

· 综述 ·

蛋白质结晶的新进展与药物设计

陈维敬, 仲维清(第二军医大学药学院无机化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 蛋白质是生命的基础,其功能与它的三维结构密切相关,关于蛋白质的结构信息,对科学家根据结构同源性确定药物靶标以及发现新的药物靶标等方面均有至关重要的作用。因此,蛋白质晶体的获得及其与药物设计的关系日益受到重视,已成为生命科学中的一个重要领域,本文主要综述了蛋白质结晶技术的最新研究进展以及在药物设计中的应用。

[关键词] 蛋白质;晶体;靶点;药物设计

[中图分类号] Q51 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)02-0081-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.02.001

New progress of protein crystallization and drug design

CHEN Wei-jing, ZHONG Wei-qing (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Protein was the foundation of all life, and its function was closely related to its three-dimensional structure. The structure information of proteins was crucial for the determination of drug targets and helped scientists to discover new drug targets according to the structure homology between the protein targets and drugs. Therefore, the availability of protein crystal, which was the basis for its structure information and the drug design, had become an important field in life science. The latest research progresses of protein crystallization technology and its application in the drug design were summarized in this review.

[Key words] protein; crystallization; target; drug design

蛋白质三维结构的研究对于开发有效地治疗疾病的药物和疗法具有重要意义^[1],目前很多发达国家都在进行蛋白质三维结构的研究,以加速新药研究的进程,然而蛋白质晶体的获得却是这一领域的瓶颈。近年来,蛋白质结晶技术得到了很大发展,在进一步完善和发展传统结晶法的同时,许多新型结晶技术也得到了推广和应用。而蛋白晶体结构的药物设计对药物开发具有重要意义。

1 结晶技术

1.1 膜结晶 膜结晶作为一种新的结晶方法,发展比较迅速。其基本原理是通过膜蒸馏来脱除溶液中的溶剂,浓缩溶液,使溶液达到过饱和并通过膜表面的诱导作用而形成晶体。与常规结晶技术相比,膜结晶技术具有结晶速度快、起始浓度低、诱导时间短、过程可控等优点,且可以更好地、更方便地控制晶体结晶过程,得到质量更好的晶体。此外,膜表面还可以起到非均相成核的作用。

自首次发现高聚物表面对生物大分子的结晶具

有诱导作用,并得到了伴刀豆球蛋白 A 的晶体和溶菌酶晶体^[2]以来,膜结晶技术得到了突飞猛进地发展,更佳的膜结晶操作条件不断出现。2006年, Ma^[3]课题组用中空纤维微孔疏水膜对溶菌酶进行了结晶,并研究了沉淀剂和添加剂对结晶的影响,结果发现,微孔疏水膜作为非均匀成核的表面,不仅减少了结晶的诱导时间和初始蛋白质的浓度,而且可以更好地控制结晶的过程。以 NaCl 和 NaSCN 为沉淀剂,加入甘油、PEG4000、PEG6000 等物质,有利于缩短晶体培养的时间,得到更大的溶菌酶晶体。2008年, Zang 等^[4]用聚偏氟乙烯中空纤维微孔膜对溶菌酶结晶的各种影响因素进行了系统的研究,研究发现,蛋白浓度、洗脱液的浓度和流速、沉淀剂浓度、结晶溶液的流速、pH 值、结晶溶液的离子强度等都对晶体的形成和晶型有影响。2010年,该课题组^[5]又以木瓜蛋白酶为对象,采用动态膜结晶技术,得到了较大尺寸的木瓜蛋白酶晶体。

膜结晶过程的多功能性,使研究者可以在较短诱导时间内得到质量完美的生物大分子晶体。可以预言,膜结晶作为一种新兴的结晶分离技术,在蛋白质的结晶方面拥有较好的潜力和较大的应用前景。

