

进化化学——利用达尔文进化论发明与改良功能生物大分子,及其在药物研制中的应用

杨日芳, 恽榴红

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

[摘要] 进化化学作为化学和生物学的交叉学科,系在实验室中应用达尔文进化论,通过定向分子进化来发明与改良功能生物大分子;可用于获得接头、催化性多聚核酸、催化抗体等功能性生物大分子。该文综述了这一领域的主要进展及其在药物研究与开发(如先导化合物的发现和新型诊断与治疗方法的设计)中的应用。

[关键词] 进化化学;离体选择与进化;药物研究与开发;接头;催化性多聚核酸;催化抗体

[中图分类号] Q71;R914.2 [文献标识码] A

[文章编号] 1000-5501(2000)02-0135-05

Evolutionary chemistry——inventing and improving functional biomacromolecules by harnessing Darwinian evolution; and its application in drug research and development

YANG Ri-fang, YUN Liu-hong

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] Evolutionary chemistry was proposed as a new field at the crossroads of chemistry and biology in which functional bio-macromolecules such as aptamers, catalytic polynucleotides, and catalytic antibodies were invented and improved via directed molecular evolution by harnessing Darwinian evolution in laboratory. Progress in the field is briefly reviewed and possible application of evolutionary chemistry in drug research and development such as discovery of lead compounds and design of new diagnosis and therapeutic method is also reviewed.

[Key words] evolutionary chemistry; *in vitro* selection and evolution; drug research and development; aptamers; catalytic polynucleotides; catalytic antibodies

所有自然界存在的酶均是基于自然选择的达尔文进化的产物^[1]。受自然界中达尔文进化成就的启发,科学家们开始掌握和应用这一进化理论,在实验室中完成达尔文进化,这不仅包括生物机体与细胞水平,还包括在单个的生物大分子水平上。

达尔文进化主要包括重复进行的三个过程:选择、扩增和变异^[2]。

选择,不管是自然的或人工的,均是一个从“不富有者(the have-nots)”群体中分离“富有者(the haves or the fecund)”的扬弃过程。在实验室中,富有者则是那些能满足实验人员所附标准要求的分子^[3]。

扩增,就是产生子代;更确切地说,就是备份遗传基因。在实验室中,实验人员将选择与扩增关联,仅使那些能满足所附标准要求者产生子代。确切地说,不是所选分子本身,而是它们的基因被扩增^[4]。

变异,就是引入变种。定向分子进化的功效在于巨大数量的力量和分子多样性^[1,4]。

贯穿于达尔文进化全过程的是适应,即适者生存。自然选择只不过是保持基因原有功能的机制,而进化的发生主要是重复基因获得了的新功能的结果。

生物学中两大不同的分支——群体遗传学和生物技术有了富有成果的结合,其共同的兴趣在于应用优化药物、抗体和酶连续的变异、选择和遗传所导致的适应性增加^[1]。只有当基因型和表型相关联时,进化才有可能发生,这就是所谓的“强制进化”^[2]、定向分子进化^[3]、离体遗传学^[4]、离体选择^[5]或离体进化^[6]。

[收稿日期] 1999-06-14

[作者简介] 杨日芳(1968-),男,湖南绥宁人,助理研究员,硕士。

定向分子进化就是在分子水平上应用达尔文进化,通过多轮的选择、扩增和变异,可以促使群体生物大分子向任意功能目标进化,从而获得或改良功能大分子。定向分子进化可以满足生产全新的工业试剂与新药^[3]。

离体进化实验研究进化群体对控制的选择压力所作的基因型和表型应答。研究揭示,与自然进化一样,人工进化群体表现出适应性反应:在进化过程中随着变异体发生变异而波动。尽管进化群体中多样性增加,在(核)酶周边区域,表型中度改变而基因型改变占支配地位;在核心区域则极少有突变,此处多样性极低^[7~10]。结果表明,进化群体在局部适应性优化中被限止。为获得更高的适应性,须经过考察更广泛的变异体,或从更早期的群体中重新开始进化过程,或者通过不断积累周边区域的中性突变,使群体跨过一些较不利的中间体,达到更好的适应性改善^[1,7]。通过改变或加强选择的限制条件,可以达到获得或拓宽生物大分子的功能(如催化活性),甚至增加其专一性。

