

· 综述 ·

反义寡聚核苷酸及其在医药领域的进展

蔡宇阳 吴梧桐

(生物化学教研室)

摘要 本文概要介绍了反义技术的基本概念和原理,较全面地阐述了反义寡聚核苷酸的种类,作为药物的优点、作用机制,以及药理学研究和药用开发现状。

关键词 反义寡聚核苷酸; 药物设计

近几年来,分子生物学中的反义技术取得了较快进展。反义技术是用人工合成的或生物中自然存在的寡聚核苷酸片段(反义DNA和反义RNA),结合目标基因或mRNA上特定的序列(靶核酸),从而有效地抑制或封闭基因的转录或翻译^[1]。反义结合的依据是Watson-Crick原则和Hoogsteen原则,前者以单链DNA或RNA为靶核酸,后者以双链DNA为靶核酸。

反义技术在医药研究方面极有价值。首先,从基础医学及药理学研究的角度来看:反义寡聚核苷酸已成为研究基因表达、基因调控及产物的功能、基因间相互作用的主要手段之一^[2]。例如:利用反义c-myc、c-myb、IL-1 α 等证明相应基因在造血及内皮细胞生长中的作用;又如:Toshiyoshi Fujiwara等^[3]用反义IL-1 β 证明:在胞内,IL-1能促进LAK(Lymphokine-activated Killer)的活性。其次,根据反义技术,人们可以有目的地研制反义寡聚核苷酸类药物。它与传统药物相比,有其独特的优势:①反义寡聚核苷酸(15~27 b)的专一性亲和力很高,能在哺乳动物体温条件下与靶核酸较好地结合(16 b的序列在人基因中不可能随机出现),因此,寡聚核苷酸药物的毒性比其它核酸类似物药物(如AZT)小得多。②反义寡聚核苷酸药物易设计和合成。因为:A,传统药物的设计,要求对目标蛋白的结构与功能以及药物-蛋白质相互作用的机理有较深的认识;B,传统的基因治疗需把整个基因导入靶细胞中,这些都要复杂得多。故有人预言,寡聚核苷酸药物设计将逐步取代传统药物设计^[4]。见表1。

目前最有希望的是抗病毒类药物,因为人们对

许多致病病毒的基因及其编码的蛋白有较多的了解,而且病毒的主要蛋白在人体中大部分无相应的蛋白种类。所以,抗病毒的寡聚核苷酸药物对人体正常基因的干扰极小^[5]。

Tab 1. Diseases which may potentially be treated with oligonucleotide therapeutics

Viral diseases

Adenovirus, HSV-1, HSV-2, Herpes zoster, CMV, EBV, HPV, influenza A and B, Parainfluenza, HTLV-1, HIV, Hepatitis A and B

Oncologic diseases

Lymphoma, Leukemia, Melanoma, Osteosarcoma, Carcinoma (of colon, prostate, kidney, bladder, breast)

Other

Psoriasis, Drug resistance, Allergy, Inflammation

1 反义寡聚核苷酸的化学结构

1.1 正常的DNA片段(ODN) ODN的合成都是通过固相法完成的,其具体途径可分为三种:①磷酸三酯法;②氨基磷酸酯法;③H-磷酸盐法(见图1)。其中,磷酸三酯法因副反应多,偶联效率低,已逐渐被淘汰。

ODN对核酸酶敏感,膜穿透力低,为克服这些缺点,人们对ODN的结构进行了各种改造^[6](见图2)。

1.2 ODN的几种结构改造

A型改造 甲基磷酸型(M-ODN):即用甲基取代磷酸二酯键中的羟基。这种改造使原本带许多负电荷的DNA变成非离子型的分子,从而能完整地穿透细胞膜而不被降解;它的缺点是:手性结构极为复杂,难以分离和纯化。硫代磷酸型(S-ODN):即用巯基取代二酯键中的羟基。它的特点是:可完整进入细

