

专论与综述

蛋白质晶体学与药物设计

林 政 炯

(中国科学院生物物理研究所,北京)

提 要

蛋白质晶体学的发展,产生了根据药物靶分子三维结构知识开展药物设计的新研究方向。本文通过一些有代表性的研究工作,介绍目前了解到的药物分子与靶分子相互作用的结构基础以及以这些结构知识为依据开展药物设计的初步尝试。

虽然医学已经取得巨大成就,但还有许多疾病人类无法征服,开发新型药物仍是十分迫切的任务。很多药物是由比较小的分子组成。这些分子是通过与某些特定的生物大分子即药物靶分子发生相互作用,影响后者的生物学功能以达到其治疗效果的。而药物分子与其靶分子都具有特定的三维结构,因此只有在深入了解其结构、相互作用及其与功能的联系的基础上,才能有效地进行药物设计,从而发明新药。

长时间以来,由于没有靶分子三维结构知识的指引,寻找药物总带有一定的盲目性。近来,随着药物靶分子三维结构信息的增加,把寻找新药的工作建立在结构知识基础之上的一个药物设计新研究领域已经出现^[1,2]。这主要应归功于X射线衍射法或蛋白质晶体学。

晶体的X射线衍射一直是测定蛋白质空间结构的唯一方法,最近几年,虽然出现了二维核磁共振等新技术,但X射线衍射作为测定蛋白质空间结构主要方法的地位仍未受到挑战。X射线衍射不仅能够提供药物靶分子的三维结构,而且可采用一种简便的差值傅里叶技术直接显示药物分子在靶分子表面的结合部位和方式。这种技术的简便使得以“反馈”方式进行药物设计有了现实可能,这就要不断用差值傅里

叶综合及时检查新设计的药物与靶分子复合物结构,看是否如预测的那样相互作用,如果不是,就修改设计思想,重新合成药物分子,再次进行复合物结构分析,直至获得满意的药物为止。

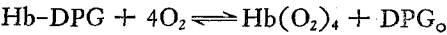
X射线衍射技术在药物分子设计领域的应用历史不长。在蛋白质晶体学发展的早期阶段,因受结构分析水平与结晶技术的限制,很难选择药物靶分子等有实用价值的蛋白质作为研究对象。最近十年,情况发生了重大变化:由于结晶技术的进步,已有可能获得更多的药物靶分子晶体作为X射线衍射研究的对象;由于结构分析能力的提高,可以研究包括感冒病毒在内的极其复杂的药物靶分子结构;由于结构精化技术日趋成熟,所测的结构已达到比较高的精度(0.1 Å),可以研究药物分子与靶分子结合的精细立体化学,并凭借图象系统及其软件的发展,用图象方式显示和分析所得到的结构信息。这些进展,使得利用X射线衍射方法揭示药物靶分子及其与药物小分子结合的三维结构,并在此基础上开展药物设计工作具备了现实的可能性。这条药物设计新途径的价值与前景已引起人们的广泛注意。

药物靶分子包括酶、膜蛋白、毒素蛋白、核

酸和病毒等几类, 目前以血红蛋白和一些酶的研究较为活跃。下面举一些有代表性的例子, 介绍用X射线衍射方法所揭示的药物分子与靶分子相互作用的结构基础, 及以这些结构知识为依据开展药物设计的初步尝试。

血 红 蛋 白

血红蛋白承担着从肺部到组织输送O₂的功能。60年代末, 发现一种小分子DPG(2,3-二磷酸甘油酸)有调节血红蛋白分子对O₂亲和力功能。从血红蛋白别构平衡观点来看, DPG与脱氧血红蛋白Hb的结合有利于O₂的释放, 使氧合血红蛋白氧饱和曲线向右移,



应用X射线衍射方法, 现已大致弄清楚了与氧结合前后血红蛋白分子构象的变化以及DPG

作用的结构基础^[3]。DPG分子结合于Hb的两个β亚基之间, DPG的三个带负电荷基团与每个β亚基中三个带正电荷基团相互吸引, 生成6个盐键, 使脱氧血红蛋白的构象趋于稳定。图1a给出DPG结合部位的立体化学。

1976年Beddell等人根据X射线衍射所揭示的DPG结合部位的结构特点, 设计并合成了一系列与DPG结构类型不同的双苯二醚衍生物^[4], 检测到产生使脱氧血红蛋白构象稳定和氧饱和曲线右移的生理效应。图1b给出了其中一种衍生物与血红蛋白分子相互作用的模型。所引入的一个羧酸和两个磺酸基团是为了提高溶解度, 也是为了增加亲和力。此项研究已被认为是根据靶蛋白分子三维结构资料进行药物设计的开创性工作。

