

中国药学会抗生素专业委员会

中国抗生素杂志社

论文集

第十届全国抗生素学术会议

2005.8.27-29 石家庄

铭谢：

华北制药集团有限责任公司

华北制药集团销售有限责任公司

华北制药集团新药研究开发中心

上海医药集团有限公司抗生素事业部

扬子江药业集团有限公司

北京双鹤药业经营有限责任公司

清远华能制药有限公司

北京博康健基因科技有限公司

目 录

一、会议特邀报告

- 1、抗肿瘤抗生素与癌症靶向治疗.....甄永苏 (1)
- 2、基因组时代的新药发现: 趋势和实践.....陈凯先 (4)
- 3、抗真菌感染药物的进展.....王爱霞 (12)
- 4、深海微生物的研究与开发.....丁 健 (16)
- 5、抗生素结构修饰的进展.....张致平 (19)
- 6、小单孢菌及其产生的次级生物活性代谢产物.....程元荣 (26)
- 7、抗生素发酵过程系统生物学研究.....张嗣良 (28)
- 8、微生物转化技术在现代医药工业中的应用.....陈代杰 (34)
- 9、头孢类品种研发与生产现状探讨.....刘家健 (45)
- 10、临床应用抗病毒药物耐药性及耐药机制研究进展.....陶佩珍 (55)
- 11、用药安全与临床实践.....李大魁 (64)
- 12、抗生素质量分析研究的新进展.....金少鸿 (70)
- 13、中国临床分离菌耐药趋势.....张秀珍 (79)
- 14、合理应用抗菌药物预防手术部位感染.....黎洁良 (85)
- 15、抗生素基因簇与药物创新.....邓子新 (88)
- 16、农用抗生素的研究与进展.....陶黎明 (95)
- 17、微生物来源的抗感染药物和生物活性物质的发现.....供田 洋 (105)

二、分会报告论文、交流论文及综述

- 1、真菌 F01-195 产生的 4 个新的大环内酯类活性化合物.....Wortmannilactones.....
.....董悦生等 (107)
- 2、人清道夫受体 CD36 拮抗剂高通量筛选模型的建立与应用.....王 娟等 (113)
- 3、以 BMP-2 为靶点的抗骨质疏松药物筛选模型的建立及应用.....丁 燕等 (128)
- 4、白细胞弹性蛋白酶抑制剂筛选模型的建立及其抑制剂 F02ZA-2554A 的研
究.....郑智慧等 (133)
- 5、卡斯帕酶-3 抑制剂高通量筛选的模型建立及活性化合物 F03ZA575 的初步研

究.....	李韶菁等 (138)
6、羧酮转化菌的诱变育种.....	凌良飞等 (145)
7、西罗莫司高产突变株 PC904-33.....	黄 捷等 (151)
8、应用基因组重排育种新方法筛选替考拉宁高产菌.....	徐 波等 (157)
9、康乐霉素产生菌航天变株 F-16 的研究*.....	孙承航等 (169)
10、海洋碳样小单孢菌产生的异黄酮类化合物—染料木素和大豆黄素...江 红等 (175)	
11、阿维链霉菌中 <i>aveD</i> 基因插入失活产生的异常组分.....	陈红霞等 (182)
12、小单孢菌 FIM-203 产生庆大霉素 A 的研究.....	郑 卫等 (189)
13、海洋青铜小单孢菌 FIM 02-523 产生的脂肽类化合物 FW523 的化学鉴别和生物学活性.....	江 红等 (195)
14、电喷雾离子化多级质谱对几种氨基糖苷类抗生素特征碎片的分析.....	方东升 (202)
15、小单孢菌 FIM99-663 产生的抗真菌抗生素.....	连云阳等 (207)
16、新的细胞毒化合物 Wortmannilactones 产生菌 F01-195 的鉴定.....	刘 梅等 (214)
17、微生物来源的白细胞弹性蛋白酶抑制剂 F01-221A 的研究.....	任 晓等 (219)
18、微生物来源的乙酰胆碱酯酶抑制剂 F01-2076A 的研究.....	林 洁 (225)
19、小单孢菌 FIM99468 产生的弹性蛋白酶抑制剂菌种分类, 发酵, 提取和生物学活性.....	江宏磊等 (230)
20、微生物来源的 Factor Xa 抑制剂 F02ZA-2172 的研究.....	路新华等 (237)
21、微生物转化法合成 15-羟基坎利酮.....	陈华明等 (241)
22、用微生物转化的方法制备非索非那定的初步研究.....	刘雪峰等 (245)
23、利用粘红酵母静息细胞高效转化 7-ACA 成 7-ADAC.....	孙馨蔚等 (252)
24、从依尼奥小单孢菌钓取并克隆自带启动子抗生素抗性基因.....	洪文荣等 (257)
25、柔红霉素产生菌 <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> SIPI-1482 中 <i>dnmV</i> 基因克隆及阻断.....	尚 珂等 (265)
26、顶头孢霉乙酰转移酶基因(<i>cefG</i>)的克隆和表达研究.....	陈 丹等 (272)
27、绿脓杆菌 <i>pprA</i> 与 <i>pprB</i> 基因的表达与功能研究.....	王艳萍等 (279)
28、非核糖体含硫多肽类抗生素生物合成基因的研究进展.....	张欣城等 (286)
29、白念珠菌 ERG11 基因突变与氟康唑耐药的关系.....	龙 丰等 (292)

30、偶发分枝杆菌 MF2 和 MF96 生物转化差异的机理研究·····	凌良飞等 (295)
31、西罗莫司同分异构体 Rap-D ₁ 的分离和鉴定·····	杨国新等 (300)
32、西罗莫司片剂的制备及溶出度的考察·····	陈有钟等 (307)
33、力达霉素抗血管生成的体外实验研究·····	欧阳志钢等 (311)
34、浊点系统两相分配生物反应器新技术平台·····	王志龙等 (317)
35、微生物天然产物数据库的建立及应用·····	姜 威等 (322)
36、PFA 用于抗乙型肝炎治疗的理论与实践·····	韩燕星 (328)
37、农用抗生素的筛选策略·····	王开梅等 (333)
38、微生物来源的 Factor Xa 抑制剂 F02ZA-2172 的研究·····	路新华等 (341)
39、黑色素生物合成抑制剂 FW-192 的初步研究·····	郑 榕等 (346)
39、细胞裂亡及其信号转导通路的研究·····	李电东 (352)
40、抗结核药物靶点研究最新进展·····	龚立康等 (358)
41、格尔德霉素抗单纯疱疹病毒 1 型作用机制的研究·····	李玉环 (363)
42、人类禽流感病毒感染的药物防治研究进展·····	张文军等 (367)
43、两相厌氧-好氧系统处理抗生素废水·····	赵胜利等 (372)
44、两种规格国产帕珠沙星注射液人体药代动力学比较研究·····	苗 佳等 (376)
45、院内嗜麦芽寡养单胞菌感染及临床用药分析·····	罗宇芬等 (386)
46、克林霉素不良反应分析·····	徐晋辉 (390)
47、我院非手术科室抗感染药物使用的调查分析·····	沈少林 (393)
48、复方双氢青蒿素片治疗非洲维和部队恶性疟疾 38 例临床观察·····	王 冶等 (399)
49、302 医院布氏杆菌病 6 例诊治·····	曲 芬等 (402)
50、急诊科抗感染药物的应用分析·····	杨应霓等 (404)
51、老年氟喹诺酮的合理应用·····	尹 澎 (407)
52、乳糖酸红霉素在临床应用中需注意的问题·····	曹 加 (409)

