染、致癌的风险和产生新的自身免疫疾病。选择性抑制 sTNF/TNFR1 而保留 mTNF/TNFR2 传导的信号能减少副作用而不降低治疗效果。该文探讨了选择性抑制 TNFR1 介导的信号通路对治疗 TNF 相关疾病的意义, 分析 TNF 识别并激活肿瘤坏死因子受体(TNFR)的作用机制, 可能会为设计新药提供新的思路。

**[关键词]** 肿瘤坏死因子受体; 选择性拮抗; 药物靶点

**[中图分类号]** R979.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2015)05-0392-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.05.003

## Research advance of selective inhibitor of tumornecrosis factor receptor

JIANG Hailong<sup>1</sup>, WANG Ningyuan<sup>1,2</sup>, LU Yiming<sup>1</sup> (1. Department of Microbial and Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

**[Abstract]** TNF signaling pathway was a valuable target, and anti-TNF drugs were successfully used to treat autoimmune and inflammatory diseases. But this therapy abrogate some beneficial TNF signaling, leading to increased risk of infection and malignancy, and the onset of new auto-immune diseases. Inhibiting the soluble TNF/TNFR1 axis while saving the beneficial transmembrane TNF/TNFR2 signaling untouched was a new approach. Because it inhibited the pathological effects of TNF and reduced the side effects, and opened the way for the treatment of other diseases in which TNFR2 inhibition was detrimental. The significance of the selective inhibition of TNFR1-mediated signaling pathways for TNF-related diseases was discussed and the mechanism of TNF identification TNFR was clarified, which might provide new ideas for the design of new drugs.

**[Key words]** TNFR; selective inhibition; drug target

TNF 不仅帮助机体抵御感染, 而且能抑制自身免疫疾病的发展和肿瘤形成。然而, 全身和局部的 TNF 过度表达会诱导相关基因参与慢性或急性炎症反应而产生不良反应。比如, 在小鼠关节、肠道、中央神经系统选择性过度表达人 TNF 将分别导致炎症性关节炎、炎症性肠病、脱髓鞘等<sup>[1]</sup>。过去十年, 几百万患者使用了抗 TNF 抗体治疗取得很好的治疗效果, 这也证实非感染性炎症和自身免疫介导的疾病机制同 TNF 功能有密切联系<sup>[2]</sup>。

近期研究发现, TNF 表达下调会诱发一些疾病, 长期使用 TNF 拮抗剂也带来不少副作用。TNF 信号是有益还是有害取决于不同的配体(mTNF、sTNF)和受体(TNFR1、TNFR2)之间的相互作用。保留膜型 TNF、TNFR2 不被抑制或使用 TNFR2 激动剂, 以及完全抑制可溶性 TNF 和膜型 TNFR1 能减少 TNF 完全拮抗剂带来的副作用。因此了解 TNF 结合 TNFR1、TNFR2 的分子机制, 分析 TNFR 介导的信号通路中存在的新靶点及其相关药物, 将有助于实现对疾病更为彻底的治疗, 降低副作用的发生。

### 1 TNFR1、TNFR2 介导的信号通路

单核细胞、巨噬细胞、T 细胞、B 细胞是 TNF 的主要来源, 主要以 2 种不同的形式存在: 分布于细胞膜表面的蛋白分子(mTNF)和酶降解后可溶性的蛋

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30500093); 国家科技部“重大新药创制”专项(2009ZX09103-690); 上海市科委重点项目(04JC14002); 军队“十一五”计划(06Q042); 上海市高校优秀青年教师科研专项基金(ejd09011)

**[作者简介]** 江海龙, 硕士研究生, E-mail: 136396583@qq.com

**[通讯作者]** 陆一鸣, 博士, 副教授. 研究方向: 小肽类药物. E-mail: bluesluyi@163.com

白肽(sTNF)。膜型和可溶性的 TNF 分别与 2 种同源的膜受体相互作用,即表达于大多数细胞表面的 TNFR1 和优先表达于造血细胞的 TNFR2。虽然两种受体都可和两种形式的 TNF 结合,但可溶性的 TNF 多和 TNFR1 结合,膜型的 TNF 易结合 TNFR2。TNFR1 传递的信号与促进炎症、细胞毒性、细胞凋亡相关,而 TNFR2 传导的信号与促进细胞活化、增殖、迁移有关<sup>[3]</sup>。