1.2 微流控芯片结晶 微流控芯片技术是化学和生命科学分析研究的重要技术平台,目前成为迅速

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(20371050)。

[作者简介] 陈维敬(1984-),女,硕士研究生。E-mail: weijing0920@163.com。

[通讯作者] 仲维清。E-mail: wqzhong2002@sohu.com。

发展的前沿领域之一。最近国际上已有多个研究小组和公司开始将微流体技术用于蛋白质结晶条件的筛选,具有减少单个条件试验所需的样品数量,增加条件试验的总数,引入更多的蛋白质结晶的影响因素,加快试验速度,减少蛋白质分解的程度,使液滴更加均匀,节省大量的人力、物力和财力等优势。

2004年,哈佛医学院研究人员使用基于微流控技术的蛋白质结晶微系统-Topaz系统,研究抗抑郁药 Integrin(一种与冠状动脉血栓结合的跨膜蛋白)的三维立体结构^[6],阐明了结合到蛋白质外功能区的多肽抑制剂所引起的结构变化,引导了配基抑制剂作为候选药物的治疗研究。Integrin 与其他膜蛋白一样,表达和结晶都十分困难,如果没有 Topaz 芯片,这个过程可能需要更多时间。2009年,李俊君等^[7]对应用于蛋白质结晶的各种微流控芯片技术的原理和方法进行了系统的阐明。

虽然微流控蛋白质结晶技术取得了突出进展,但是直到目前仅出现一种商业化的微流控蛋白质结晶产品。因此要实现快速、完美的蛋白质结晶效果,还有许多技术需要攻关。而实现单一芯片上蛋白质合成和结构解析的“一步完成”,是未来微流控技术应用于结构生物学领域的一个重要发展方向。

1.3 空间蛋白质结晶 空间的微重力环境可以有效地改善蛋白质晶体的生长质量,从而为结构与功能研究以及进一步的生物制药等生物技术开发提供支持。

2003年,日本宇宙航空研究开发机构和日本理化研究所的研究人员把蛋白质送到国际空间站上,结果有11种形成了形状完整的蛋白质单晶体,其中包括理化研究所和大阪大学提供的嗜热菌蛋白质,这种蛋白质在很多细菌内都起着重要的作用,所以研究它的功能,对新药研发具有重要意义。随后欧美等国家也相继开展了空间蛋白质晶体生长的研究。

我国的空间蛋白质晶体生长技术也有很大的发展,分别利用返回式卫星、神舟飞船、和平号空间站等空间飞行器,进行了上百次空间蛋白质结晶实验,并取得了很多研究成果。2001年“神舟二号”飞船上装载的蛋白质结晶装置,是科学家们为了揭示生命的奥秘经过多年研制而成的,它装载有天麻抗真菌蛋白、碱性磷脂酶 A2、细胞色素 B₅ 等15种蛋白质,这些蛋白晶体的研究对于抗农作物病害、治疗顽症、设计新型药物、在细胞和分子水平上研究生命现象的本质具有重要意义。2002年利用“神舟三号”飞船也获得了若干可以用于晶体结构分析的优质晶体,其中人脱氢异雄酮磺基转移酶蛋白晶体,是迄今为止空间实验中生长最好的蛋白质晶体之一。2009年中国科学院生物物理研究所根据蛋白质晶体生长

技术的发展趋势,结合我国实际情况,积极研制了一系列通用、高效、便携、无源的各类空间试验用结晶室硬件。同时,作为我国未来空间实验室的技术储备,还研制出可调节控制的多工位汽相扩散结晶室,此结晶室通过调节汽相扩散通道的面积来控制汽相扩散的速度,进而控制晶体生核和生长的过饱和度,保证晶体生长更平稳^[8]。

从目前来看,在空间生长的蛋白质晶体有60%优于地面生长的同类蛋白质晶体,甚至有在地面不能长出的晶体在空间进行了很好的生长。相信今后空间蛋白质晶体生长将对结构生物学、生物制药及蛋白质组学研究产生重大影响。