三、书面综述、交流论文摘要目录略

抗肿瘤抗生素与癌症靶向治疗

甄永苏

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医药生物技术研究所 北京 100050)

✓ 由于分子生物学的研究进展,不断发现和确定与肿瘤治疗相关的分子靶点,抗肿瘤靶向药物的研究开发受到广泛关注。目前研究的抗肿瘤靶向药物大致可分为两类,一是针对特定靶点筛选与研制的小分子药物,二是抗体靶向药物。抗肿瘤抗生素是由微生物产生的具有抗肿瘤活性的化学物质。微生物的代谢产物极其复杂多样,是发现与研制抗肿瘤靶向药物的丰富资源。近年来通过利用特定的模型和方法进行筛选或对已有的化合物进行检测,已发现与确定多种对特定分子靶点显示高度活性的抗肿瘤抗生素。在抗体靶向药物研究方面,抗肿瘤抗生素可用作“弹头”药物,与抗体及其片段进行连接,制备免疫偶联物或融合蛋白。//

作用于特定靶点的抗肿瘤抗生素

微生物产生的活性物质不仅在化学结构上而且在生物活性上都显示高度的多样性。利用各种筛选模型进行检测,不仅可以发现新的化合物,也可以发现某些已知化合物具有未曾报道过的生物活性。

1. 作用于 DNA 模板 作用于 DNA 模板的抗肿瘤抗生素包括可引起 DNA 断裂和可嵌入 DNA 模板的活性物质。目前临床使用的抗肿瘤抗生素基本上属于此类物质。研究表明,含烯二炔发色团的力达霉素(LDM, C1027)对肿瘤细胞有极强的杀伤作用,按 IC₅₀ 进行比较, LDM 比丝裂霉素、阿霉素等强 10000 倍以上。LDM 可导致细胞的 DNA 双链断裂,其作用点显示核苷酸序列特异性。LDM 可诱导肿瘤细胞凋亡和细胞裂亡。据报道,一种作用于 DNA 的化合物可以增强另一种作用于 DNA 化合物的活性,如 distamycin A 可增强 C1027 的诱导细胞凋亡作用。Hedamycin 是对富含 GC 核苷酸序列的 DNA 显示选择性结合的抗肿瘤抗生素。据报道 hedamycin 可在基因转录水平抑制抗凋亡蛋白 survivin 的表达,从而影响肿瘤细胞的生存。Mithramycin 可激活 p53 蛋白并可增强 TNF 的细胞毒作用。

2. 抑制血管生成 肿瘤生长依赖于相应的血管生成。抑制血管生成是备受关注的研制抗癌药物的新途径。已报道一系列的抗生素包括 fumagillin 及其衍生物 TNP-470 具有抗血管生成的活性,可抑制内皮细胞增殖和游动,在体内可抑制血管生成。力达霉素(C1027)有强烈的抑制血管生成作用,在低剂量(0.01 μg/鸡胚)即可抑制鸡胚尿囊膜的血管生成,并可阻断 bFGF 与受体蛋白结合。力达霉素可抑制内皮细胞增殖并诱导细胞凋亡。又据报道, borrelidin 可抑制内皮细胞增殖、诱导内皮细胞凋亡并使已形成的毛细血管关闭。其作用机制涉及两方面,即抑制苏氨酸-tRNA 合成酶和激活 caspase-3 和 caspase-8。核苷类抗生素 sangivamycin 对内皮细胞有选择性抑制增殖作用。新生霉素(novobiocin)显示抑制血管生成活性并可增强长春新碱的抗肿瘤作用。

3. 干扰细胞周期 由链霉菌产生的 trichostatin A (TSA)是组蛋白脱乙酰酶(HDAC)的特异性抑制剂, TSA 处理癌细胞可致组蛋白过度乙酰化与 p21 过表达,抑制 Cdk2 激酶活性;导致 G1 期阻滞,抑制细胞增殖。由放线菌产生的 boromycin 可以消除博来霉素所诱发的 G2 关卡,如与博来霉

素合用则可使 G2 期细胞显著减少而 subG1 期细胞增加。在动物实验, boromycin 可增强博来霉素的抗肿瘤作用。

4. 作用于热休克蛋白 90 热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, Hsp90) 是细胞内最活跃的分子伴侣 (molecular chaperone), 许多信号传导蛋白的正常功能均依赖于 Hsp90, 它在肿瘤细胞繁殖和存活中可能起重要作用。据报道, geldanamycin 特异性结合并抑制 Hsp90 的功能, 促进多种癌基因产物和周期调控蛋白的降解而显示多种生物活性。目前, geldanamycin 的衍生物 17-AAG 已进入临床 I 期研究。我们的研究表明, geldanamycin 与丝裂霉素、顺铂等化疗药物有协同作用。又据报道, 17-AAG 与奥沙利铂联合可以增强对结肠癌细胞的杀伤作用, 这与 17-AAG 抑制 NF-kappaB pathway 有关。17-AAG 也可增强紫杉醇的抗肿瘤作用, 其机制是 17-AAG 抑制 Akt 激酶的表达和激活, 提高肿瘤细胞对紫杉醇诱导凋亡的敏感性。对 Gleevec (STI-571) 耐药的白血病细胞, 仍对 17-AAG 敏感, 可被诱导细胞凋亡。