膜结合的 TNF、TNFR 被金属蛋白酶 TACE (TNF 转化酶)剪切成可溶性的蛋白。TACE 作用于 mTNF 的 66 位 Ala 和 67 位 Val 形成相对分子质量为 17 483 的 sTNF。近期,McIlwain 等<sup>[4]</sup>发现菱形蛋白家族的 iRhom2 能调节造血细胞中 TACE 的成熟和运输,iRhom2 基因敲除的小鼠给以致死剂量的 LPS 仍能存活,这可能使 iRhom2 成为治疗 TNF 相关疾病的一个新靶标。

三聚化的 TNF 和 TNFR1 的胞外区结合将诱导产生两种复合物,第一种复合物通过 TNFR1-TRADD-TRAF 途径激活 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 通路控制促炎分子与抗凋亡蛋白的表达,第二种复合物通过 TNFR1-TRADD-FADD 途径促进凋亡过程。TNFR2 胞内域虽然没有 DD 结构域,但是可与 TNF 受体相关因子 (TRAF) 的基序结合后激活 NF- $\kappa$ B 和 JNK 激酶。磷酸化的 TRAF2 能激活 NF- $\kappa$ B 和 JNK,但也能抑制 JNK 的持续激活。在两种受体共激活和表达时,TNFR2 诱导 TRAF2 的降解将抑制抗凋亡通路和促进 TNFR1 介导的细胞毒性。TNFR2 与膜型 TNF 的结合能力强于可溶性的 TNF,它将可溶性的 TNF 传递给 TNFR1,增强其信号传导。TNFR2 广泛表达于 Treg 细胞表面,Treg 对维持自身抗原耐受有很重要的作用,完全封闭 TNF 将导致 Treg 功能的异常,诱导自身免疫疾病的出现。Chen 等<sup>[5]</sup>发现 TNFR2 能稳定 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg,使其维持免疫自稳、避免自身免疫异常和肿瘤的免疫侵袭。TNFR2 介导的信号通路在关节炎和部分炎症疾病中有保护作用,有文献报道选择性激动 TNFR2 能破坏 CD8T 细胞,有效治疗 1 型糖尿病<sup>[6]</sup>。保留 mTNF 而抑制 sTNF 能够维持机体抵抗病原体的能力,激活后续通路产生的 NO 也维持其抗肿瘤效应。

## 2 TNF 与其受体的相互作用

TNF 是 II 型跨膜蛋白(单次跨膜,C 端在胞外,N 端在胞浆内),C 端胞外区的 150 个氨基酸残基组成 TNF 同源区 (THD),结构上为 10 个  $\beta$  条带构成

的  $\beta$  凝胶卷。为了同 TNFR 作用,THD 常以  $\beta$  面用非共价键形式聚集成同源三聚体。

TNF 受体为 I 型跨膜受体(单次跨膜,N 端在胞外),有 4 个富含半胱氨酸区域 (CRD1~4),CRD2 和 CRD3 结合 TNF,CRD1 (又称前配体装配区,pre-ligand assembly domain,PLAD) 帮助 TNFR1、TNFR2 的同源三聚化。TNF 和 TNFR 以 3:3 比例形成复合物是信号传递的前提,而 TNFR 通过 CRD1 在细胞表面预装成二聚体。可溶性的 PLAD 可选择性的抑制相应 TNFR 的同源三聚化,阻断 TNF 介导的炎症信号。CRD2 结构上高度保守,负责调节结合的紧密程度;CRD3 结构上高度可变,负责调节结合的特异性<sup>[7]</sup>。

两种 TNFR 都是以复合物的形式发挥作用的,而不是通过单独的受体亚单元与配体的寡聚作用。Yohei 等<sup>[2]</sup>用实验证实了 TNFR2 形成复合物对信号起始的重要性。在分析 TNF 与受体晶体复合物时发现,TNFR2 的接触面比 TNFR1 带更多的负电荷。两种受体在结合区域存在分子对接口袋 (TNFR2:Ser<sup>79</sup> to Asp<sup>81</sup>,TNFR1:Arg<sup>77</sup> to Gly<sup>81</sup>),这些位点的基序可被用来设计选择性受体拮抗剂。

