

小分子药靶

——RNA 药靶研究进展

郑晓飞* 孙志贤

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 对 RNA 药靶的特点、研究策略和针对 RNA 药靶的小分子药物筛选方法, 进行了综述. RNA 的三级结构作为分子相互作用的识别位点和结合位点对 RNA 的生物功能的实现具有重要决定作用, RNA 分子同蛋白质一样将成为新型小分子药物的作用靶点.

关键词 生物信息学, RNA, 小分子药物

学科分类号 Q 522

现代新药研究与开发离不开筛选模型, 而筛选模型的关键是寻找、确定和制备药物筛选靶——分子药靶. 选择确定新颖的有效药靶是新药开发的首要任务. 传统的小分子药靶多是蛋白质, 近年来的研究表明同 DNA 的双螺旋结构相比, RNA 结构具有令人惊奇的复杂性和多样性, 同蛋白质一样形成复杂的三级结构, RNA 的三级结构作为分子相互作用的识别位点和结合位点对 RNA 的生物功能的实现具有重要决定作用. RNA 分子同蛋白质一样将成为新型小分子药物的作用靶点, 为制药业提供了新的机遇.

1 RNA 药靶的优越性

基因组计划的顺利进行为 RNA 作为药靶提供了机遇^[1,2]. 基因组测序揭示了编码蛋白质的 mRNA 信息, 而所有的蛋白质都是 mRNA 翻译获得的, 通过干扰 mRNA 的翻译, 可以更有效地抑制蛋白质发挥作用. 因此, 结合 RNA 的小分子药物还可以产生结合蛋白质的小分子药物所达不到的作用. 除了抑制蛋白质的产生, 还可以提高蛋白质的量. 因此, 有可能替代某些基因治疗和用蛋白质的直接给药. 结合 mRNA 的小分子药物具有更好的特异性. 不同组织表达不同的 mRNA, 同一种 mRNA 在不同组织中的起始、剪接、腺苷酰化也不同, 结合 RNA 特定区域的小分子药物可能只在特定的组织中起作用, 而不影响其他组织 RNA 的功能.

在技术上, 许多用于药物筛选的靶蛋白分子的分离纯化十分困难, 况且多数蛋白质需要在特定的

细胞和特定的条件下完成翻译后修饰才具有生物学活性. 因此, 获得用于高通量筛选的靶蛋白十分昂贵和困难. 然而, RNA 的物理性质不依赖于其所编码的蛋白质, 可以通过化学或酶学方法大量合成, 又不需要体内修饰, 作为药靶 RNA 具有明显的优点. RNA 由独立的折叠亚结构域构成, 分离的亚结构域仍保持其形状和功能, 可以利用其与药物结合进行筛选, 较用蛋白质靶筛选药物廉价和快 100~1 000 倍. RNA 靶点可以从基因组序列获得, 选择有效的算法可精确预测靶 RNA 的形状, 并构建靶分子模型, 以此建立的药物筛选方法对各种 RNA 均适用. 因此, 以 RNA 做为药物筛选作用靶点, 为创新型药物的研制提供了机遇和广阔的前景.

2 结合 RNA 靶小分子药物研究策略

以 RNA 为靶点的小分子药物的研制需要建立一系列的研究技术和方法, 涉及功能基因组学、生物信息学、结构生物学、RNA 化学、药理学、组合化学和高通量筛选等一系列新理论和新方法. 其中包括^[2,3]: a. 采用独特的基因筛选方法获得原核生物和真核生物的 RNA 标签结构 (signature structures)——可能作为药靶的靶 RNA 分子; b. 分析检验靶 RNA 分子的三维结构; c. 计算机模拟设计结合靶 RNA 分子的小分子化合物的结构;

* 通讯联系人.

