

第八届海内外生命科学论坛

国家自然科学基金委员会生命科学部 主办
军事医学科学院

军事医学科学院 承办

后基因组时代的新药发现

主 编 贺福初 杜生明 孙建中

军事医学科学出版社

·北 京·

内 容 提 要

本书为第八届海内外生命科学论坛会议论文集,共40篇。这些论文围绕“后基因组时代的新药发现”这一主题,侧重于药物靶标发现、药物化学合成、药物设计、生物信息学、蛋白质组学、代谢组学等热点理论和关键技术;既有从宏观上对学科发展的概述和展望,又有具体实验研究报告。这些论文的作者都是国内生命科学、药物研发领域的著名专家和在海外工作并取得优异成绩的华人学者。可以说,本书对于从事新药研发、药物基因组学、蛋白质组学、代谢组学、生物信息学等研究的科研人员把握研究方向,跟踪学科发展,了解最新研究进展具有极高的参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

后基因组时代的新药发现/贺福初,杜生明,孙建中主编.

—北京:军事医学科学出版社,2004.5

ISBN 7-80121-349-1

I. 后… II. ①贺… ②杜… ③孙… III. 药物-研究

IV. R97

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 042870 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)66931034

66931048

编辑部:(010)66931127

传 真:(010)68186077

E-MAIL: mmsped@nic.bmi.ac.cn

印 刷:潮河印装厂

装 订:潮河印装厂

发 行:新华书店总店北京发行所

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:14.75

字 数:360千字

版 次:2004年5月第1版

印 次:2004年5月第1次

印 数:1-2000册

定 价:30.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

序

Gene 一词是在 1909 年由丹麦遗传学家约翰森(W. L. Johannsen)创造,后由我国著名遗传学家谈家桢教授将其译为“基因”并传入我国,这个词翻译得极为完美,在音、意两方面均与原词保持高度一致,使“基因——遗传因子”的意义得到充分表达。2002 年,随着人类基因组计划顺利完成,人类初步获得自身的基因图谱,成为生命科学的一个重要里程碑,从此生命科学迈入后基因组时代。人类基因组所蕴含的巨大信息为发现新药靶标、实现个体化治疗提供了一种全新的模式。

自 20 世纪 80 年代以来,伴随基因组学的发展,新药研发也由以化学合成为主逐步向化学与基因组学融合的方向转变,涌现了一系列后基因组时代的新思路、新技术、新方法、新领域,为新药研发开辟了崭新的道路。一方面,由于蛋白质组学、药物基因组学、生物信息学、系统生物学等新兴学科的崛起,必将加深人类对生命本质的认识,为新药研发提供更为深刻的理论基础;另一方面,由于高通量筛选、计算机辅助药物设计、芯片技术等高新技术的不断发展和完善,也必将进一步拓展新药研发的途径,加快研发新药的步伐。因此,我们有理由相信,后基因组时代的药物研发必将跨入一个崭新的纪元,为保障 21 世纪人类的生命健康展现出一个更加美好的前景。

本届海内外生命科学论坛紧紧围绕“后基因组时代的新药发现”这一主题,侧重于药物靶标发现、药物化学合成、药物设计、生物信息学等热点理论和关键技术,邀请了一批国内生命科学、药物研发领域的著名专家和 10 位在海外工作并取得优异成绩的华人学者,进行学术交流和广泛研讨,以启迪思路,凝聚共识,谋求后基因组时代的新药发现有所突破。

军事医学科学院院长



2004 年 5 月 11 日

第八届海内外生命科学论坛大会组织机构

大会主席 贺福初 中国科学院院士,军事医学科学院副院长
大会副主席 朱作言 中国科学院院士,国家自然科学基金委员会副主任
孙建中 军事医学科学院科技部部长

学术委员会

主 任 秦伯益(院士)
顾 问 孙曼霁(院士) 吴祖泽(院士) 沈倍奋(院士)
陈凯先(院士) 饶子和(院士) 沈 岩(院士)

委 员 (以拼音排序)

