

利用簇合效应发现和创制高效新农药的设想

梅向东, 杨国权, 宁君*

(中国农业科学研究院 植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 基于以下理论提出了一种创制高活性新农药的观点: 将一种活性寡糖小分子制成簇合物后, 其活性有时可大大增加, 即产生了簇合效应 (cluster effect)。通过列举簇合效应在医药领域成功应用的事例, 指出其在高活性新农药创制中应用的可能性。预期这一机制可用于筛选和发现高效新农药。

关键词: 簇合效应; 新农药创制; 寡糖

中图分类号: O 631; TQ 450. 1

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303 (2006) 03-0203-06

The New Approach on Screening Pesticides Using Cluster Effect

MEI Xiang-dong, YANG Guo-quan, NING Jun*

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Beijing 100094, China)

Abstract: A new approach to design new pesticides was introduced. It was based on the data that in some cases oligosaccharide molecules in cluster form display much higher bioactivity than the corresponding oligosaccharide molecules. That was called "cluster effect". The activities of some polymers of medicine that was significantly enhanced by their "multivalent" or "cluster effects" were enumerated. It was anticipated that the mechanism of cluster effect could be used to screen and create highly active pesticides.

Key words: cluster effect; novel pesticide creation; oligosaccharide

新农药分子的发现和开发是农药行业发展的源泉。目前的新农药创制主要依赖如下两大途径: 其一是从大量化合物中进行筛选; 其二是选择具有较好生物活性的化合物作为先导来进行合成及筛选。其中后者已成为新农药创制的重要途径。而一个农药新品种的产生, 从基础研究到实现产业化, 需要耗费大量的财力、物力和时间。为了有效应对 21 世纪世界人口高速增涨和粮食生产不足的局面^[1], 未来的新农药创制必须要向高

效率化方向发展^[2]。

1999 年, Wang 等^[3]合成了半乳糖的多价分子, 结果发现其生物活性显著提高, 他们将其归结为多价效应 (multivalent effects) 或簇合效应 (cluster effects) 的结果。其实早在 1996 年就有将单体化合物簇合成二价体分子的报道^[4], 只是当时还未形成一个明确的概念。

近几年来, 医药研究领域出现了许多关于簇合物成功应用的事例。但目前国内外尚未见有关

收稿日期: 2006-05-25; 修回日期: 2006-07-25.

作者简介: 梅向东 (1978-), 男, 博士, 主要从事新农药创制研究; *通讯作者: 宁君 (1966-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事新农药创制及植物保护新技术研究. 联系电话: 010-62899142; E-mail: jning502@yahoo.com.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 ("973 计划") (2003CB114400; 2006CB101907).

簇合效应在新农药创制研究中应用的报道。鉴于簇合效应已在生物医药研究领域得到成功应用,笔者认为将其用于新农药创制研究中也将会是一种切实可行的方案。首先选择合适的具有农药生物活性的分子作为母体,结合相应的作用靶标信息,合理设计簇合物的结构(而非简单地聚合成多聚体),进而将有望合成并筛选出高效、选择性强的农药活性分子。

1 簇合效应的提出

近年来,人们在活性寡糖的研究中发现,将母体活性寡糖小分子(γ -Gal monomer)制成簇合物(γ -Gal polymers)后,其活性有时可大大增加^[3,5],但活性提高程度会有所不同。如图1所示,

