



镜像配基筛选: 克服“酶屏障”的多肽、寡核苷酸药物研发技术

李翀^{①*}, 沈洁^②, 陆伟跃^②, 陆五元^③

① 西南大学药学院, 重庆 400715

② 复旦大学药学院, 上海 201203

③ School of Medicine, University of Maryland, Baltimore, MD 21201, USA

*通讯作者, E-mail: chongli2009@gmail.com

谨以本文祝贺西南大学药学院成立五周年

收稿日期: 2010-10-30; 接受日期: 2011-01-04

doi: 10.1360/032010-788

摘要 生物体内存在的“酶屏障”是功能性多肽和寡核苷酸成药的重要瓶颈. 以镜像噬菌体展示技术(mirror-image phage display)和镜像适配体筛选技术(Spiegelmer technology)为代表的镜像配基筛选技术能有效地克服这一屏障, 获得对靶点具有特异识别能力且在生理条件下高度稳定的D型多肽和L型寡核苷酸配基, 有望成为多肽或寡核苷酸类特异性药物研发的有利工具. 本文主要综述镜像配基筛选技术的原理及其在药学领域的研究进展.

关键词

镜像噬菌体展示技术

镜像适配体筛选技术

D型多肽

L型寡核苷酸

1 引言

高效低毒是药物研发的重要目标, 这一目标的实现首先取决于药物对靶点的特异性识别, 因此, 针对特定靶点开展配基筛选就成为了现代药物研究的一个重要策略. 在各种基于化学和生物学方法构建的配基筛选技术中, 以噬菌体展示技术^[1]和 SELEX 技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, 指数富集的配体系统进化技术)^[2, 3]为代表的多肽和寡核苷酸配基筛选技术具有其独特的优势, 得到了较为广泛的应用.

噬菌体展示技术是将外源基因插入到噬菌体内编码其外壳蛋白的结构基因中, 使外源基因编码的多肽能够随外壳蛋白的表达而展示到噬菌体表面的生物技术. 当在噬菌体结构基因的适宜位置插入编码海量多肽的随机寡核苷酸库时, 噬菌体就成为表面载有随机肽库的筛选工具. 经多轮筛选(每一轮筛

选包括: 与靶点孵育、洗去未与靶点结合的噬菌体、提取与靶点结合的噬菌体并进行繁殖扩增用于下一轮筛选)后, 表面展示与靶点特异性结合的多肽的噬菌体被选择性富集, 测定噬菌体中所插入的寡核苷酸序列, 其编码的氨基酸序列即为与靶点特异性结合的多肽配基. 较之于噬菌体展示技术中寡核苷酸序列与相应多肽的转换, SELEX 技术则为直接构建随机寡核苷酸库进行配基筛选的技术, 经类似的多轮筛选(每一轮筛选包括: 与靶点孵育、洗去未与靶点结合的寡核苷酸、提取与靶点结合的寡核苷酸并进行 PCR 扩增用于下一轮筛选)后得到对靶点具有高亲和力和高特异性的寡核苷酸配基(核酸适配体, aptamer).

上述配基筛选技术通过生物学手段(噬菌体的增殖与 PCR)实现了配基信息的指数级放大, 使配基的筛选、检测与分析得到简化, 这是其他一些小分子化合物库筛选方法如 OBOC(one-bead-one-compound,

一珠一化合物)技术^[4]所不具备的;同时,筛选得到的多肽和寡核苷酸配基对靶点的识别能力强且分子量相对较小、免疫原性相对较弱、生产成本相对较低,因此显示出一定的优势.然而多肽和寡核苷酸在生理环境下易被酶降解而失去活性,成药性(druggability)较差,使得相应的配基筛选技术在药物研发领域的应用受到了限制.

酶识别并降解多肽或寡核苷酸的化学反应具有立体选择性,其反应程度和效率与反应物的立体结构高度相关.早在100多年前,人们对于分子的立体结构及其异构现象就有了深刻的认识.1874年,范特霍夫和勒贝尔分别提出碳四面体构型学说,建立了分子的立体概念并阐明了旋光异构现象.常见的20种基本氨基酸,除甘氨酸以外,都有两种互成镜像的对映体—L型和D型.其中L构型的氨基酸由生物体内对应的“密码子”编码并经表达产生,故被称为天然氨基酸.作为生物体的重要组成成分,自然界存在的多肽蛋白几乎都是由天然氨基酸构成的L型多肽蛋白,噬菌体表面展示的多肽即为L型多肽.核苷酸也具有L型和D型两种对映异构体,其中D型为天然构型,经SELEX技术筛选得到的适配体(aptamer)是由天然核苷酸组成的D型寡核苷酸.

人体内相应的降解酶能有效识别天然构型的多肽或寡核苷酸并导致其活性丧失,而由于立体选择性因素,D型多肽和L型寡核苷酸无法被体内的降解酶识别,因此这些镜像分子在生理环境下高度稳定.采用镜像技术筛选针对特定靶点的多肽或寡核苷酸配基,能获得特异性好同时稳定性强的镜像配基,在药学领域具有良好的应用前景.