1.4 结晶伴侣共结晶 蛋白质结晶伴侣(如单克隆抗体)是一种辅助蛋白质,这种辅助蛋白与特定的蛋白质结合后,可以减少蛋白质构象的不均一性,同时增大了蛋白质分子间的相互接触面积,从而促进了晶格的形成。这种结晶技术尤其适用于膜蛋白质以及分子量较大的蛋白质复合物^[9],如人类 β_2 肾上腺素 G 蛋白偶联受体的晶体就是通过与单克隆抗体相结合得到的^[10,11]。除了膜蛋白质,与单克隆抗体相结合的结晶技术也成功地应用于极易溶解的蛋白质的结晶,例如,莱姆病螺旋体 OspA 是一种极易溶解的蛋白质,只有与单克隆抗体相结合成复合物后,才能获得晶体^[11]。

然而,由于单克隆抗体价格昂贵,且需要被特定酶水解成与待结晶蛋白匹配的片段,一定程度上限制了这一技术的发展,为了解决这个问题,一些“半合成结晶伴侣”和“合成结晶伴侣”已成功应用于某些蛋白质的结晶^[9],结晶伴侣技术在膜蛋白结晶中的首次应用就是半合成 Fv(抗体的单链 Fv 片段)重组体,此外,半合成晶体 VHH(美洲鸵重链抗体 VHH 结构域)也成功应用于几种蛋白质结构的测定^[12,13]。合成伴侣包括非动物免疫抗体产生的碎片,全长钾通道 KcsA 就是第一个用合成伴侣获得晶体结构的膜蛋白质^[14]。Designed ankyrin repeat proteins (DARPINs)是一种合成蛋白,用 DARPINs 作为结晶伴侣的5种蛋白质晶体结构已经被报道^[15]。

结晶伴侣的应用大大促进了蛋白质结晶技术的发展,合成伴侣的成功使这项技术变得更加快速和经济。然而,结晶伴侣的获得还是一个巨大的挑战,需要人们不断去研究和探索。

1.5 膜蛋白质结晶 膜蛋白质参与了大量的生物学功能,包括信号传递,分子运输,电子传递,以及可与溶性或其他膜结合配体的分子间相互作用等。此外,很多药物也作用于膜蛋白质,据估计在全部蛋白

质靶标中 50% 以上的药物靶标是膜蛋白,相对于可溶性蛋白质,由于膜蛋白趋于无定型聚合,而不是三维晶格,因此只有少量的膜蛋白结构被确定。然而,随着蛋白质工程及微聚焦 X 射线衍射等越来越多的高新技术的出现,膜蛋白结晶技术也得到了很快地发展,2010 年, Mio 等^[16]研究了单粒子重建对于认识膜蛋白质三维结构的重要作用。2011 年, Fujiyoshi 等^[17]综述了基于电子晶体学的生理结构分析,其中,电子晶体学对接近膜蛋白质自然环境下的晶体结构分析有潜在和广阔的应用;同时,讨论了基于低温显微镜分析膜蛋白质结构的一些技术。2011 年, Bill 等^[18]综述了最新的科技方法在解决膜蛋白质结构中的广泛应用。同时,以上所讲的结晶伴侣技术在膜蛋白的结晶中也得到了广泛的应用。

膜蛋白质的氨基酸序列有一定的相似性,但是不同的膜蛋白在稳定性、晶体结构、生物物理和生物化学等方面的特性有很大的不同。氨基酸序列不相关的蛋白质也可能会有相似的晶体结构。最近出现的一些新技术,可以帮助识别和控制重组膜蛋白生产的生物途径基础,了解为什么膜蛋白溶解于助溶剂后会失活,并为获取高分辨率的衍射数据确定关键参数。总之,越来越多的高新技术为克服这一领域的主要瓶颈提供了技术平台。

