

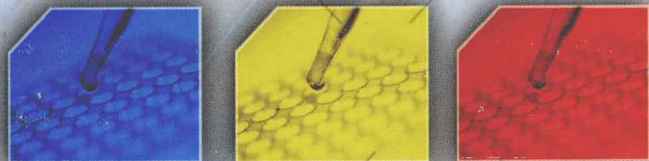
国家“十一五”重点图书出版项目
——生物医学实验技术系列丛书

XIAOHESUAN YAOWU

小核酸药物开发 技术

KAIFA JISHU

费 嘉◎主编



国家“十一五”重点图书出版项目
——生物医学实验技术系列丛书

小核酸药物开发技术

主 编	费 嘉	
副 主 编	胡海燕	李育敏
编 者	费 嘉	胡海燕
	梁 爽	李育敏
	谷景义	朱雪姣
	王秀菊	

军事医学科学出版社
· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

小核酸药物开发技术/费嘉 主编. -北京: 军事医学科学出版社, 2011. 4

ISBN 978-7-80245-724-9

I. ①小… II. ①费… III. ①核酸: 药物-制造 IV. ①TQ464.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 048189 号

出 版: 军事医学科学出版社

地 址: 北京市海淀区太平路 27 号

邮 编: 100850

联系电话: 发行部: (010) 66931051, 66931049, 81858195

编辑部: (010) 66931127, 66931039, 66931038,

86702759, 86703183

传 真: (010) 63801284

网 址: <http://www.mmsp.cn>

印 装: 中煤涿州制图印刷厂北京分厂

发 行: 新华书店

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

印 张: 16.75

字 数: 380 千字

版 次: 2011 年 8 月第 1 版

印 次: 2011 年 8 月第 1 次

定 价: 36.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者, 本社发行部负责调换

前 言

核酸属于生物大分子，而小核酸指小于 50 bp 的核酸片段，通常称寡核苷酸。小核酸药物专指靶向作用于 DNA、RNA 或蛋白质的一类寡核苷酸分子，包括反义寡核苷酸、三链 DNA、CpG 寡核苷酸、Aptamer、Decoy、核酶、siRNA、microRNA 等。它可以抑制或替代某些基因的功能，因而具有药物开发价值，有些内源性寡核苷酸（如 microRNA）对疾病诊断、治疗和预后评估多方面有重要意义。小核酸药物是充满希望的靶向治疗药物，是生物制药领域的重要内容。本书力图结合分子生物学的最新技术，从小核酸药物的靶标鉴定、化学合成及修饰到动物实验、临床验证，系统而详细介绍小核酸药物开发技术，对生物医药相关学科的研究生、新药研发人员、制药工业界和高科技投资者具有适用价值。

此书为暨南大学研究生教材，本书获暨南大学研究生教材建设项目资助。

目 录

第一章 小核酸药物的研发	1
1 小核酸药物	1
1.1 反义寡核苷酸	1
1.2 三链 DNA 技术	2
1.3 CpG 寡核苷酸	2
1.4 Aptamer 技术	3
1.5 Decoy 技术	3
1.6 核酶	4
1.7 siRNA 药物	5
1.8 microRNA 药物	5
2 小核酸药物研发	6
2.1 小核酸药物的研究阶段	7
2.2 小核酸药物的开发和产业化阶段	7
2.3 小核酸药物的商业化阶段	8
3 生物技术药物产业化	8
参考文献	9
第二章 反义寡核苷酸药物开发技术	12
1 引言	12
2 反义寡核苷酸的作用机理	13
2.1 水解靶标 mRNA	13
2.2 调节前体 mRNA 的剪接	14
2.3 阻断蛋白质的翻译	15
2.4 切除 mRNA5'端帽子结构	16
2.5 调节 mRNA 多聚腺苷酸化位点	17
3 反义寡核苷酸的化学修饰	18
3.1 寡核苷酸化学修饰的种类	18
3.2 寡核苷酸药物化学修饰的应用和创新	24
4 反义寡核苷酸的药物传递	24
4.1 脂质体介导的递送方法	25
4.2 特异受体的配体导向递送方法	26