2 镜像配基筛选的原理和关键技术

尽管D型多肽和L型寡核苷酸显示出较大的应用潜力,但这类镜像配基却无法直接通过上述常规的筛选技术得到:由于噬菌体表面不能表达非天然的D型多肽序列,无法经噬菌体展示技术直接筛选出D型多肽配基;SELEX技术筛选过程中需要核酸酶的参与(PCR扩增寡核苷酸),非天然的L型寡核苷酸不能被核酸酶识别,也无法经SELEX技术直接得到L型寡核苷酸配基.因此,需要通过间接转换的方法来实现镜像配基的有效筛选.

2.1 镜像配基筛选技术的原理

许多蛋白质在人体疾病发生、发展过程中扮演了重要的角色,因而成为特异性药物筛选的优良靶点,即靶蛋白.靶蛋白和其相应配基(多肽或寡核苷酸)均具有立体异构现象,并分别具有互为镜像关系的对映异构体.基于这类镜像对称关系,当配基与靶蛋白特异性结合时,配基对应的镜像分子势必也能够有效识别靶蛋白的镜像分子,且前后两种组合的结合能力相当,这就为获取镜像配基提供了思路:针对天然靶蛋白筛选镜像配基和针对天然靶蛋白的镜像分子(D型靶蛋白)筛选天然构型的配基(L型多肽或D型寡核苷酸)这两种方式也具有镜像对称关系,当前一方式难以直接实现时,可考虑采用后一方式首先获得结合靶蛋白镜像分子(D型靶蛋白)的天然配基(L型多肽或D型寡核苷酸),所得配基的镜像分子(D型多肽或L型寡核苷酸)即为天然靶蛋白的镜像配基.

上述原理是由美国麻省理工学院 Kim 小组于1996年首次提出的,该小组以此建立了镜像噬菌体展示技术(图1),其步骤为:首先通过化学全合成得到天然靶蛋白(L型)的镜像分子—D型靶蛋白,然后利用噬菌体展示技术筛选得到能特异性结合D型靶蛋白的配基(L型多肽),最后合成所得配基的镜像分子—D型多肽^[5].由于L型多肽配基能特异性结合D型靶蛋白,根据镜像对称关系,D型多肽配基也能特异性结合L型靶蛋白,因此该D型多肽即为天然靶蛋白的镜像配基.类似地,采用SELEX技术替换上述步骤中的噬菌体展示技术,可得到针对特定靶蛋白的镜像寡核苷酸配基,即为镜像适配体筛选技术^[6].

在常规多肽和寡核苷酸配基筛选方法的基础上,

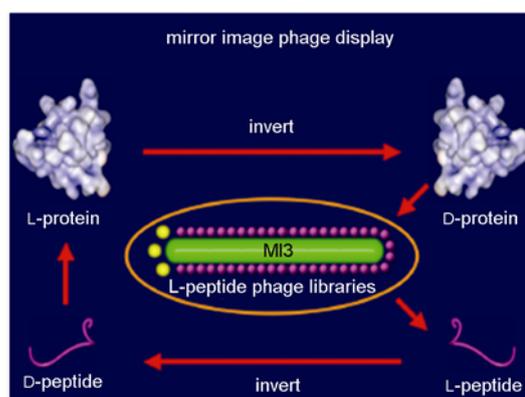


图1 镜像噬菌体展示技术

通过对靶蛋白和配基的依次构型转换(天然 L 型靶蛋白转换成其 D 型对映体、所得配基转换成其镜像对映体)能够实现镜像配基的有效筛选, 所得配基特异性好、稳定性强, 具有成药的潜力。

2.2 镜像配基筛选技术的关键

在镜像配基筛选过程中, 制备靶蛋白的对映体 D 型靶蛋白是整个筛选技术得以有效进行的关键, 这就不能不提到用于蛋白化学全合成的片段拼接技术(native chemical ligation, NCL). 1953 年 Wieland 等发现缬氨酸的硫酯与半胱氨酸在水溶液中能够快速反应生成二肽(缬氨酸-半胱氨酸), 并提出了可能的反应机理—转硫酯/分子内重排形成酰胺键^[7]. 以此为基础, 美国 Scripps 研究所的 Kent 小组^[8]建立了片段拼接技术. 他们的做法是: 分别合成一个 C 端为硫酯的多肽片段和一个 N 端为半胱氨酸残基的多肽片段, 在硫基催化剂作用下两片段在水溶液中能形成以半胱氨酸为连接位点的产物(图 2).

片段拼接技术对于蛋白质的化学全合成具有重要意义. 受限于每一步偶联反应的效率, 直接经固相合成得到的多肽链段难以超过 50 至 60 个氨基酸的长度^[9], 而采用片段拼接的思路, 可以将需要合成的蛋白分割为所含氨基酸数目小于 60 的片段, 分别合成相应的多肽片段再进行连接, 从而有望实现分子量更大的蛋白全合成. 由于该反应是在温和的水环境下进行, 这对于容易变性的多肽蛋白来说, 能够较好地保证合成产物的活性. 然而, Kent 等早期提出的片段拼接方法要求与硫酯连接的多肽 N 端必须是半胱氨酸. 半胱氨酸在蛋白质中的含量丰度较低, 序列中出现几率较小, 这使得对目标蛋白进行片段分割时只能被动取决于半胱氨酸所在的位置, 几乎没有其他选择的余地, 极大地限制了该方法的广泛应用. 为改变这一状况, 包括 Kent 等在内的多个研究小组开展了大量的研究, 将蛋白化学全合成时的片段“分割点”由半胱氨酸扩展到包括丙氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、缬氨酸及硒氨酸等在内的多种氨基

