

文章编号: 1004-0374(2009)01-0007-04

药物设计与同步辐射

张海涛, 沈旭*

(中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 当代药物设计是通过阐明药物与靶标相互作用的机理, 对药物先导化合物进行改造和优化。利用晶体X射线衍射的方法获得药物与靶标复合物的结构, 为药物设计提供最直接有力的依据。同步辐射凭借其高强度、低发散性、波长可调谐性等得天独厚的优势, 实现了对药物与靶标复合物结构的高通量测定, 大大提高了基于结构的药物设计效率。

关键词: 药物设计; 晶体X射线衍射; 同步辐射

中图分类号: R914.2; 0571.43*6 **文献标识码:** A

Drug design and synchrotron

ZHANG Hai-tao, SHEN Xu*

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: Drug design is based on the mechanisms of the drug and target interaction to achieve optimization of the leads. The structures of drug-target complexes obtained by X-ray crystallography provide direct and convictive evidences for drug design. Synchrotron has the advantages of high intensity, low divergence and tunability, so that it can be used for high-throughput data collection of complex structures, thus improving the efficiency of structure-based drug design.

Key words: drug design; X-ray crystallography; synchrotron

1 当代药物设计的策略

在后基因组时代, 从基因组到药物的创新药物研究流程, 涵盖了新靶标的发现、新先导化合物的发现、药物的开发这三大环节。通过功能基因组研究, 新基因或新功能被发现并被确证为药物的新靶标, 然后针对这些靶标进行药物设计, 发现和优化先导化合物, 从而获得新的候选化合物, 再经过药物开发阶段的临床前研究和临床研究得到新药投放市场, 这个过程一般将耗费大约10年时间和10亿美元^[1]。由于新药的审批程序对临床研究有着严格要求, 因此“多快好省”地获得新的先导化合物就成为药物设计者竞相追逐的目标。

当代药物设计越来越表现出学科交叉协同研究的特点。用结构生物学的方法可以获得生物大分子的三维结构, 用表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)、等温量热滴定(isothermal titration

calorimetry, ITC)、差示扫描量热(differential scanning calorimetry, DSC)等生物物理学的方法可以获得生物大分子之间或生物大分子与小分子相互作用的动力学和热力学参数^[2], 用高通量和高内涵筛选的方法发现先导化合物, 用计算机辅助的药物设计(computer-aided drug design)进行分子动力学模拟, 以及ADME研究(吸收absorption、分布distribution、代谢metabolism和排泄excretion), 这些数据都为药物先导结构的发现和优化以及疾病相关基因调控网络研究提供了依据^[3]。

2 复合物晶体结构的测定对药物设计的重要性

在药物与有机体相互作用的过程中, 一方面药物对于有机体表现出一定的药理和毒理作用, 另一方面有机体对药物的吸收、代谢等也起到反作用,

收稿日期: 2009-02-23

*通讯作者: xsheng@mail.shnc.ac.cn

因此生物靶标大分子与药物小分子相互作用的机制就成为药物设计的基础。这种大分子-小分子复合物的结构是两者相互作用机理的最直接证据, 可以通过 X 射线晶体学、核磁共振光谱学以及比较建模的方法来获得。其中, 通过蛋白质晶体对 X 射线的衍射获得蛋白质结构是结构生物学中最常用的方法, 也是基于结构的药物设计(structure-based drug design, SBDD)的重要依据^[4]。

药物靶标蛋白与配体(包括底物、药物中的激动剂或拮抗剂等)形成复合物后, 往往会使蛋白的结构发生微妙的变化, 激活或抑制、提高或降低蛋白的活性, 从而起到调节蛋白功能的作用。仅有不配体的蛋白三维结构(apo-structure)不能说明配体结合后发生的反应, 只有获得蛋白与配体复合物的结构(holo-structure), 通过比对配体结合前后的蛋白构象变化, 研究蛋白与配体之间相互作用的基团, 才能从分子水平上阐明配体作用的机理。复合物晶体结构能够准确而直观地揭示出二者相互作用的具体方式, 是药物作用的最有力证据^[5]。

复合物晶体结构重要的作用还在于为小分子药物的设计和改造提供了依据。利用蛋白与配体的复合物晶体结构, 可以指导理性的药物设计(rational drug design)^[6]。通过合成化学的方法发现和优化药物先导结构, 利用计算机辅助的药物设计方法进行虚拟筛选(virtual screen), 不断地提高化合物的活性, 降低毒性, 将先导化合物开发成药物候选物。同时, 还可以用化学生物学的方法以小分子为探针发现新的药物靶标, 将已经应用的药物用于新疾病新靶标的治疗。因此, 以复合物的晶体结构为基础的药物设计, 大大缩短了药物研发的周期, 减少了药物研发投入, 在药物研究中起到越来越重要的作用。