4.3	纳米粒介导的递送方法	27
5	反义寡核苷酸的应用	27
5.1	利用反义寡核苷酸研究基因功能	27
5.2	反义寡核苷酸在肿瘤治疗中的应用	32
6	反义寡核苷酸药物开发现状	34
	参考文献	38
第三章	三链核酸	41
1	三链 DNA 的结构	41
2	三链 DNA 的设计与合成	44
3	三链 DNA 的应用	45
3.1	顺向嘧啶 (TC) 寡核苷酸的识别效应	46
3.2	反向嘌呤 (G、GA、GT) 寡核苷酸的识别效应	46
3.3	识别 TA 断点的寡核苷酸	48
3.4	识别 CG 和 TA 断点同时存在的寡核苷酸	49
3.5	前景及预测	50
	参考文献	50
第四章	CpG 寡核苷酸与免疫调节	52
1	CpG 结构特征	53
2	CpG ODN 的免疫学活性	54
3	CpG ODN 的应用	55
3.1	CpG ODN 抗肿瘤的研究	55
3.2	CpG ODN 抗感染的研究	56
3.3	CpG ODN 作为疫苗佐剂的研究	57
3.4	前景与问题	58
	参考文献	58
第五章	Aptamer 技术	61
1	适配子的筛选	61
1.1	SELEX 技术的基本原理和过程	61
1.2	SELEX 技术的特点	63
1.3	SELEX 技术的完善	63
2	适配子的特点	64
2.1	适配子的优点	64
2.2	适配子与抗体	65
3	适配子在治疗方面的应用	66
3.1	抗凝血	66
3.2	抑制血管生成	68

3.3	免疫调节	68
3.4	抗病毒	70
3.5	炎症治疗	70
3.6	抑制增殖	71
4	适配子在肿瘤学方面的应用	72
4.1	肿瘤诊断	72
4.2	肿瘤治疗	73
5	适配子在其他方面的应用	75
5.1	生物传感器	75
5.2	适配子技术与纳米技术的结合	76
5.3	适配子在环境毒理学中的应用	77
5.4	小 结	78
	参考文献	79
第六章	Decoy 技术	83
1	转录因子 decoy 策略的概念及作用原理	83
2	转录因子 decoy 的化学修饰	84
3	转录因子 decoy 的优点	84
4	转录因子 decoy 的应用进展	84
4.1	E2F decoy	85
4.2	NF - kappaB decoy	86
4.3	AP - 1 decoy	88
4.4	STAT3 decoy	89
4.5	CRE - decoy	90
4.6	Sp1 - decoy	91
4.7	Egr - 1 decoy	91
5	Decoy 技术应用前景及存在的主要问题	92
	参考文献	92
第七章	核 酶	98
1	核 酶	99
1.1	I 型内含子	99
1.2	II 型内含子	102
1.3	RNase P	105
1.4	锤头型核酶	107
1.5	发夹型核酶	110
1.6	HDV 核酶	111
1.7	VS 核酶	112

2 核酶的应用	114
2.1 抗肿瘤血管生成	114
2.2 AIDS 的治疗	116
2.3 病毒性肝炎基因治疗研究	123
2.4 小结	123
参考文献	124
第八章 siRNA 药物开发技术	132
1 siRNA 的原理和作用机制	132
1.1 RNAi 的分子机制	132
1.2 siRNA 的设计原则	133
1.3 siRNA 的合成方法	134
2 siRNA 的应用	136
2.1 基础医学	136
2.2 siRNA 在药物研究中的应用	137
2.3 siRNA 在临床医学研究中的应用	139
2.4 前景及问题	141
参考文献	141
第九章 microRNA 药物开发技术	144
1 microRNA 的生物合成和作用机制	145
1.1 microRNA 的生物合成	145
1.2 microRNA 的作用机制	146
2 microRNA 在疾病发生中的作用	146
2.1 microRNA 与肿瘤	148
2.2 microRNA 与其他疾病	151
3 microRNA 在疾病治疗中的应用	152
3.1 高表达的 microRNA 与疾病的治疗	153
3.2 低表达的 microRNA 与疾病的治疗	155
4 microRNA 核酸药物的应用前景及存在的主要问题	156
参考文献	156
第十章 生物芯片技术在药物开发中的应用	163
1 生物芯片的概念	163
1.1 基因芯片	164
1.2 蛋白质芯片	165
1.3 组织芯片	165
1.4 芯片实验室	166
2 生物芯片技术在药物开发中的应用	167