酸^[10-16], 有效地扩大了该方法在蛋白合成领域的应用范围, 例如: 片段拼接技术使得多种重大疾病相关蛋白^[12, 17-20](如生存素、HIV-1 蛋白酶等)的合成研究工作得到了开展, 所得合成产物的活性与天然表达产物的活性相当. 在合成较大的蛋白质时, 有必要将多个片段(三个或三个以上)经多次拼接才能完成. Kent 等人完成了 HIV-1 蛋白酶二聚体(203 个氨基酸)的合成工作, 实现了由 200 个以上氨基酸组成的蛋白的化学全合成^[17]. 近期, 我们也利用这一技术合成了肿瘤相关靶蛋白—MDM2/MDMX 蛋白的 p53 结合域(图 3), 并以此为基础开展了抗肿瘤研究^[21-25].

D 型靶蛋白制备的可行性是开展镜像配基筛选的前提: 拟作为靶分子的蛋白是否可以通过现有的化学全合成技术制备得到(保证产物的纯度和一定的产率); 经合成和折叠后所得 D 型蛋白的结构是否正确(与天然靶蛋白的真实结构成镜像对称关系). 由于 D 型蛋白的合成成本比 L 型蛋白要高得多, 因此, 在进行镜像配基筛选前, 有必要首先开展所选靶蛋白本身的化学全合成, 若能成功合成该 L 型蛋白且其结构和活性经验证与天然蛋白一致, 则可以按照 L 型靶蛋白的制备方法同样获得 D 型靶蛋白, 并将其用于镜像配基筛选.

3 镜像配基筛选技术的应用

3.1 镜像噬菌体展示技术在药学研究中的应用

Kim 小组首次应用镜像噬菌体展示技术时, 选择的靶蛋白是酪氨酸激酶 c-Src 的 SH3 结构域(Src homology 3 domain)^[5]. c-Src 在破骨细胞介导的骨质再吸收过程中扮演了关键角色, 因此干扰 c-Src 的功能对于骨质疏松的治疗具有较大的价值. Kim 等首先合成 60 个氨基酸长度的 D 型蛋白(靶蛋白的对映体), 经噬菌体展示技术筛选出 D 型蛋白的多肽配基, 最后合成了该多肽配基的镜像分子(D 型多肽). 活性测定与结构研究的结果均显示该 D 型多肽能有效地识别

