



DEL for

蛋白降解剂
开发

DNA和RNA
结合蛋白

G蛋白偶联受体
配体发现

药物分子优化

特定作用机制
的酶配体开发

RNA靶标
配体发现

蛋白相互作用
抑制剂发现

共价配体的
发现

激酶

无限可能

大环化合物



CONTENTS

目录

• DEL for 蛋白-蛋白相互作用抑制剂发现	01
• DEL for G蛋白偶联受体配体发现	04
• DEL for DNA和RNA结合蛋白	06
• DEL for RNA靶标配体发现	08
• DEL for 激酶	10
• DEL for 特定作用机制的酶配体开发	14
• DEL for 共价配体的发现	16
• DEL for 大环化合物	19
• DEL for 药物分子优化场景中的应用	23
• DEL for 蛋白降解剂开发	26
• DEL for 无限可能	30

DEL for 蛋白-蛋白相互作用抑制剂发现

蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 被认为是几乎所有生物过程的基础,在此基础上形成了复杂的相互作用网络,对这一互作网络的干扰或改变会导致潜在的生理紊乱或疾病。部分蛋白互作网络会参与肿瘤的发展,因而被认为是抗肿瘤靶点(图1)。因多种可能的复杂构象的存在和互作界面的特性,基于PPI的药物发现往往较为复杂。DNA编码化合物库 (DEL) 筛选是一种基于亲和力的小分子筛选,是PPI药物发现的强大工具。通过对目标PPI作用机制 (MOA) 的深入了解和筛选分组的合理设计,DEL能够筛选出具有所需MOA,甚至直接具有特定功能的高选择性的苗头化合物。

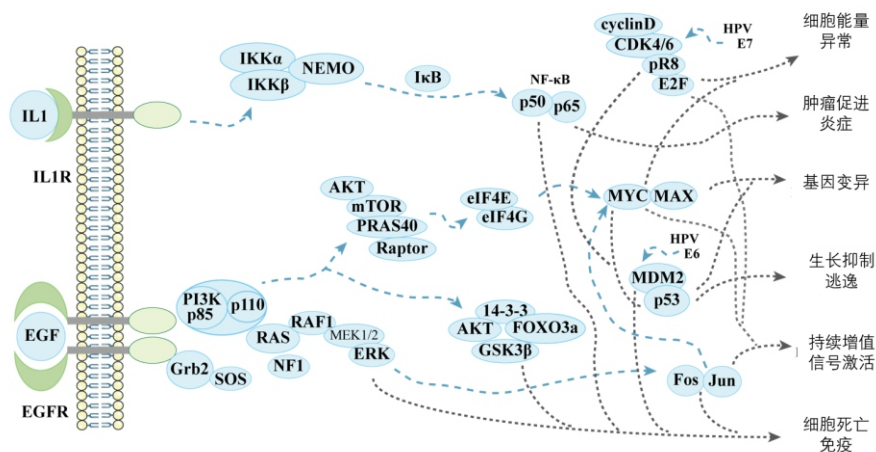


图1. PPI互作网络示例

» 直接筛选得到可干扰PPI的苗头化合物

PPI抑制剂发现面临的巨大挑战之一是小分子的结合特性与互作蛋白或小肽的结合具有较大不同,PPI的相互作用位点更多是浅而大的界面,而非深而特征明显的口袋,这为小分子的结合带来了一定难度。凭借DEL分子所提供的庞大的化学空间,成都先导深耕PPI抑制剂发现十余年,大量可以与靶点结合的化合物被证实为能够直接抑制PPI过程的干扰抑制剂。针对细胞因子及其受体之间相互作用的研究是治疗自身免疫和自身炎症性疾病的关键,成都先导通过DEL筛选找到的IL-17A配体,被验证能有效阻断IL-17A和IL-17RA相互作用,且此系列化合物在药化优化后被进一步提名为临床候选化合物(图2)。

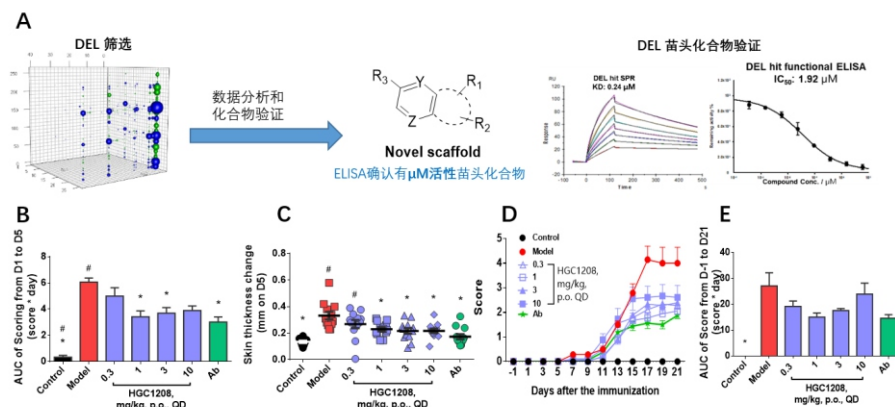


图2. A) 通过DEL成功鉴定直接作用于IL-17A: IL17RA互作的分子,DEL衍生的PPI抑制剂在IMQ诱导的银屑病模型(B、C)和EAE模型(D、E)中都显示作用

» “定制化筛选策略”:以功能为导向的苗头化合物发现

特定环境(如信号配体结合、辅助因子相互作用、pH值变化)导致的构象改变是最常见的PPI调节途径之一,如通过形成复合物调控下游通路信号传递,或者开关型结构域在辅助因子存在或不存在时随着结构域朝向的改变而“打开或关闭”等。长期以来,“定制化筛选策略”一直被用于PPI基于构象变化和功能调控的化合物鉴定中,在互作蛋白、辅因子、激活剂和抑制剂等不同场景下,靶点蛋白不同构象的筛选能够直接获得具有特定功能的选择性苗头化合物(图3)。

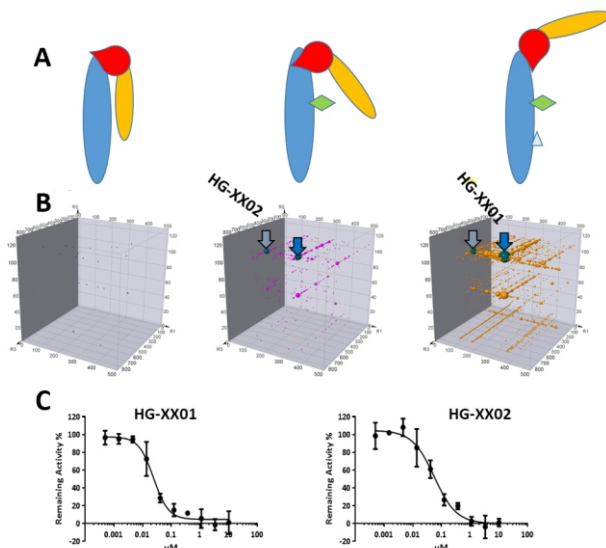


图3. A) PPI靶点存在不同辅助因子时的构象变化会带来不同的功能表现。B) 从DEL筛选出的不同系列苗头化合物具有构象选择性。C) 不同系列的苗头化合物的验证结果

» 特殊MOA作用分子的鉴定

在一些特定的情况下,由于存在多重调控路径,靶蛋白的PPI通路会较为复杂。一方面,靶蛋白可能与**互作蛋白1**形成异源二聚体,并进一步与**蛋白2**形成三元复合物,从而上调下游信号通路;另一方面,靶蛋白可能与**互作蛋白3**形成另一种异源二聚体,并上调旁路信号通路。通过让互作蛋白以不同的组合参与DEL筛选来反映所有实际生理过程中可能出现的情况,我们最终成功获得了一系列苗头化合物,其中一个苗头化合物可以与**靶蛋白-互作蛋白1**复合物结合。在后续进行的验证工作中,我们发现这种复合物结合分子可以稳定**靶蛋白-互作蛋白1**复合物,这一稳定剂的结合可以阻止三元复合物的进一步形成并阻止靶蛋白与**互作蛋白3**形成复合物。这是一种基于特殊MOA的双功能稳定剂,通过稳定靶蛋白特定状态来抑制其作用(图4)。

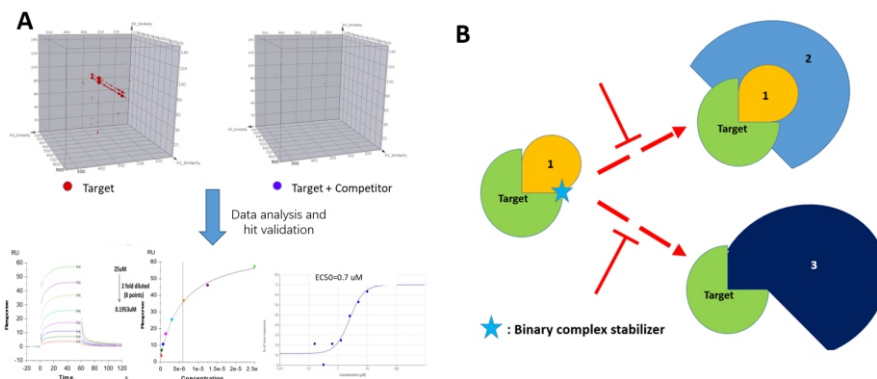


图 4. A) 一系列通过DEL鉴定并通过正交方法确认的苗头化合物。B) 进一步的MOA研究表明,在苗头化合物存在的情况下,基于特殊MOA的两个PPI互作路径均受到了干扰

成都先导的蛋白互作靶点筛选

在成都先导的PPI筛选中，基于靶蛋白自身特性制定的DEL筛选方案对筛选成功起着决定性作用，通过引入不同的互作蛋白（或其他分子）来尽可能模拟靶蛋白的不同构型和不同生理过程中的状态的“定制化筛选策略”（图5），加上成都先导万亿级DNA编码化合物库，大量具有良好选择性、优秀的活性的苗头化合物被鉴定，助力PPI药物研发。