2.1	基因芯片技术的应用	167
2.2	蛋白质芯片在药物开发中的作用	172
2.3	组织芯片在药物开发中的作用	176
2.4	芯片实验室在药物开发中的作用	176
3	结 语	178
	参考文献	178
第十一章	蛋白质组学与药物开发	180
1	蛋白质组学	180
2	蛋白质组学简介	180
2.1	蛋白质组学产生的科学背景	180
2.2	蛋白质组学的概念	181
2.3	国际蛋白质组学计划	185
2.4	中国的肝脏蛋白质组计划	186
3	蛋白质组学的研究内容	187
3.1	研究内容	188
3.2	研究方法	188
3.3	研究技术	189
4	蛋白质组学的应用及意义	191
4.1	蛋白质组学的应用	191
4.2	蛋白质组研究的意义	195
5	蛋白质组学发展现状趋势与展望	197
5.1	趋势与展望	197
5.2	中国蛋白质组学的现状与趋势	199
	参考文献	199
第十二章	代谢组学与药物开发	202
1	代谢组与代谢组学定义	202
2	代谢组学与基因组学、转录组学和蛋白质组学	203
3	代谢组学的研究方法	204
4	代谢组学分析技术	205
4.1	核磁共振技术	205
4.2	色谱与质谱联用技术	206
4.3	色谱-核磁-质谱联用法	208
4.4	代谢组数据分析	208
5	代谢组学在医药研究中的应用	209
5.1	在功能基因组研究中的应用	209
5.2	在疾病诊断研究中的应用	210

5.3 在药物研发中的应用	210
5.4 在中医药研究中的应用	211
5.5 展 望	212
参考文献	212
第十三章 生物信息学与药物开发	214
1 生物信息学简介	214
1.1 历史背景	214
1.2 研究范围	219
1.3 生物数据库	223
2 生物信息与医药应用	233
2.1 生物靶标	233
2.2 通路与网络	236
2.3 生物信息综合分析应用	239
2.4 药物开发	241
参考文献	242
第十四章 系统生物学在药物开发和中医药现代化中的作用	245
1 系统生物学	246
1.1 系统生物学思维方法	246
1.2 系统生物学的基本工作流程	246
1.3 系统生物学的基本特点	248
2 系统生物学与药物开发	250
2.1 实验方法	251
2.2 数据分析和途径信息学	251
2.3 文献挖掘	251
2.4 数学建模	252
3 系统生物学与中医药现代化	252
3.1 中医理论与系统生物学的共同语言	252
3.2 系统生物学是中西医结合的创新平台	255
3.3 系统生物学展望	256
参考文献	256

第一章

小核酸药物的研发

核酸属于生物大分子，小核酸指分子量相对小的分子，目前还没有严格的碱基数量界定，通常认为是小于 50 bp 的核酸片段。小核酸药物专指靶向作用于 RNA 或蛋白质的一类寡核苷酸分子，包括反义寡核苷酸、CpG 寡核苷酸、Aptamer、Decoy、核酶、siRNA、microRNA 等。它可以抑制或替代某些基因的功能，有些内源性寡核苷酸（如 microRNA）具有疾病诊断和预后评估价值。小核酸药物是充满希望的靶向治疗药物，是生物制药领域的重要内容。