在生物大分子进化领域中主要有核酸(DNA和RNA)分子进化和蛋白质分子进化。可以用于研制“智能配体或接头(aptamer)”^[6]、核酸药物^[5]、核酸酶^[6]、脱氧核酸酶^[11]、受体和抗体酶^[8,9]。

1 核酸分子进化

核酸分子进化基础是DNA的PCR与3SR技术和RNA的变温扩增技术RT-PCR^[3,4,11],新的序列变异体则通过应用PCR的突变形式产生^[11]。以随机或半随机化学合成寡核苷酸来建立序列变异体库,再应用自然选择或非自然选择来分离含所需性质的分子;这种分离系基于其特殊的配体结合性质、催化性质或其他可使分子富集的性质。无限期的、连续多轮的选择和扩增使得离体定向进化成为可能^[4],成功的关键在于起始库的选择和选择压力或限制条件的合理设计,起始库中含有 $10^{11} \sim 10^{15}$ 个不同序列^[3,7],典型的重复轮数为3~15轮。

离体选择或离体进化常被认为是1990年发明的^[5,12],但核酸的定向进化可追溯到60年代Spiegelman等对噬菌体Q复制酶的重复离体复制实验^[13],离体进化实验包括许多不同的目的和不同的选择策略。在定向进化实验中,不管哪类大分子作离体选择,第一步就要组建一个差异分子群体(库),这包括三种策略^[3]:总括策略:即设计包括定义限制的所有可能变异体的全序列大分子;猎枪(shotgun)策略:即设计随机差异的序列大分子,用于猎取具有新型性质的分子;聚焦策略:即以具

有某一特性的分子为母序列,引入随机突变,精炼或改良特定的分子性质。

指数富集式配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)已被广泛用于分离能与靶蛋白或小分子高亲和力结合的RNA和DNA分子,这些分子被称为“智能配体或接头”^[6]。能与蛋白靶分子作用的接头可用硝酸纤维素滤膜捕获或以初始聚丙烯酰胺凝胶分离,而能与小分子结合的接头则可用亲和层析分离^[5]。该技术可用于研制核酸药物^[5];还可用于研制新的核酶。一方面,可以利用其结合基态底物的性质,加上突变、扩增重筛其催化性质;另一方面,应用类似于生产催化抗体或抗体酶的工艺,直接筛选能与过渡态类似物结合的“催化性智能配体或接头(catalytic aptamer)”^[6]。

离体选择和离体进化已超越其研究基础情节,已拥有了发现有治疗应用前景的先导化合物和设计新型诊断方法的成果^[5]。

1.1 接头

1.1.1 核酸药物

最近研制了三种能增加接头与靶分子亲和性的方法^[5]:悬挂能引导与靶分子特定部位结合的小分子(如弱的抑制剂);交联酶的自杀性底物,使与靶分子共价结合;杂合光敏核苷酸。

为使接头更适应作药物,需增加核酸的分子稳定性并减小分子,采用的方法有^[5]:以DNA分子库代替RNA分子库;引入化学修饰(包括前取代和后取代策略);进行构象限制性最小化:分割重要的功能残基和支架残基,以化学连接链取代支架残基[如取代环(loop)区和引入刚性连接链];特别是二硫键策略:系在核苷酸中引入化学活性基团——巯基,利用二硫键将接头部位特异地交联,不致引起接头大的构象变化。

接头在体活性包括^[5]:阻断基因表达,如可阻断许多胞外细胞素的功能;抑制酶的代谢作用;调节复杂的代谢过程。其给药系统同反义药物。

1.1.2 对传统药物研制的影响

1.1.2.1 鉴定药物作用靶标^[5] 离体选择能准确定义核酸靶分子的序列和结构;定义DNA靶分子;也能帮助定义核酸以外的靶分子,因为接头不仅能作渊源或功能相关的蛋白靶分子的特异性探针,也能作相同靶分子的不同状态或构象的探针。