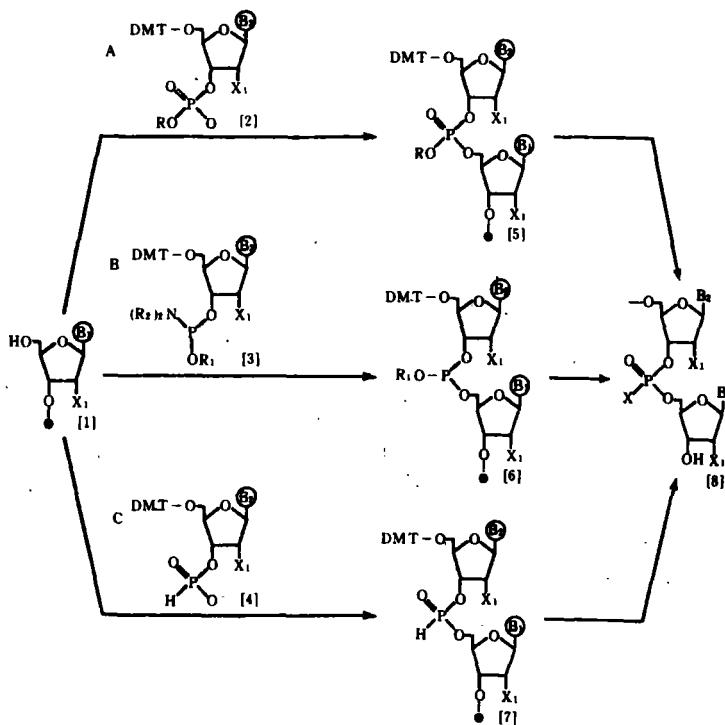


Fig 1. Synthesis of oligonucleotides and oligoribonucleotides and their analogues by three different approaches.

A: Phosphotriester approach; B: Phosphoramidite approach; C: H-phosphonate approach.

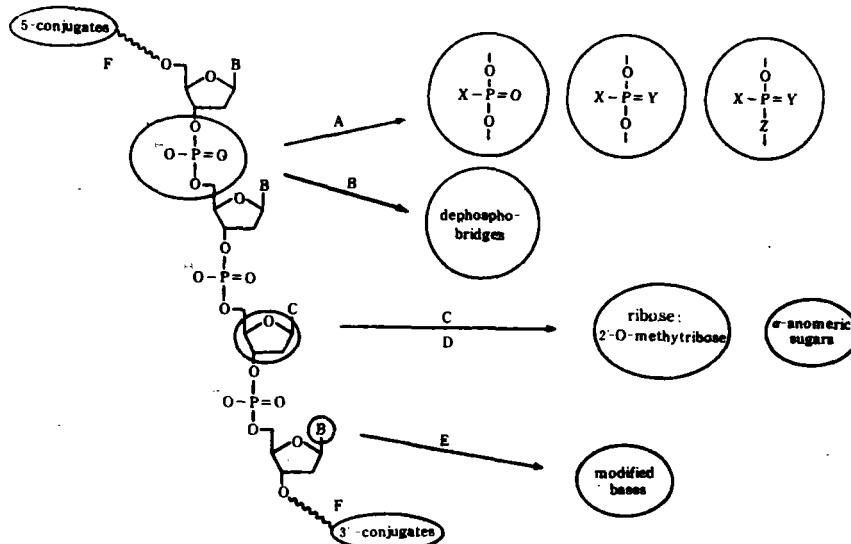


Fig 2. Six types of modification of ODN.

胞内，抗核酸酶能力强，且有较好的水溶性。双硫代磷酸型(SS-ODN)：即在 S-ODN 的基础上再以硫原子取代未成酯键的磷酸氧原子。它具有更强的抗核酸酶的能力。据报道^[1]，14 b 的 SS-ODN 对 HIV 的抑制能力是 S-ODN(15 b) 的 28 倍。

B 型改造 即用硅氧烷桥、硫醚桥等取代磷酸二

酯键(见图 3A)。

C 型改造 正常的 DNA 都是 β -构型，因而改用 α -构型后的 DNA 片段的抗核酸酶的能力大大增加(是前者的 30 倍以上)，而且它能与互补的 β -DNA 或 RNA 形成稳定的平行结构；缺点是成本太高。

D 型改造 即戊糖采用的是核糖或 2'-修饰的核

糖,它们与互补 RNA 链的亲合力大大高于正常 DNA 与 RNA 的亲合力(见图 3B)。

E 型改造 即在戊糖的 1'位置加以各种修饰(见图 3C)。

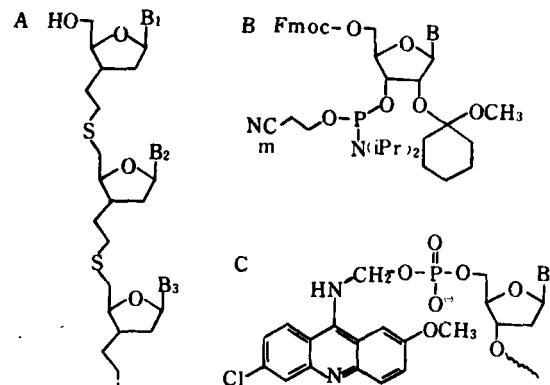


Fig 3. Examples of several types of ODN modification.
A, Thioether bridged oligonucleotide analogues;
B, One example of 2'-modified oligoribonucleotides;
C, One example of 5'-conjugates.