## 3 传统的抗 TNF 抗体及其缺点

目前上市的抗 TNF 抗体有:①人鼠嵌合的单抗,英夫利昔单抗 (infliximab);②完全人化的抗体:阿达木单抗 (adalimumab);③可溶性 TNFR II 型受体与 IgG 分子 Fc 区的融合蛋白:依那西普 (etanercept)。使用英夫利昔和阿达木单抗治疗风湿性关节炎的患者容易出现结核杆菌及真菌恶性感染等不良反应<sup>[8]</sup>。依那西普结合 mTNF 的能力较弱,治疗克罗恩病的疗效逊于英夫利昔单抗和阿达木单抗,但它不容易引起感染。这表明较弱的 mTNF 结合能力有助于免疫系统更好地发挥作用<sup>[9]</sup>。

## 4 当前非抗体蛋白对 TNFR 的作用

4.1 颗粒蛋白前体 (progranulin) 颗粒蛋白前体大量表达于内皮细胞、免疫细胞、神经元细胞、软骨细胞,是一种内源性生长因子,常与主动防御、炎症、肿瘤、神经功能有关。沉默颗粒蛋白前体将加重胶原诱导的小鼠关节炎模型的症状。重新给以人重组颗粒蛋白前体,能阻止疾病的进展。相似的结果在 TNF 转基因小鼠关节炎模型有报道,表明颗粒蛋白前体通过抑制体内 TNF/TNFR 信号实现它的抗炎效应。唐伟等<sup>[10]</sup>使用酵母双杂交筛选,确定了 TNFR1 和 TNFR2 是这种分子主要的结合蛋

白。他们开发了一种类似的小分子 *atsttrin*, 保留了 *progranulin* 作用于 TNFR 的基本功能, 对 TNFR2 的亲合力高于 TNFR1。 *atsttrin* 在延缓疾病进展上比 *progranulin* 效果更好, 比依那西普更能减轻关节炎动物模型的炎症。 *progranulin/atsttrin* 的作用机制可能是多方面的, 它一方面作为拮抗剂抑制 TNFR1 介导的炎症信号通路, 另一方面作为激动剂促进 TNFR2 介导的 Treg 和 Teff 调节功能。

**4.2 肿瘤坏死因子受体的前配体装配区** 前配体装配区 (PLAD) 是 TNFR 在细胞外氨基末端的区域, 它在物理性质上与几种 TNF 接触的主要区域不同, 预示着它在 TNFR 信号转导中有很重要的作用。 Deng 等<sup>[11]</sup> 发现可溶性的 PLAD (尤其是 TNFR1 来源的) 可拮抗 TNF 在体外的生化效应和显著抑制动物关节炎模型的炎症。可能是膜型 TNF 产生的有益信号被抑制, 而可溶性 TNF 产生的有害信号未被封闭。

**4.3 胰岛素样生长因子结合蛋白 5 (IGFBP-5)** 胰岛素样生长因子结合蛋白是胰岛素样生长因子 (IGF) 系统的重要成员, 它可以和 IGFs 结合形成复合物, 使得血液中能与 IGF 受体结合的 IGFs 减少, 降低其促增殖、分化、能量代谢等作用。 IGFBP-5 有 3 段功能域: N 末端功能域、L 功能域、C 末端功能域。 Hwang 等<sup>[12]</sup> 通过免疫共沉淀发现, 只有 IGFBP-5 的 L 段能够选择性地与 TNFR1 结合, 竞争抑制 TNF 结合 TNFR1, 从而抑制下游的促炎效应。

**4.4 TNF 突变体** Mukai 等<sup>[13]</sup> 利用噬菌体展示技术使 TNF 在 29-32、84-89、145-147 等位点的氨基酸产生突变, 筛选出高亲和性的 TNF 突变体 R1antTNF。 R1antTNF 对 TNFR1 的结合能力强于野生型 TNF, 而结合 TNFR2 的能力下降, 体内外实验都证明其具有很好的抗炎效应。

**4.5 基于 TNFR1 的模拟肽** Takasaki 等<sup>[14]</sup> 通过研究 TNF 与其受体的晶体结构, 确定了关键的 TNF 结合位点。 将这些位点的氨基酸序列进行替换和环化, 发现其中的 WP9QY 具有很好的 TNFR1 结合活性。 在 TNF 介导的细胞毒效应中, 75  $\mu\text{mol/L}$  的 WP9QY 可缓解 90% 的 L929 细胞不被杀死。 Mukaro<sup>[15]</sup> 利用放射性碘标记 TNF<sub>70-80</sub> 多肽 (该多肽只激活 p38 和 NF- $\kappa$ B) 和相应的 TNF 突变体, 发现了 TNF<sub>70-80</sub> 多肽的结合位点 (位于 TNFR1 胞外区和跨膜区的三肽 GTT), 并合成一段重复的九肽 (GTTGTTGTT), 取得良好的抗 TNF 效应。

