

11 孙之荣. 生物物理学报, 1994; (4): 665

The Supersecondary Motifs of Protein Structure. Sun Zhirong (*Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084; China*).

Abstract Simple combinations of a few secondary structure elements with a specific geometric arrangement have been found to occur frequently in protein structures. These units have been called either supersecondary struc-

ture or motifs. Motifs are formed by packing side chains from adjacent α helices or β strands close to each other. Simple motifs combine to form complex motifs. Several motifs usually combine to form compact globular structures, which are called domains. In other words, the cores of domains are built up from combinations of small motifs, such as α -loop- α , α -loop- β , β -loop- α , β -loop- β or β - α - β motifs.

Key words protein, supersecondary structure, motifs

反义寡核苷酸的化学修饰*

王升启

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 反义寡核苷酸的功能在很大程度上取决于其稳定性、生物利用度及与靶基因结合或反应的特性。通过特定的化学修饰可以改变这些物理、化学特性, 从而增加其抗病毒、抗肿瘤及对其他特定基因的表达抑制活性。

关键词 反义核酸技术, 反义寡核苷酸, 化学修饰

反义寡核苷酸技术 (antisense oligonucleotide technology) 最初是指与单链 RNA 互补的一段寡核苷酸序列。随着研究的不断深入, 发现寡核苷酸不仅可与单链 RNA 结合形成 DNA-RNA 杂合体, 而且某些特殊序列还可与双链 DNA 结合形成三链核酸 (triplex)。人们将前者称为反义 (antisense), 后者称为反基因 (antigene) 以示区别。此外, 还将能够竞争蛋白结合单链或双链 DNA/RNA 的序列称为正义 (sense)^[1]。反义寡核苷酸技术是目前所知最精确、高效及最具广泛意义的调控特异基因表达的潜在策略。这一技术为诸如病毒感染、肿瘤等重要疾病的治疗开辟了一个全新的途径。大量颇有苗头的体外和体内抗病毒及抗肿瘤药理实验结果、初步的药代动力学和毒理学实验

数据加之大规模 DNA 合成技术的进步, 已促成了用于治疗白血病 (AML)、人乳头瘤病毒 (HPV) 引起的尖锐湿疣及巨细胞病毒 (CMV) 引起的角膜炎的几种反义寡核苷酸 (ASON) 进入 I/II 期临床实验。

反义寡核苷酸的功能在很大程度上取决于其稳定性、生物利用度及与靶基因结合或反应特性。通过特定的化学修饰可以改变这些物理、化学特性, 从而增加其抗病毒、抗肿瘤及其他特定基因的表达抑制活性。本文综述介绍近年来国内外 ASON 化学修饰及生物学意义方面的研究进展。

* 总后卫生部“八·五”重点招标课题“反义寡核苷酸和核苷类抗病毒药物的研究”的部分内容。

收稿日期: 1994-12-05, 修回日期: 1995-04-11

1 增加核酸酶抗性

ASON 进入体内面临的第一个问题就是受到机体内大量存在的核酸酶的攻击, 采用适当的措施对 ASON 进行必要的化学修饰使其能抵抗核酸酶的降解, 这是 ASON 作为药物首先要考虑的问题。目前已有许多行之有效的方法可延长 ASON 在体内的半衰期。按其修饰位置不同可分为骨架、磷酸、糖环及碱基修饰等。

1.1 骨架修饰^[2,3]

与一般核酸结构一样, 正常的 ASON 链的骨架也是由一个接一个的核苷酸通过磷酸二酯键连接而成的核酸片段。这种天然结构对核酸酶异常敏感, 在体内半衰期仅数分钟, 在 ASON 未与靶基因结合前即已降解, 因此根本无法发挥其功能。基于 ASON 发挥其特异性抑制基因表达的关键在于其碱基排列顺序, 而与易降解的磷酸和糖环组成的磷酸二酯键骨架无关, 因此, 人们将天然的磷酸二酯键 (phosphodiester) 骨架换成聚酰氨 (nylon)、吗啡啉 (morpholin)、碳胺脂 (carbamate) 或肽骨架 (peptide), 结构见图 1。它们不仅非常稳定而且也有较好的抗病毒活性。