5. 作用于靶点 mTOR 靶点 mTOR (mammalian target of rapamycin) 是 (PI3K)/Akt 信号转导通路下游的效应分子, 可介导细胞增殖与细胞凋亡。rapamycin 及其同系物 CCI-779, RAD 001, 和 AP23573 等显示对 mTOR 有高度特异性的抑制作用, 阻断相关的信号转导, 干扰细胞周期, 出现 G1 期阻滞。又据报道, mTOR 抑制剂对 ErbB2 阳性的乳腺癌细胞具有更强的抑制作用。

抗肿瘤抗生素用于构建抗体靶向药物

单克隆抗体对相关抗原有高度特异性, 在研制靶向药物方面有巨大的潜力。近年来, 治疗肿瘤的抗体药物研究开发取得了突破性进展。Rituxan 是 1997 年第一个获美国 FDA 批准上市的抗肿瘤抗体药物, 用于治疗 B 细胞性非霍奇金淋巴瘤。自 1998 年以来, 先后获批准用于治疗肿瘤的抗体药物有 Herceptin、Mylotarg、Campath-1H、Zevalin、Bexxer、Erbix 和 Avastin 等。当前, 抗体药物的研究开发已成为生物技术药物领域的热点。目前处于临床前期、临床 I 期与临床 II 期研究开发的各类生物技术药物中, 抗体药物的品种数量位居前列。

1. 抗体药物的构成 从分子构成来看, 抗体药物可分 3 类: (1) 抗体, 亦称非偶联抗体或裸抗体。(2) 抗体偶联物, 或称免疫偶联物, 由抗体或抗体片段与“弹头”物质连接而成。可用作“弹头”的物质有放射性核素、化疗药物与毒素。这些“弹头”物质与抗体连接, 分别构成放射免疫偶联物、化学免疫偶联物与免疫毒素。(3) 融合蛋白, 由抗体片段和活性蛋白两个部分构成。抗体药物具有两种功能, 一是与靶分子特异性结合, 二是杀伤肿瘤细胞, 其作用主要通过依赖补体的细胞毒性 (CDC) 和依赖抗体的细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 两种免疫机制实现。为了加强抗体药物的杀伤肿瘤细胞活性, 阿霉素、柔红霉素、博来霉素、新制癌菌素、丝裂霉素、平阳霉素、博安霉素、卡里奇霉素、力达霉素以及格尔德霉素等均曾与抗体偶联, 制备抗肿瘤抗体药物。

2. 抗体药物的小型化与高效化 抗体及其偶联物均为大分子物质。以 IgG 型抗体为例, 其分子量约为 150 kDa; 与药物连接制成的化学免疫偶联物的分子量更大。庞大的抗体药物分子难以通过毛细血管内皮层和细胞外间隙到达实体瘤深部的肿瘤细胞。因此, 研制小型化抗体药物对提高疗效有重要意义。另一方面, 由于注入体内的抗体药物实际到达肿瘤细胞的数量有限, 为取得良好效果, 抗体药物需要高效化, 仅有微量到达靶部位即可杀伤肿瘤细胞。研制小型化与高效化抗体药物需要高效“弹头”药物。常用的化疗药物如阿霉素、丝裂霉素、氮甲蝶呤等虽然对肿瘤细胞有相当强的

杀伤作用，但作为“弹头”物质仍需用十数个或数十个药物分子去连接一个抗体分子，以求加强偶联物的活性。近年发现一些对肿瘤细胞有极强杀伤作用的抗肿瘤抗生素如卡里奇霉素(calicheamicin)和力达霉素(lidamycin)，可为研制小型化、高效化抗体药物提供新的“弹头”物质。

3. Calicheamicin 与抗体构成的偶联物 据报道，calicheamicin (CLM)对肿瘤细胞的杀伤活性比阿霉素强 1,000 倍。2000 年美国 FDA 批准用于治疗复发的急性髓性白血病的 Mylotarg 就是抗 CD33 的人源化抗体与 CLM 的偶联物。关于 CLM 与其它抗体构成偶联物的研究续见报道。MUC1 在多种上皮来源的实体瘤均有表达，抗 MUC1 抗体与 CLM 偶联物在裸鼠移植实验表明，对表达 MUC1 的卵巢癌有明显疗效；对顺铂耐药的肿瘤细胞亦显示较高的活性。抗 CD22 的抗体与 CLM 偶联物在裸鼠实验结果，对 B 细胞淋巴瘤有明显的抑制作用。

4. Lidamycin 与抗体构成的偶联物 从我国湖北省潜江市土壤分离的一株链霉菌产生的抗肿瘤抗生素力达霉素 (LDM)对癌细胞有极强的杀伤作用，体外检测按 IC₅₀ 值进行比较，LDM 比阿霉素强 10,000 倍以上。按 1:1 分子比将 LDM 与单抗连接，其偶联物对裸鼠移植的肝癌、胃癌均有显著疗效。抗体 Fab' 片段的分子量约相当于完整抗体的 1/3，Fab' 片段与 LDM 构成的偶联物在动物实验对肿瘤生长有显著抑制作用。

5. Lidamycin 强化融合蛋白 抗体的 Fv 片段的分子量约相当于完整抗体的 1/6，而单域抗体 (single domain antibody) VH 或 VL 的分子量分别相当于完整抗体的 1/12。利用单链抗体 (scFv) 或单域抗体制备抗体药物将可进一步降低其分子量，在抗体药物分子小型化方面达到新的水平。LDM 的分子由烯二炔发色团 (active enediyne, AE) 和力达蛋白 (lidaprotein, LDP) 组成，两者通过非共价键结合。LDM 的分子可以拆分和重建。利用 LDM 分子的这一特点，我们采取 DNA 重组和分子重建的技术路线，分别构建了单链抗体强化融合蛋白 Fv-LDP-AE 以及单域抗体强化融合蛋白 VH-LDP-AE 和 HL-LDP-AE。分别在动物实验证明对肿瘤生长有显著抑制作用。

前 景

已报道的研究结果表明，利用特定的检测方法可以从微生物产物中发现新的、作用于特定分子靶点的活性物质，也可以从已知的抗肿瘤抗生素中发现其针对特定分子靶点的活性。可以预期，将有针对各种不同靶点的抗肿瘤抗生素（多数为小分子活性物质）用于癌症靶向治疗研究。某些抗肿瘤抗生素如卡里奇霉素、力达霉素等对癌细胞有极强的杀伤作用，可以作为高效“弹头”药物，用于构建抗体靶向药物。抗肿瘤抗生素与抗体工程技术的结合可以构成新的技术平台，利用针对各种不同靶点的抗体与抗肿瘤抗生素制备一系列的、用于治疗各种恶性肿瘤的抗体靶向药物。功能基因组学和蛋白质组学研究的发展将为研制抗体药物提供与肿瘤治疗相关的新分子靶点。随着抗癌药物研究的发展，包括抗肿瘤抗生素在内的可供利用的新型“弹头”物质将不断出现。针对新靶点，制备新型抗体靶向药物，将在癌症靶向治疗中取得更好的效果。