F 型改造 即在寡聚核苷酸的 5'或 3'末端共价连接上其它分子,增强其细胞透过性、稳定性和与靶核酸的结合能力,并因此提高药效。如:在 S-ODN 的 3'末端共价连接胆固醇分子,可提高抗 HIV 的活性^[8]。

2 反义寡聚核苷酸的作用机制和药物设计

反义作用有专一性和非专一性之分。专一性反义作用主要发生在五个层次:①抑制 DNA 的转录;②抑制前体 mRNA 的拼接;③抑制 mRNA 的戴帽及 poly A 尾巴的连接;④抑制翻译的启动;⑤阻遏核糖体在 mRNA 上的移动。在病毒里存在非专一性反义作用,其本质是:诱导病毒的 RNase H 非专一性降解病毒 mRNA,以抑制翻译的进行。

在针对转录过程的专一性反义抑制中,反义寡聚核苷酸与双链 DNA 的某一段特异性结合,形成三螺旋结构(见图 4)。

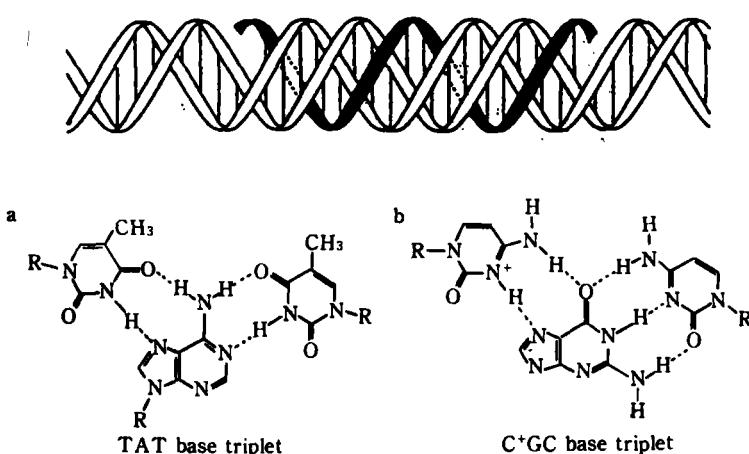


Fig 4. Triplex structure; a and b the major base triplets.

无细胞提取液等体外实验表明:三股螺旋结构能抑制 DNA 的复制,阻断转录因子的结合,并阻断转录的启动;有数据表明:在完整细胞中,反义寡聚核苷酸能特异性抑制某一目标蛋白的合成。这些在药物设计方面有非常广阔前景。(反义寡聚核苷酸药物开发研制的流程见图 5)。

依据三股螺旋结构设计药物有四条原则^[8,9]:①反义寡聚核苷酸的最佳长度为 20~40 bp;②结合区段,富含嘌呤碱基的那条链的嘌呤含量应在 65% 以上,以确保三股螺旋的结构稳定性;③遵循 G 与 G, C

形成 G, G, C, T 与 A, T 形成 T, A, T 的原则(G:鸟嘌呤,C:胞嘧啶,A:腺嘌呤,T:胸腺嘧啶);④结合区段中,若富含嘌呤的那条链中嘌呤含量过高,构建的反义寡聚核苷酸最好能与该链反向平行。遵循这四条原则,人们已在体外的合成体系、无细胞提取液中成功地构建了三股螺旋结构。

针对翻译过程的反义调控包括:干扰 mRNA 与核糖体的结合,干扰 mRNA 的构型、剪切拼接、戴帽与 poly A 尾的连接,激活 RNase H 降解 mRNA 等。其中最理想的作用位点是 mRNA 上 5'端起始密码子。

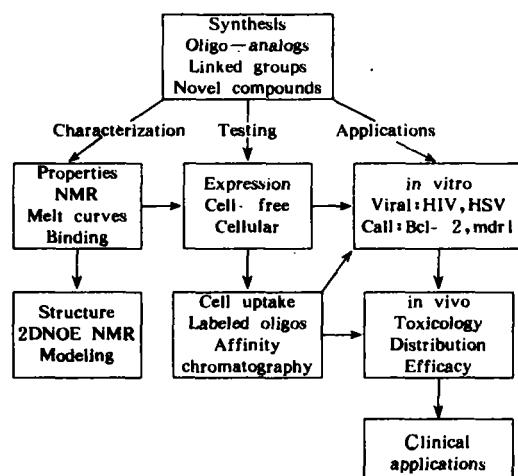


Fig 5. Flow diagram of antisense oligonucleotide R&D field.