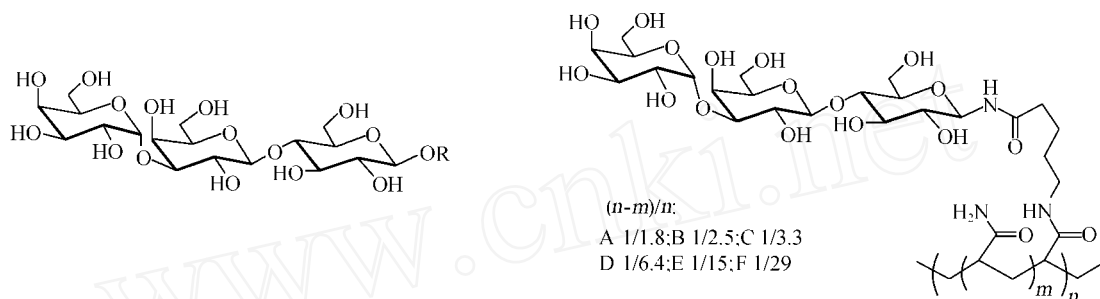


Fig 1 γ -Gal monomer and polymers^[3]

图 1 半乳糖单体及其聚集体



Fig 2 Monovalent binding between a monovalent receptor and a monovalent ligand^[7]

图 2 单价受体与单价配体的结合示意图

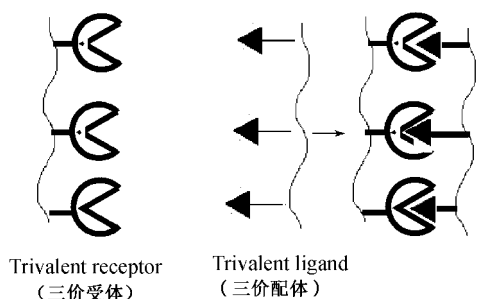


Fig 3 Polyvalent binding between a trivalent receptor and a trivalent ligand^[7]

图 3 三价受体与三价配体的结合示意图

polymer A 的活性最高,而 polymer F 的活性最低,即簇合结构中母体寡糖小分子数目的比例越高,其活性提高程度越大。这主要是由活性结构的簇合效应引起的。

所谓簇合效应(cluster effect)是指通过簇合产生的多价配体可与受体的多位点相互作用,从而产生协同效应,使其结合力和特异性增强^[6]。一个粒子(小分子、寡糖、蛋白质、核酸或一些分子的集合体、细胞膜、细胞器、病毒、细菌或一个细胞)与其他粒子作用时相对应的识别、结合位点的个数称为效价(valent)^[7]。单效价及多效价配体与受体的结合作用见图2和图3,通常多价配体比单价配体对相应的受体有更强的亲和力和。

多价配体可以通过多个结合点与细胞表面的多价受体结合(图4a);即使细胞表面的受体是单效价的,多价配体结合多个受体的趋势也可引起细胞表面流动的双分子层发生二维扩散,从而使受体簇合后与配体结合(图4b);多价配体不仅可与受体的主要结合点作用,还可与受体的结合亚点作用,从而增强配体和受体之间的亲和力(图4c)。此外,多价配体能增加结合点的局部浓度,也可使配体的亲和力得到增强,而受体表面配体骨架的水合作用、颗粒大小对受体也起着立体稳定的作用。多价配体通常通过多种机理协同后与受体相互作用^[8]。

2 多效价糖基配体

自然界许多粒子中的糖蛋白通常可紧密地结合成有高度次序的低聚体结构,并通过多个结合点与其他受体结合^[9,10],如流感病毒表面分布的

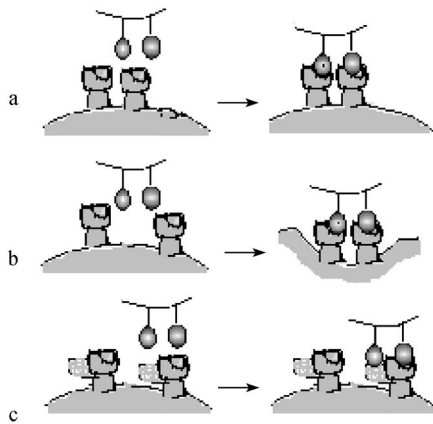


Fig. 4 (a) Interaction of multivalent ligand with acceptor through multiple binding positions; (b) Multivalent ligand accelerates coagulation of acceptors on cell surface; (c) Multivalent ligand can interact with the main binding position, and also with sub-binding position on the acceptor^[8]