1.6 高通量蛋白质结晶 高通量蛋白质结晶方法具有快速、微量、灵敏和大规模的优点,可以快速筛选蛋白质配体或先导化合物复合物的晶体生长条件,对药物筛选有十分直接和重大的影响,近年来得到了很大的发展。2005 年, Leulliot 等^[19]描述了在酵母结构基因组学中高通量蛋白质技术的优化策略。2007 年, Kambach^[20]详细阐述了基于高通量技术平台研究复合物及膜蛋白质等结构和功能的概念、策略和经验。2011 年, Luft 等^[21]以在结构基因组学 10 年多的实践经验总结了高通量筛选蛋白质结晶的教训,为以后的科学工作者提供了有益的思路。

高通量蛋白质结晶技术以快速、有效的方式极大地推动了蛋白质结晶技术的发展,但仍需要人们在细节分析和结果的解释等方面做出更大的投入和研究,取得更大的成功。

2 蛋白质的晶体结构在药物设计中的应用

许多蛋白质本身就是药物,很多疾病的病因和治疗直接与蛋白质有关,蛋白质的晶体结构是新药开发的基础,也是新型疫苗、新型抗体开发的基础,在整个药物发现阶段起着关键作用,影响着新型药物的设计^[1]。到目前为止,已经有 200 多种药物是

基于对蛋白质结构研究的结果^[22~25],根据药物作用的靶分子的空间结构来设计新药已是国际上新药研究的主流,许多公司已用结构指导药物设计方法开发优良候选药物。

2.1 功能蛋白/酶的结构与药物设计 治疗艾滋病的氨普奈韦 (amprenavir, Agenerase) 和奈非那韦 (nelfinavir, Viracept) 就是利用人类免疫缺陷病毒蛋白酶的晶体结构开发的药物。此外,还有根据乙酰胆碱脂酶设计的治疗老年痴呆症的药物,根据凝血酶设计的抗血栓药物,根据基质金属蛋白酶设计的抗肿瘤药物等。随着越来越多的与疾病相关的功能蛋白/酶的结构被结晶,药物设计得到了很大的发展。

Stathmin 蛋白,做为一个潜在的肿瘤标志物^[26],对其结构的研究为将其作为抗肿瘤治疗的靶标、构建核酶和 siRNA 进行 RNA 干扰治疗、联合药物化疗提供了可能。最近,科学家们获得了细胞膜蛋白-LTC4 合酶的三维结构(该蛋白对人类哮喘的发生有重要影响),确定了该蛋白活性区域的精确位置和性质,这一发现对治疗相关疾病具有重要意义。2008 年, Tabernero 等^[27]详细阐述了酪氨酸磷酸酶的结构和功能的关系,它是人类糖尿病和癌症等疾病药物设计的靶点。2011 年, Chrysin 等^[28]概述了以结构为基础的药物设计的方法 (SBDD),并且阐述了以 glycogen phosphorylase (GP) 为靶点,设计新型抗糖尿病药物的实现过程。雌激素受体 α (ER α) 参与了很多种的生理活动和疾病过程,2011 年, Rosano 等^[29]阐述了以结构为基础的药物设计对发现 ER α 调节器 (SERMs) 的影响,这对预防和治疗相关疾病有重大作用。

2.2 计算机模拟与药物设计 计算机辅助药物设计 (computer aided drug design) 是以计算机化学为基础,通过计算机的模拟、计算和预测药物与受体生物大分子之间的关系,设计和优化先导化合物的方法。其一般原理是,首先通过 X-单晶衍射等技术获得受体大分子结合部位的结构,采用分子模拟软件分析结合部位的结构性质,如静电场、疏水场、氢键作用位点分布等信息,然后再运用数据库搜寻或者全新药物分子设计技术,识别得到分子形状和理化性质与受体作用位点相匹配的分子,合成并测试这些分子的生物活性,从而发现新的先导化合物。因此,计算机辅助药物设计包括活性位点分析法、数据库搜寻、全新药物设计等。近年来,随着蛋白质组学的迅猛发展,以及大量与人类疾病相关基因的发现,药物作用的靶标分子急剧增加,计算机药物辅助设计也取得了更大的进展。