**4.6 从固相合成随机肽库中筛选活性肽** Chid-

nos-Rojas 等<sup>[16]</sup> 利用固相合成组合随机肽库鉴定了两条多肽, SEP1 (SSYKYLXX)、SEP7 (PIRRSDSX) 可模仿 TNF 受体结合位点的功能。 细胞毒性实验表明, 该多肽以剂量依赖性方式抑制 TNF 杀伤人 KYM-ID4 细胞和小鼠 L929 细胞。 分析表明, 该抑制作用依赖于精氨酸侧链上的咪唑基。

**4.7 从噬菌体展示文库中淘选封闭肽** 尹丙姣等<sup>[17,18]</sup> 以 TNFR1 为靶点采用噬菌体展示技术进行亲和淘选 12 线肽库和环 9 肽库, 获取了具有较好结合能力和生物活性的多肽 (12 线肽: DHRPLWGESMVW、环 9 肽: CKHALHRHC)。 用人 IgG1 的 Fc 段连接多肽获得的融合蛋白具有更好的结合能力和活性, 显著抑制人单核细胞炎症因子的释放, 可抵抗高脂血症诱导的小鼠肥胖。

## 5 TNFR1 选择性抗体

科研工作者长期致力于获得选择性拮抗 TNFR1 的单抗, 但未获得理想的效果。 因为多数 TNFR1 单抗不是以拮抗剂的方式识别 TNF 的结合位点, 而是以激动剂的方式起作用。 Roland 等<sup>[19]</sup> 第一次获得了人源化的 TNFR1 抗体 (IZI-06.1), 与 TNFR1 的半胱氨酸富含区 1 (CRD1) 有很高的亲和性, 而对 TNFR2 无亲和作用。 IZI-06.1 抑制凋亡的同时也抑制炎症因子的表达。 TNFR1 抗体能治疗 TNF 抗体治疗效果不佳的疾病, 减少 TNF 抗体所致的副作用, 目前已进入 II 期临床研究阶段。

## 6 小分子 TNFR1 拮抗剂

Carter 等<sup>[20]</sup> 通过筛选化合物库显示母核结构为 N-烷基-5-芳香基-2-咪唑-1,3-噻唑-4-酮的化合物能够破坏 TNF 结合 TNFR1 ( $\text{IC}_{50} = 50 \text{ nmol/L}$ ), 从而抑制 Ramos 细胞中 I $\kappa$ B 磷酸化 ( $\text{IC}_{50} = 600 \text{ nmol/L}$ )。 这类化合物与 TNFR1 有较弱的结合能力 (40~100  $\mu\text{mol}$ ), 在光的作用下与 TNFR1 上 Ala-62 的 N 原子发生共价结合。 Murali 等<sup>[21]</sup> 通过设计小分子化合物 (F002) 与 TNFR 的 W-107 结合, 使 TNFR1 产生变构效应, 占据了 TNF 与 TNFR1 的结合位点, 使下游的炎症激活通路得到抑制。 虽然发现多种小分子天然化合物可以在细胞水平抑制 TNF 的活性, 但是大多数小分子化合物体内起效浓度很高, 而且还有较强的细胞毒性。

## 7 总结

过去 20 年, 抗 TNF 治疗取得很好的效果, 使用 TNF 抗体甚至成为关节炎和炎症肠病的标准治疗

方式。TNF 作为多功能的细胞因子,完全拮抗 TNF 的所有信号通路会产生严重的副作用。选择性抑制 TNFR1 和 sTNF,或激动 TNFR2 能避免抑制炎症通路的同时而不影响免疫调节和监视功能。目前文献报道的方法有:①设计针对 iRhom2 的药物影响 TACE 表达或筛选药物直接抑制 TACE 的活性来调节可溶性 TNF 浓度;②利用 TNFR1、TNFR2 与 TNF 结合的晶体结构分析存在的分子对接口袋,设计选择性结合 TNFR1 的小分子药物;③改造内源性的配体(颗粒蛋白前体、胰岛素样生长因子结合蛋白 5、TNFR1 的 PLAD)以增强其结合的选择性;④利用文库淘选结合 TNFR1 的单抗等等。TNFR2 有维持免疫自稳的作用,但其具体机制还不明确,使用 TNFR2 激动剂能改善一些炎症疾病,但还不清楚其促增殖作用是否会增加癌变风险。已报道的几种靶向 TNFR1 的小分子药物虽然有较好的拮抗作用,但也带来明显的细胞毒性。因此综合考量以上因素,选择合适的药物抑制 TNF 的部分通路,将是未来研究抗 TNF 药物的主要方向。