基因组时代的新药发现：趋势和实践

陈凯先 蒋华良 罗小民 沈建华

(中国科学院上海药物研究所 上海 201203)

摘 要

人类基因组计划深刻地影响了药物研究和开发的思路 and 策略, 生命科学的研究方法和技术与药物研究的结合日益紧密, 计算机信息技术也越来越多参与到药物研究过程中来。本文以实例说明了虚拟筛选、配体垂钓以及靶标的发现与确证方法在药物研究中的应用。

关键词: 基因组, 系统生物学, 高内涵筛选, 虚拟筛选, 配体垂钓, 靶标确证

Abstract

The progresses from Human Genome Project have dramatically changed the strategy and methods of drug discovery and development. Meanwhile, new methods and techniques from life sciences and computer informatics have been also introduced into drug discovery. Here we demonstrate the applications of virtual screening, ligand fishing and drug target validation to drug study.

Key words: Genome, Systems biology, High content screening, Virtual screening, Ligan fishing, Drug target validation

一. 后基因组时代药物研究的新进展和新趋势

20 世纪下半叶以来, 生命科学和生物技术的研究成果成为最激动人心的科学成就之一。这些领域日新月异的发展, 推动药物研究与医药产业进入了一个革命性变化的新时代。人类基因组计划的完成以及后续功能基因组、结构基因组和蛋白质组计划的实施, 深刻地改变了药物研究开发的思路和策略, 形成了**新药研究的新模式 — 从基因功能到药物**。与此相应, **国际上创新药物研究的发展趋势呈现出两个显著的特点**: 一是生命科学前沿技术如功能基因组、蛋白质组和生物信息学等与药物研究的结合日益紧密, 以发现和验证新型药物靶点作为主要目标, 取得了显著的进展; 二是理论和结构生物学、计算机和信息科学等一些新兴学科越来越多地参与到新药的发现和前期研究中, 使新药研究的面貌发生了巨大的变化, 出现了一些新的研究领域和具有重要应用价值的新技术, 对创新药物的研究与开发产生深远的影响。

生物技术(如功能基因组和生物芯片技术等)、高通量筛选、分子模拟、药物设计方法在药物研究中的应用, 加快了药物发现的进程。Novartis 的科学家在上世纪 80 年代后期以融合基因 Bcr-Abl 的表达产物—酪氨酸激酶为靶标, 开发了对慢性骨髓白血病有较好疗效的新物 Gleevec (STI571)¹。洛克菲勒大学科研人员又以 STI571 与 Bcr-Abl 酪氨酸激酶复合物的晶体结构为基础进行了新一轮的药物设计和筛选, 获得了活性更高的先导化合物, 并克服了 STI571 易产生抗药性的缺陷。美国

Millennium 医药公司的一个研究小组利用芯片技术研究患者对抗高血压药物的敏感性, 在 1000 多个高血压相关基因中发现血管紧张素转换酶 2 (ACE-2) 为药敏的主要调控蛋白, 并在模建三维结构的基础上设计了新的 ACE-2 抑制剂, 仅用不到两年的时间就将其投入 I 期临床试验²。药物研究新模式的出现也大大加强了人类应对急性传染病爆发的能力。去年 SARS 流行期间, 中国、美国和欧洲的科学家以惊人的速度确定了冠状病毒为 SARS 致病原, 测定了其基因组^[3-7], 在此基础上开展了相关的病原学、诊断试剂、疫苗和药物研究, 取得了重要成果。

然而, 随着高通量筛选、生物芯片等一批重要的新技术在创新药物研究中实际应用, 新药研究的投入大幅增加, 而近年来新药研究的成果和产出, 却并未如所预期的那样, 呈现显著的上升。一个重要原因, 是基因的功能及其调控远比人们起初设想的要复杂得多。大多数疾病是由多种基因共同影响的结果: 人体内存在着基因网络复杂的动态调控机制。因此, 针对单个分子靶点的新药研究思路和高通量筛选技术, 难以全面、完整地反映化合物与疾病的相关性。药物研究必须调整策略, 从针对单个基因转变为针对多个基因 (或基因调控网络), 必须深入研究基因 (靶点) 之间的作用与联系, 考虑信号转导通路和功能系统的调控。

最近发展起来的系统生物学 (Systems Biology) 概念为发现多基因和病毒感染等复杂疾病的治疗药物提供了新的思路 and 方向, 使得人们关注在疾病相关基因调控通路和网络水平上研究药物的作用机理、代谢途径和潜在毒性等, 也使在细胞水平全面评价活性化合物的成药性 (Druggability) 成为可能^[8-10]。**高内涵筛选 (High Content Screening, HCT) 方法的创立是这一新兴研究领域近年来一项重大的技术发展^[11-12]**。所谓高内涵筛选是指在保持细胞结构和功能完整性的前提下, 尽可能同时检测被筛样品对细胞、生长、分化、迁移、凋亡、代谢途径及信号转导等多个环节的影响, 从单一实验中获取大量相关信息, 确定其生物活性和潜在毒性。从技术层面而言, 高内涵筛选是一种应用高分辨率的荧光数码影像系统, 在细胞水平上实现检测指标的多元化和功能化的筛选技术, 旨在获得被筛样品对细胞产生的多维立体和实时快速的生物效应信息。高内涵筛选克服了以往药物发现的“串行”研究方法 (即化合物筛选→初步药效学评价→急性毒性评价→全面的临床前研究→临床研究) 效率低、速度慢的弱点以及高通量筛选 (High Throughput Screening, HTS) 成功率低的缺陷, 使研究人员可以在新药研究的早期阶段就获得活性化合物对细胞的多重效应的详细数据, 包括细胞毒性、代谢调节和对其它靶点的非特异性作用等, 从而可显著提高发现先导化合物的速率, 增加药物后期开发的成功率。目前, 高内涵筛选技术已经引起了国际大制药公司的高度重视, 全球已有约 60 家新药研究机构启动了这一领域的研究项目。应用高内涵筛选技术, 宾夕法尼亚大学的科学家发现了在细胞凋亡等信号转导途径中起重要作用的双特异性磷酸酯酶抑制剂。另有资料表明, 这一技术用于筛选 G 蛋白偶联受体拮抗剂也获得了较好的结果。国外业界人士认为, 如果说高通量自动化 DNA 测序技术对顺利完成人类基因组计划的贡献是革命性的, 那么高内涵筛选在当今药物发现中将起到同样的关键作用。因此, 高内涵筛选是创新药物研究技术发展中的一个值得注意的新趋势。