2010年, Morrow等^[30]综述了基于丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 的不同功能域(激酶结构域、PH 结构域、链接区域、C-端疏水片段等)设计 Akt 抑制剂的研究进展和局限,并对计算机辅助药物设计方法设计 Akt 抑制剂治疗癌症进行了展望。2011年, Muni-kumar等^[31]采用基于结构的计算机辅助药物设计方法,设计筛选新的热激蛋白 90 (HSP90) 抑制剂,他们以已获得的 HSP90 抑制剂的结构为基础,采用 FLEXX 和 CATALYST 两种程序对新的 HSP90 配体进行了有效地筛选,对癌症的治疗有重大意义。2011年, Yuan等^[32]开发了一个全新药物设计程序 LigBuilder 2,这个程序使用了药物设计者感兴趣的几个最先进的技术,通过引入一个合成辅助分析仪,将设计结果限制在合成容易获得的“化学空间”内,极大地提高了设计的有效性,从而攻克了计算机辅助药物设计的一个很大的难题,即设计出的化合物能否顺利合成的问题。

计算机辅助药物设计是药物设计发展的新阶段,随着它的高速发展,将会有越来越多的成功的例子,计算机辅助药物设计技术将会越来越成熟。然而,药物在体内的稳定性、药物的毒副作用等问题,也是药物设计者必须关注的重大问题,因此,在基于结构的药物设计过程中,必须要把设计的化合物在体内的吸收、分布、代谢、排泄和毒理方面的性质考虑进去,所以今后计算机辅助药物的设计将会逐步向基于药物作用机制的计算机辅助药物设计方向发展。

2.3 高通量筛选与药物设计 高通量筛选技术是将多种技术方法有机结合而形成的一种新药物及其先导化合物筛选体系,它以微板形式作为实验载体,以自动化操作系统执行实验过程,以灵敏快速的检测仪器采集实验数据,以计算机对数以千计的样品数据进行分析处理,从而得出科学准确的实验结果。药物高通量筛选技术,作为发现创新药物的重要技术手段之一,近年来也取得了很大的进展,2011年, Bon等^[33]以蛋白质/抑制剂共结晶的结构为基础,采用高通量虚拟筛选和个别对接(individual docking)等技术确定了有效的选择性 rab geranylgeranyl transferase (RabGGTase) 抑制剂,该抑制剂能抑制几个癌细胞株的增殖,且在外周血单个核细胞(PBMC cells)中不显示细胞毒性。2011年, Mai等^[34]建立了一个新的高通量肺结核药物筛选平台技术,该技术利用 mycobacterial-protein fragment complementation (M-PFC) 来识别在分枝杆菌中的蛋白质-蛋白质相互作用的小分子抑制剂。

高通量筛选作为药物筛选的一种方法,也有

其局限性。首先,高通量筛选所采用的主要是分子、细胞水平的体外实验模型,而任何模型都不可能充分反映药物的全面药理作用;其次,用于高通量筛选的模型是有限的和不断发展的,要建立反映机体全部生理机能或药物对整个机体作用理想模型,也是不现实的。但是,相信随着人们对高通量筛选研究的不断深入,随着对筛选模型的评价标准、新的药物作用靶点的研究和发现、以及对筛选模型的新颖性和实用性的统一,高通量筛选这一药物筛选新技术必将在未来的药物研究中发挥越来越大的作用。

2.4 进化踪迹(ET)与药物设计 进化踪迹(evolutionary trace, ET)方法已成为表征蛋白质的活性位点或功能表面,确定其具体功能残基的重要方法。当一个蛋白家族序列中有至少一个蛋白质结构已知时,通过对该蛋白家族在进化中的保守残基的研究,绘制这些保守残基在蛋白质结构中的空间位置,以探测蛋白质的活性位点。因此,ET方法可以充分利用已有的序列信息,有效地确定与亚家族具体功能相关的残基,从而最终构建蛋白质的序列-结构-功能关系。最近研究表明,进化了的重要残基在空间的簇聚是一种普遍现象,与支配结构和功能的残基具有协同作用^[35]。