靶点	加入的试剂	靶点蛋白形式
	互作蛋白 	
	互作蛋白 	
	互作蛋白 	
	结合的小分子/小肽/辅因子 	

图5. DEL筛选中PPI靶点可能的筛选分组设计

DEL for G蛋白偶联受体配体发现

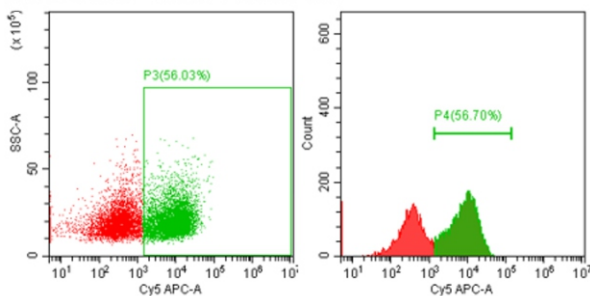
G蛋白偶联受体 (GPCR) 是一种具有典型的7个跨膜结构的多跨膜蛋白。它构成了一个大类的药物靶点家族, 已有多种药物上市。鉴于制备具有正确构象的纯化蛋白有一定困难, 传统的GPCR配体发现大多利用基于细胞的高通量筛选和虚拟筛选, 在较少的情况下, 利用纯化蛋白进行筛选。DNA编码化合物库 (DEL) 的筛选也在GPCR配体发现中有广泛应用, 成都先导也采用了各种筛选方法来进行GPCR配体的发现。

» 基于细胞的筛选

基于细胞的DEL筛选已经被应用于GPCR靶点, 特别是对于难纯化制备的靶点。DEL筛选的结合解离平衡过程主要是由靶标浓度主导, 因此, 细胞表面靶蛋白的表达量是筛选成功的关键。已有文献对GPCR靶蛋白表达水平和DEL分子富集比进行了直接比较 ([ACS Comb Sci. 2015 Dec 14;17\(12\):722-31](#)), 当表达量低于某个水平时, 即使是nM亲和力的配体也无法被富集。此外, 细胞表面蛋白的复杂性也加深了细胞筛选的难度, 对于常规的基于蛋白质的筛选, 靶标纯度可以被视为100%, 然而, 对于基于细胞的筛选, 由于细胞表面各种其他蛋白的存在, 靶标纯度可能低于1%。

虽然基于细胞的GPCR筛选有较大难度, 但成都先导已在此方面进行了验证。通过在HEK293细胞上过表达靶GPCR, 同时制作了一个阳性配体-DNA偶联物来进行筛选条件验证, 并作为DEL筛选的阳参 (图1)。DEL筛选富集了相对较弱的信号, 信号对应的化合物被验证为具有 μ M效力的拮抗剂。

A. 细胞准备和靶蛋白表达检测



B. 阳性配体-DNA偶联物在DEL筛选中的富集

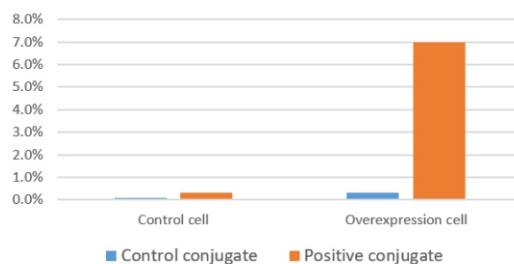


图1. A) 流式细胞实验确认了靶标GPCR的过表达。B) 在DEL筛选中成功富集了阳参DNA偶联物

» 基于细胞膜的DEL筛选

准备高GPCR过表达细胞是耗时且相对难以实现的, 因为高外源蛋白的表达可能对细胞造成影响且有时会阻碍细胞增殖。作为替代方案, 基于细胞膜的筛选为GPCR的配体筛选提供了新的方案。GPCR在细胞膜中保持了其自然的构象, 同时通过增加细胞膜量和标签固定等策略可进一步提高靶点量, 并节省了从细胞膜中将蛋白纯化出来的工序。成都先导已经验证了基于细胞膜的GPCR DEL筛选, 同时在实验中平行引入了去垢剂稳定的纯化蛋白筛选作为比较, 两种筛选都富集了类似的DEL信号, 且相应的化合物被验证为纳摩尔亲和力的结合分子 (图2)。

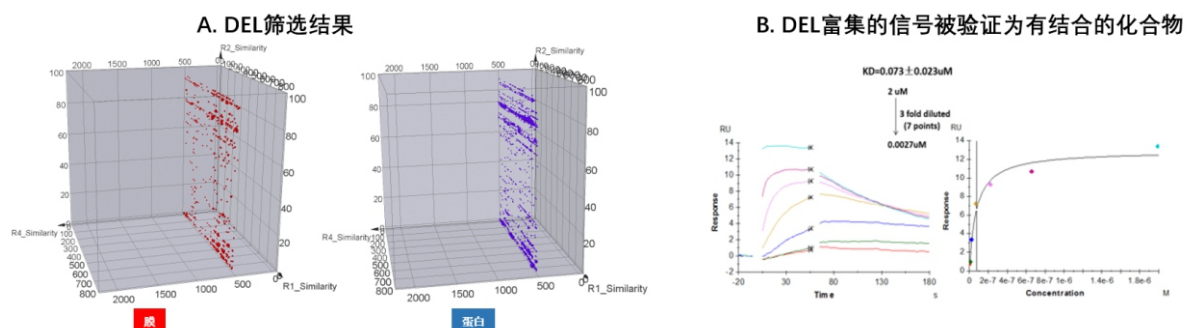


图2. A) 基于细胞膜和蛋白的筛选富集了类似的信号。B) SPR验证DEL筛选的化合物为纳摩尔亲和力的化合物

» 基于纯化蛋白的DEL筛选

由于跨膜区的疏水性，GPCR在水相溶液中易沉淀。因此，需要采用去垢剂、纳米盘和其他颗粒材料等不同策略来稳定蛋白使其在水溶液中保持正确的结构。去垢剂为GPCR提供了疏水保护，并在无脂质系统中保持蛋白质的正确构象，然而，去垢剂必须保留在下游的应用过程中以维持GPCR的构象。纳米盘为GPCR提供了和细胞膜更类似的环境，有时也能用来稳定一些更难制备的蛋白，但制备过程更耗时，同时纳米盘结构蛋白上的结合分子也需要在筛选中进行排除。成都先导已经进行了多次去垢剂/纳米盘稳定的GPCR筛选，采用光GPCR或与G蛋白复合物的GPCR进行筛选，鉴定了多种针对不同GPCR靶标的激动剂或拮抗剂。

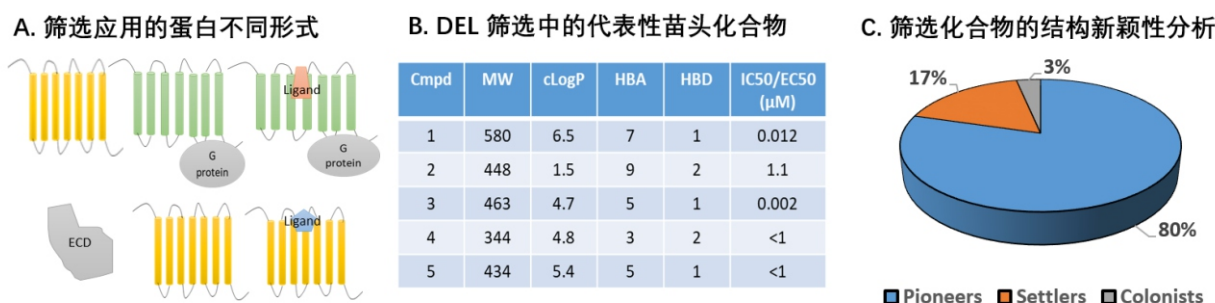


图3. A) 在DEL筛选中使用的GPCR的不同形式。B) DEL筛选中的代表性苗头化合物的化学性质和活性。C) DEL苗头化合物的结构新颖性分析，分析方法参考文献([ACS Med Chem Lett. 2020 Nov 12; 11\(11\): 21142119](#))

成都先导的GPCR DEL筛选

上述方法提供了GPCR DEL筛选的多种策略。基于纯化蛋白的筛选往往能提供更高的靶标浓度，且结合过程在更简单的环境中进行。如果可以获得稳定的纯化蛋白，那基于蛋白的筛选是GPCR配体发现的优先选择。如果纯化蛋白难以制备，那基于细胞膜和细胞的DEL筛选是可考虑的筛选策略。基于细胞的筛选使靶标蛋白保持在了天然的细胞状态中，不需要任何额外的蛋白制备操作，同时保留了互作蛋白和辅因子的相互作用，是GPCR筛选的理想状态，但靶蛋白高表达的细胞制备可能难以达到。因此，基于细胞膜的筛选提供了另一个方案，在此状态下靶点保持在天然的细胞膜中，同时可以通过后续操作富集靶蛋白提高靶点浓度。

成都先导在GPCR筛选方面有着丰富的经验，提供多种针对不同GPCR的DEL筛选策略，根据靶点本身的特征量身定制筛选方案，助力GPCR配体发现和药物开发：

- 细胞/细胞膜/蛋白模式提供了多种筛选方式。
- 不同的蛋白区域和形式使筛选得以区分不同的结合位点或激动/拮抗机制的化合物。
- 大的DEL库为筛选成功提供了保障，尤其是孤儿受体等无已知配体的GPCR。
- 快速筛选时间和多成功案例。