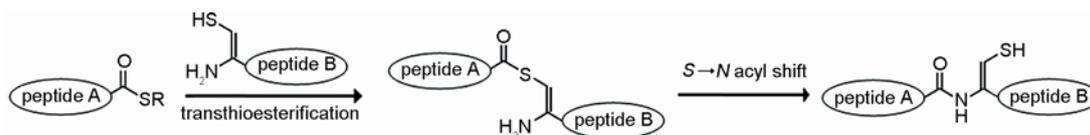


图 2 片段拼接技术示意图

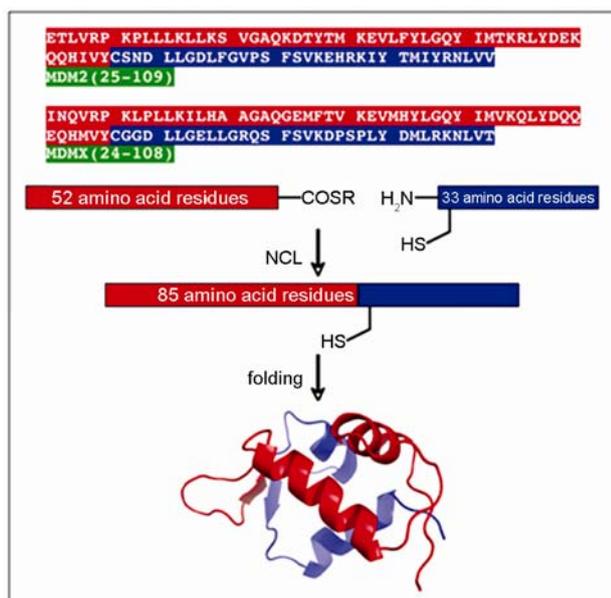


图3 基于片段拼接技术的靶蛋白(MDM2/MDMX 蛋白的 p53 结合域)全合成

酪氨酸激酶, 验证了镜像噬菌体展示技术的可行性。

在镜像噬菌体展示技术首次应用获得成功的基础上, Kim 小组^[26]开展了抗 HIV 病毒的研究。HIV 外膜蛋白 gp41 通过介导病毒外膜与宿主细胞膜融合来促进病毒的侵入, 如果能弱化 gp41 的这一功能, 就能抑制 HIV 病毒对宿主的感染。前期研究发现当 HIV 病毒入侵时, 其 gp41 蛋白 N 端高度保守序列的同源三聚体卷曲螺旋(coiled-coil)结构会暂时外露, 这就提供了一个潜在抗 HIV 病毒的靶点。然而, 这一段保守序列自身的疏水性强, 脱离整体蛋白后会发生大量聚集, 无法形成天然的同源三聚体结构。研究者采用了蛋白片段“嫁接”策略, 选择与 gp41 蛋白上相应结构高度相似的卷曲螺旋(GCN4-pI_QI)三聚体作为模板(图 4(a)), 将 gp41 蛋白 N 端保守序列嵌入其 N 端, 所形成的嵌合体—IQN17 三聚体(图 4(b))能够较好地模拟 gp41 蛋白上相应区域的真实结构。该嵌合体由三条序列完全一样的多肽(IQN17)自发组装形成, 每条多肽含 45 个氨基酸, 其中 17 个氨基酸来自于 gp41 蛋白 N 端高度保守序列。随后, 研究者以上述嵌合体为靶蛋白, 合成了全 D 型的 IQN17 多肽, 通过镜像噬菌体展示技术得到能特异性结合 gp41 蛋白 N 端保守区域的 D 型多肽配基 D10-p1。研究结果表明, D10-p1 多肽能有效抑制 HIV 病毒侵入宿主细胞。Kim 等人的上述工作是镜像配基筛选技术在重大疾病防治研究

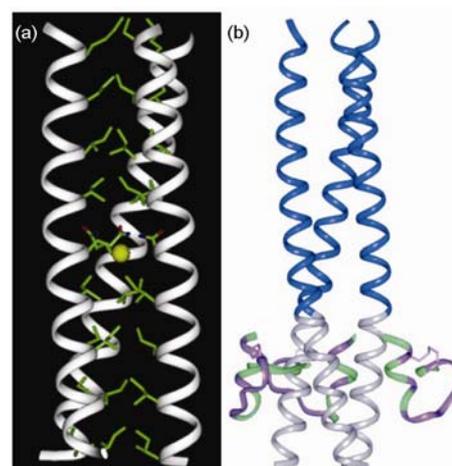


图4 镜像配基筛选中采用的蛋白片段“嫁接”与结构模拟策略: (a) GCN4-pI_QI 三聚体带状结构图^[26](经 Elsevier 授权使用). (b) IQN17 三聚体与 D10-p1 晶体结构带状图, 其中蓝色部分为 GCN4-pI_QI 原有序列, 灰色部分为“嫁接”序列, 紫色/绿色条带为 D 型多肽 D10-p1^[27](经 Elsevier 授权使用)

中的首次应用, 该项研究更为重要的意义在于将片段“嫁接”和结构模拟的策略引入到靶蛋白的构建中。较大的蛋白往往具有不同的功能区域, 由一些片段组成, 当选择某一片段作为靶蛋白时, 需要考虑片段脱离整体蛋白后如何保持其原有结构的问题。因此, 在整体蛋白难以实现全合成而独立片段难以保持天然构象时, 可考虑采用结构模拟的方法来构建适宜的靶蛋白用于镜像配基筛选。

美国犹他大学的 Kay 小组^[28]在 Kim 等人的研究基础上对靶蛋白和噬菌体肽库分别进行了优化, 经镜像噬菌体展示技术得到了对 HIV 病毒抑制能力更强的 D 型多肽 PIE7。由于 gp41 的卷曲螺旋结构是三聚体, Kay 等通过聚乙二醇(PEG)连接制备了 PIE7 的三聚体, 经测定该多肽三聚体与靶点的解离常数仅为 250 pM, 其超强的活性完全符合临床前研究的要求。近期, Kay 等^[29]在 PIE7 的研究基础上进一步得到更优的 D 型多肽 PIE12 三聚体, 已将其作为候选药物进行动物安全性评价, 并计划在未来两到三年内进行临床实验。

随着人类老龄化问题的日渐严重, 阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)的发病率呈逐渐上升的趋势。脑内形成 β -淀粉样斑块是 AD 的主要发病机理之一, 而 β -淀粉样多肽是这类斑块的主要成分, 因此如果能获得针对 β -淀粉样斑块或多肽的特异性配基,

对 AD 的早期诊断和治疗都具有重要的临床意义^[30]. Wiesehan 小组^[31]率先将镜像噬菌体展示技术应用于这一领域. 他们以淀粉样斑块的主要成分 $A\beta_{(1-42)}$ (全长 42 个氨基酸) 作为靶蛋白筛选得到一条全 D 型的 12 肽, 通过包括动物实验在内的系统研究证实, 该 D 型多肽对 β -淀粉样斑块有较强的结合作用, 并能有效干扰 β -淀粉样多肽相互聚集形成斑块的过程, 因此在阿尔茨海默病的诊断和治疗方面具有较大潜力.