二. 后基因组时代药物研究的策略：计算机与化学合成、 生物测试的结合

1. 大规模虚拟筛选在先导化合物发现中的作用

从已有的化合物，包括合成化合物和天然产物中寻找药物或先导化合物，是药物发现的一条重要途径。然而到目前为止，人们只是针对大约 500 种疾病治疗靶点，筛选了现在已发现的 2000 多万种有机化合物中的大约 10% 的化合物^[13]。因此，仍然有大量的潜在的活性化合物未被人们发现。另一方面，生物学的研究，尤其是基因组计划的实施，特别是人类基因组测序计划的完成，为疾病治疗提供了大量的潜在靶标，据估计数量大约为 600~1500 个。高通量筛选为对大量化合物进行实验测试提供了可能，大大加快了发现活性化合物的速度。

然而，高通量筛选也有一些局限，首先是效率问题，虽然其发现活性化合物的速度快，但是相对于一般药理测试，高通量筛选存在假阳性问题；其次是化合物样品问题，虽然化学文摘等刊物收录的化合物数量非常庞大，但实际上无论是制药公司，还是大学或研究所，其样品库中的化合物数量都是有限的，虚拟筛选利用计算机强大的计算能力，采用三维药效基团模型搜寻或分子对接的方法，在化合物数据库中寻找可能的活性化合物。在找到一些潜在的活性分子之后，可以通过向有关公司订购、自己合成或提取分离的方法得到样品，并进行药理测试。与高通量筛选相比，虚拟筛选不存在样品的限制，其费用也远远低于前者。先进行虚拟筛选，然后再进行药理测试这一研究策略的效率比直接进行药理测试大大提高。

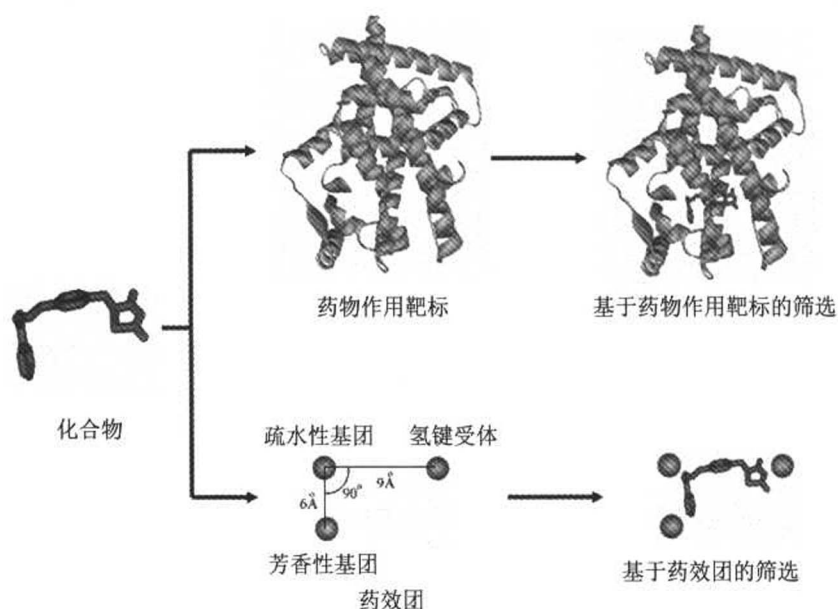


图1 虚拟筛选的两种策略，基于靶标的虚拟筛选（上部）
和基于药效团的虚拟筛选（下部）

Doman 等^[14]以 II 型糖尿病的靶点——蛋白酪氨酸磷酸酯酶 1B (PTP1B) 抑制剂的发现为例, 比较了高通量筛选和虚拟筛选方法, 其结果列于图 2。从中可以看到, 经过虚拟筛选后再进行生物学测试, 其“命中率”比随机的高通量筛选提高了 1,700 倍。

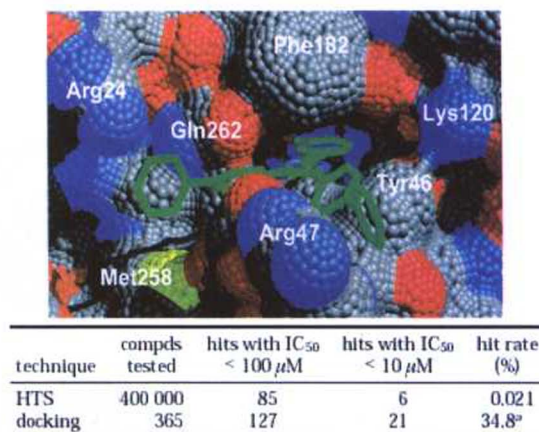


图 2

为了开展大规模的虚拟筛选, 我们建立了基于国产超级计算机的新药发现和设计系统, 其框架如图 3 所示。在这个系统中首先利用现有的 (或虚拟设计的) 小分子化合物数据库和靶标生物大分子数据库, 在超级计算机上进行虚拟的筛选; 选出分子再经进一步的精确计算和分子模拟, 进行复筛; 最后进行化学合成和生物活性测试验证。