图 4 (a)多价配体通过多个结合点和受体相互作用; (b)多价配体可促使受体在细胞表面簇和; (c)多价配体可和受体上的主要结合点作用,也可和结合亚点作用

血球凝聚素即是以三聚体的形式与细胞表面上的唾液酸发生作用的(图 5)^[11]。研究者从这种现象中受到启发,希望通过合成有多个结合点的配体来提高配体和受体间的亲和力。近年来,已合成了多个多价价的糖基配体(ligand),并通过红血球凝聚素的抑制(inhibition of hemagglutination, HIA)、酶连接的植物凝聚素测试(enzyme-linked lectin assay, ELLA)、恒温滴定微反应热的测量(isothermal titration microcalorimetry, ITC)及细胞质基因组表面共振(surface plasmon resonance, SPR)等方法对其活性进行了测试,发现配体活性的提高程度在 0~10⁶ 倍不等,其中 Sigal^[12]和 Choi^[13]等合成的直链型含唾液酸的聚丙烯酰胺对

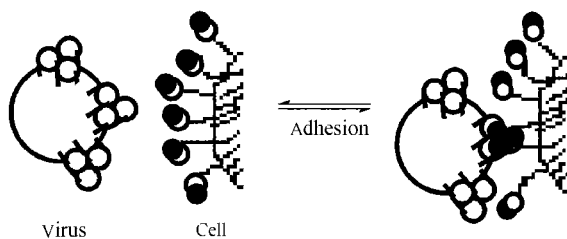


Fig. 5 Adhesion of influenza virus to mammalian cell via multivalent binding of viral hemagglutinin (HA) trimers to multiple sialic acids expressed on cell surfaces^[11]

图 5 流感病毒上的三聚体和唾液酸的结合示意图

流感病毒 A-X31 粘附红血球的抑制作用比单个的唾液酸强 10⁶ 倍(以同浓度的糖基片段为基准)。目前,设计合成各种多价价的糖基配体已被认为是研究生物体内蛋白质与糖类、糖类与糖类之间相互作用的一条重要途径,所合成的配体被用于干扰由糖基配体引起的生物识别过程,是找到抗感染、抗病毒、抗 HIV 药物及人体疫苗的新途径,也是进行肿瘤诊断的新方法^[14,15]。

3 非糖类多价价配体

在非糖类生物医药研究中,也有许多通过合成多价价配体而使生物活性大幅度提高的成功事例。

Yahi^[16]利用高效薄层色谱(high performance thin layer chromatography, HPTLC)对单体 NF036 及其簇合物(二聚体)苏拉明(Suramin)进行了测试,上样展开后进行薄层扫描,用闪烁计数器测定放射能。结果表明,单体 NF036 阻碍 HIV-1 的 gp120 位点与 T 细胞结合的 IC₅₀ 值为 5 400 μg/mL,而其二聚体苏拉明的 IC₅₀ 值为 54 μg/mL,活性是单体的 100 倍(图 6)。

Wiley^[17]与 Harrison^[18]等报道,天然化合物内屈考诺酮(conocurvone)是 teretifolin B 的三聚体(图 7),内屈考诺酮可强烈抑制 HIV-1 的复制(EC₅₀ 值 20 nmol/L),而 teretifolin B 却几乎没有活性。产生这种活性差异的原因可能是由于内屈考诺酮可以形成螺旋结构,所形成的螺旋分子与病毒 DNA 链的大沟、小沟结合,干扰了病毒核酸的复制和转录;而单体 teretifolin B 则不具备此特性。