反义寡聚核苷酸已成功地应用于对一些(原)癌基因表达的体外抑制,如:C-myc、N-myc、HPVE5-E6、bcl-2、myb等,这对于抗癌药的研制很有价值。

3 药理学研究和药用开发现状

人们曾担心,反义寡聚核苷酸不能被细胞吸收。1986年,Zamecnik等以实验证明,当HeLa和CEF细胞与20 μmol/L的20 b长的寡聚核苷酸混合时,15 min内,胞内寡聚核苷酸浓度达1.5 μmol/L;一系列的微注射结果表明:一旦寡聚核苷酸进入细胞,将很快地以被动扩散的方式进入核内。显然,这对寡聚核苷酸作为药物是很有利的^[9]。

目前,反义药物的临床应用还未见报道,主要的研究工作还局限于动物模型中。例如:人们在小鼠体内进行了细胞毒实验,分别以2.5、10、40 mg/kg的剂量给药14 d,无毒性;在腹膜内或皮下以100 mg/kg的剂量给药14 d,无死亡^[8]。而当以160 mg/kg剂量给药时,四分之三的受试小鼠3 d内死亡^[9]。有人测定了12 b的M-ODN在体内各器官的分布情况:肾>肺>肝>脾>肌肉>脑,其中肾中的含量为肝中的15倍,血浆与淋巴液中的5倍,脑中的95倍(而且脑中无明显的积累)^[10]。药代动力学的结果表明:寡聚核苷酸外排的速度依赖于核苷酸骨架的性质。80%未修饰的寡聚核苷酸(有4处硫代磷酸化的键合)外排时间为12 h,75%的甲基磷酸化类似物外排时间为2 h。S-ODN在24 h内外排30%,后24 h又外排25%,而留在血液和组织中的部分相当稳定,其降解主要是3'核酸外切酶的作用。另有实验表明:S-ODN仅以10⁻⁸~10⁻⁶ mol/L的浓度,就能有效地抑制

HIV、HSV、HPV和流感病毒,且没有明显的细胞毒作用,可见反义寡聚核苷酸类药物相当有效,且相对低毒。

不久前美国商用通讯公司在一个报告中预测:1999年反义寡聚核苷酸的市场潜力可达45亿美元,比目前全部生物技术的市场还大。美国在这方面走在前面^[11,12]。如:Gilead Scieme投资1200万美元研究各种抗病毒(HIV、巨细胞病毒、HSV、HBV)、抗肿瘤(肺癌、结肠癌、卵巢癌、白血病)等药物。又如:ISIS与ABI合作,1989年和1990年分别投资520万和1000万美元研究抗病毒和抗炎症的反义药物及相应的给药问题,而且该公司已于1990年向FDA提出两项IND申请(针对HSV和HPV)。而我国在这方面还基本上是空白。

反义寡聚核苷酸要真正成为药物还有许多工作要做。如:如何大幅度降低反义寡聚核苷酸的合成及修饰的成本;对它作长期毒性实验(包括可能的免疫应答,是否有致突变效应、降解产物去向等);考察它是否会长期稳定地嵌入动物及人体染色体组;检验它在人体中的行为等。尽管如此,人们对它的前景充满信心。

参考文献

- 1 Weintraub HM. Antisense RNA and DNA. *Sci Am*, 1990; 262(1):40
- 2 Marcus-Sekura CJ. Techniques for using antisense oligodeoxy-ribonucleotides to study gene expression. *Anal Biochem*, 1988;172(2):289
- 3 Fujiwara T, Grimm EA. Specific inhibition of Interleukin 1β gene expression by an antisense oligonucleotide: obligatory role of Interleukin 1 in the generation of lymphokine-activated Killer Cells. *Cancer Res*, 1992;52(18):4954
- 4 Cohen JS. Oligonucleotide therapeutics. *TIBTECH*, 1992;10(3):87
- 5 Agrawal S. Antisense oligonucleotides as antiviral agents. *TIBTECH*, 1992;10(5):152
- 6 Uhlmann E, Peyman A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle. *Chem Rev*, 1990;90(4):543
- 7 Caruthers MH, Beaton G, Cummins L, et al. Chemical and biochemical studies with dithioate DNA. *Nucleosides and Nucleotides*, 1991;10:47
- 8 Durland RH, Kessler DJ, Gunnell S, et al. Binding of triple helix forming oligonucleotides to sites in gene promoters. *Biochem*, 1991;30(38):9216
- 9 Chubb JM, Hogan ME. Human therapeutics based on triple helix technology. *TIBTECH*, 1992;10(4):132
- 10 Disposition and metabolism of oligodeoxynucleoside methylphosphonate following a single iv injection in mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 1990;18(5):815
- 11 Klausner A. Antisense start-ups surveyed. *Bio Technology*, 1990;8(4):303
- 12 Ratner M. Drug development-waiting for antisense to deliver. *Bio Technology*, 1991;9(5):410