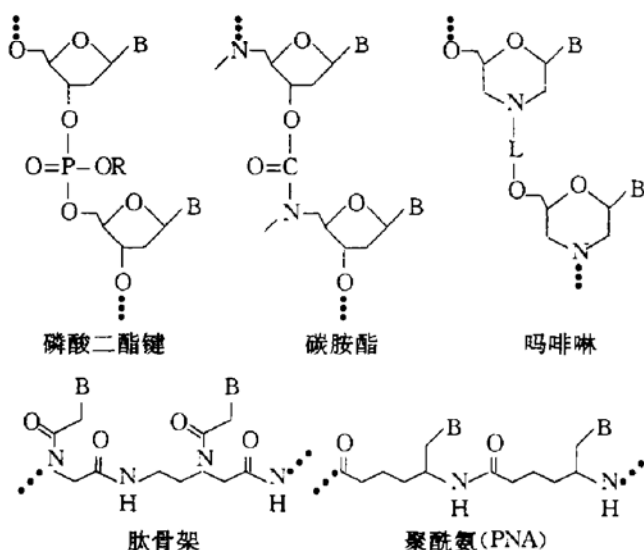


图 1 骨架修饰 ASON 的结构

1.2 磷酸修饰^[4,5]

ASON 的磷酸二酯键是核酸酶作用的关键

键化学键, 而磷原子更是核酸酶攻击的中心, 对该原子的轻微改变都会大大影响到核酸酶的作用。因此研究最多的化学修饰即是磷原子, 包括硫代、甲基化、胺化和酯化等 (图 2)。从现有研究资料看这是一类最有应用价值的修饰 ASON, 人们称之为第一代 ASON, 其中硫代 ASON 已进入临床实验阶段。

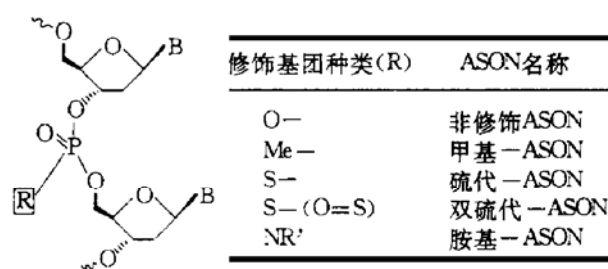


图 2 磷酸修饰 ASON 的结构类型

硫代修饰包括“一步法”和“逐步法”两种。所谓“一步法”就是指在 ASON 合成完成后采用硫化剂一次处理完成所有磷原子的硫化。这一方法适用于 H-磷酸法合成的 ASON, 所用的硫化剂为元素硫。与“一步法”不同, “逐步法”则是指每合成一个磷酸二酯键即进行一步硫化。它适用于磷酰亚胺法合成的 ASON, 所用硫化剂有四乙基秋蓝姆 (tetraethylthiorame) 等。

合成脱氧寡核苷酸 (ODN) 属多价阴离子, 因此很难透过细胞膜, 将 ODN 的 P-OH 用甲基、胺基或烷氧基取代后即可改变其离子特性, 从而不仅使其具有核酸酶抗性而且可以以被动转运的方式透过细胞膜。甲基化是比较成功的例子, 它可采用甲基化磷酰亚胺单体 (methylphosphoramidite) 在 DNA 合成仪上自动合成。这类修饰有两点不足: 一是形成的磷酸二酯键有 Sp、Rp 两种构型, 这样终产物就有 2^n 个异构体 (n 为磷酸二酯键的数目); 二是溶解性能较差。

1.3 糖环修饰^[6~8]

糖环上的修饰包括 α 构型、 $1'/2'$ -位取代及 $3'-3'/5'-5'$ 连接三种。 α 构型修饰是指将天然 DNA 的 β 型核苷键替换成 α 构型, 这一构型改变使核酸酶不能有效地识别其磷酸二酯键。

但最近也有研究资料却得出不同的结果, 即某些 α 型的 ASON 并不比 β 型更稳定, 其被血清中 3'-端核酸外切酶降解速度与 ASON 的 3'-端 2 个核苷酸的结构有关, 3'-端结构为 AG/CA/CT 时两者稳定性相当, 只有当 3'-端结构为 TC/AC/CC 时, α -型比 β 型更稳定. α 构型修饰 ASON 的合成采用的前体为 α 型核苷, 由于合成难度较大, 因此这类修饰的成本较高.