DEL for DNA和RNA结合蛋白

DNA编码化合物库(DEL)筛选已应用于多种靶标,并有多个候选化合物进入药物开发的不同阶段,但鉴于DEL分子中的DNA标签的存在,DNA或RNA结合蛋白(如转录因子、解旋酶、聚合酶、核酸酶、染色质重塑复合体等)在DEL筛选中的应用仍被质疑。为了解决DEL DNA标签可能的干扰,成都先导在筛选条件优化和数据分析算法方面做出了巨大努力,这些实践加上公司万亿级规模的DEL和十余年的DEL经验,为DNA或RNA结合蛋白的配体发现提供了有力的手段。

» 转录因子的DEL筛选

转录因子参与多种生物过程,是基因表达调控的重要系统。转录因子通常被认为是具有挑战性的靶标,因为一方面它们通常缺乏内源配体(核受体除外),涉及蛋白-蛋白/蛋白-DNA的相互作用,另一方面相互作用位点大、平且瞬时。转录因子的DNA结合域可能会结合DEL DNA,从而使DEL筛选变得更加复杂。为了解决这些问题,成都先导在DEL筛选中采用了一系列应对手段,包括使用不同的结构、突变体、选择性靶标、DNA封闭等方法可以去除此干扰因素(图1)。

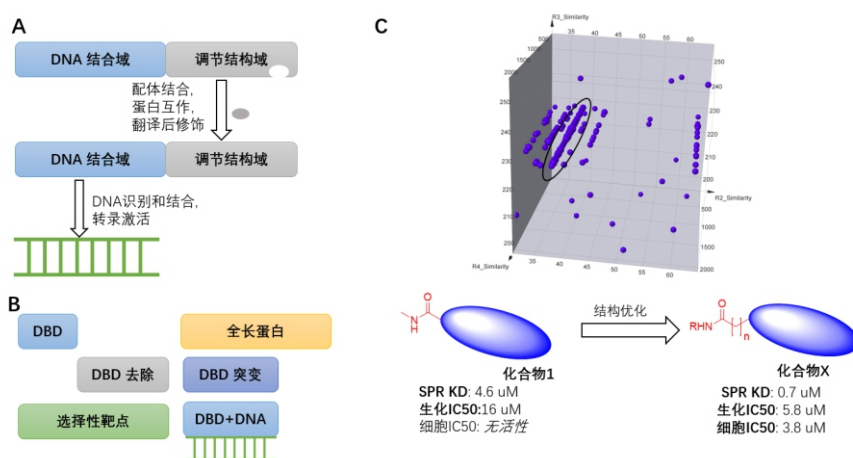


图1. A) 转录因子的作用示意图。B) 筛选中用到的不同的蛋白形式。C) 代表性转录因子筛选信号和苗头化合物作用

» DNA解旋酶的DEL筛选

DNA解旋酶以ATP依赖性方式解开DNA结构,在DNA复制和修复过程中至关重要。其功能紊乱会导致基因组的不稳定及癌症的发生,因此是一类重要的治疗靶点。DNA解旋酶和DEL DNA的结合也带来潜在的高筛选背景和假阳性信号,通过定制的筛选策略,成都先导对多个解旋酶靶标进行了DEL筛选,发现了不同系列的具有良好选择性的苗头化合物(图2)。

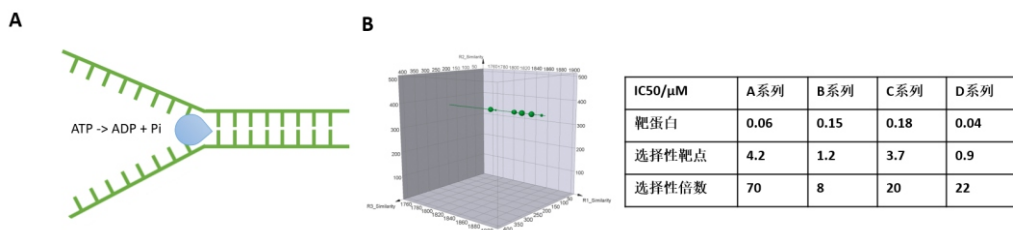


图2. A) DNA解旋酶的作用示意图。B) 代表性解旋酶筛选信号和苗头化合物作用

» DNA聚合酶的DEL筛选

DNA聚合酶在链式反应中催化DNA的合成,其突变或功能紊乱与人体多种疾病相关,同时也是抗微生物药物开发的一大药物靶标类型。通过对DNA底物 and 不同配体的筛选条件的精心设计,我们已经找到了多个具有良好酶抑制活性和选择性的药物(图3)。

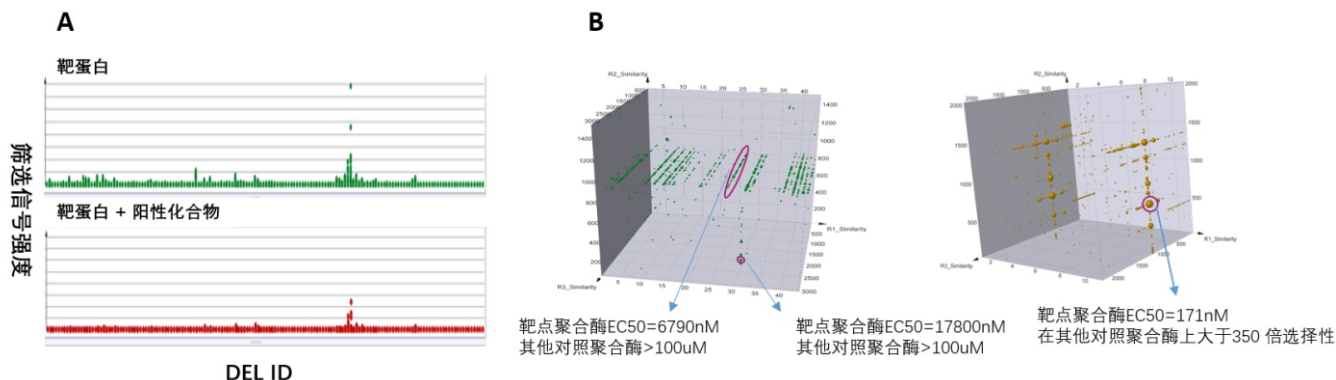


图3. A) DNA聚合酶靶点筛选的信号示意。B) 代表性筛选信号和苗头化合物作用

» 计算方法助力“大海捞针”

将真正结合的小分子从靶点与DEL DNA亲和力和所产生的噪音中成功区分出来对配体发现至关重要。我们通过分析DNA标签中具有随机碱基片段的唯一分子标识符 (Unique Molecular Identifier) 序列以识别靶点样本中特异富集的DNA的片段,从而全面了解整体DNA结合水平。此外,我们还深入研究了DEL分子的结构-信号关系,从而区分出由共同的DNA片段结合而不是小分子药效团富集的信号。这一严格的过程确保能够最大限度地减少假阳性,提高配体发现的精确度。

» 核酸酶和RNA结合蛋白的DEL筛选

DNA酶会切割DNA,长期以来一直被认为与DEL筛选不相容。经过不懈努力,成都先导通过引入使DNA降解活性丢失的突变体和调控催化所需的特定金属离子,对核酸酶靶标进行了DEL筛选。

RNA结合蛋白包含RNA解旋酶、RNA酶、RNA依赖的RNA聚合酶以及其他RNA处理/转运蛋白等。通常,可以通过评估RNA结合蛋白的DNA结合亲和力来评估DEL筛选的潜在干扰,在解决了DNA结合蛋白的筛选问题后,RNA结合蛋白的筛选也就迎刃而解了。成都先导也成功筛选了多个RNA结合蛋白靶点并获得活性苗头化合物。

成都先导对核酸结合蛋白的筛选

成都先导处于DEL筛选的最前沿,致力于攻坚挑战性靶点的筛选,提升靶点筛选的命中率。对于DNA和RNA结合蛋白筛选项目,欢迎与我们的筛选专家联系,我们将最大限度地提高配体开发的成功率:

- DNA结合化合物在筛选中被排除
- 涵盖各种靶标类型的综合筛选解决方案
- 用专有算法对DNA结合导致的假阳性进行二次排查
- 久经考验的筛选经验和成功案例

DEL for RNA靶标配体发现

虽然传统上蛋白一直是药物发现的主要靶点类型，但现在这个领域正在迅速发展和变化。由于RNA干扰技术的进步和像Risdiplam这样的小分子药物的开发，RNA靶标逐渐引起了人们的重视。尽管RNAi药物取得了进展，但由于小分子独特的优势，如细胞渗透性、稳定性和能够调节广泛生物学目标的能力，小分子仍然是药物发现中的重要组成部分。然而，将DNA编码库(DELs)这种强大的小分子配体发现工具应用于RNA靶点仍存在不少挑战。成都先导的DEL技术处于这些努力的前沿，引领DEL技术在RNA靶标的小分子配体的发现上的应用。