我们近期将镜像噬菌体展示技术的应用范围扩展到抗肿瘤研究领域^[32, 33]. p53 基因是人类最重要的抑瘤基因之一, 由 p53 基因表达产生的 p53 蛋白是抑瘤功能的执行者, 所有肿瘤的发生、发展都伴随 p53 蛋白的失活或缺失, 而通过恢复 p53 的活性则能起到抗肿瘤的效果. 造成 p53 失活的原因有多种, 其中一个重要原因是部分肿瘤过度表达一些负性调节蛋白如 MDM2 蛋白等, 能与 p53 蛋白结合形成复合物从而使其失去活性. 这类肿瘤含有正常的 p53 基因及蛋白, 其比例约占人类肿瘤总体的 50%. 对于这类肿瘤, 如能抑制 MDM2 对 p53 的结合, 使 p53 蛋白处于游离状态, 就能恢复 p53 蛋白的抑瘤功能, 达到抗肿瘤的目的.

MDM2 蛋白由 491 个氨基酸组成, 我们以 MDM2 蛋白的 p53 结合域作为靶蛋白, 其含有 85 个氨基酸. 我们首先采用片段拼接技术合成了天然构型的 MDM2 蛋白的 p53 结合域, 记为 syn MDM2. 通过活性测定和结构对比, 证实 syn MDM2 与天然 MDM2 蛋白相应区域具有完全一致的活性和结构. 我们利用得到的 L 型 syn MDM2 直接开展噬菌体展示的研究, 得到了一条与 syn MDM2 解离常数仅为 3 nM 的 L 型多肽 PMI. 通过上述研究, 开展镜像配基筛选的可行性已得到充分保证. 由此, 我们合成了全 D 型的 syn MDM2, 利用镜像噬菌体展示技术筛选得到能有效抑制 p53 与 MDM2 结合的 D 型多肽 D-PMI α , 其与 L 型 syn MDM2 结合时表现出明显的左手 α 螺旋结构(图 5), 解离常数约为 50 nM. 通过肿瘤靶向脂质体的递送, D-PMI α 能显著抑制人神经胶质瘤 U87 细胞的生长并延长荷瘤模型动物的生存时间, 显示出良好的治疗活性.

到目前为止, 国际上已有多个研究小组将镜像噬菌体展示技术成功地应用于多种重大疾病的防治研究中, 并取得了较好的效果. 虽然尚未有任何 D 型多肽药物获得批准上市, 但镜像噬菌体展示技术的

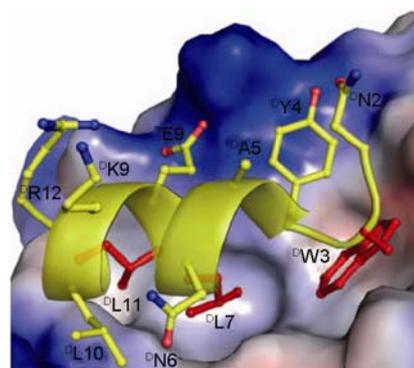


图 5 特异性结合 MDM2 蛋白的镜像多肽配基 D-PMI α ^[32] (版权为 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 所有, 经授权使用)

出现无疑推动了 D 型多肽药物的研发工作. 人们也逐渐意识到这一技术在疾病治疗和诊断领域的潜力, PIE12 三聚体受到的广泛关注就是一个很好的证明.

3.2 镜像适配体筛选技术在药学研究中的应用

Klussmann 小组最初应用镜像适配体筛选技术时所选择的靶点是具有立体异构的小分子—腺嘌呤核苷(图 6)^[6]而非疾病相关的大分子蛋白. 在其有效性得到验证后, 镜像适配体筛选技术的应用范围

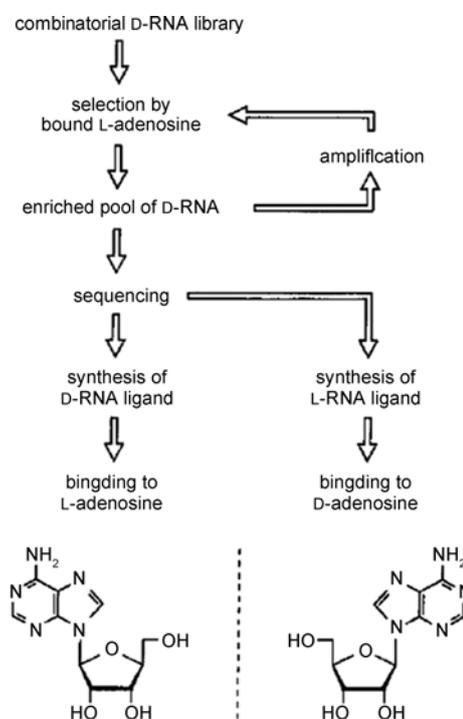


图 6 镜像适配体筛选技术^[6](Nature 出版集团授权使用)

迅速扩大。

促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 是一种调节哺乳动物生殖的重要多肽类激素, 能够调控促性腺激素、黄体生成素和促卵泡激素的生成, 因此 GnRH 及其受体可作为性类固醇激素依赖型疾病的治疗靶点, 如: 前列腺癌、乳腺癌以及子宫内膜异位症等。Klussmann 等^[34]以 GnRH 为靶点, 筛选得到一条 67 个碱基长度的镜像适配体—NOX1255, 经表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 法测定, 该镜像适配体与 GnRH 的解离常数仅为 20 nM, 具有高度的特异性。细胞水平实验结果显示, 一定浓度的 NOX1255 能有效抑制 GnRH 与细胞上 GnRH 受体结合, 其 IC₅₀ 约为 20 nM。研究者进一步开展了动物水平实验, 以去势小鼠作为模型动物, 以血清中黄体生成素的浓度作为评价指标。研究发现 NOX1255 经皮下注射后能有效降低黄体生成素的浓度, 但该效应持续时间较短。为减缓肾脏的清除速度, 延长其作用时间, 采用 PEG 对 NOX1255 进行修饰 (5' 位连接, PEG 分子量为 40000), 结果表明经 PEG 修饰后 NOX1255 的作用时间大大延长, 能持续近 48 个小时。