1 小核酸药物

1.1 反义寡核苷酸

反义寡核苷酸（antisense oligonucleotide, ASODN）通常指由 15 ~ 25 个核苷酸组成，并且进行了某些化学修饰的短链核酸。它的碱基顺序排列与特定的靶标 RNA 序列互补，进入细胞后可按照 Watson - Crick 碱基互补配对原则与靶标序列形成双链结构。反义寡核苷酸与靶标基因的 RNA 结合后可通过各种不同的机制影响靶标基因的表达。

反义寡核苷酸的一个重要特征就是其对应于它的靶标 RNA 的高度序列特异性。这种序列的高度保真度是反义寡核苷酸能够调控一个基因家族中的单个成员基因，甚至调控一个成员基因的某个变异体。这是其他在蛋白质水平上的研究技术所无法做到的。反义寡核苷酸在 RNA 分子水平上或空间上干扰 RNA 的代谢过程，如造成 RNA 降解、改变剪接、成熟和阻断反义等。这种在 RNA 水平的调节提供了更多的机会来研究基因的功能，同时也提供了高选择性和高精确性研究靶标基因的可能性^[1]。

反义寡核苷酸的产业化发展极大地推动了其成为一项专门技术。反义寡核苷酸技术包括寡核苷酸的化学修饰、反义寡核苷酸的设计和筛选、反义寡核苷酸的作用原理和机制的研究及开发应用、技术平台的构建和应

用、基因功能的测定和药物靶标的选择、反义寡核苷酸的药学性质鉴定、剂型和给药方式、药理、药效、毒理和药代动力学、大量生产合成工艺等^[1-3]。

1.2 三链 DNA 技术

1953 年 Watson 和 Crick 首次发现了 DNA 的双螺旋结构，被公认为是生物界最广泛的遗传信息载体的普遍存在形式。4 年之后，Felsenfield 等人发现了一条人工合成的腺嘌呤核糖核苷酸的均聚物 (PolyA) 能和人工合成的两条均聚尿嘧啶核糖核苷酸 (PolyU) 形成三链结构，这是最初所接触的三链核苷酸 (triplex forming oligonucleotide, TFO) 的概念。到了 1974 年，Arnott 等人使用人工合成的多聚脱氧核苷酸与多聚胸腺嘧啶核苷酸在高盐水溶液中得到了三链 DNA。研究人员还相继发现了一些三链的 DNA 以及 DNA-RNA 复合物。

双螺旋 DNA 的两条链方向相反，互相平行且交互缠绕，两链间是靠 Watson-Crick 碱基对之间的氢键相联系的。由于碱基对偏于螺旋轴的一侧，两条链之间就形成了一个深沟和一个小沟。三链 DNA 是由经典的 Watson-Crick 双螺旋中含有多聚嘌呤的那条链通过 Hoogsteen 和反式 Hoogsteen 型氢键与第三条链相作用形成的，第三条链位于 Watson-Crick 双链的深沟中。目前发现有两种三链 DNA 形式，即嘧啶·嘌呤-嘧啶型 (Y·RY) 和嘌呤·嘌呤-嘧啶 (R·RY) 型。三链 DNA 的这种结构在医疗领域有着极其重要的价值^[4-7]。

1.3 CpG 寡核苷酸

CpG 表示核苷酸对，其中 G 在 DNA 链中紧随 C 后，CpG 双核苷酸在人类基因组中的分布很不均一，而在基因组的某些区段，CpG 保持或高于正常几率，这些区段被称作 CpG 岛 (CpG island)，在哺乳动物基因组中的 1~2kb 的 DNA 片段，它富含非甲基化的 CpG 双倍体。CpG 岛主要位于基因的启动子和第一外显子区域，有 60% 以上基因的启动子含有 CpG 岛，GC 含量大于 50%，长度超过 200bp。