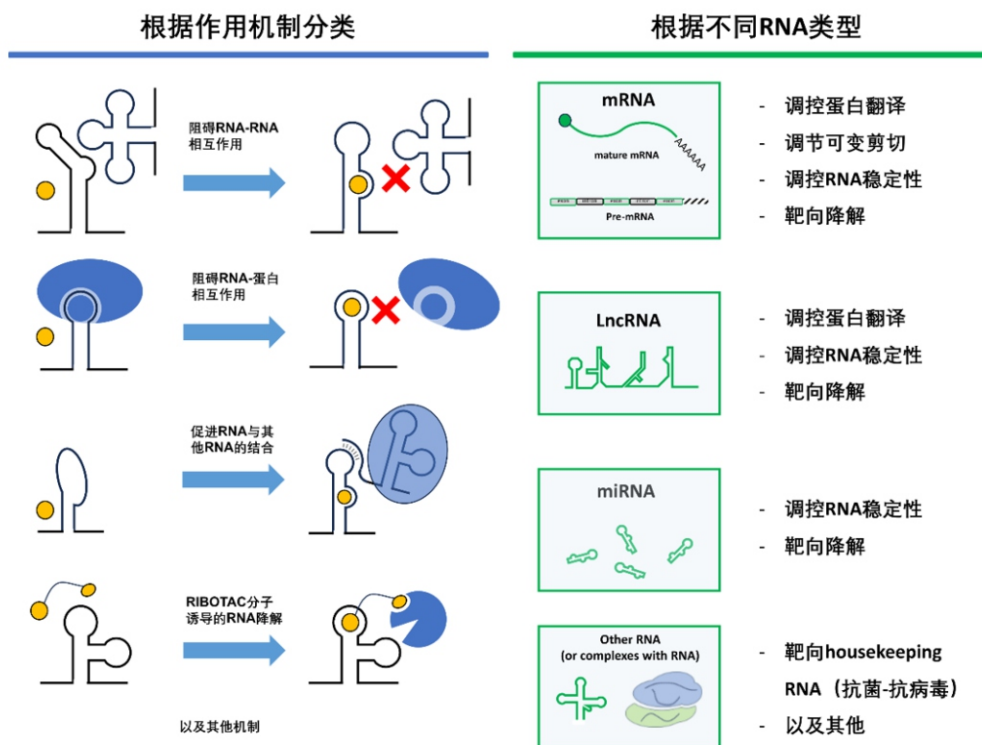


图1. 靶向RNA的小分子药物发现 (根据机制和RNA类型分类)

» RNA的DEL筛选: 当前的挑战

RNA结构的动态性质: 众所周知，RNA分子具有动态特性，通常会形成复杂的二级和三级结构。这些结构会受到某些DEL筛选缓冲液的影响，使得某一种构象比其他构象更稳定。这可能会导致筛选富集信号来源于某种生理条件下并不会广泛存在的RNA构象，因此这些信号很难在下游实验中被验证。

DNA标签与RNA靶标之间的相互作用: DEL依靠基于亲和力的方法发现配体。然而，DEL的DNA标签与RNA靶标之间的相互作用会产生大量假阳性信号。这个由于DNA与RNA相互作用带来的干扰，阻碍了DEL在RNA靶标配体发现上的广泛应用。

未充分开发的RNA配体化学空间: 与蛋白结合分子相比，人们对与RNA结合的化合物化学空间了解相对有限。RNA配体的化学空间在很大程度上仍未得到充分开发，这为鉴定RNA靶点的有效小分子配体带来了挑战。

成都先导的DEL技术:引领RNA靶标的小分子配体发现

成都先导的DEL技术旨在克服这些挑战,并使RNA靶标的小分子配体发现变得有效。我们的方法包括:

- **综合评估不同筛选条件下的RNA构象:**在筛选实验之前,我们使用基于测序的方法对不同条件下的RNA结构进行评估。这使我们能够识别和选择对RNA折叠影响较小的筛选条件,确保在筛选过程中RNA靶标结构的前后一致性。
- **创新的筛选和信息学方法来控制DNA:RNA相互作用在DEL筛选过程中的干扰:**我们使用诸如添加竞争寡核苷酸,竞争性洗脱等策略,结合我们的专有算法来消除DNA:RNA相互作用的影响。
- **成都先导的万亿级化合物库:**成都先导的万亿级化合物库化学空间巨大,针对RNA靶标,并未将RNA配体的结构限制在传统意义的化学空间上,增加了发现靶向RNA小分子配体的可能性和多样性。
- **合作和透明的伙伴关系:**在成都先导,我们相信合作的力量。我们与合作伙伴紧密合作,以确保RNA项目的成功。透明的合作方式意味着我们与合作伙伴公开分享数据,以加速发现并推动项目进展。

DEL筛选小分子靶向RNA的案例展示

我们的平台已经在RNA靶标的小分子配体发现中验证了良好的结果。我们还在《Nucleic Acids Research》杂志上发表了本文中提到的详细方法(Nucleic Acids Res. 2022 Jul 8;50(12):e67.)。以下是我们成功项目的一些例子:

► **结合E. coli FMN Riboswitch的小分子化合物:**FMN riboswitch是一类通过响应环境变化来调节基因表达的RNA元件,从而在控制细菌生长中起着关键作用。我们的平台已经成功地识别出靶向E. coli FMN riboswitch的新型小分子化合物,这些化合物与阳参ribocil C相比作用相当(图2)。这些发现不仅验证了我们针对RNA靶标的DEL筛选方法,同时也为抗菌剂开发开辟了有效的新途径。

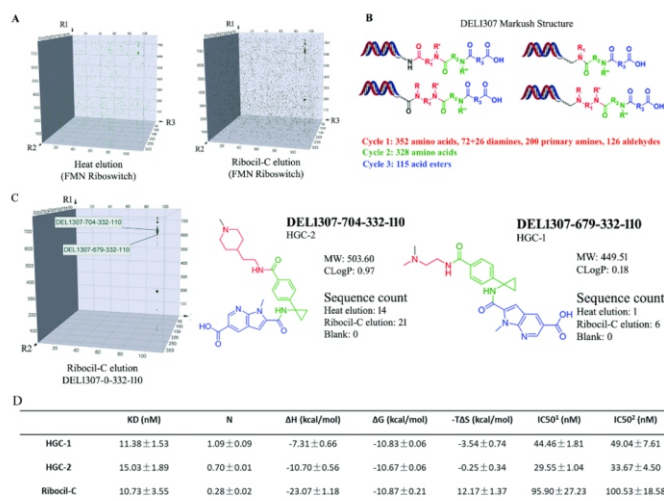


图2. A-C)DEL筛选的代表性富集信号和DEL分子结构,D) DEL鉴定的苗头化合物的ITC和FMN竞争结果

► **高选择性的RNA小分子化合物:**在一个合作项目中,通过精巧的设计和条件优化,以及选择性靶标的平行筛选,我们成功找到了特异结合RNA靶标的小分子配体,且配体显示出了对特定RNA(单碱基差异)的选择性。因为此合作项目的保密性目前数据未公开,但这是我们平台在应对RNA配体发现复杂挑战能力的一个见证。这次项目体现了我们与其他平台合作的能力,对保密性和数据安全的重视,同时取得了显著的结果。

成都先导的DEL技术提供了RNA靶标小分子配体发现的无限可能。联系我们的专家团队,帮助您解锁RNA靶标在药物发现项目中的全部潜力。

DEL for 激酶

作为最庞大且功能多样的基因家族之一，激酶被公认为是关键的生物信号网络调控因子。在过去的20年中，超过30%的药物开发将激酶作为靶标。截至2024年1月，美国食品药品监督管理局 (FDA) 已批准了90多种小分子激酶药物，同时大约有200种可口服给药的蛋白激酶抑制剂正处于临床实验阶段。这些化合物对肿瘤和非肿瘤疾病的治疗均产生了重大影响。在FDA批准的小分子激酶药物中(图1 A)，超过50种被归类为多靶点药物，占市场上激酶药物的大多数。尽管多靶点方法提供了更广泛的治疗范围，并通过作用于多个相关通路增强了治疗的灵活性和效率，但也存在潜在的缺点，比如由更广的活性谱带来的脱靶效应和毒性风险会使药物的副作用应对及患者护理更加复杂。FDA批准的药物中只有不到40种是单靶点激酶药物，它们作用于如EGFR(表皮生长因子受体)、BTK(布鲁顿酪氨酸激酶)、BCR-ABL(断裂点簇集区-埃布尔森蛋白)等关键激酶靶点，展现了针对特定疾病通路的精确靶向能力，并因其特异性为多种疾病提供了潜在副作用更少的靶向治疗方案。根据Cortellis CCI的数据显示，2023年有15种激酶药物的销售额超过了10亿美元，其中包括2种BCR-ABL抑制剂、3种CDK4/6(周期蛋白依赖性激酶4/6)抑制剂、2种BTK抑制剂、3种JAK(Janus激酶)抑制剂，以及分别靶向于EGFR、BRAF(快速加速性纤维肉瘤B型)、ALK(间变性淋巴瘤激酶)、MET(间质表皮转化因子)、VEGFR(血管内皮生长因子受体)的5种抑制剂(图1B)。销售额最高的三款药物，即Ibrutinib、Palbociclib和Ruxolitinib，都是首创类药物(First-in-Class)。此外，2015年上市的Alectinib已成为治疗ALK阳性非小细胞肺癌的最佳类药物(Best-in-Class)；2017年上市的Abemaciclib有望超越Palbociclib，成为治疗ER-/HER2-(雌激素受体阴性/人表皮生长因子受体2阴性)乳腺癌的最佳类药物。

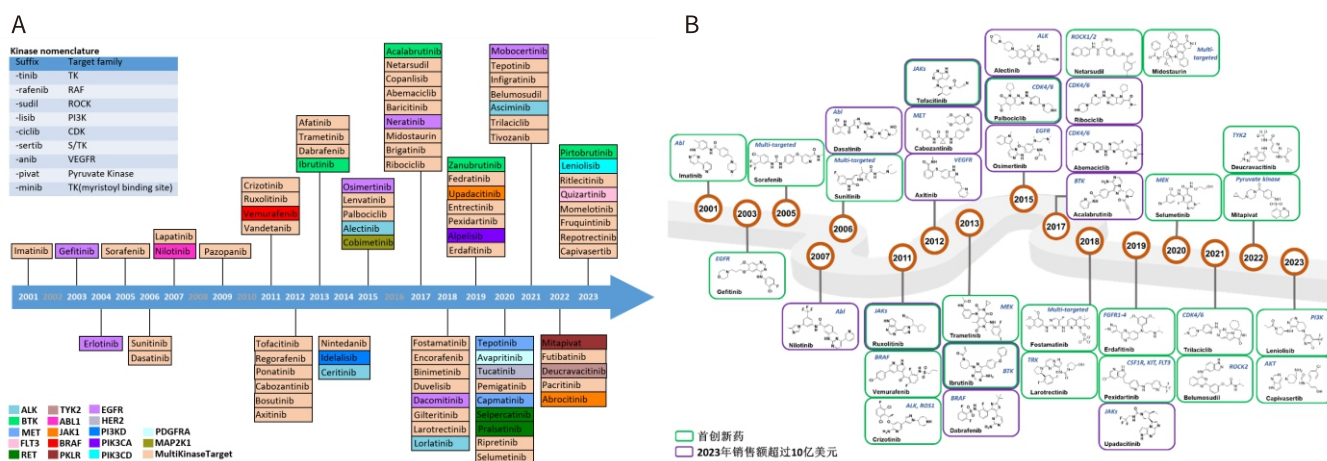


图1. 2001年至今FDA批准的激酶药物, A) 根据靶点类型归类展示。药物按批准年份排序, 其靶点通过不同颜色表示。B) 代表性激酶药物结构。首创类药物用绿色框出, 2023年销售额超过10亿美元的药物用紫色框出, 且标注了主靶点