陈志南 杜冠华 蒋华良 来鲁华 李 锦
李 松 刘克良 马大龙 彭双清 王昌恩
汪 海 王升启 恽榴红 张学敏 张永祥

秘 书 长 张永祥

组织委员会

主 任 孙建中
副 主 任 杜生明 张永祥
秘 书 长 房彤宇
成 员 刘 超 丁日高 彭 奕 徐守军 李 朝
崔孟珣 高 波 甄 蓓

目

录

1. 新药研究中的困惑·····	秦伯益(1)
2. 蛋白质组研究与新药研发·····	姜颖等(5)
3. 后基因组时代的药物发现:趋势和实践·····	陈凯先(11)
4. 代谢物组学在药物发现和开发研究中的意义·····	刘昌孝(17)
5. Anion Channels: New Therapeutic Targets for Cardiovascular Diseases·····	Duan Dayue(23)
6. 钾离子通道在老年痴呆发生及神经元凋亡中的关键作用·····	王晓良(29)
7. HIV – 1 Capsid Protein; the Potential New Target of Anti – AIDS Drug Development·····	Tang Shixing(30)
8. Novel Therapeutic Anti – cancer Targets: Ubiquitin E3 Ligases·····	Xie Weilin(34)
9. 我国人类功能基因研究与开发策略探讨·····	马大龙(35)
10. EphA Kinases Regulate Cell Motility and Proliferation – Novel Targets for Therapeutic Intervention in Cancer·····	Miao Hui(39)
11. HAB18G/CD147 分子研究进展·····	陈志南(40)
12. GeneChip/microarray Applications in Drug Development and Toxicity Assessment·····	Lu Bin(48)
13. 药物筛选和兴奋剂检测蛋白质芯片的设计与制备·····	杜冠华等(52)
14. Bioinformatics and Cancer Target Discovery·····	Zhang Zemin(63)
15. 基于蛋白质相互作用及网络的药物设计·····	来鲁华(73)
16. Glycoengineering Tumor Cells for the Selective Targeting and Immunotherapy of Cancer·····	Guo Zhongwu(79)
17. 抗阿片依赖药物靶标研究的新进展·····	李锦等(81)
18. 药物代谢酶多态性、功能及在个体化医疗中的作用·····	文思远等(87)
19. 代谢组学方法在药物肝肾毒理学研究中的应用·····	彭双清等(95)
20. ACE2: 肾素 – 血管紧张素系统的新靶点·····	缪朝玉(101)
21. 一个新的原癌基因编码的四次穿膜蛋白质 LAPT4 β ——肿瘤治疗中的 新靶标·····	周柔丽等(108)
22. 雷公藤红素对猪内皮细胞诱导的人淋巴细胞免疫排斥反应的抑制·····	董润安(111)
23. 黄樟素氧化物及其衍生物对细胞生长及细胞周期和 P53 蛋白 表达的影响·····	杜爱英等(115)

24. PPAR γ 作为心肌肥大防治靶点的实验研究	伍仕敏等(124)
25. 孤儿受体 hGPCRc 的分子克隆及其初步分析	袁广胜等(132)
26. 血管生成促进因子和抑制因子在肿瘤血管生成中的作用	黄 芝等(138)
27. 靶向 HIV Tat - TAR 的抑制剂活性评价新方法的研究	于晓琳等(147)
28. 杨树提取物与白杨素对癌细胞的选择性杀伤作用	陈 希等(158)
29. 咪喃酮衍生物类环氧合酶 - 2 抑制剂研究进展	朱学军等(167)
30. 心力衰竭大鼠骨骼肌萎缩时 Bcl - 2、Bax 的表达及氯沙坦的影响	付春景等(175)
31. 膜整连蛋白 β_4 是响尾蛇毒诱导血管内皮细胞凋亡的作用靶位	赵启韬等(182)
32. 海南特有药用海洋生物芋螺资源的开发前景	罗素兰等(189)
33. 神经网络方法在 5,7,8 位取代的喹诺酮类化合物定量构效 关系中的应用	郭波涛等(196)
34. 后基因组时代的新药发育毒性评价与研究	吴纯启(202)
35. 人类基因组计划回顾与后基因组学时代的挑战	董晓群(208)
36. 新的激活素 II 型受体相互作用蛋白鉴定及其促激活素信号传导作用	徐桂月等(214)
37. 小鼠激活素受体相互作用蛋白 3 (ARIP3) 的基因构成和启动子分析	崔雪玲等(215)
38. 4 - 色满酮类化合物的合成及其抗炎活性研究	孙 光等(216)
39. GABAB2 亚基对 GABABR 受体中配体亲和力的微调控的分子机制	刘剑峰(218)
40. 化学基因组技术与功能基因组和创新药物研究	蒋华良等(220)

新药研究中的困惑^{*}

秦伯益

军事医学科学院, 北京 100850

1998年由我牵头并执笔,有10名院士和20多名药学界教授参加起草的一份中国工程院咨询报告《振兴我国民族医药工业,加速新药研究开发的建议》送达国务院。李岚清副总理批示:“请国家经贸委会同有关部门研究”。有关的9个部委开会研究后答复:咨询报告反映了我国医药行业的基本情况,所提建议是积极合理的,很多工作正在逐步改革落实。报告主要是两部分,下面罗列一下提纲。

1. 存在问题

- (1)百业经药,政出多门。
- (2)国营制药企业面临困境。
- (3)假冒伪劣药悄然上市,坑害百姓。
- (4)新药研制不断滑坡,后继乏药。
- (5)中药研究与生产徘徊难前。
- (6)洋药抢滩,国药面临冲击。