镰刀形细胞贫血病是一种遗传性分子病,

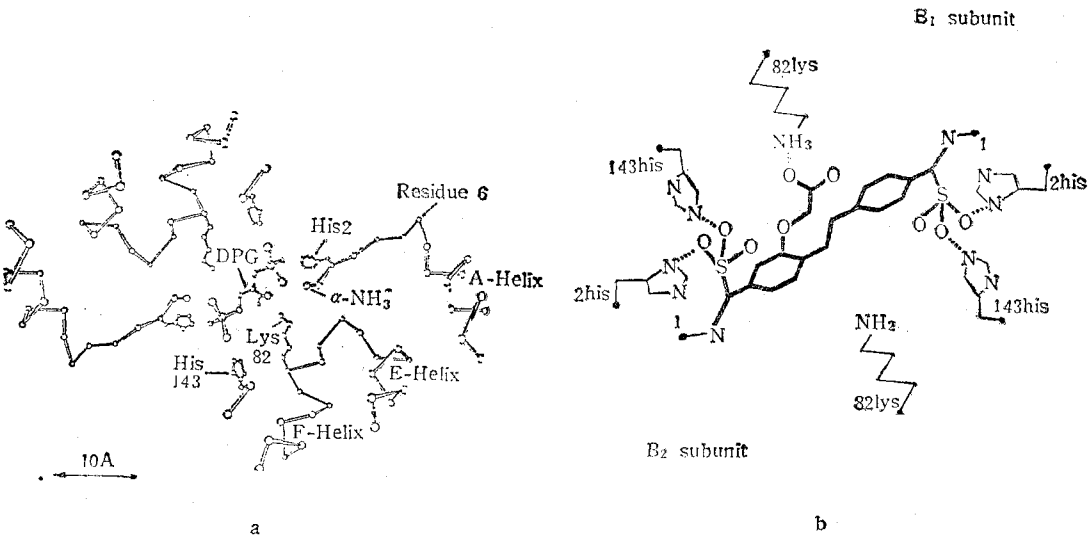


图 1

(a) X射线衍射所揭示的 DPG 与人脱氧血红蛋白的结合部位^[3] (b) 根据 DPG 结合部位结构特点设计的新配体, 一种双苯二醚衍生物及其与血红蛋白分子的相互作用^[4]

起因于血红蛋白分子β亚基中第6位氨基酸Glu被疏水性氨基酸Val所置换, 生成变异的血红蛋白HbS, 由于置换后所产生的表面疏水微区, 使HbS分子易于聚合, 引起红细胞的镰刀形化, 结果造成红细胞通过毛细血管受到阻碍。根据最新的包括HbS等几种人血红蛋白高分辨率三维结构资料, 可对HbS聚合过程的细节作出推测, 这个聚合过程涉及HbS分子的

第6位Val与相邻分子链之间的相互作用。最近已经测定了数种抗镰刀形细胞贫血病药物与血红蛋白复合物的晶体结构^[5], 初步揭示了药物作用的一些可能方式。如药物ethacrynic acid可能与HbSβ亚基第9位Cys发生相互作用, 进而减弱了上述第6位Val与相邻分子链HbS之间的亲和力, 使分子聚合难以形成。值得注意的是, X射线结构分析表明, 许多

药物都结合在远离 DPG 结合部位的 α 亚基之间,但却产生与天然效应物 DPG 类似的降低氧亲和力效应,暗示蛋白质分子可能存在多种未被自然界利用的效应物结合部位,这些部位可用于药物设计。

二氢叶酸还原酶 (DHFR)

DHFR 催化二氢叶酸生成四氢叶酸的反应。在氨基酸、胸苷酸和嘌呤的生物合成中需要四氢叶酸作为中间物,如果二氢叶酸还原酶受到抑制,四氢叶酸的含量就会减少,这将会导致细胞生长的停止。因此可用来抑制癌细胞或细菌细胞的生长,抗菌素三甲氧苄二氢嘧啶 (Trimethoprim, TMP), 抗疟药乙胺嘧啶 (pyrimethamine) 和抗白血病药氨甲蝶呤 (methotrexate, MTX) 等 DHFR 抑制剂已在临床中使用。由于 DHFR 抑制剂的多种重要医学用途,十年前 Kraut 等人就选择它作为药物设计的靶分子,与有关公司合作开展了 X 射线晶体学的研究。到目前为止,已经获得几种