以未甲基化的 CpG 二核苷酸为核心的短核苷酸序列，即 CpG 基序。CpG 寡核苷酸 (CpG ODN) 是人工合成的含有 CpG 基序的寡核苷酸，具有免疫刺激活性。CpG 寡核苷酸的免疫活性，受 CpG 二核苷酸侧翼序列、寡核苷酸骨架及特殊序列影响，它们具有细胞特异性，有的 CpG 寡核苷酸甚至在不同细胞里作用完全相反。其还具有种属特异性，即特定序列的 CpG 寡核苷酸对特定种属的免疫细胞具有免疫活性。将对鼠免疫细胞具有强刺激活性的寡核苷酸作用于人的免疫细胞时，仅显示出微弱的免疫活性，甚

至无免疫活性，反之亦然。鼠选择性的 mCpG 寡核苷酸所含的 CpG 基序为 5' - GACGTT - 3'，而人选择性的 hCpG 寡核苷酸所含的为 5' - TCGTCGTT - 3'。CpG 抑制是脊椎动物在长期进化中形成的一种识别自身和外源 DNA 的重要免疫机制。脊椎动物免疫系统正是通过对未甲基化 CpG 二核苷为核心的特定核苷酸序列（CpG 特征结构）的识别来辨别细菌 DNA 等外源 DNA，并对其产生免疫应答的。随着对 CpG - DNA 免疫学特性的深入了解，人们对 CpG 特征结构在 DNA 免疫学中的重要作用有了逐步的认识，并在 DNA 疫苗、病毒免疫、抗肿瘤、抗寄生虫病等方面进行了广泛研究，逐渐认识到 CpG 寡核苷酸具有重要的治疗价值^[8,9]。

1.4 Aptamer 技术

20 世纪 90 年代初，美国的 Gold 等人构建了随机寡核苷酸文库，并从中筛选出与靶蛋白特异结合的核酸配基，命名为指数富集的配基系统进化技术（systematic evolution of ligands by exponential enrichment），简称 SELEX 技术。同年，Tuerk 等人应用该技术从人工构建的随机寡核苷酸文库中筛选到能特异性结合噬菌体 T4 DNA 聚合酶的寡核苷酸配体。从生命科学的角度来看，SELEX 技术就是利用分子生物学技术，构建人工合成的单链随机寡核苷酸文库。

然后从该文库中筛选出对靶分子结合具有高特异性和高亲和力的核酸适配子（Aptamer，又称适体）。Aptamer 技术筛选获得的能与靶分子专一、高效结合的单链寡核苷酸（可以是 RNA，也可以是 DNA），长度一般为 25 ~ 60 个核苷酸。在大多数情况下，核酸适配子除与靶分子结合外，对靶分子的功能多为抑制作用。

目前，适配子已经广泛地用于基础研究、临床诊断和药物研发等方面。2004 年，Archemix 公司研究开发了凝血酶抑制剂 ARC183，主要用于冠脉旁路移植手术（CABG），经皮冠脉介入治疗及其他需要急性抗凝治疗的情况。2004 年末，Pifzer 和 Eyetech 公司共同研制的用于治疗湿性老年黄斑变性的核酸适配子药物“Macugen”（又名 Pegaptanib），在美国被批准上市，这意味着适配子的研究将越来越深入。Aptamer 技术将在疾病诊断、靶向治疗、抗病毒和免疫调节等方面发挥重要作用^[10-12]。

1.5 Decoy 技术

正确的基因表达调控是机体正常发育和器官组织功能正常发挥所必需的，真核生物基因表达调控主要发生在转录起始。转录因子（transcription factor, TF）是靶基因调控的关键，在转录起始阶段，转录因子与顺式元件结合，可激活靶基因的转录表达。不同的 TF 作用于不同的 DNA 序列，调

控不同基因的表达；同一 TF 又可调控多个基因表达。转录因子 decoy 策略 (transcription factor “decoy” strategy) 是合成与顺式元件相一致的高亲和力的脱氧双链寡核苷酸 (double-stranded oligodeoxynucleotides, dsODNs) 转染细胞, 竞争抑制反式因子 (转录因子) 与顺式元件的结合, 干扰转录因子的 DNA 结合活性, 从而抑制内源性靶基因表达, 最终达到基因治疗和基因调控的目的^[13]。1995 年, Morishita 等^[14]首次报道了 E2F decoy 具有抑制新生内膜增生的作用, 可以预防再狭窄的发生, 从此为基因治疗开辟了一条新的途径。