2. 几点建议

- (1)理顺组织体制。
- (2)加强基础研究。
- (3)开发现代中药。
- (4)整顿医药市场。
- (5)调整进口政策。
- (6)改革投入机制。

五年过去了,有的进步明显,如理顺组织体制、整顿医药市场、改革投入机制等。多数也有不同程度进步,但还没有根本改善。而且一些问题解决后,又会有新的问题出现。因此,要正视老问题。

一、看清新形势

要谈新形势,当然首先是中国加入世贸组织后带来的新形势和中国内部深化改革给医药行业带来的新形势。这方面的形势这几年国内谈得很多了。今天我不谈了,下面我只想谈谈后基因组时代到来后的新形势。

国际合作的人类基因组测序和作图已提前完成。但这几年的进展我有几个“没想

^{*} 本文系2003年7月28日在海口市举行的药物研究开发论坛上的讲话稿

到”。没想到人类基因总数那么少,没想到人和动物基因差别那么小,没想到各种相关基因多得如牛毛,没想到基因组药物学那么招人炒,没想到系统的纵向研究没人搞,没想到很多新药苗头打水漂。

原预计人类基因总数约 10 万,结果是 4 万多。这倒没有什么,是多少就多少。奇怪的是人和动物,如黑猩猩、小鼠的基因竟然 95%,甚至 99%是相同的。那么人和动物各种功能差别的物质基础在哪里?当然可以说是在蛋白质,但蛋白质也是要靠基因去转录和翻译的呀!现在,各种相关基因,如肿瘤、心血管病等疾病相关基因和多种特殊心理素质的相关基因,如犯罪基因、流氓基因、自杀基因等不断出现,多不胜数,但越多越没有特殊意义。现在很多基金申请时都打着基因组药物学的旗号,但从何下手做,却都说不清楚。因为功能基因组、疾病基因组都还不清楚,基因组药物学的切入点也很渺茫。基因组药物学的前提是要有新的药物靶标,如可分泌蛋白、受体、酶等。中国做出了几个有效新靶标?难说呀!国外发现的新药靶标,轮得到我们去开发吗?不过,尽管基因组药物学还不能在近期很快推出新药,但如不抓紧及早开展研究,那么几十年后我们的差距还将拉大。

目前很多实验室都在自身强项领域里横向延伸。因为利用自身优势做同类课题,进展比较快,容易出成果。如做完 1%人类基因组后,很快就做清楚了水稻基因组,接着就要做猪和血吸虫的基因组了,估计也会较快地成功。但那 1%人类基因组的功能基因组学谁去做?那 1%基因组与人类疾病的相关基因是什么?目前国内没人做。国内外都是各学科做各学科的,或个别学科之间协作的。但没有人组织起来做系统的纵向研究,尽管大家都认为最终是要朝纵向发展的。

要看到人类基因组研究现在还只是在结构基因组层次完成了第一个阶段。这阶段,相当于基因的解剖学、组织学阶段。据 2000 年初《自然》杂志上一篇文章估计,要认识所有基因,解读这本“天书”大约还要 10 年。做清楚所有基因的功能,即完成蛋白质组学的研究,大约要到 2050 年,相当于基因的生理学、生物化学阶段。预计到 2100 年才能识别并确定基因变异与疾病的关系,即完成疾病基因组学的研究,相当于基因的病理学阶段。也就是说,还要一个多世纪的努力。当然,这是指整个医药领域与基因组学有关工作的进程。对各个疾病和药物的研究进程不会是一刀切的,早的也许 20~30 年;晚的也许 80~100 年。但无论如何,不是像现在在很多科研人员想象的那么简单。现在重要的是应该集中研究一两种疾病,譬如 SARS,或者更简单的疾病,从结构基因组、功能基因组、疾病基因组到药物基因组和基因组药物学纵向地完成全套工作,真正做出特效药来。这样取得的经验会对其他疾病的研究有借鉴,会有利于推动整个医药领域与基因组学有关工作的进步。目前全世界还没有一个国家完成了对一种疾病的全套基因水平的纵向研究。我国如能趟出一条路来,提出一套经验来,那对世界的贡献就大了。这种工作希望由国家科技部或中国科学院高层领导来统筹。

以基因组学的思路研究药物,和过去我们找药主要靠经验积累和大量随机筛选不同。过去即使病原病理都不清楚,也可以找到有效药。这种途径今后也还可以用,但那不是基因组药物学的思路。现在有些人还是用过去经验筛选的思路去想像基因组药物学的研究前景,这样的话,不打水漂才怪呢!