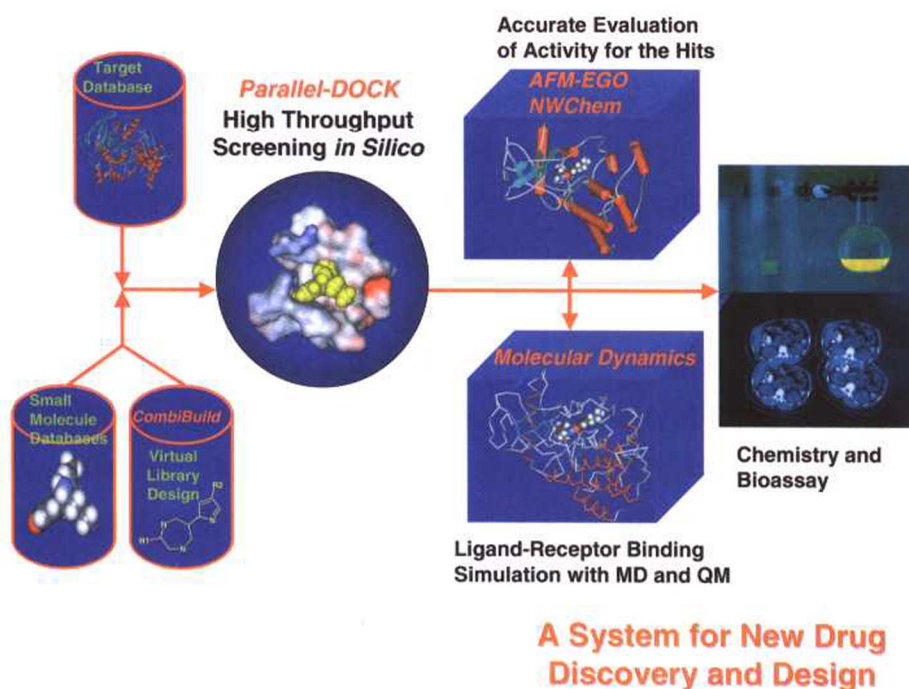


图 3

在实际研究工作中, 我们采取的策略可以更详细地用图 4 来说明。经虚拟筛选和生物活性测试初步发现的活性化合物, 其分子结构再被拆分成一些基本的分子碎片 (文献上发表的活性化合物也可这样处理), 利用得到的分子碎片再生成虚拟的组合化合物库, 进一步扩增化合物结构的多样性和规模, 随后再进行第 2 轮的虚拟筛选。

Discovery Strategy

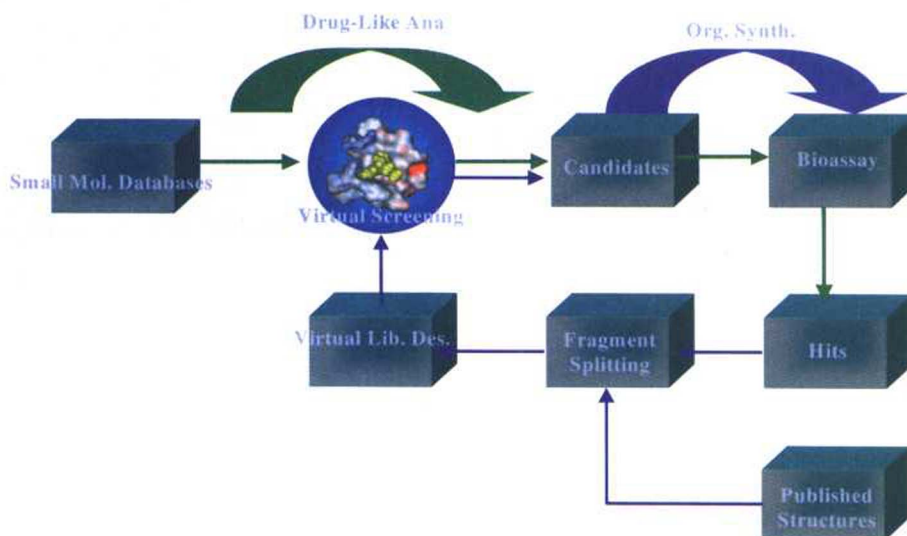


图 4

利用上述技术平台和研究策略，我们以核受体 PPAR γ 为靶标，开展了寻找抗糖尿病先导化合物的研究工作。在超级计算机上，对商业性的小分子化合物库 ACD-SC、MDDR 以及我们自己建立的中国天然产物数据库(CNPD)中大约 240 万小分子化合物，进行了两轮虚拟筛选，选出得分最高的 600 个化合物；随后根据“类药性”原则和药物化学家的经验，从中精选出 150 个化合物进行实验的研究——采用表面等离子体散射技术（利用 Biacore 仪器），测定化合物与受体 PPAR γ 的结合常数，得到了 76 个具有较强结合活性的化合物。在此基础上又进行了细胞水平和整体动物模型的测试，发现了一些与 PPAR γ 有很高结合活性的化合物 ($K_i < 100$ nM)，其中 3 个化合物的激动活性高于曲格列酮。虚拟筛选的结果经实验筛选验证后的成功率，显著高于目前国际上文献报道的先进水平。这些化合物的结构类型新颖多样，包括 10 多个不同的结构类别，打破了现有激动剂只有噻唑二酮和羧酸两大类结构框架的局面，对发展新型 PPAR γ 激动剂具有重要意义。另外还建立了细胞分化和葡萄糖转运细胞模型，并在此基础上建立了系统的胰岛素增敏剂临床前动物试验体系。采用 3T3-L1 细胞分化模型进一步评价虚拟筛选发现的活性化合物，发现化合物 T32 和 T33 具有很强的促 3T3-L1 细胞分化能力，活性强于或类似于罗格列酮；并且对基础水平和胰岛素刺激的细胞葡萄糖转运均有促进作用。应用 ob/ob 小鼠模型对 T33 的体内作用进行研究，显示该化合物具有显著胰岛素增敏作用。

Large-Scale Virtual Screening

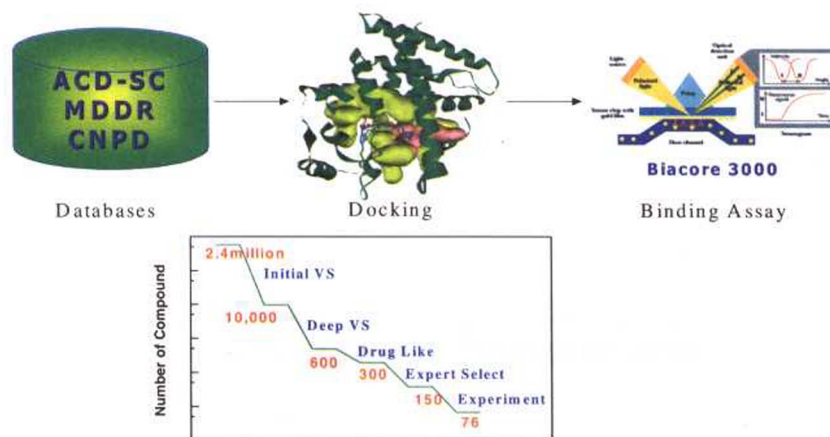


图5 针对 PPAR γ 的大规模虚拟筛选和结合活性测试

2. “配体垂钓”——从中草药中寻找活性化合物

中草药和各种天然产物中，含有大量的各种成分，其结构类型独特多样，是新药研究的宝贵资源。但是传统的分离、提取、纯化方法，效率很低，不适应快速发现活性结构的需要。从天然产物的众多成分中，迅速发现对某一靶标大分子具有结合活性的化合物，具有重要意义。另一方面，由于基因组学、蛋白质组学、分子生物学和结构生物学的进展，许多在生命现象中起着重要作用的生物大分子被分离和纯化，其结构得到阐明，迫切需要对其功能和调控网络进行深入的研究。中草药等天然产物中的活性成分，是开展这方面研究的极好的工具。以这些活性成分为探针，开展化学生物学研究，对于药物研究和整个生命科学的发展，都具有重要影响。