3 同步辐射简介

同步辐射是连续波段的电磁波, 涵盖了红外线、可见光、紫外线和 X 射线等, 广泛应用于生命科学、材料科学、大气化学、微电子机械、能源等诸多领域。1947 年在美国通用电气的同步加速器上首次意外发现。它是速度接近光速的带电粒子在作曲线运动时沿轨道切线方向发出的电离辐射。与常规的转靶 X 射线源相比, 同步辐射源产生的 X 射线具有高通量、高准直性以及波长连续可调等优点, 在结构生物学的的数据收集和相位解析中有着广泛的应用, 采用同步辐射 X 光可以最大限度地提高蛋白晶体衍射和数据收集的效率。如 1999 年被

Science列为十大科技进展之一的核糖体结构数据就是在美国的同步辐射装置(ALS)收集的。

第一代同步辐射光源是20世纪70年代世界各国为高能物理研究建造的储存环和加速器上“寄生”运行的, 北京同步辐射实验室(BSRF)就属于第一代同步光源。第二代同步辐射光源是80年代出现的专门为同步辐射应用建造的加速器, 合肥国家同步辐射实验室(NSRL)就属于第二代专用光源。第三代同步辐射光源在90年代开始大量出现的, 以小发射度及采用大量的插入件为特征, 上海光源(SSRF)就属于第三代同步光源。目前全世界约有70座实验用的同步辐射装置, 主要分布在欧洲、美国和日本。上海光源(SSRF)能量位居第四(3.5 GeV), 排名前三的是日本的SPring-8、美国的APS和欧洲的ESRF。

同步辐射应用于生物大分子结构研究时具有很多优势^[7,8]: (1)高强度(high intensity)。光亮度是普通 X 射线的上亿倍以上, 光强度是 X 射线管的上百倍以上, 功率是 X 线管的上万倍以上。这种高强度可以大幅度提高晶体分辨率和数据质量, 对于非常小的蛋白质晶体或具有极端大单位晶胞的大分子晶体特别有利。(2)低发散性(low divergence of the beam)。光束的低发散性将产生更锐利的衍射斑点, 能够将具有极端大单位晶胞的大分子晶体产生的衍射点有效分开。衍射点越锐利, 对于大晶胞蛋白晶体的衍射点越容易分开, 对于数据的质量影响很大。(3)波长的可调谐性(tunability)。同步辐射可以提供连续可调波长的 X 射线, 因此可以使用单色器任意挑选出所需要波长的 X 射线。通常用于多波长反常散射法(MAD)和 Laue 衍射法。多波长反常散射法是利用生物大分子中原本含有的或者人为引入的金属离子或重原子对不同波长 X 射线具有特征的反常散射效应, 将同步辐射光源的波长调整到对应原子反常散射明显的位置, 获得反常散射数据, 从而进行晶体结构解析。Laue 法是利用入射光中的连续谱迎合衍射条件产生衍射。另外, 由于某些 X 射线探测器对短波长 X 射线更敏感, 同时使用短波长的 X 射线可以减少样品的吸收效应和辐射衰减效应(例如, 使用波长 1Å 左右的 X 射线比 1.5Å 的波长更有优越性)。因此, 利用同步辐射产生的短波长进行数据收集也是非常好的一个选择。(4)时间分辨(time-resolved)。由于同步辐射功率大波长连续, 因此可以利用 Laue 法在极短的时间间隔内收集多套相对完整的衍射数据, 将以天为单位的数据收集时

间缩短为以分钟或者小时为单位, 因此可以高通量的收集数据。

而且同步辐射还是一种洁净的光源, 它是在 10 - 11 托的超高真空环境中产生的, 没有灯丝、隔离物质等带来的污染。

4 同步辐射用于复合物晶体结构测定的优势

从细菌基因组中选择靶标开始算起, 一直到获得高分辨率的蛋白结构, 只有不到 5% 的成功率。而如果换成真核蛋白的话, 成功率更低, 同样蛋白靶标与小分子的复合物晶体结构也不容易获得^[9]。

获得复合物晶体的常用方法主要有两种: 浸泡法(Soaking), 将已经获得的蛋白质晶体浸泡在含有小分子配体的晶体生长液中, 因为晶体中的蛋白仍然保持活性的状态, 所以小分子配体可以逐渐扩散并结合到配体结合位点, 从而获得复合物的晶体, 但这种方法仅限于配体结合后蛋白基本不发生构象变化的晶体。而对于配体会诱导蛋白构象发生较大变化的晶体, 必须通过共晶法(co-crystallization)来获得, 顾名思义就是将蛋白质与配体混合孵育后再进行晶体的生长, 得到的就是含有配体的复合物晶体。