种属来源的 DHFR 的高分辨率结构,并已了解到底物与 NADH 辅因子在酶分子上的结合部位,弄清了其与抗癌物 MTX、抗菌素 TMP 复合物结构。发现 TMP 与 MTX 结合于酶的另一结合部位,与酶存在着范德瓦耳氢键和离子键等相互作用。TMP 之所以成为一种抗菌药,是因为它能专一的抑制细菌 DHFR 活性,而不与人体内 DHFR 发生作用。研究 TMP 的这种选择性抑制的立体化学对于有效进行药物设计显然具有重要意义。已用差值傅里叶综合测定了 DHFR 与 TMP 复合物结构^[6,7],结果表明, TMP 与脊椎动物(如鸡)来源酶和细菌(如 *E. Coli*) 来源酶的结合方式不大一样。鸡二氢叶酸还原酶的结合口袋比 *E. Coli* 来源酶大了 1.5—2.0 Å 左右。在 *E. Coli* 来源酶中, TMP 的三甲氧苄环结合于 NADH 部位附近;而在鸡来源酶中,则偏离 NADH 部位。如图 2 所示。为了找出在 TMP 与 DHFR 结合的众多立体化学因素中对选择性最为重要的因素,设计并合成了多种抑制剂类似物,并

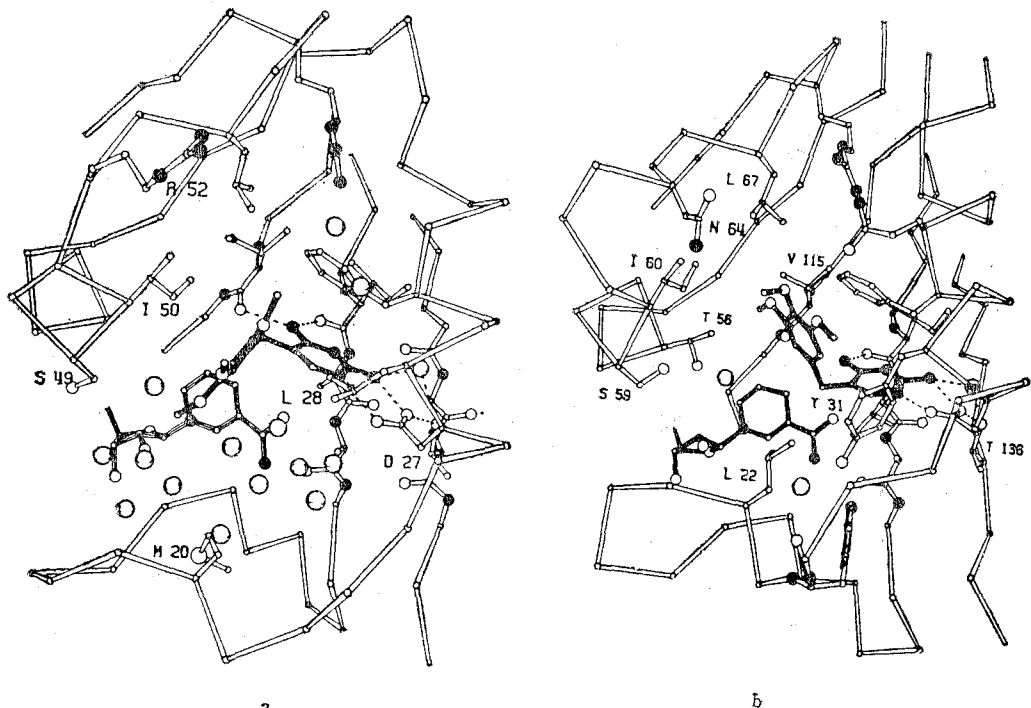


图 2 二氢叶酸还原酶结合 TMP 部位

(a) *E. Coli* 酶; (b) 鸡酶。注意 TMP 的三甲氧苄环的取向在两种酶中不一样,和 *E. Coli* 酶对比,在鸡酶中 TMP 的二氢嘧啶环的 4 氨基与酶的主链羰基之间失去一个氢键^[7]