戊糖的 1'/2' 位引入一些取代基后, 即使不改变正常磷酸二酯键的结构也能使 ASON 具备较好的核酸酶抗性. 取代基类型较多, 除简单的烷基外, 还包括烷化剂、嵌入剂等特殊功能分子. 与 α 构型修饰类似, 这类修饰也是从单体的合成开始, 然后即可方便的通过合成仪合成.

考虑到核酸酶只识别 3'-5' 磷酸二酯键, Ortigao 等合成了一类具有 3'-3'/5'-5' 颠倒连接末端的 ASON (INV-ASON). 其合成路线与正常的 ASON 类似, 只是将 3'-磷酸亚胺单体换成 5'-取代即可 (图 3). INV-ASON 不仅合成方便, 半衰期长 (30 h), 而且由于结构改变较小, 因此不会影响其与靶基因的结合. INV-ASON 能有效地抑制 SV-40 大 T 抗原在 COS 细胞中的表达.

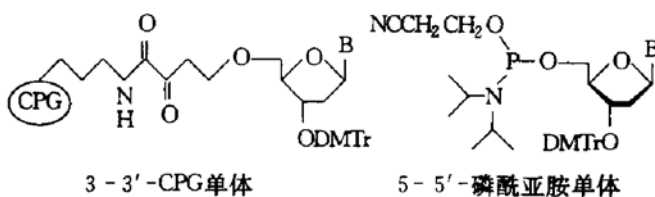


图 3 3'-5' 单体的结构

1.4 碱基修饰^[9~11]

碱基是 ASON 与靶基因通过氢键形成而直接接触的部位, 而氢键的形成又是 ASON 发挥功能的必要条件, 因此, 该部位的修饰应以不影响氢键的形成为前提. 任何影响 A-T (U) /G-C 碱基配对的修饰都会因碱基错配而导致 ASON 与靶基因的结合力或特异性降低或丢失. 由于上述原因, 就限定了碱基修饰基团位置, 一般要满足以下条件, 即修饰基必须位于形成双螺旋的大沟或小沟内, 满足这一条件的位置包括 U-5、C- (5, N4)、A/G (N2, N3, 3/7-deaza) 等. 碱基修饰基团的种类包括甲基、三氟甲基、炔丙基、咪唑丙基、蒽及碘乙酰胺丙基等, 此外还可见到杂环的修饰 (图 4). 与戊糖修饰类似, 这类修饰也是将单体修饰后, 通过合成仪合成目标 ASON.

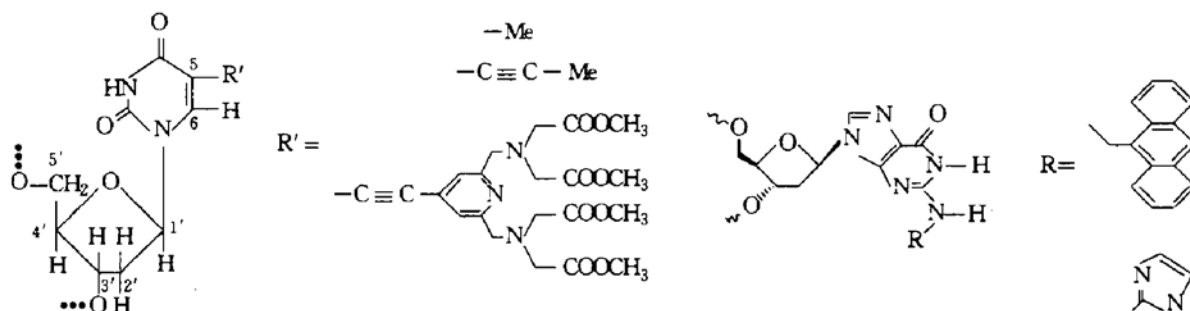


图 4 碱基修饰的种类及位置

2 靶组织导向^[12~14]

细胞表达的表面受体可以介导其配体进入该细胞, 受体结合特异大分子是导向 ASON 到

特定细胞并在该细胞蓄积的一种良好载体 (图 5). 实验证明大量正常及恶性细胞表面存在各种糖结合受体——凝集素, 如肝细胞半乳糖凝集素、巨噬细胞甘露糖凝集素及单核细胞 6-磷

酸甘露糖凝集素. 半乳糖配体通过大分子桥与 HBV 特异 ASO 连接可将 ASO 导向至肝细胞并能降低 ASO 抗 HBV 的有效浓度. 甘露糖配体也被用于 ASO 抗 HIV 的巨噬细胞导

向, 其生物利用度可提高 20 倍左右.