随后, 该策略被广泛应用于多种疾病的机制和治疗研究, 为基因调控和基因治疗研究提供了一种新的有力手段, 尤其是在基因治疗方面, 越来越受到人们的重视和利用, 是一个非常值得研究和开发的领域。以转录因子为靶点的 decoy 核酸药物是从转录水平上调控基因表达, 从而达到治疗目的的一类新型基因治疗药物, 称为基因转录调控药物。众多的研究已经表明该策略是一种有潜力的基因治疗和基因功能研究工具^[13-16]。

1.6 核酶

核酶 (ribozyme) 是一类具有催化核酸水解和连接功能的核酸分子。发现至今已经 28 年。核酶最初是在 1981 年, 美国科罗拉多大学的 T. Cech 等人发现的^[17], 他们以原生动物嗜热四膜虫为材料, 研究 RNA 的基因转录问题时, 发现转录产物 rRNA 前体在鸟苷 (G) 和 Mg^{2+} 存在下, 在完全无任何蛋白酶存在下能进行自我剪接 (self-splicing), 可将 rRNA 前体中存在的链长 414 个核苷酸的内含子切下, 证明了 RNA 具有催化功能。1986 年 T. Cech 等人通过对四膜虫 rRNA 前体自我剪接机制的深入研究, 发现前体中的内含子 (称为 L19RNA) 具有很强的酶活性, 这个由 395 个碱基构成的线状 RNA, 具有特征的三维结构, 它既能使核苷酸聚合成多核苷酸, 又能将多核苷酸切成不同长度的片段, 具有催化分子间反应的功能。1983 年 S. Altman 和 N. Pace 发现了核糖核酸酶 P (RNaseP, 由 77% RNA 和 23% 蛋白质组成) 可催化大肠杆菌 tRNA 前体, 在 5' 端切去 1 个寡核苷酸片段转变为成熟的 tRNA, 其中有催化活性的是 RNaseP 的 RNA 组分。1986 ~ 1988 年, 使用体外转录方法得到一批具有催化活性 (主要是切割活性) 的 RNA, 并测得它们的动力学常数后, 完全得到了包括一些曾经怀疑过 RNA 催化功能的酶学家在内的广泛承认。1989 年, 诺贝尔化学奖授予于核酶的发现者 S. Altman 和 T. Cech。2000 年, 实验研究证明核糖体也是核酶, 具有氨基转移酶的功能^[17-20]。

如今, 人们对核酶的结构和催化机理的研究已经比较深入, 在应用方面也取得了很大的进展。作为一种基因治疗方法, 核酶有着广阔的应用前景和极大的临床实用价值。在生物技术领域, 核酶已成为基因功能研究、

核酸突变分析、生物传感器研究等方面的新型工具酶。在当代生物医学领域,科学家们已利用核酶定点切割 RNA 分子的特性,研究并设计核酶进行抗病毒、抗肿瘤和针对某些遗传疾病的核酶治疗。由于核酶的本质是 RNA,其引起免疫应答的可能性比外源蛋白小得多,且其分子较小,易于操作,因此核酶在许多重大疾病如艾滋病、癌症、肝炎等的治疗中具有广阔的前景,现已取得了巨大的成就。

1.7 siRNA 药物

1995 年,美国康奈尔大学 Guo 在研究一种线虫时,首次发现 RNA 抑制现象。1998 年,Fire^[21] 等对线虫进行阻断效应实验,发现双链 RNA (doublestranded, dsRNA) 可特异性抑制特定基因的表达,此阻断效果比单用正义或反义 RNA 强 10 倍以上,Fire 将这种由 dsRNA 引发的特定基因表达抑制现象称为 RNA 干扰作用 (RNA interference, RNAi)。