对这些抑制剂与 DHFR 复合物进行结构分析。结果发现对选择性负责的主要因素并不是三甲氧苄环取向的差异,而是 TMP 的二氢嘧啶环的 4-氨基与 DHFR 主链羰基氧之间形成氢键数量不一样。当 TMP 与 *E. Coli* 的 DHFR 结合时,能够形成两个氢键,而在与鸡的 DHFR 结合时只能形成一个氢键。这是用蛋白质晶体学方法揭示药物分子种属选择性立体化学的第一个例子。

根据 TMP 与 DHFR 复合物的结构知识,曾尝试合成一些比 TMP 作用更强的抑制剂^[8]。图 3 给出了细菌 DHFR 底物结合部位。从图 3 中可以看到, TMP 的二氢嘧啶环与第

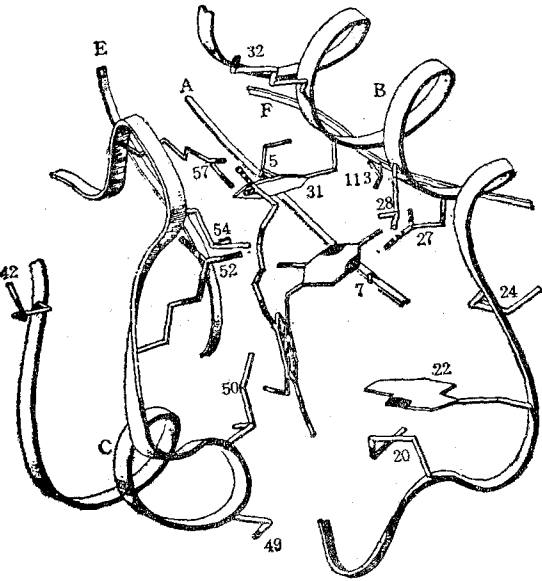
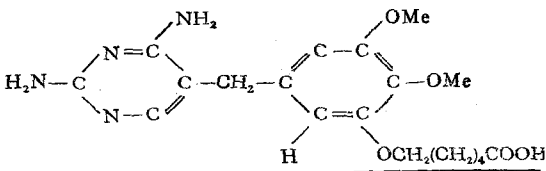


图 3 细菌二氢叶酸还原酶与 TMP 结合部位的示意图

在 TMP 的苯环上引入一个长链脂肪酸,使之与 57 位 Arg 发生静电相互作用,增强抑制能力^[8]

27 位门冬氨酸有紧密接触。值得注意的是在 TMP 上方相距几 Å 处还有一个碱性氨基酸即第 57 位的精氨酸。可以设想,如果在 TMP 苯环上的适当位置引进一个脂肪酸链,使其与 Arg-57 发生静电相互作用,将会加强药物的抑制作用。根据这个想法,曾设计并合成了一种 TMP 类似物:



(划线部分为新引入的脂肪链)

经实验证明,此类物确是更强的抑制剂, X 射线衍射实验也证实其结合方式与预测一致。

血管紧张肽转变酶 (ACE)

血管紧张肽 II 是控制血压的重要因子。此激素浓度越高,血压也越高。在体内此激素的产生经历了两步过程: 第一步在血管紧张肽原酶 (renin) 催化下无活性的血管紧张肽原分裂成血管紧张肽 I (十肽); 第二步在 ACE 催化下, 将血管紧张肽 I 的羧端二肽去掉, 生成血管紧张肽 II。抑制任何一步反应都会导致血管紧张肽 II 浓度的下降, 从而降低血压。

迄今为止, 尚未见到有关 ACE 三维结构的报道, 但已知它是一个含锌的外肽酶, 而一种这样的蛋白水解酶即羧肽酶 A (CpA) 的结构已经知道的比较详细。1977 年 Cushman 等假定 ACE 的活性部位与作用方式类似于 CpA, 提出了一个 ACE 活性中心模型, 并以此来指导药物设计^[9]。根据这个模型, 被水解的多肽的带负电荷羧端与 ACE 的带正电荷基团发生相互作用, 而被水解的肽键的羰基则与锌离子发生相互作用, 两者之间大约相隔两个氨基酸残基的距离 (在 CpA 情况下只间隔一个氨基酸残基)。模型中还假定底物氨基酸侧链与酶有某种互补关系并发生相互作用 (如同在 CpA 情况下, 底物的苯丙氨酸侧链与酶的专一疏水口袋发生作用那样), 底物中不被水解的肽键与酶分子的一基团发生氢键结合 (见图 4)。作者并根据 D-2-苯琥珀酸是 CpA 很强的双产物型抑制剂这一事实, 推测琥珀酰氨基酸可能是良好的 ACE 抑制剂, 以此为起点设计合成了一系列 ACE 抑制剂, 并检验其抑制能力, 首先发现, 当氨基酸为脯氨酸时抑制能力最强, 接着又证实了用巯基代替羧基会具有更强抑制作用。