连接配体的桥分子包括蛋白质和多聚赖氨酸两种, 连接时先使配体与桥分子共价交联, 然后再与 ASO 通过共价或电性结合.

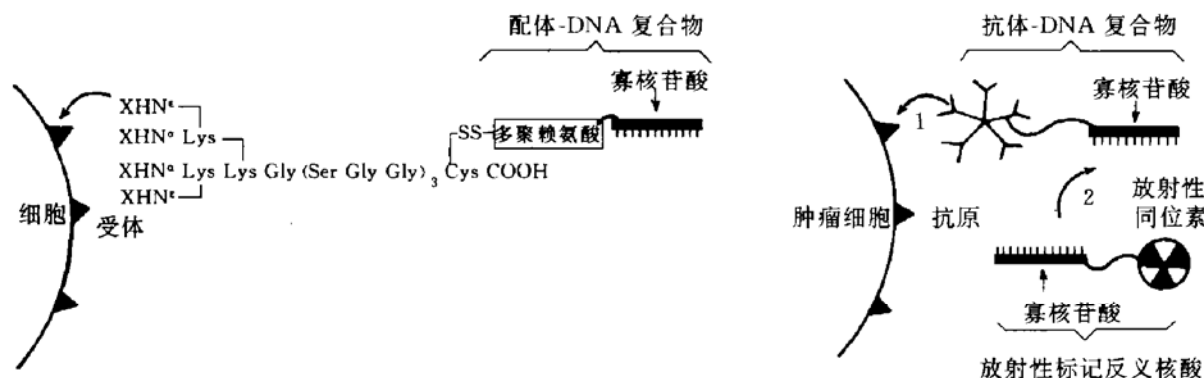


图5 配体/抗体-ASO 复合物的结构

单克隆抗体(McAb)是 ASO 导向的另一类潜在的有效大分子, Kuipers 等研究表明 hCG-IgG1 结合的 ASO-放射性同位素 (RI) 复合物可有效地结合抗原并与互补 DNA 靶杂交. McAb-ASO-RI 复合物中 McAb 和 ASO 是通过二硫键连接的, ASO 和 RI 之间则通过磷酸二酯键连接.

3 增加生物利用度

ASO 进入体内发挥功能面临的另一个非常重要的问题是生物利用度即药物的摄取及在细胞内的分布. 由于 ASO 带负电荷且呈较强的亲水性, 因此不易与带有同样电荷的靶细胞接触, 更不易透过脂质双分子层构成的细胞膜进入细胞内. 化学修饰是解决这一问题的有效手段, 修饰途径包括引入亲脂性基团和改变负电性等.

3.1 亲脂性基团^[15,16]

ASO 分子上连接亲脂性基团能改变其亲脂性从而有效地增加其透膜性. 亲脂性基团通常通过磷酸或羧酸酯键连接于 ASO 末端的 5'-OH 或 3'-OH. 亲脂性基团包括脂肪酸(醇)、胆酸或胆固醇等. 修饰基团对 ASO 的 Mt 及与 DNA/RNA 杂交的性能影响不大.

3.2 多聚氨基酸^[17,18]

改变 ASO 多价阴离子特性的另一种修饰途径是将 ASO 与带有多价阳离子的多聚氨基酸缩合制备成多聚氨基酸-ASO 复合物. 已制备了两类多聚氨基酸-ASO 复合物, 一类是 Lemaitre 等制备的多聚赖氨酸-ASO (PLL-ASO); 一类是 Zhang 等制备的多聚鸟氨酸-ASO.

1978 年 Ryser 和 Shen 研究证明 PLL 能有效地介导各种药物进入完整细胞. 1986 年 Bayard 等将 2', 5' -An 的 3' -末端氧化成二醛基, 然后与 PLL 的 ε-氨基缩合制备了 N-吗啡啉环桥联的 (2', 5' -An)_m-PLL 复合物, 该复合物对不同细胞系内 RNase H 具有特异激活作用. 在上述研究结果的启发下 1987 年 Lemaitre 等通过 DNA 合成仪合成了一些 3' -端带有一个 rA 的 ASO 并将 rA 的 2', 3' 羟基用高碘酸氧化成二醛, 然后在氰基硼氢化钠催化下醛基与 PLL 的 ε-氨基缩合制备了 15~17 nt 的 ASO-PLL 复合物.