RNAi 是指通过反义 RNA 与正链 RNA 形成双链 RNA 特异性地抑制靶基因的现象,通过人为地引入与内源靶基因具有相同序列的双链 RNA (有义 RNA 和反义 RNA),从而诱导内源靶基因的 mRNA 降解,达到阻止基因表达的目的。目前科学家已初步阐明 RNAi 的作用机制,认为此过程主要分为三个阶段:启动、剪切、倍增^[22]。

siRNA 是 RNAi 作用赖以发生的重要中间效应分子,它是长 21 ~ 23nt 的 dsRNA 特征性结构,即 siRNA 的序列与所作用的靶 mRNA 序列具有同源性,siRNA 两条单链末端为 5'端磷酸和 3'端羟基,此外每条单链的 3'端均有 2 ~ 3 个突出的非配对的碱基,使 siRNA 不同于其他小 dsRNA,是细胞赖以区分真正的 siRNA 和其他 dsRNA 的结构基础。ATP 在 siRNA 介导的 RNAi 中具有重要作用:较长 dsRNA 向 siRNA 的转变需要 ATP 参与,siRNA 双链结构解旋并列成有活性的 RISC 也依赖于 ATP。此外,ATP 使 siRNA 的 5'端带上磷酸分子,可能充当靶 RNA 裂解的一种分子参照。

siRNA 技术可以方便地阻抑特异性基因,受抑制的基因可以是内源性基因,也可以是外源性基因。内源性基因如癌基因或与疾病相关的基因,外源性基因如病毒基因,针对它们进行特异性阻抑,可应用于临床基因治疗或开发新型药物等方面的研究^[23-25]。

1.8 microRNA 药物

microRNA (miRNA) 是真核生物中一类内源性、大小有 19 ~ 24 个碱基、参与基因转录后负性调控的非编码单链小分子 RNA。1993 年,首个 miRNA lin-4 被发现与线虫发育时序有关,其通过互补结合到 lin-14 mRNA 3'端非翻译区 (3'untranslated region, 3'UTR) 的 7 个保守位点下调

lin-14 的表达^[26]。但直到 2000 年,研究人员在线虫中发现另一种与 lin-4 作用方式相似的小分子 RNA——let-7, 此类小分子 RNA 才被正式命名为 microRNA (miRNA)^[27]。此后,寻找新的 miRNA 以及揭示其在基因调控中的作用一直是研究的热点,分别在 2002 年和 2003 年两度入选 Science 杂志年度十大科技突破。生物信息学研究表明 miRNA 总数可能大于编码基因总数的 1%, 而 30% 以上的编码基因可能是 miRNA 的靶基因^[28-30]。随着生物信息学和基因克隆技术的迅猛发展,现已在人类发现 541 个 miRNA, 记录于 miRNA 数据库 (<http://microrna.sanger.ac.uk>)。miRNA 靶基因预测软件也迅速发展起来,从 2003 年第一个靶基因预测软件 miRanda 到现在已有 10 多种^[31-32]。miRNA 在物种进化中高度保守,其表达具有组织特异性和时序特异性。研究表明 miRNA 参与生命过程中一系列重要进程,包括早期发育、细胞增殖、分化、凋亡、死亡、免疫调节和脂肪代谢等。此外,miRNA 直接或间接参与肿瘤的发生与发展,miRNA 表达谱可用于肿瘤分类、诊断、预后评估及靶向治疗。因此 miRNA 在疾病发生发展中扮演着重要的角色,开发以 miRNA 为基础的核酸药物是基因治疗的重要内容。

miRNA 在医学发展中的意义主要体现在两个方面,一是对疾病发病机制的深入认识,二是为新的诊断和治疗技术提供靶位,前者是后者的基础。miRNA 是疾病发展过程中基因表达的有力调节者,尤其是在肿瘤发生发展机制中扮演着重要的角色。而且 miRNA 是在转录后负性调控基因表达,相对于从转录过程和蛋白质水平进行调节,尤其是对于转录过程中多种转录因子和蛋白质参与的复杂调控模式和某些蛋白质微量改变即引起的细胞功能异常来说,通过 miRNA 进行调节更容易且效果更好。