激酶抑制剂发现的关键挑战

» 选择性

由于不同激酶的ATP结合位点结构高度同源，因此实现选择性并规避脱靶相互作用一直是激酶抑制剂设计中的一项重大挑战。虽然同时抑制多种蛋白激酶，通过针对多个靶标可能带来潜在的优势，然而这种策略往往伴随着增加毒性的风险和期望的副作用。例如，第一代JAK抑制剂（如Tofacitinib、Ruxolitinib、Baricitinib、Peficitinib和Delgocitinib）是广谱JAK抑制剂，它们与JAK1、JAK2、JAK3和TYK2的相互作用模式相似，都是结合在由残基L881、A906、V938、L959和L1010（基于JAK1编号）组成的疏水口袋中并与铰链区的残基形成氢键（图2A）。这些非选择性抑制剂靶向多种JAK家族激酶并阻断多条相关信号通路，会导致包括感染和贫血在内的严重副作用。不过通过持续研发，目前已批准了几种第二代JAK抑制剂（图2B），它们选择性地抑制JAK家族成员，从而抑制特定疾病相关信号通路，同时保留其他细胞因子的功能。

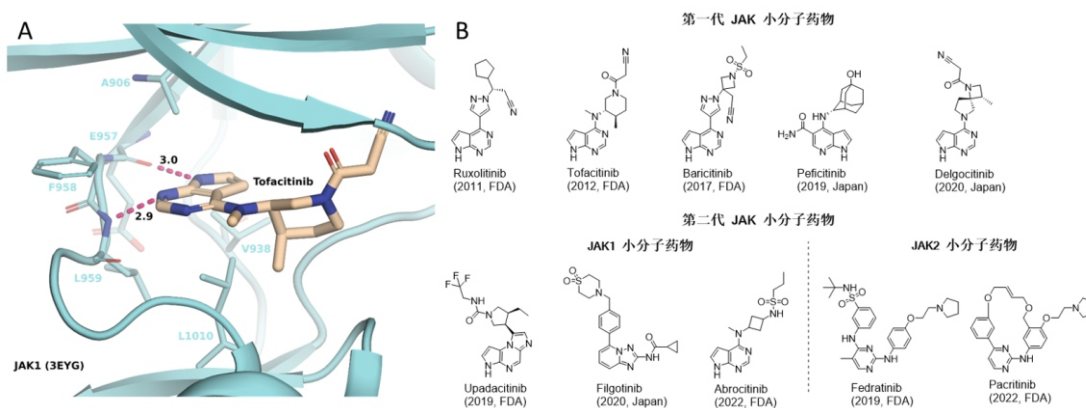


图2. A) Tofacitinib与JAK1的铰链区残基形成两个氢键 (PDB:3EYG) ; B) JAK代表性小分子药物的化学结构

» 抗药性

随着激酶突变体的出现，激酶抑制剂的疗效降低，因此新一代的抑制剂研发迫在眉睫。利用下一代测序技术检测驱动突变以及对突变体的结构分析揭示了潜在的药物设计策略。以EGFR为例，第一代和第二代抑制剂已被批准用于非小细胞肺癌的治疗。然而，T790M 突变会增加对 ATP 的亲合力，从而产生抗药性并使抑制剂失效，第一代和第二代抑制剂的失效促使了第三代共价抑制剂的开发，特异性地靶向T797位的半胱氨酸（图3）。然而，新的抗性突变体C797S的出现破坏了共价结合。目前，迫切需要能够克服 C797S 突变的第四代EGFR抑制剂，而这种抑制剂仍处于开发阶段。因此，对于发现和开发针对突变体的激酶抑制剂，同时保持对激酶谱良好的选择性，亟需有效的苗头化合物发现工具。

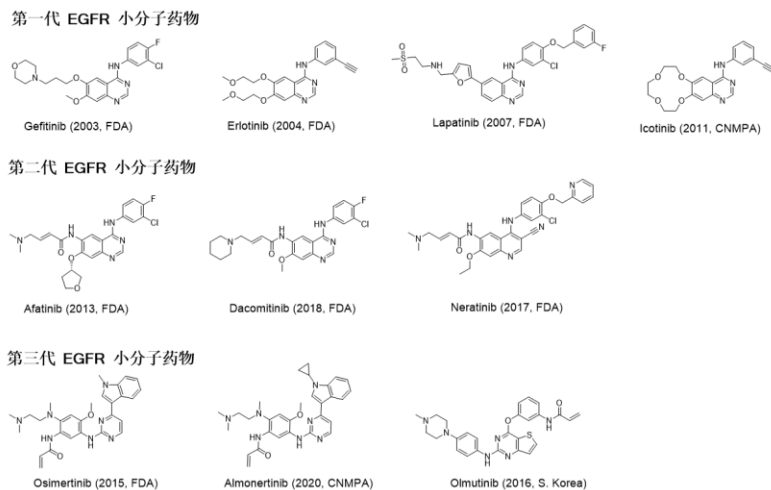
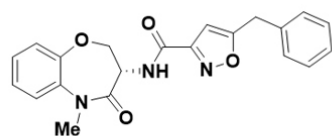
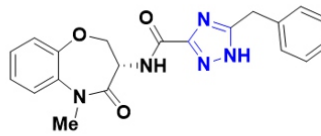


图3. EGFR代表性小分子药物的化学结构

DNA编码化合物库(DEL) 技术作为一种对筛选靶点结构无特殊要求和预知的方法,能够同时筛选十亿至万亿个不同的分子,能找出与激酶功能域(包括异构位点)有选择性结合的化合物。受体相互作用蛋白激酶1(RIPK1) 抑制剂的发现就是一个例子,通过对DEL筛选得到的先导化合物进行小幅优化,候选化合物GSK2982772进入了临床试验阶段(J. Med. Chem. 2017, 60, 4, 1247–1261) (图4)。事实上,通过 DEL 筛选发现激酶抑制剂已经获得了很大的发展,这一点从许多成都先导合作伙伴的激酶抑制剂发现项目中可以得到证明。我们对激酶生物学的全面理解和丰富的筛选数据为发现更多强效选择性激酶抑制剂提供了非常有效的途径。



从DEL筛选得到的RIPK1抑制剂 GSK481
RIP1 FP IC₅₀: 10 nM
ADP-Glo IC₅₀: 1.6 nM
LogD: 5.9, 大鼠AUC: 0.38 µg.h/ml
318和456个激酶的测试中显示出完全的特异性



在临床II期的RIPK1候选化合物GSK2982772
FP/ ADP-Glo IC₅₀: 1.0 nM
LogD: 3.8, 大鼠AUC: 2.3 µg.h/ml

图4. 在DEL筛选中发现的RIPK1抑制剂及其向临床候选化合物的优化

» “定制化筛选策略”:实现先导化合物的高选择性

DEL 技术的主要优势之一是可以同时进行多个筛选实验。利用我们的“定制化筛选策略”,可以在一开始就确定 DEL 化合物对不同激酶的选择性。例如,一个酪氨酸激酶靶点有多个同族亚型,它们共享一个高度保守的羧基末端激酶结构域和一个相对独特的氨基末端结构域。为了使先导化合物对该特定激酶具有良好的选择性,我们在 DEL 筛选中加入了四个密切相关的激酶(A-D)作为阴性筛选样品。过滤掉所有重叠的结合分子后,就可以选择特定的结合分子进行合成和验证。图5显示了这五个样本的筛选结果和化合物验证,证实了它们具有良好的活性和选择性。

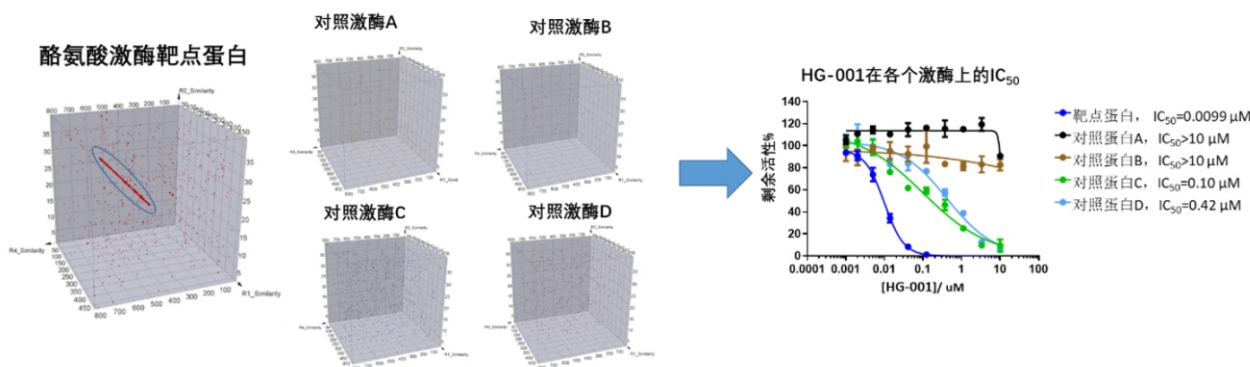


图5. 在DEL筛选中包含靶点蛋白与对照蛋白以筛选得到高选择性抑制剂

» 基于不同MOA(结合机理)和突变体选择性的激酶抑制剂发现

激酶抑制剂作为一类成熟靶点的药物,已被用于治疗各种类型的疾病。当前对于激酶抑制剂研发,独有的 MoA将是新的突破口。有了占据特定口袋的强效工具化合物,我们就能对口袋/结合位点的结合性质进行精确定位(图6A),并在 DEL 筛选过程中,将与 DNA 标签适当连接的工具化合物用作内参化合物,以评估筛选过程中口袋的可及性。此外,通过同时对野生型和突变体蛋白进行筛选且将已知作用机制的工具化合物用于区分可能的结合位点,我们在DEL筛选中也成功鉴定到了突变体选择性的苗头化合物(图6B)。