Harel 等^[19]曾报道 9-氨基-1,2,3,4-四氢吡啶(THA)可作为治疗一种神经疾病 Alzheimer's Disease (AD) 的药物。AD 是由乙酰胆碱酯酶(AChE)过多而导致的,通过酶抑制剂适当抑制 AChE 的催化作用可能是治疗此类疾病的潜在途径。Harel 等提出, AChE 具有两个活性位点(图 8),其中高亲和性的催化位点与 THA 的结合通过一般晶体 x 射线衍射方法即可得到证明,而低亲和性的外周位点则很容易被忽视。研究发现, THA 易于与 AChE 高亲和性的催化位点相结合,但不与丁酰胆碱酯酶(BChE)的外周位点结合。

根据这一特点,人们设计了 THA 的类似物,即既能与 AChE 高亲和性的催化位点结合又能与

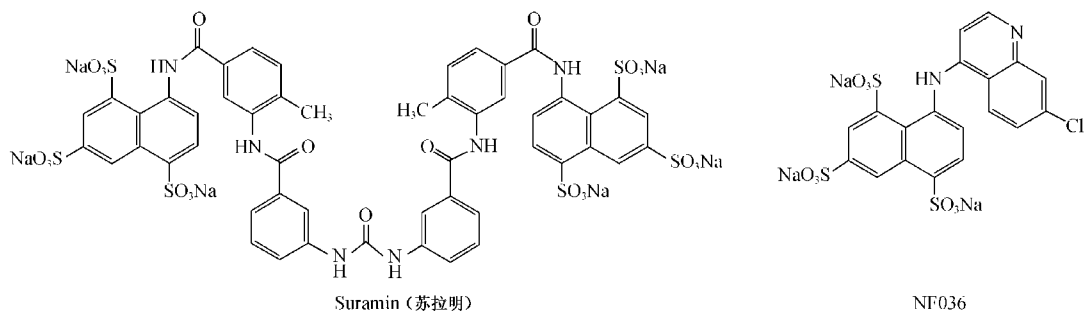


Fig 6 Structure of NF036 and its dimer Suramin^[16]

图 6 NF036及其二聚体苏拉明的结构式

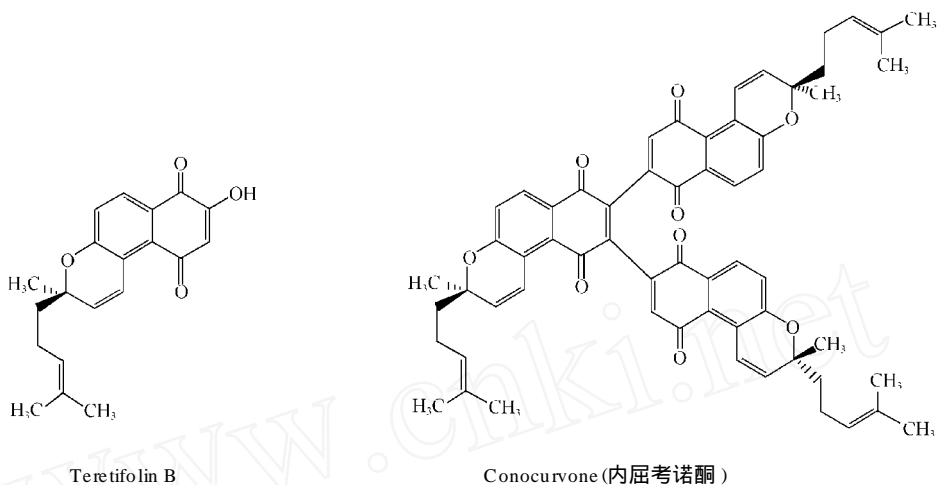


Fig 7 Structure of naturally occurring oligomeric molecules that display anti-HIV activity^[17,18]