1.1.2.2 药物设计 事实上,即使接头自身不适于作药物,也可以用作药物模型。具体体现在:

“反向药物发现”法^[5]。一方面,通过绘制氨基糖苷类药物结构与核酸序列的相关图谱,可以提

供老药可能的新作用靶;另一方面,通过与基因库中全序列的相同序列比较,可以发现许多潜在的作用靶。氨基糖苷以外的小分子化合物也能作反向药物发现法的候选对象,这不仅可用于发现抗核酸药物;而且,通过确定接头-配体络合物的结构,可提示蛋白质-药物络合物中的作用特性,如堆集作用和氢键网络。

接头与小分子结合的选择性和结构特性使人相信,离体选择将有助于形成药物发展规划的新基础;描绘化合物结构与核酸序列关系的数据库的无穷作用最终必将在从头设计特异性抗核酸药物的研究中得到证实。筛选化学组合库与反向药物发现法结合,将在细胞或病毒基因组的研究中产生幸运的“成功(hits)”:产生分子识别“码(codes)”——这一合理药物设计的基础^[5]。

核酸模拟物^[5]。正如肽模拟物可在选择噬菌体肽库或蛋白结构所发现的活性肽的结构基础上设计合成一样,核酸模拟物也可在接头的序列和结构基础上设计合成。

对化学组合库设计的影响^[5]。从某种意义上讲,核酸分子库实际上是可复制的化学库。

其可复制性和易得性使得分子可通过多轮的选择、扩增和变异,来促使活性化合物之间的竞争,而得到进化,精制得到少数几个对某一靶标分子具有最大亲和力或效力或所需的分子性质的个体分子。借鉴这一特性,在普通的化学组合库中通过链接一个供筛选的标签、一个地址(locale)或一个编码的可复制或不可复制的标签^[14],普通有机分子库也能重新合成与重复筛选,这种化学库实际上也具备了可复制性。

对于化学库中覆盖率问题,离体选择实验揭示,功能性全覆盖甚至能从有限的分子库获得;对于先导化合物的发现,较小数量的柔性单体与较大数量的刚性单体一样有效。抗精氨酸接头、抗碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)接头和催化性接头等离体选择和进化实验证实了“短基元专制(tyranny of short motifs)”的真实性。假若不同序列产生的结构和功能多样性与不同的化学基团产生的结构和功能多样性等效,则化学库中结构多样性越大,就越有可能选择到高亲和性的候选药物,这正是许多化学库的设计基础^[5]。

1.2 催化性多聚核苷酸

通过离体选择和离体进化人工合成新型核酶正使核酶实际的催化潜力得以揭示。特别是组合化学方法在发现现代细胞代谢不再应用的核酶功能中起着中心作用,离体选择和离体进化已被广泛用于生

产甚至可催化非磷中心的反应的核酶,同样,这些方法已被用于分离生产迄今自然界尚未发现的DNA酶即脱氧核酸酶^[11]。

要筛选催化性多聚核苷酸,就须有一种能鉴定可加速所需化学转化的分子的方法。迄今为止,成功的选择方法可分为三类^[11]:自修饰区分:如磷酸酯的裂解或连接反应,活性分子的分子量增大,利用凝胶层析分离;此外,抗生物素蛋白和生物素之间的相互作用常被用于以亲和层析方法分离所需分子,即将底物挂上生物素标签,而以固化有抗生物素蛋白(常用链霉菌抗生物素蛋白)的凝胶作填充剂进行亲和层析;与过渡态类似物的结合:以类似于分离催化抗体的方法^[15],间接生产新的催化性多聚核苷酸;催化洗脱:即利用共价连接或对底物亲和性的方法,将核酸固定在固相载体上,然后通过调节洗脱剂到允许反应的条件,洗下活性分子。此外,一种在体选择的方法,系将生物体的生存命运与其催化多聚核苷酸的功能联系起来,该选择适用于分离有在体高活性的核酶。