A

化合物	DEL 系列1中的代表性化合物, ATP 结合位点	DEL 系列2中的代表性化合物, 别构结合位点	DEL 系列3中的代表性化合物, 别构结合位点
靶点激酶, Ki	23nM	10nM	36nM
对照激酶, Ki	163nM	>686nM	无抑制
选择性比例	7	>68	绝对选择性

B

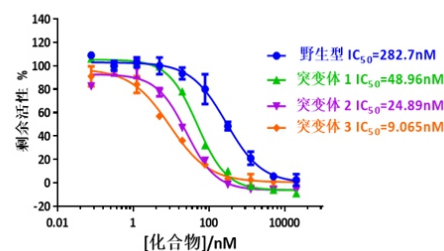


图6. 通过DEL筛选快速获得拥有特殊MOA (A) 和突变体高选择性 (B) 的抑制剂

针对不同类型激酶的催化域或调控域筛选策略制定

激酶可根据其磷酸化底物的不同进一步分类, 我们也对筛选过的激酶类型进行了总结 (图 7A)。无论其亚型如何, 几乎所有激酶都具有相似的催化结构域, 许多激酶还含有调控结构域。因此, 激酶抑制剂发现的一个基本问题是以催化结构域为靶点, 还是以调控 (非激酶) 结构域为靶点。

脂质激酶: 脂质激酶与蛋白激酶的内在结构差异为成功获得选择性抑制剂提供了可能。脂质激酶的调节亚基可能含有潜在在小分子抑制剂的结合口袋, 这为筛选新型激酶抑制剂提供了良机, 不仅因为结合口袋的可及性, 而且通过避免针对更保守的催化结构域, 可使化合物具有更好的选择性。

假激酶: 假激酶结构域通常具有与含催化活性的激酶结构域相似的三维结构, 这使它们成为 DEL 筛选的潜在目标。占据 ATP 结合位点的竞争性配体可能会导致下游通路中断, 而异构配体引入的构象变化也可能阻断下游信号传导和调控, 同时, 这些配体也可以用于进一步开发成靶向蛋白降解剂。通过关注非催化假激酶结构域, 成都先导发现了多个系列的苗头化合物, 这些化合物后来被证实能够直接对下游调控通路实现干扰 (图 7B)。

A

激酶类别	占比	代表化合物的蛋白活性
丝氨酸/苏氨酸激酶	56%	1.9 nM
酪氨酸激酶	21%	5.4 nM
脂质激酶	15%	4.9 μ M
丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶	5%	1.4 nM
假激酶	3%	4.8 nM

B

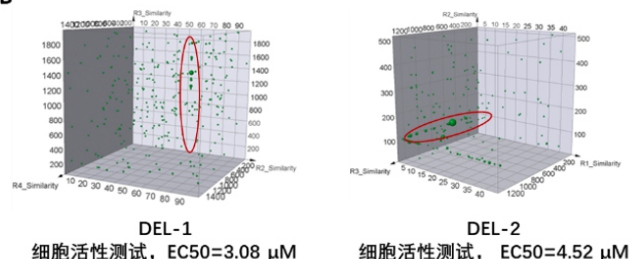


图7. A) 成都先导筛选过的激酶类型分布及代表性化合物的活性; B) 假激酶筛选实例

成都先导的激酶DEL筛选

全新激酶抑制剂发现的关键在于化合物的有效性、选择性、新颖性和专利性。凭借我们专有的万亿级DEL库、丰富的筛选经验、长期积累的筛选数据, 使用成都先导的DEL筛选服务, 不仅保证了快速经济的激酶抑制剂发现, 也保证了高成功率的筛选结果。

DEL for 特定作用机制的酶配体开发

基于酶本身催化化学反应、活性位点及结合口袋的结构特性，酶一般被认为是更能被小分子化合物所靶向的靶点。随着生物化学和酶学的发展，对于酶类靶点的筛选已经日趋成熟和完善。相对于传统的高通量筛选 (HTS)，DNA 编码化合物库 (DEL) 的筛选有着独特的优势，尤其是对多底物的酶，其结合口袋的不同构象可以在DEL筛选中同时被探索，从而能够鉴定和优化得到具有更好作用机制 (MOA) 的差异化配体。针对激酶和其他DNA结合酶的DEL筛选在“DEL for”系列其他文章中已经进行了详细的阐述，在本篇，我们主要着眼于有独特催化机制的多底物酶，以及结合口袋对结合化合物有着特定倾向结构的酶。

对于定向结合顺序酶的DEL筛选

虽然基于酶活的筛选能够直接筛到有酶活调节作用的苗头化合物，但基于亲和力的DEL筛选有着独特的优点：提供独特MOA的化合物以确保更好的药物疗效。对于靶点酶学特性的全面理解是有效药物筛选的基础，尤其是针对特殊机制多底物反应的酶。例如Naa50，此蛋白对底物有着定向结合顺序，其只能先结合乙酰辅酶A，之后才能结合第二个底物，催化乙酰基的转移。基于对酶学特性的详细探索，我们设计了针对靶点不同状态的筛选方案，从而获得了具有高活性的苗头化合物 ([ACS Med Chem Lett.2020 Apr 10;11\(6\):1175-1184](#), 图1)。

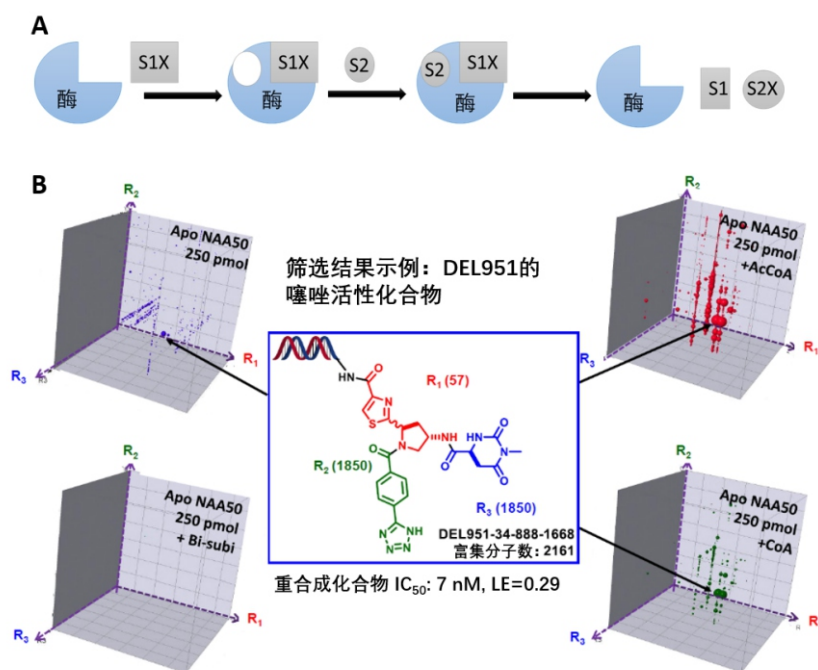


图1. A) 定向结合顺序的酶反应机制。B) 从DEL筛选中得到具有独特作用机制的Naa50抑制剂

对于乒乓反应机制酶的DEL筛选

乒乓反应是酶催化反应中的一个典型机制，其催化反应可以分成两个部分：第一个底物同靶点结合后被催化反应，形成酶-X基团的中间体，释放出第一个产物；之后，第二个底物再结合酶-X基团中间体，接受X基团的传递。中间体状态的蛋白具有独特的构象，在筛选中能够提供探索此构象蛋白的机会，从而确保找到具有独特MOA的小分子抑制剂 (图2)。

DEL for 特定作用机制的酶配体开发

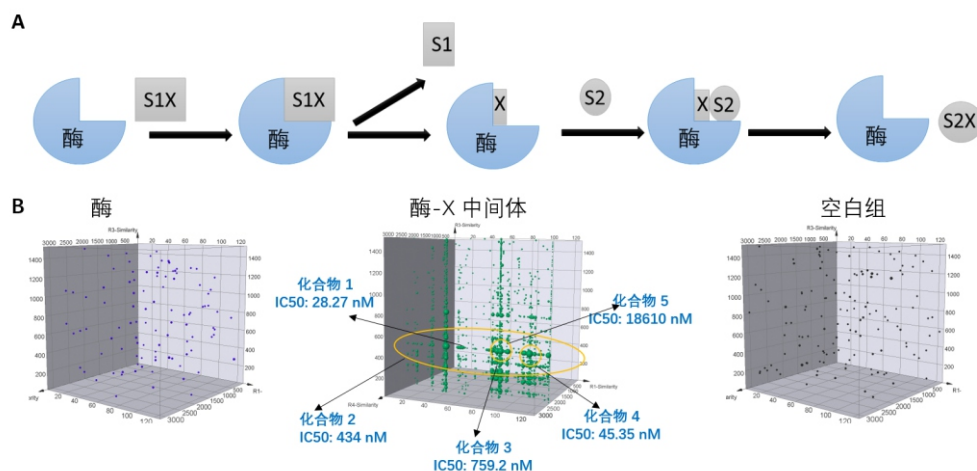


图2. A) 乒乓反应机制的酶反应。B) 不同酶状态的筛选结果比较, 且中间体状态的蛋白筛选得到了多个高活性苗头化合物

特定竞争机制的DEL筛选

竞争性、非竞争性和反竞争性抑制是可逆抑制剂常见的三种形式, 在筛选中加入特定底物或者已知结合位点的配体, 能帮助区分筛选化合物的结合模式, 从而确保得到希望作用机制的化合物。另一方面, 有些作用位点因为其表面特性, 会与特定结构的化合物结合, 比如, 因为磷酸酶的反应特性, 其活性位点结合的化合物常常带有极性且无选择性, 从而使后续的药代动力学及药效开发受阻。在筛选中加入活性位点的结合物作为封闭, 可以帮助排除活性位点结合的分子, 从而找到结合变构位点的分子, 使化合物具有更好的可开发特性。图3为用活性位点配体进行封闭筛选的示例。