拓扑异构酶 I (Topo I) 参与 DNA 代谢功能的全过程,该酶已成为设计新型抗癌药物的重要靶酶。确定新的药物结合残基对设计和优化新型拓扑异构酶 I 抑制剂有重要作用,2005年, Song等^[36]对真核拓扑异构酶 I 进行了多序列比对,并建立了进化树,用 ET 方法识别人拓扑异构酶 I 的重要功能残基,在先前研究的基础上,确定了 Topo I-DNA 复合物中新的药物结合位点,为以结构为基础的高通量筛选,合理设计新型先导化合物提供了基础。

羊毛甾醇 14 α -脱甲基酶(CYP51)是细胞色素 P450 超家族中的一员,是真菌生命周期中至关重要的酶,也是唑类抗真菌药物开发的重要靶标。基于目前所获得来自结核分枝杆菌的 MTCYP51 的晶体结构, Sheng等^[37]构建了来自白色念珠菌的 CACYP51 的三维结构模型,并成功地设计和合成了许多新型的 CACYP51 抑制剂。近来,他们又采用 ET 方法确定了 CACYP51 中与催化活性相关的重要残基和 CACYP51 特有的残基,并以此为靶分子设计,合成以真菌 CYP51 为靶标的抑制剂。

3 结语与展望

随着越来越多的与疾病有关的蛋白质结构的测定,基于结构的药物分子设计越来越受到重视,结构

指导的药物设计已经成为许多公司开发优良候选药物的重要方法。以与疾病相关的蛋白质分子结构为基础,通过高通量筛选和计算机辅助等方法,设计新型药物,其目标明确,可以大大地减少所筛选的化合物数目,加快药物分子开发的周期。然而,为了成功地设计一个新型的药物,除了研究配体与蛋白质的相互作用外,它在体内的吸收、分布、代谢、排泄和毒理方面的性质都是必须要考虑的因素。此外,有些靶标的蛋白质晶体结构也较难以获得,因此,以结构为基础的药物设计仍然是一个充满挑战的领域。