核酶结合与定位(二价)金属离子作为结构单元,并催化化学转化;也能利用其他有机分子作为辅酶,但普遍地将核酶归类为金属酶。选择的单链DNA也采取特异的三级结构,具有真正金属酶的功能,其结构与反应机理也相似^[11]。但是,最近的研究结果表明,(二价)金属离子并非RNA酶和DNA酶必需的辅酶,但可以利用辅助因子来扩展适用范围,提高催化效力;另一个增加核酸催化效力的方法是在其核苷中引入功能基团如咪唑基和吡啶基等^[16]。

1.2.1 核酶^[6,11,16]

包括改良天然核酶和生产新的核酶。已成功生产出RNA裂解酶、RNA连接酶、RNA磷酸化酶(激酶样核酶)、单核苷酸聚合酶、单核苷酸合成酶^[17]、DNA裂解酶、联苯异构化酶、卟啉金属化酶、氨酰基转移酶、酰胺裂解酶、酰胺合成酶、肽合成酶、*N*-烷基化与*S*-烷基化酶和Diels-Alder环合酶。

1.2.2 脱氧核酸酶

一种简单而经常发生的DNA结构是一个由4个鸟苷组成的4倍体结构(鸟苷四倍体),这一生物学相关的DNA结构在许多DNA接头中显示为关键结构单元,如抗人血栓素接头和抗HIV gp120接头,有稳定DNA结构的作用^[11]。DNA接头结合小分子的性质可利用作底物或辅酶^[18],这一特性必能将利用于扩展多聚核苷酸酶适用的催化反应范围和增大其催化效力;Roth和Breaker^[18]首次成功地利用离体选择以组氨酸作为催化DNA的反应组分催

化 RNA 的裂解反应。已成功生产出 RNA 裂解酶、DNA 连接酶、DNA 氧化裂解酶和卟啉金属化酶^[11]。

由此可见,制造“设计”的 RNA 疗法和生化试剂是切实可行的。这些新的催化性多聚核酸及其制备方法,在核酸研究中开辟了全新的方向。

2 蛋白质分子进化

Brenner 和 Lerner^[19]发展的一种编码组合化学方法,将化学合成的多样性和遗传的功效联系在一起,提供了一种非常有效的、多用途的药物筛选方法。该方法系平行合成具有双“臂”的双用途的分子库,其中一臂是能结合某一靶标的功能大分子;另一臂则是可给功能臂编码的遗传大分子,典型的是 DNA。这一方法在理论上可适用于任何类型的分子库^[3,19]。

催化抗体,又称为抗体酶,在生物医学和有机合成中均具有良好的应用前景;其传统的制备方法就是利用过渡态稳定化作用设计的半抗原诱导产生胚系抗体在体进化,筛选得到对过渡态稳定类似物有高亲和力的抗体,这样的抗体对化学转化具有酶样的催化作用,其关键在于半抗原的设计与合成^[14]。目前已报道的产生催化抗体的方法有:自身免疫^[15]、反应免疫^[20]和过渡态稳定化^[15]。半抗原的设计策略包括:过渡态稳定类似物策略^[15]、诱导与转换策略^[15]和互补电荷策略^[21];作者^[22]最近提出了潜过渡态策略,并应用这一新策略成功诱导产生了具有较高梭曼水解酶活性的抗体酶。值得指出的是,反应免疫法已成功应用于诱导产生有广泛底物特异性的醛缩酶样抗体;事实上,已有这类商品化的催化剂上市^[23]。

把底物转化与离体选择优势直接结合,将能进化具有广泛的底物、反应和反应条件的酶。从含有变异体的巨大抗体库中直接选择有增强催化活性变异体的策略包括^[23]:应用基于机理的抑制剂从噬菌体表达库中共价捕获活性分子;以固相载体从噬菌体表达库中催化捕捉或释放抗体酶;基于补足营养缺陷型的在体选择。其中,Schultz 等^[23,24]提出了一种可在生物扩增体系中离体进化蛋白催化剂的通用方法。该方法系将交联有生物素的底物通过一个柔性连接臂共价地和位置特异地连接在一种可表达蛋白催化剂的丝状噬菌体的 p 包被蛋白上,利用催化洗脱和活性催化剂能在分子内将底物转化为产物的原理,以固化有链球菌抗生物素蛋白的填料的柱层析从含有变异体的蛋白(抗体)库中选择分离活性催化剂。该方法是以葡萄球菌核酸酶为