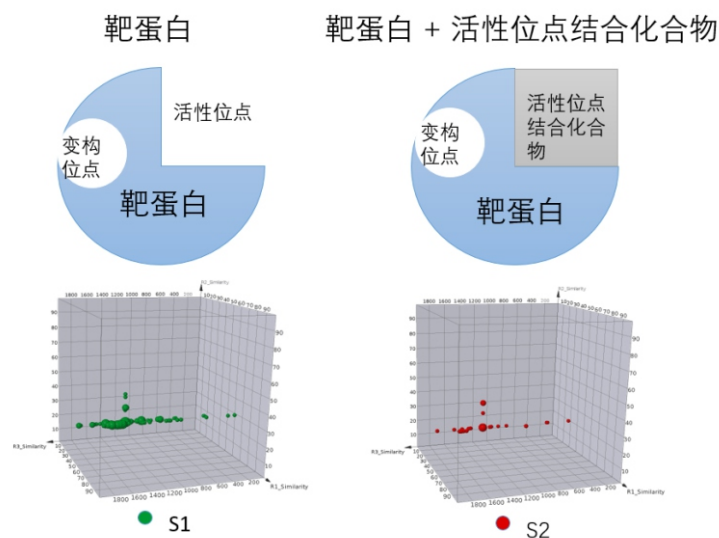


图3. 用活性位点结合化合物来筛选变构位点分子的示例

酶是生理条件下的主要功能发挥介质, 其包含了多种类型的药物靶点, 占目前开发靶点的接近一半, 针对酶靶点的配体发现在疾病治疗中有着重要意义。DEL筛选能够实现快速、低成本的酶配体开发, 并具有以下独特优势:

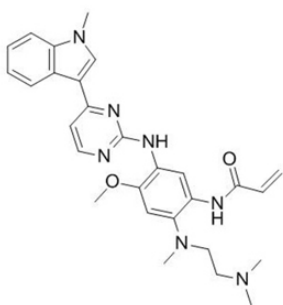
- 酶不同构象和状态的同步探索
- 活性位点和变构位点结合分子的区分
- 可高效引入其他相关酶进行选择性和机制测定

DEL for 共价配体的发现

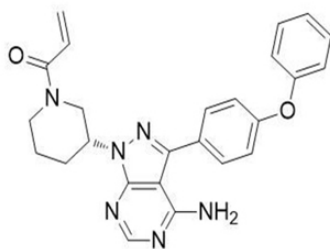
虽然历史上偶然发现了许多共价药物,但由于共价抑制剂对检测的干扰和可能缺乏选择性带来毒性问题,过去人们对共价抑制剂的开发并不热衷。随着近几十年的发展,共价抑制剂的合理设计受到了越来越多的关注,主要归功于其药效更强、靶向作用时间更长、选择性更高,以及对某些对可逆抑制剂耐药的突变体更加有效。

» 共价配体发现方法

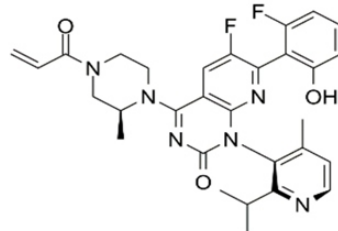
通过在适当位置加入反应弹头,可逆配体可被合理设计成共价抑制剂。可逆部分提供结合亲和力(Ki),而亲电部分则与特定氨基酸(半胱氨酸、丝氨酸、赖氨酸等)发生反应,提供共价相互作用(Kinact)。表皮生长因子受体(EGFR)和Bruton酪氨酸激酶(BTK)共价抑制剂的发现也采用了这种策略,即首先发现配体,随后加入迈克尔受体亲电体(图1)。



奥希替尼 (EGFR)



伊布替尼 (BTK)



索托拉西布 (KRAS G12C)

图1. 共价药物实例

直接筛选共价化合物库也为共价配体的发现提供了一种有效的策略,KRAS G12C最初的苗头化合物的发现就是一个典型的例子,其导致了最终开发成功的上市药物索托拉西布(AMG510,图1)。质谱法、基于活性的蛋白分析法(ABPP)以及共价DNA编码化合物库(DEL)是主要的实验手段。前两种方法虽然简单易行、选择性好,但通量相对较低,而共价DEL筛选则具有通量高、成本低和能够快速研究大化学空间的独特优势。在这方面,成都先导在共价筛选上进行了全面的探索,包括共价库设计、筛选条件优化和化合物表征,并取得了多项共价库筛选的成功。

» 成都先导的共价DEL

成都先导的共价DEL分子由两部分结构组合而成:第一部分是数百万个能提供一定非共价结合活性与选择性的DNA编码的可扩展中间体;第二部分是可提供共价结合的数十个结构与机制各异的亲电基团。通过条件温和的DNA/亲电基团兼容的化学反应,两部分结构连接在一起,生成完整的共价DEL(图2.库设计示意图;图3.代表性的off-DNA分子结构)。其中,可扩展中间体部分由数百个成都先导独有的骨架与超过3万个各种不同类型的分子砌块,通过多种化学组合而成,从而保证这些中间体结构具有足够的新颖性、多样性以及类药性。根据作用机制的不同,成都先导对数十个亲电基团进行了分类,从而能针对性地用于不同的靶点蛋白。例如,当靶标蛋白含有半胱氨酸时,我们会选择由迈克尔受体以及其他的针对半胱氨酸的亲电基团构建的共价键库来进行筛选。在可拓展中间体上引入共价基团能带来两个好处:一是在中间体结合活性没那么强的时候通过共价反应增强分子的结合能力,从而增加直接找到先导化合物的概率;二是不同结构的共价基团也可通过某些作用进一步产生选择性。除了专门针对半胱氨酸的共价DEL,成都先导还能提供针对赖氨酸、丝氨酸等氨基酸残基的共价DEL。

DEL for 共价配体的发现

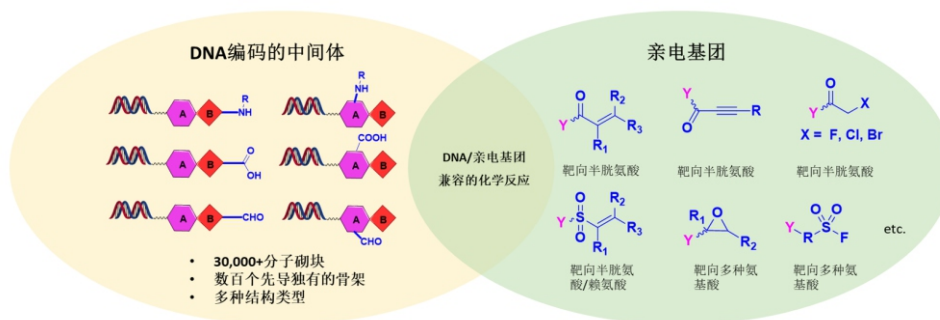


图2. 成都先导共价DEL设计

为了保证筛选结果的可靠性，成都先导对共价基团的稳定性与活性都进行了相应的验证。稳定性验证结果表明我们选用的亲电基团能在DEL的合成、纯化、储存及筛选过程中保持结构稳定。我们也会通过定期重复地对某些靶点进行筛选，以确保共价库亲电基团的反应活性和整体活性。

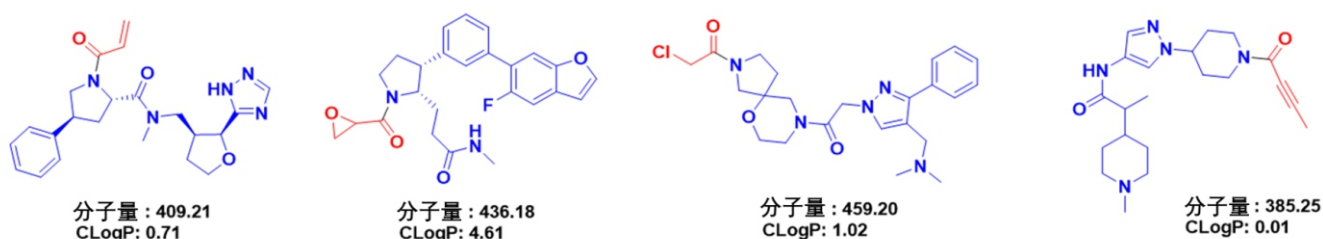


图3. 部分库分子的off-DNA结构 (亲电基团标记为红色)

共价配体的合适靶点

- ▶ 靶向在ATP结合位点附近含有非保守半胱氨酸的激酶，以提高药效，并在某些情况下克服突变导致的耐药性（如EGFR、BTK、JAK3）。
- ▶ 靶向具有关键催化亲核氨基酸的蛋白酶（如去泛素酶、SARS-CoV-2主蛋白酶）。
- ▶ 以催化过程中会形成半胱氨酸-泛素共轭物的蛋白为靶标（如E2、HECT和RBR E3等）。
- ▶ 以结合口袋中或附近含有半胱氨酸、丝氨酸、赖氨酸或苏氨酸的其他靶蛋白为靶标，开发抑制剂或将其转化为降解剂。