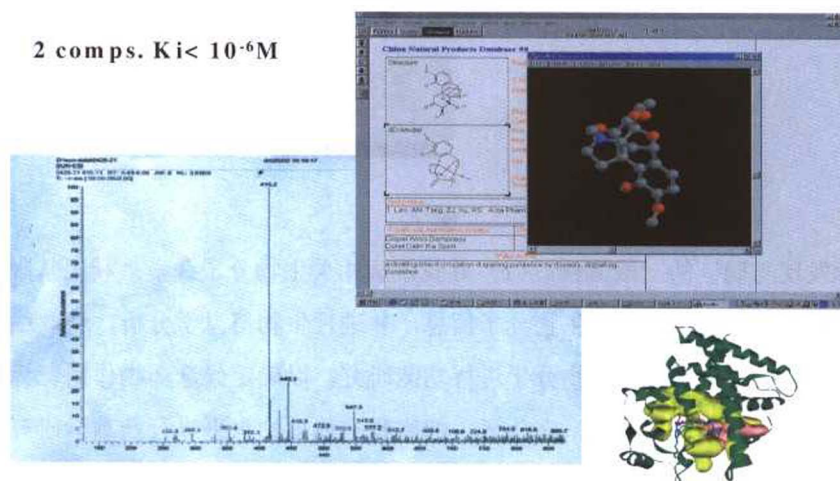


图6

为此，我们建立了“配体垂钓”技术体系，该系统的框架如图6所示。我们以适当的方式把靶标生物大分子（如核受体 PPAR γ ）固定，让中草药粗提物溶液通过固定相，活性化合物与靶标分子结合而留在固定相上。然后将其洗脱，并用 LC—MS 进行鉴定，把得到的活性分子结构输入计算机，与虚拟筛选结果进行比较。我们用这样的方法，获得了结合常数 $K_i < 10^{-6}M$ 的活性化合物（图6）。

3. 靶点发现与确证

人类基因组计划的实施为药物研究提供了发展机遇,不过,由现在已经测定序列的基因中发现可能的药物作用靶标并非易事。一般选择药物作用靶标要考虑两个方面的情况:首先是靶标的有效性,即靶标与疾病确实相关,并且通过调节靶标的生理活性能有效地改善疾病症状;其次是靶标的副作用,如果对靶标的生理活性的调节不可避免地产生严重的副作用,那么将其选作药物作用靶标是不合适的。

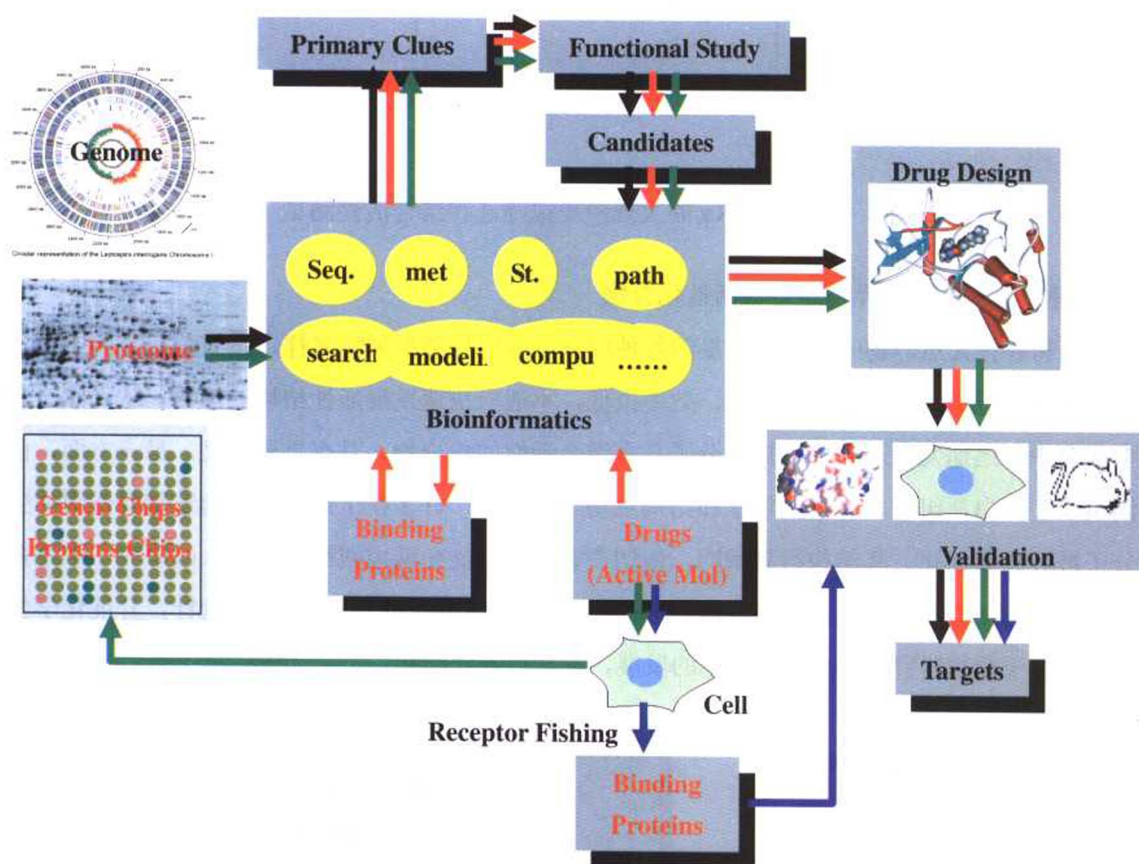


图 7

图7为靶标发现与确证的一般流程。(1)寻找疾病相关生物分子线索:利用基因组学、蛋白质组学以及生物芯片技术获取疾病相关生物分子信息,并进行生物信息学分析,获取线索。(2)确定候选药物作用靶标:然后对相关的生物分子进行功能研究,以确定候选药物作用靶标。(3)针对候选药物作用靶标,设计小分子化合物,在分子、细胞和整体动物水平进行药理学研究,验证靶标的有效性。另外,还可以根据已经确证有活性的化合物进行受体垂钓,寻找其作用靶标。