二、探索新思路

(一)要创新,不轻言创新;要跨越,不凭空跨越

要大胆创新,但要防止创新贬值。不是人人都能创新的,不是事事都要创新的,不是处处都可以创新的。是否创新,要由实践检验确认,实践是评价创新最权威的标准。不是口头上说说,会议上讲讲,有几个新词、新概念就算创新的。创新是要在实验室里做出来的,不是文字创新、会议创新创得出来的。而有些规范工作,如 GLP、GCP、GMP 等,没有根据是不许擅自创新的。创新不能搞成群众运动,搞成“一窝蜂”、“一边倒”、“一刀切”、“一团糟”、“一风吹”那一套。

要跨越式发展,就首先要继承、要引进,要在前人的基础上,在现有的水平上起步,才谈得上跨越。不能像过去那样关起门来搞唐吉珂德式的“伟大的创举”,结果在客观规律面前处处碰壁。不能像从前,改过去是创新,改过来又是创新。白兜了一个圈子,倒说是不断创新。

(二)要传统,不固守传统;要接轨,不盲目接轨

不论西药研究,还是中药研究,过去都已经有了相当的经验和传统研究方法。凡是有效的都不要轻言放弃。现在医药基因组学兴起后,又多了新的、更高效的研究新药的思路和方法。我们应该起步,应该投入。但新方法是过去老方法的补充与发展,不是取代。看一看近一二十年世界新药的发现途径绝大多数还是原来老的那些途径,如大量化学合成药还是定向设计的。如“伟哥”,是凭经验发现的。发现后才用分子生物学的道理解释它的药理作用。今后通过基因组学新途径发现的药物肯定会多起来,但旧的不会就没有。应该新老并用,左右逢源。

中药应力争走向国际。现在中药的开发状态确实令人不安。要打入国际就必须按国际的标准做,否则人家不会接受你。不接受你,也就无法认识你的优点。你在国内按传统的一套做,不要紧。要进入国际医药主流市场,你就必须与它接轨。这是天经地义的事。哪有既要人家用你,又不按人家规定办的道理。除非人家改变注册规定,而改变了的规定也还是人家的规定,你还是必须遵守。在这一点上,是没有讨价还价余地的。

要说不接轨,倒还真有不必要考虑接轨的。那是指完全由我国科学家原创的重大的创造发明。外国还没有,轨道是我们先铺的。要接轨,就应该他们来接我们的轨。如果有这样的项目,那就是我们的骄傲了。如果将来有很多项目外国愿意来接我们的轨,那中国科学技术的国际地位就不是一二个诺贝尔奖所能涵盖的了。中国科技界也就真的站起来了,真的可以扬眉吐气了。

(三)要蹲着,不总是蹲着;要站着,不总是站着

现代药物研究,学科越分越多,每个学科又越来越向微观深入,不蹲下去,很多现象看不清,很多靶点找不着。不但要蹲下去,还要蹲得深,蹲得久。看清楚了,找着了,才罢休。但蹲深了,蹲久了,又容易只会用显微镜,不会用望远镜。只见树木,不见森林;攻其一点,不及其余。偶有所得,就大呼小喊;全局形势,却一无所知。所以常蹲着工作的人要时不时站起来,多看看总体情况,把握好自己的方位。

新药研究与开发的全局形势只有站着看才能看得清。纵向看,该化合物研发到了哪个阶段?各学科的工作分别到了哪个阶段?横向看,它与国内外同类药物优缺点的比较如何?开发前景如何?现在研究中各学科之间的配合和进度是否协调?各项工作都在动态中发展,不断从平衡走向不平衡,再从不平衡走向平衡,直到完成或放弃。不站着看,是看不清的。但站

久了,也得蹲下去看看。尤其是关键性的结果必须把握准,否则,药效、毒性、稳定性、质量控制等环节上任何一点失误都会导致总体的失败,“一着不慎,满盘皆输”。越是在基因、分子水平上做药,越要多蹲蹲、多站站,多换几个角度和距离看看。我是做了一辈子新药研究主题负责人的,深知新药研究总体把握的甘苦,深知蹲着和站着的重要。这虽然不是什么新思路,鉴于很多人没有做新药的经验,屡屡在意想不到的地方出错,所以把老经验谈谈,就算温故而知新吧!

致谢

本文曾请顾健人院士、沈倍奋院士、李松教授审阅并提出宝贵意见。

蛋白质组研究与新药研发

姜 颖 贺福初

军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850

【摘要】 蛋白质是生命活动的主要承担者,一切生命活动无不与蛋白质有关。蛋白质组研究已成为 21 世纪生命科学的焦点之一。蛋白质组学集生物技术、分析技术、信息技术和材料技术等之精华,采用大规模、高通量、高速度的技术手段,通过研究全部基因所表达的所有蛋白质在不同时间与空间的表达谱和功能谱,全景式地揭示生命活动的本质。蛋白质组是开发疾病防治药物和技术的直接靶体库,将蛋白质组技术应用在生物靶标发现及新药研发的整个过程中,具有巨大的发展潜力。本文就蛋白质组技术在新药研发中的应用作一简要综述。

【关键词】 蛋白质组学;新药研发

Proteomics in New Drug Discovery and Development

Jiang Ying He Fuchu

【Abstract】 Proteomics is a research field aiming to characterize molecular and cellular dynamics in protein expression and function on a global level. The most significant advantage of proteomics is its ability to examine a whole proteome or sub - proteome in a single experiment so that the protein alterations corresponding to a pathological or biochemical condition at a given time can be considered in an integrated way. Proteomic technology has been extensively used to tackle a wide variety of medical subjects including biomarker discovery and drug development. By complement with other new technique advances in genomics and bioinformatics, proteomics has a great potential to make considerable contribution to biomarker identification and to revolutionize drug development process. This article provides a brief overview of the proteomic technologies application in new drug discovery and development.