传统的肿瘤化疗药物由于缺乏肿瘤特异性,可能引起较大的副作用。发现更好的靶位点,寻找肿瘤特异的治疗药物,是该领域研究的重要内容。一些 miRNA 通过调控细胞增殖、分化和凋亡直接指导癌症的发生,另一些通过抑制癌基因或抑癌基因的表达而与癌症密切相关。因此当 miRNA 在某种肿瘤中发挥关键作用,尤其是其特异性高的时候,这些 miRNA 则有望成为肿瘤特异的治疗靶标。

针对 miRNA 在疾病中的不同作用,可采取相应的治疗策略。目前,用反义技术抑制高表达的 miRNA 和转基因技术导入低表达的 miRNA 是研究 miRNA 与疾病治疗的常用方法。这些以 miRNA 为切入点设计的基因药物在疾病基因治疗中发挥着重要的作用,其应用前景十分广阔^[33-35]。

2 小核酸药物研发

每一种小核酸药物的成功产业化都需要经过研究、开发、产业化、商业化四个步骤^[36]。

2.1 小核酸药物的研究阶段

研究阶段主要包括小核酸药物的设计、合成、纯化。

1. 小核酸的设计

确定小核酸的靶标是十分重要的一步，但是这一步也面临很多难以解决的问题。一方面小核酸与靶标结合后引起靶基因表达的变化可能会有体内其他途径来弥补，使得小核酸对靶标的调节效应被减弱而无法检测到，或者机体内产生的反馈调节作用，最终使得小核酸的调节作用不能完全发挥出来^[37]。另一方面小核酸与靶标结合不紧密，脱靶效应难以避免。因此，在设计小核酸时，要尽可能提高其在体内的稳定性及与靶标的特异性结合能力。例如小核酸的长度就是一个十分关键的因素。一般来说长度越长，其特异性越高。在动物细胞染色体内大约有几十亿对碱基，如果4个碱基的数目大致相同，并在整个基因中随机分布，那么按照统计学原理，大于17个碱基的反义核酸与非靶基因杂交的可能性不大^[38]。

2. 小核酸的合成

小核酸的合成目前已经发展到比较成熟的阶段，规模能从纳摩尔到摩尔级别，大多数实验室和药厂都是采用亚磷酰胺或者修饰的亚磷酰胺化学合成法，通过DNA自动合成仪来完成。优化的高质量试剂、干燥的合成环境是得到高耦联效率和高纯度产品的关键，而这也正是药物的合成过程中的一大难题。如在原料方面，配好的进口试剂价格昂贵，而自配试剂所用的原料试剂如甲苯、乙腈、吡啶、醋酐等无水处理又比较费时费力，今后要降低药物成本，进行大规模合成在一定程度上也依赖于合成试剂处理方法的进展^[39]。

3. 小核酸的纯化

合成产物难免会有杂质的存在，因此对合成产物进行纯化，提高纯度是十分关键的一步。纯化的方法主要有聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）、薄层色谱、高效膜吸附色谱、寡核苷酸纯化柱芯（OPC）和高效液相色谱（HPLC）。其中HPLC是纯化常用的方法，并适用于大规模纯化。

2.2 小核酸药物的开发和产业化阶段

开发阶段主要是指药物的非临床实验及临床Ⅰ、Ⅱ期试验。产业化阶段主要是指临床Ⅲ期实验。

目前，小核酸在体内被摄取的情况与细胞培养中的摄取情况有很大区别，但它是如何进入细胞，尤其是在体内如何被细胞摄取的，这一机制很少被仔细的研究。另外小核酸药物必需以一定的数量接近靶组织，并穿过细胞膜进入细胞才能发挥作用，因此如何有效地投递药物上还需要进一步