图 7 具有抗艾滋病病毒活性的天然产物低聚分子内屈考诺酮及其单体 teretifolin B 的结构

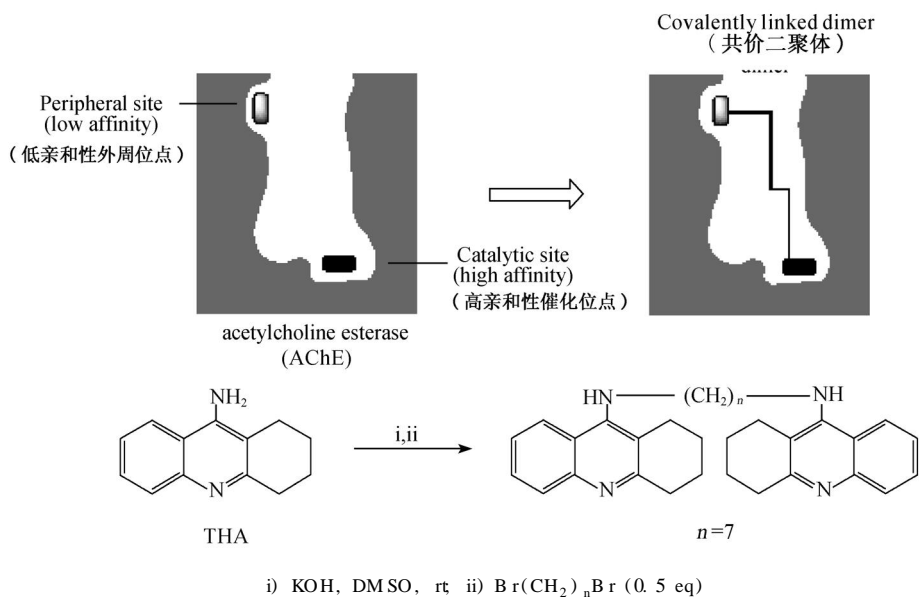


Fig 8 Catalytic pocket of acetylcholinesterase presenting a high-affinity substrate site and a low-affinity site near the entrance to a second substrate and divalent inhibitors of AChE composed of tetrahydroacridine (THA)^[4]

图 8 乙酰胆碱酯酶的高亲和性位点与低亲和性位点及由 THA 组成二价态的乙酰胆碱酯酶抑制剂

低亲和性的外周位点结合的双氨基四氢吡啶 (bis-THA)。研究表明^[4, 20-22], bis-THA 的活性 (IC_{50} 值 0.4 nmol/L)是 THA 的 1 475 倍。Pang 等^[4]用小鼠脑匀浆液做实验,以质量分数为 1% 的 Triton X-100 作为 AChE 的来源,以小鼠血清作为 BChE 的来源。在以 10^{-4} mol/L ethopropazine (爱普巴嗪,一种治疗震颤性麻痹的药物)抑制 BChE 的同时,以乙酰硫代胆碱作底物,采用分光光度滴定法测定 AChE 的指标。用非线性最小平方回归拟合法 (nonlinear least squares regression program) 计算 IC_{50} 值。结果表明, bis-THA 的活性和选择性 (相对于 BChE) 较 THA 均有较大提高^[4]。