【Key words】 proteomics; new drug discovery and development

基因,尤其是基因组研究形成了 20 世纪生命科学研究一道亮丽的风景线,取得了巨大的成就。20 世纪 80 年代以后,新药开发从以化学合成为主向生物学时代转变,特别是在人类基

基因组计划即将完成之时,利用大规模基因组研究方法和成果,为临床用药的高效性、针对性和安全性及新药开发、评价提供了新的模式,这就是最近几年提出的“药物基因组学”。但“药物基因组学”存在几点致命的缺陷。由于核酸结构多数是同源的,联系着许多正常功能,因而作用于 DNA 的药物,大多数选择性差,毒性大,有严重的细胞毒性;其次是疾病的特征主要表现在蛋白质上,许多疾病如癌症、心血管疾病等是多种基因共同作用的结果,因而很难找到关键的基因。由于上述原因而制约了新药开发的速度,所以仅凭“药物基因组学”这只单脚圆规,很难绘出完美的圆圈。因此新药的研发必须回到蛋白质的研究上,才能真正在功能结构上阐明生命活动的实质,取得突破性进展。

蛋白质组学的特点是采用高分辨率的蛋白质分离技术,高效率的蛋白质鉴定技术,全景式地研究在各种特定情况下的蛋白质谱^[1]。20 世纪的新药研究集中在作用于细胞膜上的酶靶和受体靶,以信息传递或阻断为目标,发现和生产目前临床上常用的药物。一项科学统计表明,20 世纪 90 年代中期,全世界制药业用于寻找新药的药靶共约 483 个,它们主要是蛋白质(受体占 45%,酶占 28%);而当时全世界正在使用的 2 000 多种药物中,85%都是针对上述 483 种药靶。这 483 种药靶分子构成了全世界药厂的最重要的发展源泉。从功能基因组学的角度,人们认为每种疾病平均与 10 个左右基因相关,而每种基因又与 3~10 种蛋白质相关,如果以人类主要的 100~150 种疾病进行计算,则应该有 3 000~15 000 种的蛋白质具有成为药靶的可能。这些潜在的发展源头,将有可能给制药界带来的无穷的财富和发展空间。这也是为什么蛋白质组学作为发现药靶的主要技术平台,越来越受国际制药业界垂青的重要原因所在。

通过蛋白质组技术对疾病发生不同时期蛋白质表达谱的变化进行分析,发现疾病不同时期蛋白质标志物,不仅对发现新药有指导意义,而且可形成未来诊断学和治疗学的理论基础。药物研发过程包含有许多阶段:靶标发现、确认,先导化合物选择,小分子化合物筛选和优化及临床验证等。蛋白质组技术不仅能为药物研发提供确定的药靶,而且也提高了整个药物研发过程中下游研究的效率。在此基础上,一些亚学科如化学蛋白质组学(chemical proteomics),拓扑蛋白质组学(topological proteomics),临床蛋白质组学(clinical proteomics),毒理蛋白质组学(toxicoproteomics)及药物蛋白质组学(pharmacoproteomics)相继建立起来以充分发挥蛋白质组学在药物研发中的作用^[2]。可以预料,不断发展的蛋白质组学结合大量的由基因组提供的遗传信息将会极大地推动药靶的确认和药物研发的整个过程。

1 蛋白质组学在生物标记物研究中的应用

生物标记物通常是与疾病发生相关的蛋白质,在疾病的诊断、分级、预后及治疗监测过程中常被作为诊断指标进行定量测定。疾病的发生发展是一个复杂的过程,包括许多蛋白质在表达水平或表达类型上的改变。这些发生改变的蛋白质可以在组织或体液中被检测到,因此可以作为疾病治疗的生物标志物。一个理想的生物标记物,应该对某种疾病有高度的特异性,但大部分的生物标记物都会在许多不同类型的疾病中表达,只是表达水平有所不同。结合考察几个非特异性的生物标记物可能对某种疾病产生特定的指示作用。在这一方面,蛋白质组技术因为能在特定的条件下,规模化地考察蛋白质的表达情况,所以为生物标记物的发现、鉴定和评价提供了有力的技术平台。实际上从诞生开始,蛋白质组学特别是 2-DE/MALDI-TOF 和 SELDI/ProteinChip 技术就已经被广泛的应用于鉴定不同的疾病标志物,如利用蛋白质组技术已经在肺癌、肝癌、胃癌、心脏疾病、关节炎、肝炎等疾病上鉴定出一些应用于诊断的生物标志物^[3-6]。