高迁移率族蛋白 A1 (high mobility group protein A1, HMGA1) 是一种染色质结构转录因子, 与肿瘤的发展密切相关。该蛋白在多种恶性肿瘤中高度表达, 但在绝大部分已分化或非增殖的正常细胞中几无表达, 因此 HMGA1 具有作为肿瘤治疗靶点的潜力。Klussmann 等^[35]以 HMGA1 为靶点, 筛选出能够与之特异性结合的镜像适配体 NOX-450, 其解离常数为 7 nM, 显示出很强的结合能力。由于 HMGA1 位于肿瘤细胞内, 为验证 NOX-450 的抗肿瘤活性需要将其递送到肿瘤细胞内。研究者借鉴了基因递送的方法, 先将镜像适配体进行 PEG 修饰, 然后将其与多聚乙炔亚胺 (PEI, polyethyleneimine) 按一定比例混合, 所得复合物能够将 NOX-450 有效递送到肿瘤细胞内。在荷瘤 (胰腺癌 PSN-1) 动物模型上, NOX-450 复合物经瘤旁注射后能显著抑制肿瘤生长, 显示出良好的抗肿瘤活性。

与镜像噬菌体展示技术类似, 镜像适配体筛选技术已被用于多种人类重大疾病的诊断和治疗研究中, 如严重的自身免疫性疾病^[36]等。与前者稍有不同的是, 镜像适配体筛选技术自诞生之初就与新药开发紧密结合, 该技术已获得超过 340 项国际专利, 并

催生出世界上第一家镜像适配体药物研发企业—德国的 NOXXON 公司, 该公司的领衔专家正是此项技术的发明者 Klussmann 博士。目前该公司已有多个镜像适配体候选药物进入到临床研究阶段, 有望从中产生出世界上首个 L 型寡核苷酸药物。

4 不足之处和展望

尽管体内具有许多与疾病相关的重要蛋白, 但就目前而言, 其中能作为靶蛋白进行镜像配基筛选的数量是十分有限的, 这也反映在仅有少量的镜像配基筛选的相关文献报道。造成这一现状的主要原因在于实现靶蛋白全合成的困难: 许多蛋白或其重要功能区域的长度均远在 100 个氨基酸之上, 而实现长度超过 100 个氨基酸的蛋白高效合成对研究人员仍然是一个挑战。迄今为止, 已报道的镜像配基筛选研究中, 所研究的靶蛋白长度均未超过 100 个氨基酸, 显示出蛋白全合成技术在镜像配基筛选中的滞后性。另外, 由于靶蛋白和镜像配基均为非天然产物, 其单体 (D 型氨基酸和 L 型寡核苷酸) 的制备方法比天然单体要复杂得多, 相应的合成成本比天然构型的产物高, 这也使得当前镜像配基筛选技术主要被应用于一些重大疾病的研究中。

常规噬菌体展示技术或 SELEX 技术除了可以针对已知靶蛋白开展配基筛选外 (分子水平), 还可以进行细胞水平甚至动物水平的配基筛选^[37, 38], 即在靶蛋白具体信息未知的情况下, 获得特异性识别某类细胞或某种组织器官的配基。而镜像配基筛选技术则是建立在对靶蛋白充分认知的基础之上, 因而无法将其应用于未知靶点的配基筛选或研究工作中。一些其他筛选技术, 如 OBOC 肽库, 可通过直接构建全 D 型肽库来实现多种水平的 D 型多肽配基筛选^[39], 能够在一定程度上弥补镜像配基筛选技术在这方面的不足。

Kim 和 Kay 等人^[26, 28-29]将靶蛋白结构模拟策略引入到镜像配基筛选技术中, 为该技术今后的发展提供了有益的思路: 除了依靠蛋白合成技术的不断进步 (如糖蛋白^[40]、脂蛋白^[41]等在内的复杂蛋白的合成) 推动镜像配基筛选技术的发展, 结构生物学和计算机辅助设计在该领域的重要性也将会日益突出。更多疾病相关蛋白尤其是膜蛋白的结构陆续得到阐明^[42], 将进一步扩展镜像配基筛选技术的应用范围;

而采用计算机辅助设计^[43]的策略能有效提高靶蛋白结构重建和模拟的水平, 避免不必要的合成工作, 有利于提高针对复杂蛋白开展镜像配基筛选的可行性, 同时也能提高该技术的筛选效率和所得配基的活性。