PLL 结合的 ASO 在 100~200 nmol/L 的浓度下即呈抗病毒活性, 这一浓度仅为未结合 ASO 的 1/50 左右. 制备 ASO-PLL 所用 PLL 的分子量要在 14 000 左右, 太小运载效率

低, 太大则呈明显的细胞毒性。

考虑到 PLL-ASON 分子量太大且没有明确的化学结构, 1993 年 Zhang 等合成了另一类多聚氨基酸-ASON——多聚鸟氨酸-ASON (PLO-ASON)。多聚鸟氨酸的长度为 3~12 个残基, ASON 长度为 12 nt。为便于连接, 在 PLO 末端连接一半胱氨酸, 在 ASON 的末端连接一氨基, 偶联时加入双功能偶合剂即可。采用的偶合剂有磺基-间-马来酰亚胺苯甲酸羟基琥珀酰亚胺活泼酯 (磺基-MBS) 和碘乙酸琥珀酰亚胺两种。用磺基-MBS 偶合时, PLO 的氨基不需保护, 用碘乙酸琥珀酰亚胺则需保护。

PLO-ASON 的 T_m 值随鸟氨酸残基的数目增加而升高, PLO 修饰不影响 ASON 的 RNase H 及病毒 RNA 的翻译抑制活性。

4 靶基因嵌入、切割及交联^[19~22]

从统计学意义上看, 长度为 11~15 nt 的 ASON 即可特异识别人类细胞所有 mRNA 中某一特定 mRNA 分子。这样短的 ODN 不仅有利于透过细胞膜而且与靶基因结合的几率也大, 但与靶基因结合力并不太强。在 ASON 分子末端引入一些具有特定功能的化合物不仅能够有效地增加 ASON 与靶基因的共价或非共价结合强度而且还可以将靶基因切断。这类化合物包括靶基因嵌入、切割及交联功能分子。

可以通过两种途径将嵌入、切割及交联功能分子引入 ASON 分子 (一般为 5' 或 3' 末端)。第一种途径是将保护的嵌入、切割及交联功能分子与保护的 ASON 分子缩合生成带保护基的修饰 ASON 中间体, 然后再将保护基脱去产生修饰 ASON。第二途径是用一种不影响 ASON 及修饰分子结构的缩合剂催化非保护修饰分子与非保护 ASON 直接缩合, 这种缩合通常需要先先在 ASON 或修饰分子上连接一活泼功能基团, 包括磷酸基、氨基、巯基、醛基及羧基等。

总之, 反义寡核苷酸作为一类颇具潜力和挑战意义的新一代治疗药物正逐渐受到越来越多的关注, 它是现代分子生物学、核酸合成化

学等多学科高度发展的高科技结晶。从现有研究资料推测, ASON 真正成为临床广泛应用药物的日子已非遥遥无期的事情。大规模 DNA 合成技术和仪器的开发, 各种增加 ASON 核酸酶抗性、生物利用度及生物学活性的化学修饰技术的建立, 一些系统的药理、毒理、代谢和分布实验数据的积累都为 ASON 进入临床应用开辟了光明的前景。事实上, 在美国已经有一些制药企业就 ASON 的临床实验向 FDA 提出申请并获准进行 I / II 期临床试验, 而且部分临床试验已显示出 ASON 的独特效果。FDA 也已将 ASON 作为新药的特殊要求, 特别是质量标准等有关问题正式提到议事日程。不能否认 ASON 用于临床治疗还存在成本高、合成困难等这样那样的问题, 不过这一问题在药物发展的初期是难免的, 随着对 ASON 认识和研究的不深入这一系列的问题都会迎刃而解。不久的将来, ASON 将可能成为临床医生消灭病毒、肿瘤等现在一些所谓“不治之症”的有力武器。