2 蛋白质组学在新药研发中的应用

一个新药从发现到上市需要经过许多过程,其中包括:靶标发现、确认,先导化合物选择,小分子化合物筛选和优化,候选新药的临床前和临床研究等过程。通过蛋白质组技术对疾病发生不同时期蛋白质表达谱的变化进行分析,可以发现疾病不同时期蛋白质的变化,从而可以进行药物作用靶标的发现和确认、药理作用机制和药物毒性筛选中的研究。

2.1 药物靶标的发现和确认

如前所述,绝大多数药物靶标是蛋白质。蛋白质组由于可以全面地检测疾病和药物处理过程中,蛋白质表达谱和蛋白质-蛋白质相互作用的变化,已经成为发现和确认药物靶标的主要手段。许多研究小组利用蛋白质组手段来研究白血病^[7]、肺结核^[8]及慢性骨骼疾病^[9]的新药靶。利用蛋白质组技术研究 HCV 和 HIV 病原体与宿主的相互作用^[10],揭示生理状态下细胞蛋白质与病原体蛋白质的相互作用发现潜在的药物靶标。药靶鉴定的通常策略是利用蛋白质组技术通过分析生长因子或调节酶处理细胞前后蛋白质表达谱的改变,寻找药物作用的靶标。利用这种研究策略已经在人肠上皮细胞中鉴定了细胞分裂素可以作为免疫疾病治疗的靶标^[11],在肺上皮细胞中鉴定出转录生长因子- β 可以作为肺病治疗的潜在靶标^[12]。利用免疫沉淀和 2-DE 分离等技术还可以研究信号通路中磷酸化蛋白质组的变化情况,如目前已经在 IFN- α 或 IL-2 处理的人淋巴细胞^[13]及凝血酶激活的人血小板^[14]中,鉴定出新的信号蛋白质或信号通路中潜在的药物靶标。

药物靶标鉴定的另外一种策略是化学蛋白质组,即将复杂的蛋白质组中某些特定的蛋白质连接到化学探针上,从而对其功能进行探究^[15]。许多预测蛋白质可能具有催化活性,但以前并没有被人们发现。尽管对这些未知功能的蛋白质我们无法筛选其作用底物,但理论上鉴定这些新蛋白的小分子结合物有可能阐述其新的活性。用这些新蛋白质来筛选小分子化合物库如用核磁共振、芯片等技术就可以发现这些与蛋白质结合的小分子化合物。显然,化学蛋白质组筛选为药物研发提供了新的思路。标记半胱氨酸蛋白酶的化学标签,已经被用来确定细胞凋亡、白内障形成及疟疾感染过程中的蛋白质靶标。活性相关的化学探针是根据检测蛋白质与化学标签相互作用的活性和亲合力的差异来寻找药物靶标^[16,17]。近年来,两种化学蛋白质组技术荧光结合的光失活 (fluorophore-assisted light inactivation, FALI) 和发色基团结合的激光失活 (chromophore-assisted laser inactivation, CALI) 被引进用于蛋白质靶标鉴定和确认^[18,19]。

利用结构蛋白质组发现和确认药物靶标也是一个很好的发展方向。蛋白质的一级结构决定了其三维结构,进而决定了其功能。通常情况下,具有相同功能的蛋白质都具有结构同源性,即使没有明显的序列同源性。因此,许多预测蛋白质可能与已知蛋白具有结构和功能上的同源性。这一基本理论,引发了一门新学科——结构蛋白质组学的诞生^[20],其目标就是提供所有蛋白质的三维结构信息。据估计,将来人们将根据蛋白质的结构信息来阐述大部分未注释蛋白质的功能^[21]。在蛋白质组范围,解析蛋白质的三维结构对于制药业来说至关重要,因为在发现新的药靶、根据结构同源性确定药靶、利用结构相关的方法提供先导化合物的候选方案及发展完善的结构预测算法帮助科学家利用序列信息预测蛋白质的结构和功能等药物研发一系列过程中,蛋白质的结构信息将发挥重要的作用。目前,结构蛋白质组学还是一门新兴学科,德国、加拿大、日本、美国和中国都投入巨资(总额超过 10 亿美元)进行这一学科的建设。

2.2 药物作用机制的研究

蛋白质组技术可以应用于药物的作用机制、药物活性的生化基础和药物参与生化途径等

的研究,所获得的实验数据,对阐明药物作用机制和新调节因子的作用模式提供了有力证据,也为新药研发提供了新的思路。通过构建差异蛋白质表达谱检测药物处理前后复杂的蛋白质的改变情况,可以进行药物作用机制的研究。这种方法已经用于人肿瘤细胞系、动物细胞及动物模型上,并阐述了许多药物的作用机制。除了对动物进行研究外,通过蛋白质组的技术还可以检测细菌对抗生素或化学物质的反应^[22,23]。用 2-DE 技术,分离抗生素处理前后的细菌蛋白质,通过比较和鉴定这些变化的蛋白质,研究者可望得到抗生素的新的作用机制,以确定新的候选化合物。