复合物晶体往往比单纯的蛋白晶体更难以得到, 因为配体的结合会引起蛋白构象发生或大或小的改变, 而且由于配体不同的作用机理, 会使生长晶体的最适条件也发生改变。即使通过浸泡法或共晶法获得了复合物晶体, 这些晶体也往往会出现裂痕或者晶体的个体比较小, 对于数据质量带来不利影响。实验室 X 射线光源方便性的优势已经被相对弱的入射 X 射线束所减弱。以铜作为阳极的 X 射线束分辨率只有固定的 1.5418Å, 对于那些衍射能力较差的晶体, 就只能获得大约 3.0Å 的数据。同步辐射相对于普通的实验室内的 X 射线光源, 具有的高强度和低挥发性, 使其能够从更小的晶体获得更高分辨率的数据, 从而弥补因为配体的结合而对复合物晶体产生的不利影响, 因此采用同步辐射 X 光可以最大限度提高蛋白晶体衍射和数据收集的效率。

更重要的是, 当代药物设计已经进入了高通量的时代, 越来越多的蛋白靶标被确认, 越来越多的先导化合物被发现, 靶标蛋白与这些小分子的复合物晶体也源源不断地获得, 实验室内的 X 射线仪需要大约 1 天的时间才能获得一套完整的数据, 而同步辐射可以将时间缩短为几个小时。另外同步辐射配备的自动上样装置, 可以容纳多达 100 颗晶体, 并含有液氮以保证晶体收集过程所需的低温。这些

晶体可以自动地被上样和回收, 而无需人工操作。同步辐射的种种优势都使得晶体结构数据的高通量测定成为可能, 极大地加快了药物研究的进程^[10-13]。

5 展望

同步辐射已凭借其得天独厚的优势(高强度、低发散性、波长可调谐性等)成为研究生物大分子结构的最主要工具之一。在生物大分子-小分子, 特别是药物靶标与小分子先导化合物的复合物结构测定中, 同步辐射更能凭借其数据收集时间短的优势, 对靶标-小分子的结构进行高通量测定, 大大提高了基于结构的药物设计与改造的效率。

利用同步光源所产生的微聚焦、高强度的光束线, 可从一些微米大小的晶体中收集得到高质量的数据, 而这在以前是难以想象的。由此, 我们可以对更多功能重要但结构高度复杂的生物大分子, 如膜蛋白及大分子复合物等进行结构测定。从这一点出发, 我们也可以尝试获得这些复杂分子与天然配体、已上市药物(如核糖体与抗生素、GPCR 与各种药物等)、设计开发的前导化合物的复合物结构, 从而更深入地了解这些复杂分子的功能, 利用其与靶标相互作用的结构细节, 开发设计出更高效、特异性更好、毒性更低的药物, 开发针对重要靶标的全新药物^[14]。

在上海张江高科园建造的第三代同步辐射在国际上处于领先水平, 它的投入使用将对我国在生物大分子晶体结构领域的研究具有不可限量的推动作用, 同时它也将带动药物设计开发等相关医药领域的高速发展, 对于提升我国的科研水平与国际竞争力有着划时代的重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] Gershell LJ, Atkins JH. A brief history of novel drug discovery technologies. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(4):321-7
- [2] Cooper MA. Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(7):515-28
- [3] Araujo RP, Liotta LA, Petricoin EF. Proteins, drug targets and the mechanisms they control: the simple truth about complex networks. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(11):871-80
- [4] Scapin G. Structural biology and drug discovery. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(17):2087-97
- [5] Danley DE. Crystallization to obtain protein-ligand complexes for structure-aided drug design. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2006, 62(Pt 6):569-75
- [6] Davis AM, Teague SJ, Kleywegt GJ. Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, 42

- (24):2718-36
- [7] Girard E, Legrand P, Roudenko O, et al. Instrumentation for synchrotron-radiation macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr DBiol Crystallogr*, 2006, 62(Pt 1):12-8
- [8] Gad SC. *Drug discovery handbook* [M]. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005
- [9] Schmid MB. Seeing is believing: the impact of structural genomics on antimicrobial drug discovery. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(9):739-46
- [10] Manjasetty BA, Shi W, Zhan C, et al. A high-throughput approach to protein structure analysis. *Genet Eng (N Y)*, 2007, 28:105-28
- [11] Beteva A, Cipriani F, Cusack S, et al. High-throughput sample handling and data collection at synchrotrons: embedding the ESRF into the high-throughput gene-to-structure pipeline. *Acta Crystallogr DBiol Crystallogr*, 2006, 62(Pt 10):1162-9
- [12] Cipriani F, Felisaz F, Launer L, et al. Automation of sample mounting for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr DBiol Crystallogr*, 2006, 62(Pt 10):1251-9
- [13] Blundell TL, Jhoti H, Abell C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(1):45-54
- [14] Cowieson NP, Kobe B, Martin JL. United we stand: combining structural methods. *Curr Opin Struct Biol*, 2008, 18(5):617-22