尽管有少量文献报道 D 型多肽^[44]和 L 型寡核苷酸^[34]的免疫原性很弱, 但迄今为止, 尚无较大规模的研究来系统地评价上述镜像分子的体内生物学行为, 这类评价工作的深入开展对今后镜像配基筛选技术的发展是不可或缺的。除严重威胁全人类健康的重大疾病之外, 罕见病(orphan disease)可能会是镜像配基筛选技术今后重点关注的目标^[45]。虽然这类疾病的发病几率很低, 但考虑到全世界人口的庞大基数, 患者的绝对数量仍十分可观。由于研发成本高, 利润较低和影响范围窄等诸多原因, 目前仅有极少量的

医药企业涉足于罕见疾病治疗药物的研发中, 导致治疗成本高昂。镜像配基筛选技术若能在该领域发挥作用, 势必会使上述状况得到较大改观。

5 结束语

小型化和高效化^[46]是当前生物类特异性药物(如抗体等)的发展趋势, 这一趋势使得镜像配基筛选技术的特点和优势得到充分体现。镜像配基筛选技术针对的靶点明确, 筛选周期相对较短, 筛选出的镜像分子高度稳定、特异性好、生产和储存成本相对较低, 具有良好的应用前景。随着多学科交叉和相关学科领域的发展, 这一化学生物学新技术有望在新药研发中扮演更为重要的角色。

致谢 本文得到国家重点基础研究发展计划(973 计划) (2007CB935800 和 2010CB934000)、西南大学博士基金(SWU110028)和西南大学基本科研业务费专项资金项目(XDJK2009C077)资助, 特此一并致谢。

参考文献

- 1 Smith GP. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228: 1315-1317
- 2 Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346: 818-822
- 3 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249: 505-510
- 4 Lam KS, Salmon SE, Hersh EM, Hruby VJ, Kazmierski WM, Knapp RJ. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature*, 1991, 354: 82-84
- 5 Schumacher TN, Mayr LM, Minor DL, Milhollen MA, Burgess MW, Kim PS. Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. *Science*, 1996, 271: 1854-1857
- 6 Klussmann S, Nolte A, Bald R, Erdmann VA, Furste JP. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 1112-1115
- 7 李娟, 郑基深, 沈非, 方葛敏, 郭庆祥, 刘磊. 蛋白质的化学全合成. *化学进展*, 2007, 19: 1866-1882
- 8 Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SB. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, 1994, 266: 776-779
- 9 Kent SB, Kochendoerfer GG. Chemical protein synthesis. *Current Opin Chem Biol*, 1999, 3: 665-671
- 10 Yan LZ, Dawson PE. Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 526-533
- 11 Crich D, Banerjee A. Native chemical ligation at phenylalanine. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 10064-10065
- 12 Low DW, Hill MG, Carrasco MR, Kent SB, Botti P. Total synthesis of cytochrome b562 by native chemical ligation using a removable auxiliary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 6554-6559
- 13 Haase C, Rohde H, Seitz O. Native chemical ligation at valine. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47: 6807-6810
- 14 Hondal RJ, Nilsson BL, Raines RT. Selenocysteine in native chemical ligation and expressed protein ligation. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 5140-5141
- 15 Yang R, Pasunooti KK, Li F, Liu XW, Liu CF. Dual native chemical ligation at lysine. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 13592-13593
- 16 Zhang LS, Tam JP. Orthogonal coupling of unprotected peptide segments through histidyl amino terminus. *Tetrahedron Lett*, 1997, 38: 3-6
- 17 Torbeev VY, Kent SB. Convergent chemical synthesis and crystal structure of a 203 amino acid 'covalent dimer' HIV-1 protease enzyme molecule. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 1667-1670
- 18 Li C, Wu Z, Liu M, Pazgier M, Lu W. Chemically synthesized human survivin does not inhibit caspase-3. *Protein Sci*, 2008, 17: 1624-1629