Tel: 010-66931237, E-mail: xfzheng@zheng.com.cn

收稿日期: 2000-09-25, 接受日期: 2000-11-09

d. 以计算机模拟出的小分子结构为模板, 采用组合化学方法合成大量小分子化合物; e. 建立新的高通量筛选方法检测化合物分子结合靶 RNA 分子的亲和力和特异性; f. 发现结合与疾病有关的 RNA 靶的有生物活性的小分子药物. 其难点在于小分子药物筛选分子药靶的 RNA 靶结构的确定, 以及特异性结合靶 RNA 结构、具有生物学活性并无毒副作用的小分子化合物的设计合成和筛选. 目前, 以 RNA 为作用靶的药物研究主要包括两大类: 一是传染性疾病——新型抗菌和抗病毒药物研制; 另一类是非传染性疾病——包括抗癌和抗炎症药物研制.

3 传染性疾病最适靶 RNA 的获得

细菌和病毒 RNA 是小分子药物结合的极好靶点. 病毒基因组效率很高, 而且大多有关基因组和 RNA 作用的知识来源于病毒. 而且象流感病毒只有 RNA, 其 RNA 的独特结构对分子识别有重要作用. 许多病毒都有不同的类别, 可以进行结构预测.

细菌也有良好的结合 RNA 小分子药物作用的靶 RNA. 已知细菌 16S rRNA 的 A 位点就是小分子化合物的良好结合位点^[4]. 几种天然抗菌药就是通过作用细菌 RNA 或 RNA/蛋白质复合物而起作用的, 包括氨基糖家族、大环内酯家族和硫链丝菌素等. 为获得抗致病菌药物, 首先要寻找在人和动物细胞中不存在, 只存在于致病菌的细胞中, 并在致病菌细胞生命周期中具有重要作用, 又在各种致病细菌中高度保守的细菌标签结构 (signature structure) 作为超广谱抗致病菌药物作用的分子靶. RNA 的三级结构作为分子相互作用的识别位点和结合位点对 RNA 的生物功能的实现具有重要决定作用. 因此, 致病菌的 RNA 标签结构可能成为最具优势的超广谱抗致病菌药物作用的分子靶. 如果这种 RNA 标签结构真的存在, 那么针对这种结构的新化合物将具有超广谱的抗致病菌作用.

洛费尔等利用基因比较法寻求解决细菌抗药性的问题. 已为 14 个细菌品种的全部基因染色体排序, 将仅具有约 600 个基因的最简单支原体的 DNA 序列与大肠埃希氏菌的序列进行比较后发现, 它们有 26 个基因是共同具有的. 进一步用基因突变的方法证实, 其中有 6 个基因是细菌存活必不可少的. 其中 4 个对酵母菌并不重要, 当然对人类就更不重要了. 这就意味着它们是未来抗菌素作用的

目标. 此外, 核糖体 RNA 也是首选靶 RNA 结构.

4 真核 mRNA 中最适靶 RNA 的获得

细胞在生长过程中通过对 mRNA 的调控作用精确地控制蛋白质的表达. RNA 成熟、转运、定位和翻译过程涉及许多的 RNA 识别位点, 这些位点为小分子药物的结合提供了良好的机会^[5,6]. 获得这些 RNA 结构区是研制结合靶 RNA 小分子药物的关键. 分析表达序列标签 (ESTs) 发现 mRNA 转录子比预期更具有不均一性, 许多基因具有多达 10~20 个不同的转录子形式, 其中一些与疾病有关. 如在癌细胞中, mdm2 基因转录起始位点不同于正常细胞; Bcl-X mRNA 转录子的不同剪接形式导致不同的细胞行为和对化疗药物的不同敏感性. 3' 末端的不是不同转录子形式的主要来源. 研究 160 000 EST 序列发现 20%~40% 的转录子具有不同的两个或两个以上的 3' 末端. 此外, 在不同的组织和不同的发育时期, 特定种类的 mRNA 也有不同的 3' 末端, 有些与疾病有关. 如 mss4 基因转录子在胰腺癌发生过程中有不同的 3' 末端. 3' 末端不同, 不影响蛋白质的组成, 但影响信息的稳定性和翻译的调控. 尽管转录于同一 DNA, 翻译相同的蛋白质, 不同的转录子形式有不同的序列和独特的 RNA 三级结构形状. 可能作为 RNA 药靶的不同 RNA 独特形状产生的方式也不同. 包括: a. 转录起始位点或 3' 末端序列在正常 mRNA 中没有, 这些序列自身或与邻近 RNA 形成特殊结构; b. RNA 不同剪接方式产生特殊的连接, 接点两端的 RNA 重排形成新的三维结构. 区分不同转录子形式和组织特异表达转录子也是非常重要的. 研究发现转录子和蛋白质在不同疾病状态的表达水平不同. 在胃肠癌和正常细胞中, 有约 500 个转录子的表达处于显著不同的水平. 可见, 组织特异性转录子提供了十分有用的结合小分子的 RNA 药靶. 有理由相信, 在不同的转录子形式中发现有用的组织特异性转录子的机会是很大的, 因为任一细胞中都有 10 000~20 000 个基因表达, 每个基因有 2~20 种不同的转录子形式, 找到组织特异性不同转录子的机会远大于发现组织特异性转录子. 这为真核 mRNA 中最适靶 RNA 的获得奠定了理论基础. 已经筛选到了结合 HIV TAR RNA 的药物, 其干扰 Tat 与 TAR RNA 的作用, 从而抑制病毒的复制^[7,8].