2.3 药物毒性和筛选研究

蛋白质组学在药物研究中的应用被称为“药物蛋白质组学”(pharmacoproteomics)。在药物毒理上的应用也就被称为“毒理蛋白质组学”(toxicoproteomics)。毒理蛋白质组学的应用主要分为两大部分:①在临床前、临床中发现毒性标志物(单一物质或表达谱)以预测或早期发现药物毒性;②药物毒理机制的研究。与传统方法相结合,蛋白质组学在鉴定药物毒理机制上具有广阔的应用前景,能更准确地预测药物在人体中所发生的毒性^[24]。在机制研究的基础上,蛋白质组学更适用于药物毒性筛选和预测。确立毒性作用和蛋白质标志物之间的关系就意味着可以利用这些标志物进行新化合物的毒性筛选。应用灵敏的蛋白质组学技术可以在比传统方法(像组织病理和临床化学)剂量更低、时间更短的情况下鉴定出毒性作用。这样就可以在研究的早期预测药物潜在的毒性作用和对先导化合物进行毒性排序,从而有效地节省大量时间和经费。目前,毒理蛋白质组学主要应用于肝脏、肾脏和致癌性等方面的毒性预测。

2.4 生物信息学与新药研发

利用蛋白质组学技术鉴定出一系列的蛋白质,对于这些蛋白质还应该利用生物信息学技术进行分析和归类。生物信息学是为了理解各种生物学数据的意义,运用数学、计算机技术和生物学手段进行生物信息的收集、加工、储存、分析和解析的科学。利用生物信息学技术可以对蛋白质组技术鉴定出的药物作用靶点进行进一步的确定和验证,以及对各种组合库进行筛选的指导。生物信息学可以为化学家提供化合物的生物活性和结构信息,进行偏移组合库设计(focused library),使库化合物与相应的靶蛋白形成匹配结构,从而提高筛选的命中率,更有效地发现小分子先导化合物。对于发现的先导化合物,利用生物信息学技术借助配体和作用靶的结构信息进行药效和毒性的优化,从而可以发现更理想的化合物,提高和改善药物设计性能。与生物信息相结合的新药开发是一项高度复杂的系统工程。在方法学上关键是如何将现代生物技术、信息技术、现代计算机技术、组合化学技术等结合起来,提高筛选命中率,减少在合成和筛选方面的时间和经费的投入,降低风险,最终找到高效低毒的且有预期药理活性的治疗药物。目前,生物信息学面临的真正挑战是如何使研究人员十分快捷地获取有用的信息。蛋白质组学和生物信息学的有效利用,必将对我国生物技术和医药工业的发展产生巨大的推动作用。

3 结 语

总之,蛋白质组学已经作为一种独立的技术被广泛应用于新药的研发,国内外制药公司已经将蛋白质组研究纳入其药物研发方案中。蛋白质组学是建立在基因组技术和蛋白质分析和分离技术上的巨大进步,利用蛋白质组技术可以在疾病或非正常状态下全面检测机体蛋白质的表达情况,从而可以发现疾病或药物作用的生物标志物或药靶,进行药理和毒理的筛选研究。但蛋白质组学毕竟还处在发展阶段,蛋白质组在提高通量化、低丰度蛋白质的分辨率,及

增加质谱分析小量样品的灵敏度上仍需要进一步完善。但随着 2-DE 技术和质谱技术灵敏度的提高,生物信息学及其他替代技术的不断发展,人们将能够更好地揭示蛋白质的功能。利用高通量的蛋白质组技术平台,结合基因组、生物信息学鉴定生物标记物、药物靶标和药物先导化合物是目前新药研发的一个方向。

因此,我们相信蛋白质组技术在药物研究中具有广阔的应用前景。近年来人类蛋白质组计划的启动将会大大推动蛋白质组学的发展,也将会提高蛋白质组学在药物研发中的应用。人类肝脏蛋白质组计划(HLPP)是其中的一项重要研究内容。肝脏是人体的第一大器官,是物质代谢、能量转换及供应的“枢纽”,是机体内多种重要信息调控分子的“集散地”,是机体内再生能力最强的器官,在人体生命活动中占有重要地位。同时,肝脏也是药物代谢和转化的中转站,又是淋巴细胞以外最常见的病原体持续感染的场所,控制肝病的发生发展和提高肝病患者的生活质量事关国计民生,对现代医学提出了巨大的挑战。利用蛋白质组技术将为全面认识肝脏及其疾病提供了新的历史性机遇,通过深入的肝脏蛋白质组研究,必将发现一批肝脏疾病的新型诊断生物标志物、药物作用靶标和创新药物。