参 考 文 献

- 1 Clarenc J P, Degols G, Leonetti J P *et al.* Anti-Cancer Drug Design, 1993; 8: 81
- 2 Antivirals Inc. Antisense research and development technical report, 1993; 3: 1
- 3 Nielsen P E, Egholm M, Buchardt O. Bioconjugate Chem, 1994; 5: 3
- 4 Cook P D. Anti-Cancer Drug Design, 1991; 6: 585
- 5 Zhao Q, Matson S, Herrera C J *et al.* Antisense Research and Development, 1993; 3: 53
- 6 Vichier-Guerre S, Pompon A, Lefebvre I *et al.* Antisense Research and Development, 1994; 4: 9
- 7 Ono A, Dan A, Matsuda A. Bioconjugate Chem, 1993; 4: 499
- 8 Ortigao J F R, Rosch H, Selter H *et al.* Antisense Research and Development, 1992; 2: 129
- 9 Letsinger R L, Zhang G, Sun D K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 6553
- 10 Mackellar C, Graham D, Will D W *et al.* Nucleic Acids Research, 1992; 20 (13): 3411
- 11 Wagner R W, Matteucci M D, Lewis J G *et al.* Science, 1993; 260: 1510

- 12 Kuijpers W H A, Bos E S, Kaspersen F M *et al.* Bioconjugate Chem, 1993; 4: 94
- 13 Plank C, Zatloukal K, Cotten M *et al.* Bioconjugate Chem, 1992; 3: 533
- 14 Bobfiles E, Mendes C, Roche A-C *et al.* Bioconjugate Chem, 1992; 3: 277
- 15 Abramova T V, Blinov V M, Vlassov V V *et al.* Nucleosides & Nucleotides, 1991; 10 (1~3): 419
- 16 Manoharan M, Johson L K, McGee D P C *et al.* Antisense strategy annals. New York: Academy of Science, 1992; 66: 306
- 17 Zhu T, Wei Z, Tung C H *et al.* Antisense Research and Development, 1993; 3: 265
- 18 Zhu T, Wei Z, Tung C H *et al.* Antisense Research and Development, 1993; 3: 349
- 19 Sergeev D S, Zarytova V F, Mamarev S V *et al.* Antisense Research and Development, 1992; 2: 235
- 20 England P R, Murray V. Antisense Research and Development, 1993; 3: 219
- 21 Thaden J, Miller P S. Bioconjugate Chem, 1993; 4: 366

- 22 Casas C, Lacey J L, Meunier B. Bioconjugate Chem, 1993; 4: 366

Chemical Modification of Antisense Oligonucleotides. Wang Shengqi (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract The function of antisense oligonucleotide (ASON), to great extent, depends on its stability, bioavailability and binding or reaction ability to the targeting sequence. These physical and chemical properties can be changed via specific chemical modification, and thus enhancing ASON's antivirus, anticancer as well as other specific gene expression inhibition activities.

Key words antisense technology, antisense oligonucleotide, chemical modification

cGMP 对细胞功能的调控

毛俊浩 吕志良

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

摘要 cGMP 作为胞内第二信使, 主要通过 cGMP 依赖的蛋白激酶 (cGPK), cGMP 门控的离子通道, cGMP 调节的环核苷酸磷酸二酯酶以及 ADP-核糖环化酶等后续途径, 参与许多细胞功能的调控. cGMP 既可以通过蛋白磷酸化, 也通过与蛋白磷酸化不直接相关的信号传递途径来调控各类细胞的特定生理功能.

关键词 cGMP, cGMP 依赖的蛋白激酶, cGMP 门控的离子通道, cGMP 调节的环核苷酸磷酸二酯酶, ADP-核糖环化酶

早在 60 年代就发现 cGMP 具有类似 cAMP 的胞内第二信使作用, 但对它作为胞内信使参与细胞功能调控机制的了解却远远不及 cAMP. 到了 80 年代, 有关 cGMP 的研究逐步兴起. 但直至最近, 由于发现 cGMP 在视觉信号传递及一氧化氮 (NO) 这一无机分子的信号传递中的特殊作用, 才受到人们的高度重视. 与 cAMP-蛋白激酶 A (PKA) 系统不同的是 cGMP 在不同类细胞中, 可分别通过 cGPK、

cGMP 门控的阳离子通道, cGMP 调节的环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE), ADP-核糖环化酶等介导的途径, 来调控诸如视、嗅觉信号转导, 平滑肌细胞松弛, 淋巴细胞活化, 生殖细胞趋化反应等多种细胞功能. cGMP 既可通过增强或抑制蛋白磷酸化, 还可以通过与蛋白磷酸化无关的途径来实施对细胞功能的调控. 其作用机