- 19 Li C, Li X, Lu W. Total chemical synthesis of human T-cell leukemia virus type 1 protease via native chemical ligation. *Biopolymers*, 2010, 94: 487–494
- 20 Johnson EC, Malito E, Shen Y, Pentelute B, Rich D, Florián J, Tang WJ, Kent SB. Insights from atomic-resolution X-ray structures of chemically synthesized HIV-1 protease in complex with inhibitors. *J Mol Biol*. 2007, 373: 573–586
- 21 Li C, Liu M, Monbo J, Zou G, Li C, Yuan W, Zella D, Lu WY, Lu W. Turning a scorpion toxin into an antitumor miniprotein. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 13546–13548
- 22 Li C, Pazgier M, Liu M, Lu WY, Lu W. Apamin as a template for structure-based rational design of potent peptide activators of p53. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 8712–8715
- 23 Pazgier M, Liu M, Zou G, Yuan W, Li C, Li C, Li J, Monbo J, Zella D, Tarasov SG, Lu W. Structural basis for high-affinity peptide inhibition of p53 interactions with MDM2 and MDMX. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 4665–4670
- 24 Li C, Pazgier M, Li C, Yuan W, Liu M, Wei G, Lu WY, Lu W. Systematic mutational analysis of peptide inhibition of the p53-MDM2/MDMX interactions. *J Mol Biol*, 2010, 398: 200–213
- 25 Li C, Pazgier M, Li J, Li C, Liu M, Zou G, Li Z, Chen J, Tarasov SG, Lu WY, Lu W. Limitations of peptide retro-inverso isomerization in molecular mimicry. *J Biol Chem*, 2010, 285: 19572–19581
- 26 Eckert DM, Malashkevich VN, Hong LH, Carr PA, Kim PS. Inhibiting HIV-1 entry: Discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell*, 1999, 99: 103–115
- 27 Eckert DM, Malashkevich VN, Kim PS. Crystal structure of GCN4-pIQI, a trimeric coiled coil with buried polar residues. *J Mol Biol*. 1998, 284: 859–65
- 28 Welch BD, VanDemark AP, Heroux A, Hill CP, Kay MS. Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 16828–16833
- 29 Welch BD, Francis JN, Redman JS, Paul S, Weinstock MT, Reeves JD, Lie YS, Whitby FG, Eckert DM, Hill CP, Root MJ, Kay MS. Design of a potent D-peptide HIV-1 entry inhibitor with a strong barrier to resistance. *J Virol*, 2010, 84: 11235–11244
- 30 Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, 197: 353–356
- 31 Wiesehan K, Buder K, Linke RP, Patt S, Stoldt M, Unger E, Schmitt B, Bucci E, Willbold D. Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide abeta1-42 by mirror image phage display. *Chembiochem*, 2003, 4: 748–753
- 32 Liu M, Pazgier M, Li C, Yuan W, Li C, Lu W. A left-handed solution to peptide inhibition of the p53-MDM2 interaction. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 3649–3652
- 33 Liu M, Li C, Pazgier M, Li C, Mao Y, Lv Y, Gu B, Wei G, Yuan W, Zhan C, Lu WY, Lu W. D-peptide inhibitors of the p53-MDM2 interaction for targeted molecular therapy of malignant neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 14321–14326
- 34 Wlotzka B, Leva S, Eschgfäller B, Burmeister J, Kleinjung F, Kaduk C, Muhn P, Hess-Stumpp H, Klussmann S. *In vivo* properties of an anti-GnRH Spiegelmer: An example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 8898–8902
- 35 Maasch C, Vater A, Buchner K, Purschke WG, Eulberg D, Vonhoff S, Klussmann S. Polyethylenimine-polyplexes of Spiegelmer NOX-A50 directed against intracellular high mobility group protein A1 (HMGA1) reduce tumor growth *in vivo*. *J Biol Chem*, 2010, 285: 40012–40018
- 36 Kulkarni O, Pawar RD, Purschke W, Eulberg D, Selve N, Buchner K, Ninichuk V, Segerer S, Vielhauer V, Klussmann S, Anders HJ. Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18: 2350–2358
- 37 Laakkonen P, Porkka K, Hoffman JA, Ruoslahti E. A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nat Med*, 2002, 8: 751–755
- 38 Chen Y, Shen Y, Guo X, Zhang C, Yang W, Ma M, Liu S, Zhang M, Wen LP. Transdermal protein delivery by a coadministered peptide identified via phage display. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 455–460
- 39 Monk BC, Niimi K, Lin S, Knight A, Kardos TB, Cannon RD, Parshot R, King A, Lun D, Harding DR. Surface-active fungicidal D-peptide inhibitors of the plasma membrane proton pump that block azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 57–70
- 40 Hsieh-Wilson LC. Bioorganic chemistry: A sweet synthesis. *Nature*, 2007, 445: 31–3
- 41 Grogan MJ, Kaizuka Y, Conrad RM, Groves JT, Bertozzi CR. Synthesis of lipidated green fluorescent protein and its incorporation in supported lipid bilayers. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 14383–14387
- 42 Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 2009, 323: 1718–1722
- 43 Elkin CD, Zuccola HJ, Hogle JM, Joseph-McCarthy D. Computational design of D-peptide inhibitors of hepatitis delta antigen dimerization.

J Comput Aided Mol Des, 2000, 14: 705–718

- 44 Dintzis HM, Symer DE, Dintzis RZ, Zawadzke LE, Berg JM. A comparison of the immunogenicity of a pair of enantiomeric proteins. *Proteins*, 1993, 16: 306–308
- 45 Wiesehan K, Willbold D. Mirror-image phage display: Aiming at the mirror. *Chembiochem*, 2003, 4: 811–815
- 46 邵荣光. 高效小型化抗肿瘤抗体药物的研究展望. *医学研究杂志*, 2010, 39: 3–4

Mirror-image isomers screening: Overcoming the enzyme barriers for the development of peptide and oligonucleotide therapeutics

LI Chong¹, SHEN Jie², LU WeiYue² & LU WuYuan³

1 College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

3 School of Medicine, University of Maryland, Baltimore, MD 21201, USA

Abstract: The enzyme barriers *in vivo* greatly limited the development of peptide and oligonucleotide therapeutics. The mirror-image isomers screening including mirror-image phage display and Spiegelmer technology can obtain biostable D-peptides and L-oligonucleotides with high specificity to their targets, thus will be a promising technology for the development of novel peptide and oligonucleotide drugs. This review will focus on the principle of mirror-image isomers screening and highlight recent developments of this technology in the field of pharmaceutical research.

Keywords: mirror-image phage display, Spiegelmer technology, D-peptide, L-oligonucleotide