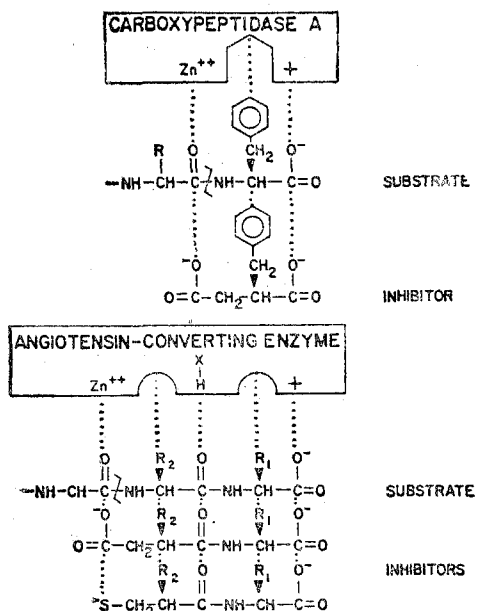
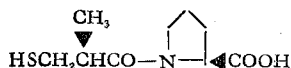


图4 牛胰羧肽酶A活性部位和血管紧张肽转变酶
假设的活性部位模型^[9]

示出已知的或假设的底物与竞争性抑制剂的结合方式。在CpA活性部位模型中,用六方形口袋表示酶活性部位的疏水口袋,而在ACE模型中,则用半圆形口袋表示与底物或竞争性抑制剂的侧链 R_1 和 R_2 的相互作用部位。 $X-H$ 表示ACE活性部位形成氢键的残基

又进一步观察到,当侧链为 CH_3 时效果最佳。最后,作者设计了一种结构式为



的药用抑制剂,现已在市场上出售,商品名叫Captopril。Captopril可以说是在某种程度上参考了已知蛋白质晶体结构资料所设计出的第一个有实用价值的药物。

感冒病毒(HRV14)

最近,使亿万人深受其害的感冒病毒结构已被测定成功。美国Rossmann教授实验室测定了人感冒病毒(HRV14)的晶体结构^[10],精度达到原子分辨率。人感冒病毒为一直径约300Å的球体,中间为RNA,外面是蛋白外壳,具有二十面体对称性,由60个单体(每个单体包括四种亚基:Vp1, Vp2, Vp3和Vp4)组成。已经鉴别出病毒分子与细胞接触部位,它

们是位于五重轴附近一个深度为25Å的“峡谷”(canyon),细胞表面的受体分子可与此“峡谷”结合,但体积较大的抗体分子却不可能。这样,人体内所产生的抗体就无法阻止病毒感染。根据已有的这些结构知识,可以提出以下几种方式设计抗病毒药物分子:①设计能竞争性地进入“峡谷”区,以阻止病毒与细胞表面的受体分子结合的药物分子;②设计以某种方式与病毒分子结合,防止后者进入体内后解聚的药物分子;③设计干扰亚基间的相互作用,破坏病毒亚基在体内自装配能力的药物分子等。

抗病毒药物分子WIN 51711和WIN 52084的作用是阻止病毒分子的解聚,但不影响与细胞的接触及随后的渗透。这两种药物分子与HRV14复合物结构已经测定^[11],结果表明,此药物分子结合位点靠近“峡谷”底部,药物分子的OP基团(Oxazoline and phenyl group)位于病毒分子的一个亲水区。此亲水区的一侧有一细孔与“峡谷”底部相通,此孔打开了通向病毒分子内部RNA内核的通道。药物分子的另一头即I基团(isoxazole group)则结合于VP1β-桶内部的一个疏水口袋,起稳定这个疏水口袋的作用。如图5所示,防止VP1疏水

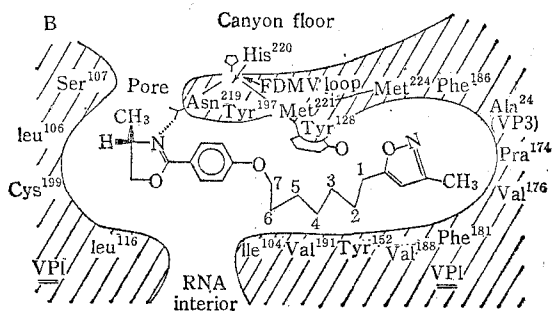


图5 抗感冒病毒化合物WIN 52084结合部位示意图
VP1指组成病毒外壳蛋白的一种亚基, canyon是假设的病毒与细胞受体分子的结合部位^[11]