5 靶向小分子的化学设计合成和筛选

通过基因组学、生物信息学和结构生物学等方法获得靶 RNA 分子后, 靶向结合 RNA 的小分子化合物的设计合成是一个重要的挑战. 结合靶 RNA 的小分子药物先导化合物可以采用计算机模拟设计, 再以计算机模拟出的小分子结构为模板, 采用组合化学方法合成大量小分子化合物, 运用高通量筛选方法检测化合物分子结合靶 RNA 分子的亲和力和特异性. 设计合成的小分子应具有如下性质^[2]: a. 具有足够的亲和力, 使其在细胞内结合靶 RNA 后, 产生生物学效应; b. 具有与靶 RNA 高级结构形状相匹配的能力, 以及特异性结合靶 RNA 的能力; c. 良好的细胞穿透力; d. 良好的药动力学性质; e. 低或无毒副作用. 要解决这一难题, 首先必须建立小分子识别 RNA 形状的化学方法. 蛋白质与 RNA 的相互作用、RNA-RNA 相互作用、天然产物抗生素与 RNA 的结合、以及人工合成 RNA 与小分子的作用研究基础为此提供了可借鉴的经验. 结合 RNA 的蛋白质研究提供了一些 RNA 碱基、氢键、骨架等的结合规律; 天然抗生素氨基糖类抗生素与 RNA 的相互作用研究同样提供了一些经验. 巴龙霉素、新霉素、利维霉素与核糖体 16S A 位点的结合研究, 有助于阐明特定基团静电作用、氢键作用对小分子结合 RNA 亲和力的影响规律. 同蛋白质相比, RNA 上的结合位点是亲水的和相对开放的. 基于分子形状的小分子识别能力因 RNA 结构的可变性而增加, 小分子结合特定靶 RNA 形成相对刚性结构取决于构象、电荷分布、芳香性、氢键. 恰当位置的正电荷是很重要的, 同样, 长距的静电作用使分子以正确的方向结合到口袋中. 在核苷酸碱基暴露的结构中, 芳香基的堆积力对相互作用有很大贡献. RNA 大沟提供许多与配基结合的氢键. RNA 结构和序列的多样性表明 RNA 是具有高亲和性和特异性的靶点. 根据 RNA 与配基相互作用的理化性质, 通过计算机模拟设计结合靶 RNA 的小分子先导化合物, 采用组合化学的方法就可以获得大量的待选化合物. 此时的关键问题就是如何进行高通量筛选.