复旦大学医学院医学分子病毒学国家重点实验室完成了表皮葡萄球菌 (*Staph. epidermidis*) 的基因组测序工作, 功能研究表明, 两个基因与表皮葡萄球菌感染有关^[15]。中科院上海药物研究所药物发现与设计中心进行了计算机虚拟筛选, 从 10 多万个化合物挑选出 56 个化合物, 再经复旦医学院实验测试, 18 个化合物具有相当强的抗表皮葡萄球菌活性, 进一步证实了靶标与抗菌活性的相关性。

参考文献

1. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* **1996**, 56:100-104.
2. Donoghue M. Hsieh F. Baronas E. Godbout K. Gosselin M. Stagliano N. Donovan M. Woolf B. Robison K. Jeyaseelan R. Breitbart R. E. Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research.* **2000**, 87:E1-E9.
3. Marra, M. A.; Jones, S. J.; Astell, C. R.; Holt, R. A.; Brooks-Wilson, A. et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science.* **2003**, 300:1399-1404.
4. Rota, P. A.; Oberste, M. S.; Monroe, S. S.; Nix, W. A.; Campagnoli, R. et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science.* **2003**, 300:1394-1399.
5. QIN ZQ. Wang J. Li W. A complete sequence and comparative analysis of a SARS-associated virus(Isolate BJ01). *Chinese Science Bulletin.* **2003**, 48:941-948.
6. Konrad Stadler, V. M., Markus Eickmann Stephan Becker; Sergio Abrignani, H.-D. K. a. R. R. SARS-Beginning To Understand A New Virus. *Nature Reviews: Microbiology.* **2003**, 1, 209.
7. Shen X. Luo XM. Luo C. Gui CS. Chen LL et al. Interaction Between Nucleocapsid Protein and Human Cyclophilin A Is Associated with SARS Coronavirus Infection. (Submitted).
8. Ideker T, Galitski T, Hood L. A new approach to decoding life: systems biology. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **2001**; 2:343-72.
9. Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science.* **2002**; 295(5560):1662-4.
10. Bonetta L. Systems biology--the new R&D buzzword? *Nat Med.* 2002; 8(4):315-6.
11. Liptrot C. High content screening - from cells to data to knowledge. *Drug Discov Today.* **2001**; 6(16):832-834.
12. Edwards BS, Oprea T, Prossnitz ER, Sklar LA. Flow cytometry for high-throughput, high-content screening. *Curr Opin Chem Biol.* **2004**; 8(4):392-8.
13. Drews J. Drug discovery: a historical perspective. *Science.* **2000**; 287(5460):1960-4.
14. Doman TN, McGovern SL, Witherbee BJ, Kasten TP, Kurumbail R, Stallings WC, Connolly DT, Shoichet BK. Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *J Med Chem.* 2002; 45(11):2213-21.
15. 秦智强, 钟扬, 张健, 何有裕, 吴旻, 江娟, 陈洁敏, 罗小民, 瞿涤, 表皮葡萄球菌双组分调控系统的生物信息学分析, 科学通报, 2004; 49 (10): 948—952.

抗真菌感染药物的进展

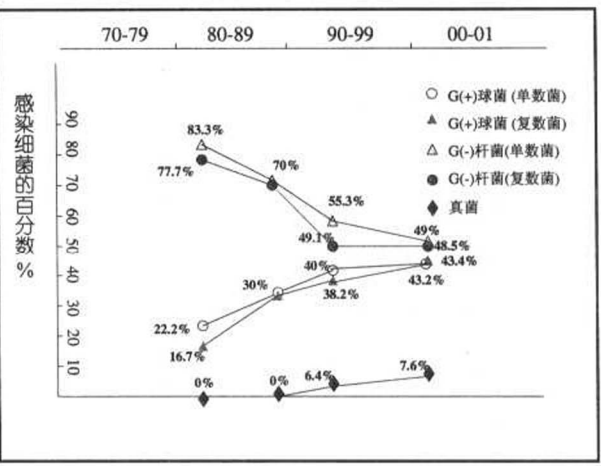
中国医学科学院 中国协和医科大学
北京协和医院
王爱霞 刘正印

近年来院内外感染中真菌感染有逐渐增加的趋势，由于早期诊断比较困难，而晚期又缺乏强有力的抗真菌药物，常造成很高死亡率。院内真菌感染的败血症发病率比院外明显增高，死亡率也以院内真菌败血症为高。从我院四个不同年代败血症培养的结果来看94-95年真菌败血症的发生率高达8.1%。2000年真菌败血症的发生率达6.7%。另外从我院20年149例真菌感染的分析来看真菌感染逐年上升。

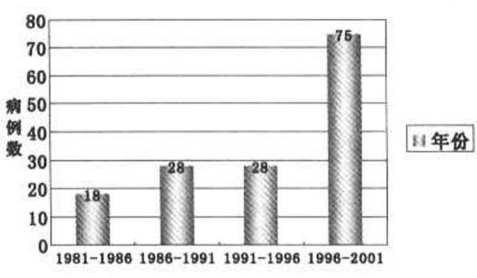
北京协和医院四次院内感染败血症的比较

	82/4-83/3	88/7-89/6	94/7-95/6	2000.1-2000.12
G(+) HAI	17.0%(8/47)	24%(12/50)	29.7%(22/74)	34.3%(36/105)
G(-) HAI	59.6%(28/47)	56%(28/50)	36.5%(27/74)	41.9%(44/105)
复数菌	23.4%(11/47)	20%(10/50)	25.7%(19/74)	17.1%(18/105)
真菌	0	0	8.1% (6/74)	6.7%(7/105)
败血症				
发病率-HAI	67.1%(47/70)	67.6%(50/74)	74.8%(74/99)	92.9%(105/113)
CAI	32.9%(23/70)	32.4%(24/74)	25.2%(25/99)	7.1%(8/113)
死亡率-HAI	51.1%(24/47)	30.0%(15/50)	44.6%(33/74)	32.4%(34/105)
CAI	13.0%(3/23)	20.8%(5/24)	20.0%(5/25)	0

注：* 34例中27例死亡，7例已处于中末期自动出院
HAI 院内获得性感染
CAI 院外获得性感染



20年内149例真菌感染的变化



Epidemiology of sepsis in the US