模型进行开发;此外,基于催化特异反应(如糖基转移、序列特异性蛋白水解或磷酸化、聚合反应等)的能力,而非基于与已知酶的序列或结构同源性,该方法还可以功能性克隆天然酶。

检验种系蛋白发育历史,从广义角度支持以外显子重组产生新型蛋白骨架,延续自然选择和点突变改善其功能的方案;在免疫应答中,重组和选择基因片段,继而体细胞超突变,能在缩短的时间内重演这些过程^[8]。Schultz 等^[23]的研究表明,在免疫应答中,许多胚系抗体能采取与抗原结合的多种构型,半抗原与胚系抗体的结合可对抗体结合部位的变化进行塑模和印迹;远离结合部位的体细胞突变能进一步精炼和稳定优化的活性部位的构型,导致抗体成熟为与抗原最大亲和力和互补性的成熟抗体。单个胚系抗体利用上述构型多样性的能力依赖于抗原对胚系抗体起始的适应和驱动抗原-抗体结合的作用力性质。免疫系统赖以解决分子识别的策略有许多种,除了产生多样性抗体库和体细胞突变外,还有构象多样性和多底物特异性。上述相同的要素可能在酶进化早期起着重要的作用。可以设想,由于每个蛋白分子都能采取许多不同的活性部位或结合部位的拓扑结构,以响应配体结合和遍及整个蛋白结构的突变,使得相对有限数量的蛋白分子库也有足够的方式进化,并具有多种底物特异性和催化作用。明确遍及整个可变区的突变在影响亲和性和特异性中的重要性是利用任何组合化学方法优化生物分子功能研究都必不可少的^[23]。

催化抗体研究无论在半抗原的设计策略、抗体酶的产生方法,还是在适用反应范围和应用等方面都取得了新进展。最近已成功地诱导产生了可催化磷酸二酯键水解^[25]和糖苷键水解^[26]的催化抗体,其中后者采用了脾细胞离体半抗原直接免疫法;借用抗体导向酶前药治疗(ADEPT)的原理^[27],Blackburn 等提出了抗体导向抗体酶前药治疗(ADAPT)方法,利用抗体酶的抗体(导向)和酶(催化)的双重功能及易于人源化的特性,克服 ADEPT 中免疫交联物的免疫原性,发展新的导向治疗方法^[28]。此外,在有机合成与药物合成中,催化抗体已成功地应用于有紫杉醇样(taxol-like)作用的天然产物 epothilones 的全合成,用于构建其中三个手性中心。

另一方面,在体噬菌体表达肽库的选择则为确定靶器官或组织特异的肽分子提供了一种好方法,为靶向化学治疗提供了一种新策略。在体噬菌体表达肽库的方法,系将噬菌体库静脉注射到动物机体内,然后从靶器官回收噬菌体,选择分离其表达的肽分子。这一方法已被成功地用于鼠模型中肿瘤血管

靶向给药的癌症治疗,从在体噬菌体表达肽选择分离出肿瘤血管特异的肽分子,然后以其中的两个肽分子为靶向分子,分别与多柔比星交联,其交联物均能与药物导向至靶部位,显著地提高了药物的疗效,并减小了药物的毒性。

总之,进化化学即在实验室中进行达尔文进化,使科学家能发明和改良生物大分子,制造受体与抗体,发现新的靶分子、功能分子和药物及发展新的治疗方法和治疗途径,进化化学将在生物医学和药物研制中发挥越来越大的作用。

[参考文献]