已经建立了识别小分子与 RNA 相互作用的高分辨率质谱方法^[9~11], 并分析了三种氨基糖抗生素与 rRNA 亚结构域的作用. 高分辨率质谱可以定量识别氨基糖混合物与多个 RNA 靶同时发生的非共价结合相互作用. RNA 靶之间的信号重叠, 可

以通过在每个 RNA 靶上, 加上能产生独特质谱信号的中性质量标签加以解决. 除了测定亲和力, RNA 的结合位点通过识别氨基糖/RNA 复合物片段产生的保护模式来确定. 核糖霉素、巴龙霉素和利维霉素与原核 rRNA 的 A 位点亚结构域形成特定的复合物; 而安普霉素优先与真核形成复合物. 此外, 可以通过对 RNA 模型的碱基进行替换, 测定其对亲和力和选择性的影响. 安普霉素对原核亚结构域的强结合依赖于 1408 位点. A1408G 突变可以选择性提高亲和力, 原核亚结构域 A1409~G1491 的错配可提高妥布霉素和 Bekanamycin 的结合. 研究表明基于质谱的方法是研究小分子/RNA 相互作用以及设计筛选新药的新方法.

6 结 论

随着基因组计划的完成, 生物信息学的迅猛发展, 分子进化理论和研究方法的不断完善, 组合化学技术, 以及药物高通量筛选技术的建立都为结合靶 RNA 分子药物的研制提供了理论储备和技术支持. RNA 功能基因组研究的深入, 对 RNA 结构功能的新认识为研制以 RNA 为分子药靶的新一代小分子药物提供了机遇和挑战. 更重要的是结合靶 RNA 的药物可能获得在蛋白质水平达不到的治疗效果, 比如提高蛋白质表达量. 但是, 要实现这一目标还有许多重要工作要做. 虽然在理论上不存在任何困难, 而且自然界也提供了良好的范例, 但是合成化合物特异识别 RNA 三维形状的规律还有待发展, 最佳 RNA 靶的鉴别方法还需完善, 先导化合物的设计合成、筛选、临床前研究和临床研究都有漫长的路要走.

参 考 文 献

- 1 David B. Using bioinformatics in gene and drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2000, **5** (4): 135~143
- 2 Ecker D J, Richard H, Griffey R H. RNA as a small-molecular drug target: doubling the value of genomics. *Drug Discovery Today*, 1999, **4** (9): 420~429
- 3 Hermann T, Westhof E. RNA as a drug target: chemical, modelling, and evolutionary tools. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9** (1): 66~73
- 4 Fourmy D, Recht M I, Blanchard S C, *et al.* Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*, 1996, **274** (5291): 1367~1371
- 5 Uhlenbeck O C, Pardi A, Feigon J. RNA structure comes of age. *Cell*, 1997, **90** (5): 833~840
- 6 Li K, Fernandez-Saiz M, Rigl C T, *et al.* Design and analysis of

- molecular motifs for specific recognition of RNA. *Bioorg Med Chem*, 1997, **5** (6): 1157~ 1172
- 7 Hamy F, Felder E R, Heizmann G, *et al.* An inhibitor of the Tat/TAR RNA interaction that effectively suppresses HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (8): 3548~ 3553
- 8 Aboul-ela F, Kam J, Varani G. The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by tat protein. *J Mol Biol*, 1995, **253** (2): 313 ~ 332
- 9 Schroeder R, Waldsich C, Wank H. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J*, 2000, **19** (1): 1~ 9
- 10 Griffey R H, Hofstadler S A, Ecker D J. Determinants of aminoglycoside binding specificity for rRNA by using mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (18): 10129 ~ 10133
- 11 Hofstadler S A, Sannes-Lowery K A, Crooke S T, *et al.* Multiplexed screening of neutral mass tagged RNA targets against ligand libraries with electrospray ionization FTICR MS: a paradigm for high-throughput affinity screening. *Anal Chem*, 1999, **71** (16): 3436~ 3440

Progress on RNA as Small Molecular Drug Target

ZHENG Xiao-Fei*, SUN Zhi-Xian

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*)

Abstract The strategic and tactical advantages, principle, screening methods, achievements of RNA as a small molecule drug target were reviewed. The process of RNA maturation, transport, intracellular localization and translation are rich in RNA recognition sites that provide good opportunities for drug binding. Both RNAs and proteins are potential drug-binding sites.

Key words bioinformatics, RNA, small-molecular drug

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931237, E-mail: xfzheng@zheng.com.cn

Received: September 25, 2000 Accepted: November 9, 2000