口袋受到破坏或阻断 Cs^+ 离子经过“峡谷”底部的细孔流向病毒内部的通道是药物分子抑制病毒解聚的原因。这是第一个关于抗病毒药物分子与病毒相互作用结构基础的描述。

结 语

运用X射线衍射技术研究药物分子与靶分子的相互作用,并在此基础上开展药物设计工作已具备了现实性,一些开创性工作是很令人鼓舞的,它已显示出比以往传统的寻找新药方法的明显优越性。X射线衍射所提供的丰富的立体化学信息是产生药物设计新思想的源泉。从已获得的初步结果来看,药物分子与它的靶分子的结合是精巧的,从结构上来看是互补的,遵循一般配体分子与蛋白质相互作用的规律。药物分子一般结合在靶蛋白分子的特定结合部位,与靶分子发生大量弱相互作用,包括氢键、离子键、范德瓦尔相互作用等。对某些蛋白质可能不止存在一个结合部位,每个部位也不止有一个结合位点。不同的药物分子与不同的结合部位或结合位点的结合可能产生不同的药理效应。至少在一个例子中已发现药物作用的种属选择性起因于精巧的结合方式的差异。

即使尚未用实验方法直接测出药物受体分子的三维结构、一些同源或功能上相关的蛋白质的晶体结构数据以及一些分子力学与动力学方法推算出的模型结构,对于药物设计也会有重要参考价值,ACE酶抑制剂Captopril的研究提供了一个很好的例子。

结构知识为药物设计提供了一个良好的起点,但一个成功的药物设计要考虑多方面的因素,例如:药物分子与靶分子相互作用有关的热力学,如结合能以及熵(生物分子发挥生物学

功能的过程是自由能变化的过程)。还有,作为有用的药物还要满足一系列临床方面的要求。例如:要能够被人体吸收并到达靶分子的作用部位、稳定、无副作用、成本低等。现在已设计出的许多药物在临床上尚未取得明显成绩,正是由于对上述因素缺乏充分研究。

尽管有这些复杂因素和问题需要解决,但是一个新的依据药物靶分子三维结构知识的药物设计方法毕竟已经出现,并展示出诱人的前景。可以预期,在药理学、理论生物学、医学化学与蛋白质晶体学等领域的科研人员的密切合作下,在不太远的将来,将会看到一批采用这个崭新方法所设计的药物出现在市场上。

参 考 文 献

- [1] Hol W. G. J.: *Angew. Chem., Int. Ed., Engl.*, 1986, 25, 767.
- [2] Goodford P. J.: *J. Med. Chem.*, 1984, 27(5), 557.
- [3] Arnone A.: *Nature (London)*, 1972, 237, 146.
- [4] Beddell C. R. et al.: *J. Pharmacol.*, 1984, 82, 397.
- [5] Perutz M. F. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 1986, 108, 1064.
- [6] Matthews D. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 392.
- [7] Matthews D. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 381.
- [8] Kuyper L. F. et al.: *J. Med. Chem.*, 1982, 25, 1120.
- [9] Cushman D. W. et al.: *Biochemistry*, 1977, 16, 5484.
- [10] Rossmann M. G. et al.: *Nature (London)*, 1985, 317, 145.
- [11] Smith T. J. et al.: *Science*, 1986, 233, 1286.

[本文于1989年1月30日收到]

多功效复合肥——腐植酸铵生产技术

腐植酸铵肥料是我所研制的新产品,是一种由有机和无机元素组成的多功效复合肥料,它克服了现有肥料对农作物只起单一功效的作用,广泛适用于各种农作物的健康生长。生产腐植酸铵肥料的主要原料是天然矿物和氮态氮肥。由于社会上生产此类产品的厂家极少,市场需求量大,经济效益好,是乡镇企业上马的好项目。厂房面积约需100m²,主要设备为粉碎机,需水、电,投资5000元左右即可生产,原料成本0.06元/公斤,售价0.12元/公斤,若日产2吨,2个月便可收回全部投资。面授:单位300元,个人200元,函授:单位100元,个人80元。(B118)。[北京市星火技术研究所提供,通信处:北京867信箱20816组,邮政编码:100024(来信咨询请附四角邮资)。]