参 考 文 献

- 1 Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa - Poljak A, *et al*. Progress with gene - product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995; 16: 1090 - 1094
- 2 Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002; 66: 39 - 63
- 3 Hanash S, Brnchory F, Beer D. A proteomic approach to the identification of lung cancer markers. *Dis Markers*, 2001; 17: 295 - 300
- 4 Wang H, Hanash SM. Contributions of proteome profiling to the molecular analysis of cancer. *Technol Cancer Res Treat*, 2002; 1: 237 - 246
- 5 Chen G, Wang H, Gharib TG, *et al*. Overexpression of oncoprotein 18 correlates with poor differentiation in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*, 2003; 2: 107 - 116
- 6 Gharib TG, Chen G, Wang H, *et al*. Proteomic analysis of cytokeratin isoforms uncovers association with survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia*, 2002; 4: 440 - 448
- 7 Hanash SM, Madoz - Gumpide J, Misek DE. Identification of novel targets for cancer therapy using expression proteomics. *Leukemia*, 2002; 16: 478 - 485
- 8 Betts JC. Transcriptomics and proteomics: Tools for the identification of novel drug targets and vaccine. *IUBMB Life*, 2002; 53: 239 - 242
- 9 Cho CH, Nuttall ME. Emerging techniques for the discovery and validation of therapeutic targets for skeletal diseases. *Expert Opin Ther Targets*, 2002; 6: 679 - 689
- 10 Tang H, Peng T, Wong - Staal F. Novel technologies for studying virus - host interaction and discovering new drug targets for HCV and HIV. *Curr Opin Pharmacol*, 2002; 2: 541 - 547
- 11 Barcelo - Batllori S, Andre M, Servis C, *et al*. Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: implications for inflammatory bowel diseases. *Proteomics*, 2002; 2: 551 - 560
- 12 Kennedy S. The role of proteomics in toxicology: Identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. *Biomarkers*, 2002; 7: 269 - 290
- 13 Stancato LF, Petricoin EF 3rd. Fingerprinting of signal transduction pathways using a combination of anti - phosphotyrosine immunoprecipitations and two - dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 2001; 22:

- 14 Maguire PB, Wynne KJ, Harney DF, *et al.* Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets. *Proteomics*, 2002; 2: 642 – 648
- 15 Jeffery DA, Bogoy M. Chemical proteomics and its application to drug discovery. *Curr Opin Biotechnol*, 2003; 14: 87 – 95
- 16 Adam GC, Sorensen EJ, Cravatt BF. Proteomic profiling of mechanistically distinct enzyme classes using a common chemotype. *Nat Biotechnol*, 2002; 20: 805 – 809
- 17 Lind C, Gerdes R, Hamnell Y, *et al.* Identification of S – glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Arch Biochem Biophys*, 2002; 406: 229 – 240
- 18 Beck S, Sakurai T, Eustace BK, *et al.* Fluorophore – assisted light inactivation: A high – throughput tool for direct target validation of proteins. *Proteomics*, 2002; 2: 247 – 255
- 19 Rubenwolf S, Niewohner J, Meyer E, *et al.* Functional proteomics using chromophore – assisted laser inactivation. *Proteomics*, 2002; 2: 241 – 246
- 20 Kim SH. *Nature Struct. Biol*, 1998; 5: 643 – 645
- 21 Eisenstein E, *et al.* Biological function made crystal clear – annotation of hypothetical proteins via structural genomics. *Curr Opin Biotechnol*, 2000; 11: 25 – 30
- 22 Bandow JE, Brotz H, Leichert LJ, *et al.* Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003; 47: 948 – 955
- 23 Bruneau JM, Maillet I, Tagat E, *et al.* Drug induced proteome changes in *Candida albicans*: Comparison of the effect of beta(1,3) glucan synthase inhibitors and two triazoles, fluconazole, and itraconazole. *Proteomics*, 2003; 3: 325 – 336
- 24 Pennie WD, Tugwood JD, Oliver GJ, *et al.* The principles and practice of toxigenomics: applications and opportunities. *Toxicol Sci*, 2000; 54(2): 277 – 283

后基因组时代的药物发现:趋势和实践

陈凯先

中国科学院上海药物研究所,上海 201203

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 and 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,大大加快了药物发现的进程。采用这些新技术,Novartis 的科学家在 20 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药 Gleevec (STI571)。最近,洛克菲勒大学科研人员以 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 1 000 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。

上述技术革命不仅加速了“重磅炸弹”式药物的发现(例如治疗高血脂症药物 HMG - CoA 还原酶抑制剂和抗炎药物环氧酶 - 2 抑制剂等),而且也拓展了药物研究的范围,针对一些原先缺乏治疗手段的疾病(如自身免疫系统疾病、神经退行性疾病、生殖系统疾病等)开发出了一些疗效较好的药物。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暴发的能力。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,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,新药研究领域目前仍面临许多严峻的挑战,寻找治疗多基因疾病(如肿瘤、神经退行性疾病、代谢性疾病等)和抗病毒感染(如艾滋病、肝炎等)的有效药物至今仍很困难。由于这