【参考文献】

- [1] Pastwa E, Somiari SB, Czyz M, *et al.* Proteomics in human cancer research[J]. *Proteom Clin Appl*, 2007, 1(1): 4.
- [2] Curcio E, Simone S, Gianluca DP. *et al.* Membrane crystallization of lysozyme under forced solution flow[J]. *J Membrane Sci*, 2005, 257(1-2): 134.
- [3] Zhang XM, Wei KG, Ma RY, *et al.* Precipitants and additives for membrane crystallization of lysozyme [J]. *Biotechnol J*, 2006, 1(11): 1302.
- [4] Zhang XM, Zhang P, Ma RY, *et al.* The study of continuous membrane crystallization on lysozyme [J]. *Desalination*, 2008, 219(1-3): 101.
- [5] 庞鸿宇, 刘丽英, 马润宇, 等. 木瓜蛋白酶动态膜结晶的实验研究[J]. *膜科学与技术*, 2010, 30(1): 30.
- [6] Xiao T, Takag J, Wang JH, *et al.* Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics[J]. *Nature*, 2004, 432(7013): 59.
- [7] 李俊君, 陈强, 李刚, 等. 微流控技术应用于蛋白质结晶的研究[J]. *化学进展*, 2009, 21(5): 1034.
- [8] 马建华, 仓怀兴. 空间蛋白质晶体生长新技术[J]. *生物物理学报*, 2009, 25(s1): 314.
- [9] Koide S. Engineering of recombinant crystallization chaperones [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2009, 19(4): 449.
- [10] Day PW, Rasmussen SG, Parnot C, *et al.* A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography [J]. *Nat Methods*, 2007, 4(11): 927.
- [11] Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor [J]. *Nature*, 2007, 450(7168): 383.
- [12] Korotkov KV, Pardon E, Steyaert J, *et al.* Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody [J]. *Structure*, 2009, 17(2): 255.
- [13] Lam AY, Pardon E, Korotkov KV, *et al.* Nanobody-aided structure determination of the EpsI:EpsJ pseudopilin heterodimer from *Vibrio vulnificus* [J]. *J Struct Biol*, 2009, 166(1): 8.
- [14] Uysal S, Vasquez V, Tereshko V, *et al.* The crystal structure of fulllength KcsA in its closed conformation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(16): 6644.
- [15] Sennhauser G, Grutter MG. Chaperone-assisted crystallography with DARPins [J]. *Structure*, 2008, 16(10): 1443.
- [16] Mio K, Maruyama Y, Ogura T, *et al.* Single particle reconstruction of membrane proteins: A tool for understanding the 3D structure of disease-related macromolecules [J]. *Progress Biophys Mol Biol*, 2010, 103(1): 122.
- [17] Fujiyoshi Y. Structural physiology based on electron crystallography [J]. *Protein Sci*, 2011, 20(5): 806.
- [18] Bill RM, Henderson PJF, Iwata S, *et al.* Overcoming barriers to membrane protein structure determination [J]. *Nat Biotech*, 2011, 29(4): 335.
- [19] Leulliot N, Tresaugues L, Bremang M, *et al.* High-throughput crystal-optimization strategies in the South Paris Yeast Structural Genomics project: one size fits all [J]. *Acta Crystallogr D*, 2005, 61(6): 664.
- [20] Kambach C. Pipelines, robots, crystals and biology: What use high throughput solving structures of challenging targets [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2007, 8(2): 205.
- [21] Luft JR, Snell EH, DeTitta GT. Lessons from high-throughput protein crystallization screening: 10 years of practical experience [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2011, 6(5): 465.
- [22] Leach AR, Gillet VJ, Lewis RA, *et al.* Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(2): 539.
- [23] Scapin G. Structural biology and drug discovery [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(17): 2087.
- [24] Arinaminpathy Y, Khurana E, Engelman DM, *et al.* Computational analysis of membrane proteins: the largest class of drug targets [J]. *Drug Discov Today*, 2009, 14(23-24): 1130.
- [25] Grey J, Thompson D. Challenges and opportunities for new protein crystallization strategies in structure-based drug design [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2010, 5(11): 1039.
- [26] 甘淋, 刘银坤. Stathm in 蛋白: 一个潜在的肿瘤标志物 [J]. *肿瘤*, 2010, 30(1): 73.
- [27] Taberner L, Aricescu AR, Jones EY, *et al.* Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships [J]. *FEBS J*, 2008, 275(5): 867.
- [28] Chrysina ED, Chajistamatiou A, Chegkazi M. From structure-based to knowledge-based drug design through x-ray protein crystallography: sketching glycogen phosphorylase binding sites [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(17): 2620.
- [29] Rosano C, Stec-Martyna E, Lappano R. Structure-based approach for the discovery of novel selective estrogen receptor modulators [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(8): 1188.
- [30] Morrow JK, Lei DC, Lu C, *et al.* Recent development of anti-cancer therapeutics targeting Akt [J]. *Rec Pat Anti-Cancer Drug Dis*, 2011, 6(1): 146.
- [31] Munikumar RD, Dhanaji AT, Seon HS, *et al.* Structure based design of heat shock protein 90 inhibitors acting as anticancer agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19(5): 1714.
- [32] Yuan YX, Pe JF, Lai LH. LigBuilder 2: A practical de novo drug design approach [J]. *J Chem Inf Model*, 2011, 51(5): 1083.
- [33] Bon RS, Zhong G, Anouk Stigter E, *et al.* Structure-guided development of selective rabggtase inhibitors [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(21): 4957.