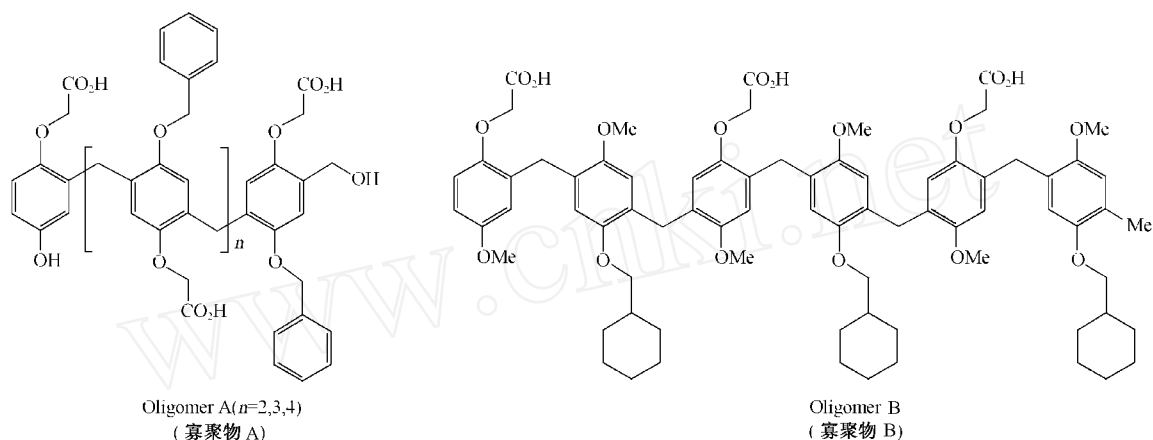


Fig. 9 Structure of anionic diphenylmethane oligomers as inhibitor of human leukocyte elastase^[24]

图 9 人体白细胞胰蛋白酶抑制剂二苯基甲烷阴离子低聚体的结构

4 簇合效应在农药研究领域应用的展望

在生物体系中,多位点结合比单位点结合更具优势。首先,多位点结合更牢固,高亲和性的多效价化合物作为一些防治对象靶标部位的抑制剂具有很大的潜在价值;其次,多效价作用能提高受体的选择性。

农药活性的提高很大程度上取决于其对靶标结合程度的增强。有的防治对象可能存在多个作用位点,如一些杀虫剂既有第一作用位点乙酰胆碱酯酶,也有第二作用位点腺苷三磷酸酶 (ATPase)。在设计簇合物时可充分考虑这些靶标的特点,从而进行合理的设计,开发出能与多靶标结合的化合物,以提高目标化合物的生物活性。

运用计算机辅助进行分子设计而发现具有生物活性的农药分子比较容易,但发现高活性的农

Dong 等^[23]还通过离体和活体检测进一步比较了 THA 和 bis-THA 抑制 AChE 的活性,指出 bis-THA 可作为一种高效、高选择性的 AChE 抑制剂。

Regan 等^[24]报道了线性寡聚物 oligomer A 和 oligomer B (图 9) 可以较好地抑制人体白血球弹性蛋白酶 (HLE) 的活性。其中, n 不同则 oligomer A 抑制 HLE 的活性不同,当 n 分别等于 2、3、4 时, IC_{50} 值分别为 8 300、130、120 nmol/L, 即当 n = 4 时,活性最高。另一个多效价分子 oligomer B 则表现出了更高的活性 (IC_{50} 值 20 nmol/L), 推测其原因除了簇合效应外,可能还有空间和位置因素的影响。

药分子却非常困难。在新农药的开发过程中,已发现了大量具有生物活性的化合物分子,但往往因其活性达不到实际开发应用水平而不能实现产业化。而利用簇合效应把适当的活性分子进行簇合,进而找到具有高活性的农药分子,最后实现产业化的产品开发将是可行的。

利用簇合效应开发具有高活性的农药分子目前还只是一个理论上的设想,尚有待于在以后的实验中得到验证和发展。需要指出的是,合成簇合物可能较合成单体化合物需要更多的步骤,需要做更深入的研究工作,其成本也可能会有所提高,但若籍此发现高活性的农药分子还是值得的。相信通过农药科研工作者的努力,簇合效应理论也能够在新农药创制中发挥较大的作用,进而为农药新品种的开发拓展一条新的思路。

参考文献:

- [1] CHEN Wan-yi(陈万义), XUE Zhen-xiang(薛振祥), WANG Neng-wu(王能武). Study and Invention on New Pesticides(新农药研究与开发) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 1996. 1-4.
- [2] LI Zheng-ming(李正名). 新农药创制的现状和发展趋势 [J]. Pesticides of World(世界农药), 1999, 21(6): 1-4.
- [3] Wang J, Chen X, Zhang W, et al Enhanced inhibition of human anti-Gal antibody binding to mammalian cells by synthetic R-Gal epitope polymers [J]. J Am Chem Soc, 1999, 121(36): 8174-8181.
- [4] Pang Y P, Quiram P, Jelacic T, et al Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroamincrine inhibitors of acetylcholinesterase: steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease [J]. J Biol Chem, 1996, 271(39): 23646-23649.
- [5] KONG Fan-zuo(孔繁祚). Saccharide Chemistry(糖化学) [M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2005. 504-524.
- [6] Bertozzi C R, Kiessling L L. Chemical glycobiology [J]. Science, 2001, 291(23): 2357-2364.
- [7] Mammen M, Choi S, Whitesides G. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors [J]. Angew Chem Int Ed, 1998, 37(20): 2754-2794.
- [8] Kiessling L, Gestwicki J, Strong L E. Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions [J]. Curr Opin Chem Biol, 2000, 4(6): 696-703.
- [9] Mitchell D, Niu S, Liman B. Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition I: kinetics of rhodopsin-transducin binding [J]. J Biol Chem, 2001, 276(46): 42801-42806.
- [10] Crocker P, Feizit T. Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions [J]. Curr Opin Struct Biol, 1996, 6(5): 679-691.
- [11] Wilson K, Skehel J, Wiley D. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution [J]. Nature, 1981, 289: 366-373.
- [12] Sigal G, Mammen M, Dahmann G, et al Polyacrylamides bearing pendant sialoside groups strongly inhibit agglutination of erythrocytes by influenza virus: The strong inhibition reflects enhanced binding through cooperative polyvalent interactions [J]. J Am Chem Soc, 1996, 118(16): 3789-3800.
- [13] Choi S, Mammen M, Dahmann G, et al Generation and in situ evaluation of libraries of poly(acrylic acid) presenting sialosides as side chains as polyvalent inhibitors of influenza-mediated haemagglutination [J]. J Am Chem Soc, 1997, 119(18): 4103-4111.
- [14] Roy R. Syntheses and some applications of chemically defined multivalent glycoconjugates [J]. Curr Opin Struct Biol, 1996, 6(5): 692-702.
- [15] Bezouska K. Design, functional evaluation and biomedical applications of carbohydrate dendrimers (glycodendrimers) [J]. Rev Mol Biotech, 2002, 90(3-4): 269-290.
- [16] Yahi N, Sabatier J M, Nickel P, et al Suram in inhibits binding of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 to galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp120 on human colon epithelial cells [J]. J Biol Chem, 1994, 269(39): 24349-24353.
- [17] Wiley D C, Skehel J J. The structure and function of the HA membrane glycoprotein of influenza virus [J]. Annu Rev Biochem, 1987, 56: 365-394.
- [18] Harrison S C. Virus structures and conformational rearrangements [J]. Curr Opin Struct Biol, 1995, 5(2): 157-164.
- [19] Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, et al Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active site of acetylcholinesterase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(19): 9031-9035.
- [20] Carlier P R, Chow E S H, Han Y, et al Heterodimeric tacrine-based acetylcholinesterase inhibitors: investigating ligand-peripheral site interactions [J]. J Med Chem, 1999, 42(20): 4225-4231.
- [21] Han Y F, Li C P L, Chow E, et al Dual-site binding of bivalent 4-amino pyridine- and 4-amino quinoline-based AChE inhibitors: contribution of the hydrophobic alkylene ether to monomer and dimer affinities [J]. Bioorg Med Chem, 1997, 7(11): 2569-2575.
- [22] Hu M K, Wu L J, Hsiao G, et al Homodimeric tacrine congeners as acetylcholinesterase inhibitors [J]. J Med Chem, 2002, 45(11): 2277-2282.
- [23] Dong Z J, Yeung O Y, Ji X O, et al Comparison of the anticholinesterase effects of bis-THA and THA in vitro and in vivo [J]. Society for Neuroscience Abstracts, 1998, 24(1-2): 184.
- [24] Regan J, McGarry D, Bruno J, et al Anionic- and lipophilic-mediated surface binding inhibitors of human leukocyte elastase [J]. J Med Chem, 1997, 40(21): 3408-3422.

(Ed. TANG J)