- [1] Joyce GF. Evolutionary chemistry: getting there from here[J]. *Science*, 1997, 276(5319): 1658.
- [2] Brookfield JFY. Making selection work[J]. *Nature*, 1995, 375(6653): 449.
- [3] Joyce GF. Directed molecular evolution: biochemists have harnessed Darwinian evolution on a molecular scale[J]. *Sci Am*, 1992, 267(6): 48.
- [4] Szostak JW. *In vitro* genetics[J]. *Trends Biochem Sci*, 1992, 17(3): 89.
- [5] Osborne SE, Ellington A. Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry[J]. *Chem Rev*, 1997, 97(2): 349.
- [6] Breaker RR, Joyce GF. Inventing and improving ribozyme function: rational design *versus* iterative selection methods[J]. *Trends Biotechnol*, 1994, 12(7): 268.
- [7] Tsang J, Joyce GF. Specialization of the DNA-cleaving activity of a group I ribozyme through *in vitro* evolution[J]. *J Mol Biol*, 1996, 262(1): 31.
- [8] Patten PA, Gray NS, Yang PL, *et al.* The immunological evolution of catalysis[J]. *Science*, 1996, 271(5252): 1086.
- [9] Wedemayer G, Patten PA, Wang LH, *et al.* Structural insights into the evolution of combining site[J]. *Science*, 1997, 276(5319): 1665.
- [10] Romesberg FE, Spiller B, Schultz PG, *et al.* Immunological origins of binding and catalysis in a Diels-Alderase antibody[J]. *Science*, 1998, 279(5358): 1929.
- [11] Breaker RR. *In vitro* selection of catalytic polynucleotides[J]. *Chem Rev*, 1997, 97(2): 371.
- [12] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346(6286): 818.
- [13] Mills DR, Peterson RL, Spiegelman S. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967; 58(1): 217.
- [14] Ohlmeyer MH, Swanson RN, Dillard LW, *et al.* Complex synthetic chemical library indexed with molecular tags[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(23): 10922.
- [15] 杨日芳, 恽榴红, 丁振国. 催化抗体研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 1996, 6(2): 139.
- [16] Joyce GF. Nucleic acid enzymes: playing with a fuller deck[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 5845.
- [17] Unrau PJ, Bartel DP. RNA-catalyzed nucleotide synthesis[J]. *Nature*, 1998, 395(6699): 260.
- [18] Roth A, Breaker RR. An amino acid as cofactor for a catalytic polynucleotide[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 6027.
- [19] Brenner S, Lerner RA. Encoded combinatorial chemistry[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5381.
- [20] Barbas CF, Heine A, Zhong G, *et al.* Immune *versus* natural selection: antibody aldolases with enzymatic rates but broader scope[J]. *Science*, 1997, 278(5346): 2085.
- [21] Thorn SN, Daniels RG, Auditor MT, *et al.* Large rate accelerations in antibody catalysis by strategic use of haptenic charge. *Nature*, 1995, 373(6511): 228.
- [22] 杨日芳, 恽榴红, 王字玲, 等. 梭曼抗体酶研究: “潜过渡态”半抗原设计策略及其在梭曼抗体酶研究中的应用[J]. *军事医学科学院院刊*, 2000, 24(2): 105.
- [23] Schultz PG. Bringing biological solutions to chemical problems[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25): 14590.
- [24] Peterson H, Holder S, Sutherlin DP, *et al.* A method for directed evolution and functional cloning of enzymes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(18): 10523.
- [25] Wentworth P Jr, Liu Y, Wenworth AD, *et al.* A bait and switch hapten strategy generates catalytic antibodies for phosphodiester hydrolysis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 5971.
- [26] Yu J, Choi SY, Moon KD, *et al.* A glycosidase antibody elicited against a chair-like transition state analog by *in vitro* immunization[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(6): 2880.
- [27] Hay MP, Denny WA. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) [J]. *Drugs Fut*, 1996, 21(9): 917.
- [28] Wenworth P, Datta A, Blakey D, *et al.* Toward antibody-directed “abzyme” prodrug therapy, ADAPT: carbamate prodrug activation by a catalytic antibody and its *in vitro* application to human tumor cell killing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(2): 799.