## 【参考文献】

- [1] Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, *et al*. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity[J]. *Curr Dir Autoimmun*, 2010, 11(2):1-26.
- [2] Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, *et al*. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex[J]. *Sci Signal*, 2010, 3(148): 1-10.
- [3] Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily players, rules and the games[J]. *Immunology*, 2005, 115(1): 1-20.
- [4] Mcllwain DR, Lang PA, Marezky T, *et al*. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against listeria and responses to LPS[J]. *Science*, 2012, 335(6065): 229-232.
- [5] Chen X, Wu X, Zhou Q, *et al*. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+ Foxp3+ Regulatory T cell phenotype in the inflammatory environment[J]. *J Immuno*, 2013, 190(3):1076-1084.
- [6] Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(6):482-493.
- [7] Magis C, van der Sloot AM, Serrano L, *et al*. An improved understanding of TNFL/TNFR interactions using structure-based classifications[J]. *Trends Biochem Sci*, 2012, 37(9): 353-363.
- [8] Dixon, Hyrich KL, Watson KD, *et al*. Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR)[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(3):522-528.
- [9] Takeuchi T, Tatsuki Y, Nogami Y, *et al*. Post marketing surveillance of the safety profile of infliximab in 5 000 Japanese patients with rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(2):189-194.
- [10] Tang W, Lu Y, Tian QY, *et al*. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice[J]. *Science*, 2011, 332(6028): 478-484.
- [11] Deng GM, Zheng LX, Lenardo M, *et al*. Amelioration of inflammatory arthritis by targeting the pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptors[J]. *Nat Med*, 2005, 10(11):1066-1072.
- [12] Hwang JR, Huh JH, Lee Y, *et al*. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) inhibits TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activity by binding to TNFR1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405(4): 545-551.
- [13] Mukai Y, Shibata H, Nakamura T, *et al*. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant[J]. *J Mol Biol*, 2009, 385(4): 1221-1229.
- [14] Takasaki W, Kajino Y, Kajino K, *et al*. Structure-based design and characterization of exocyclic peptidomimetics that inhibit TNF-binding to its receptor[J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 1266-1270.
- [15] Mukaro. Selective activation of tumour necrosis factor receptor-mediated intracellular signalling pathways[D]. Adelaide: School of Paediatrics and Reproductive Health, 2009.
- [16] Chidnos-Rojas CL, Steward MW, Partidos CD, *et al*. A peptidomimetic antagonist of TNF- $\alpha$ -mediated cytotoxicity identified from a phage-displayed random peptide library[J]. *J Immunol*, 1998, 161(10):5621-5626.
- [17] 尹丙姣, 黄丽霞, 梁慧芳, 等. TNFR1 封闭肽-hlgGFc 融合蛋白和 TNFR1 封闭肽对 TNF- $\alpha$  介导的生物学效应的封闭作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2008, 24(9):776-780.
- [18] Liang H, Yin B, Zhang H, *et al*. Blockade of tumor necrosis factor (TNF) receptor type1-mediated TNF- $\alpha$  signaling protected wistar rats from diet-induced obesity and insulin resistance[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(6):2943-2951.
- [19] Roland E, Sabine M, Jens N, *et al*. A humanized tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)-specific antagonistic antibody for selective inhibition of tumor necrosis factor (TNF) action[J]. *J Immunother*, 2008, 31(3):225-234.
- [20] Carter PH, Scherle PA, Muckelbauer JK, *et al*. Photochemically enhanced binding of small molecules to the tumor necrosis factor receptor-1 inhibits the binding of TNF- $\alpha$  [J]. *PNAS*, 2001, 98(21):11879-11884.
- [21] Murali R, Cheng X, Berezov A, *et al*. Disabling TNF receptor signaling by induced conformational perturbation of tryptophan-107[J]. *PNAS*, 2005, 102(31):10970-10975.