共价筛选

鉴于共价化合物“结合与反应”的性质，共价DEL库筛选是在多种条件下进行的，以确保能区分出真正同靶蛋白结合且与特定亲核氨基酸反应的化合物。在筛选之前，还原剂、库投入量、库大小和孵育时间等实验条件应予优化。此外，使用阳性对照-DNA共轭物、亲核残基突变体和共价工具化合物阻断等条件也能增加筛选到活性化合物的信心。成都先导对共价筛选条件进行了广泛的探索（图4），对共价库筛选有着全面理解，并获得了成功的筛选案例。

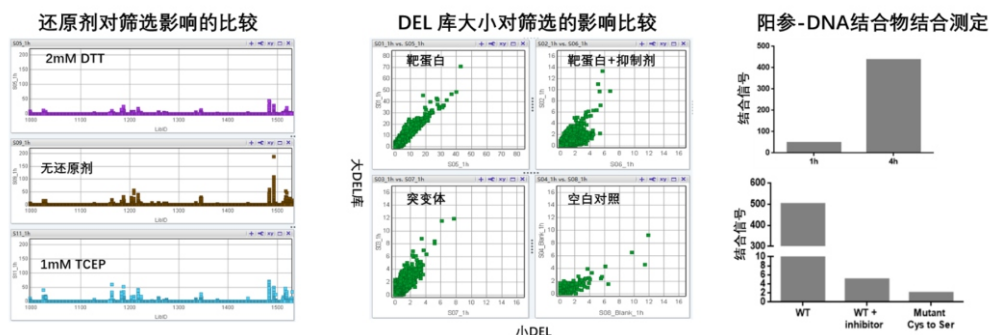
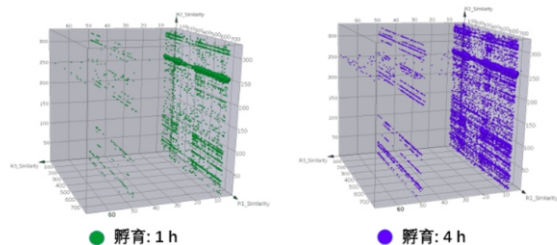


图4. 共价库筛选探索 (还原剂选择、DEL库大小比较、孵育时间选择、抑制剂阻断和突变体比较)。

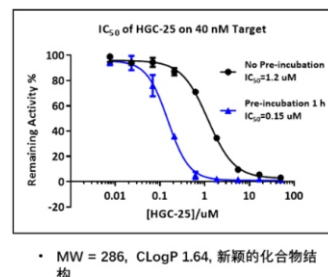
案例研究:半胱氨酸蛋白酶抑制剂的鉴定

实验设计				
序号	靶标	化合物库	孵育时间	目的
1	蛋白酶A	共价化合物库	1h	样本1、2比较, 用于发现共价反应的化合物
2	蛋白酶A	共价化合物库	4h	
3	蛋白酶A	共价化合物库+抑制剂	1h	样本3/4与样本1/2比较, 用于识别具有抑制性的化合物
4	蛋白酶A	共价化合物库+抑制剂	4h	
5	无蛋白	共价化合物库	4h	识别Beads结合的化合物

代表性DEL的化合物富集情况

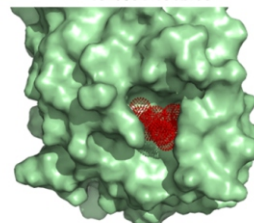


代表性化合物的抑制



• MW = 286, CLogP 1.64, 新颖的化合物结构

X-射线衍射晶体



化合物重合成

- 合成了10个化合物
- 7个和我具有共价抑制性
- IC₅₀范围: 130-500nM
- 3个共价反应的基团

蛋白-化合物共晶

- 先导进行了化合物的共晶培养与衍射
- 先了解蛋白-化合物的相互作用结构解析

图5. 共价库筛选计划、筛选结果、时间依赖的抑制确认以及半胱氨酸共价结合的结构确认。

共价配体的表征

与传统的可逆抑制剂相比, 共价化合物的表征具有一些独特之处。首先, 共价化合物表现为非线性的酶活-时间反应曲线, 其抑制活性也有典型的时间依赖特征, 从而影响了使用IC₅₀进行共价化合物分析和排序的准确性。Kinact/K_i是一个更有意义的参数, 是共价化合物表征和构效关系 (SAR) 分析的关键指标。此外, 结合的不可逆性还可以通过质谱分析、稀释实验、透析和突变蛋白来验证 (图6)。

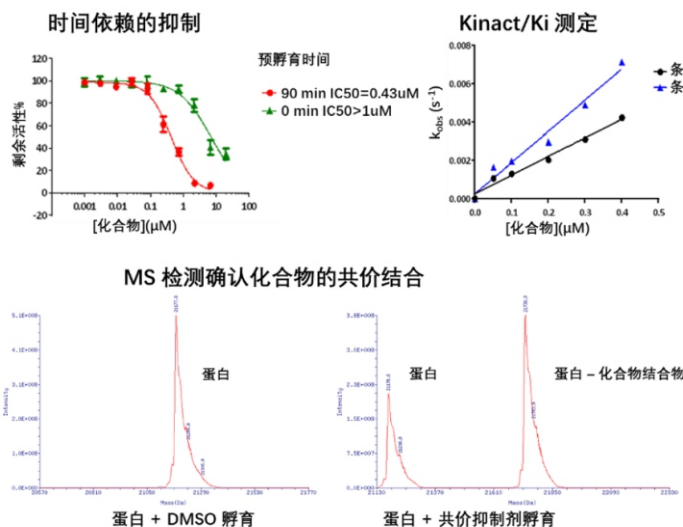


图6. 代表性的共价化合物验证方法

展望

利用共价配体直接抑制挑战性靶点已成为现代药物发现领域极具吸引力的方法。共价DEL库筛选具有化学空间大、材料消耗少、筛选效率高的特点, 将成为推动这一领域发展的有力方法。成都先导拥有经过严格验证的超10亿的大规模共价DEL库、丰富的筛选经验和全面的共价分析能力, 可极大地助力加快您的共价配体发现工作。

DEL for 大环化合物

大环化合物¹通常指原子数不小于12、具有环状结构的有机分子，其分子量介于小分子和生物大分子之间(图1)。与直链化合物相比，大环化合物具有刚性但仍有一定灵活构象，这使得它对靶点具有更高的亲和力和选择性，在一些传统小分子难以调节的靶点上具有独特的优势。环状分子的结构多样性赋予了它多种多样的功能和显著的生物活性，使其成为药物发现中一类重要的分子类型，受到了广泛关注。目前已有超过60种大环化合物被美国食品和药物管理局(FDA)批准为药物(图2)，其中绝大多数环状药物来源于天然产物或其衍生物。大环药物治疗的适应症集中在感染性疾病、肿瘤、自身免疫性疾病和免疫抑制剂等领域。

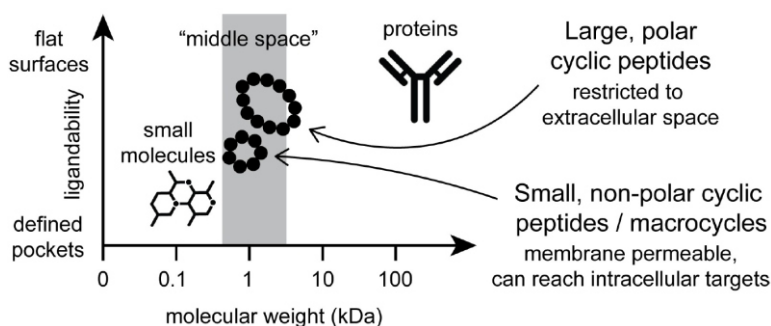
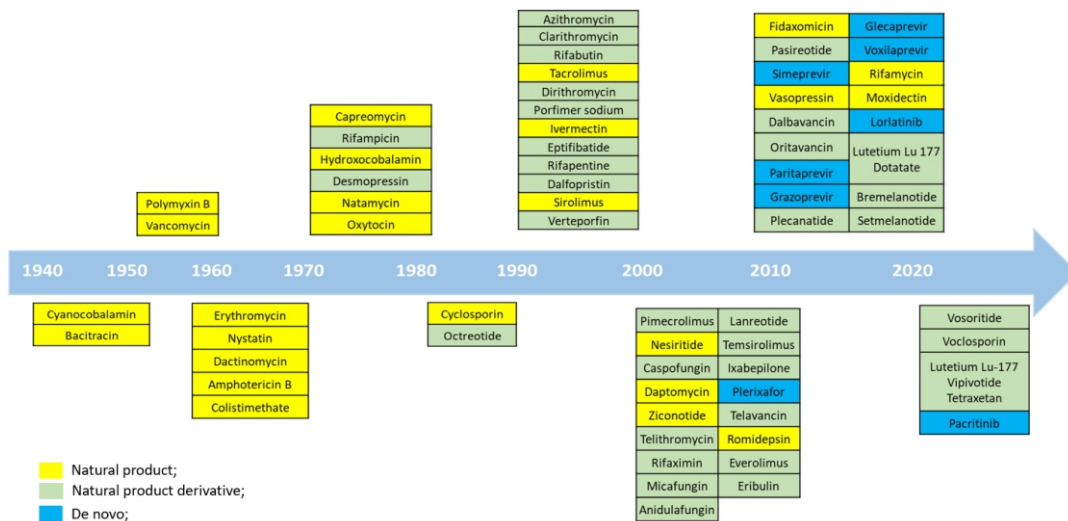


图1. 大环化合物与小分子、生物大分子的比较^{1b}

(a)



(b)

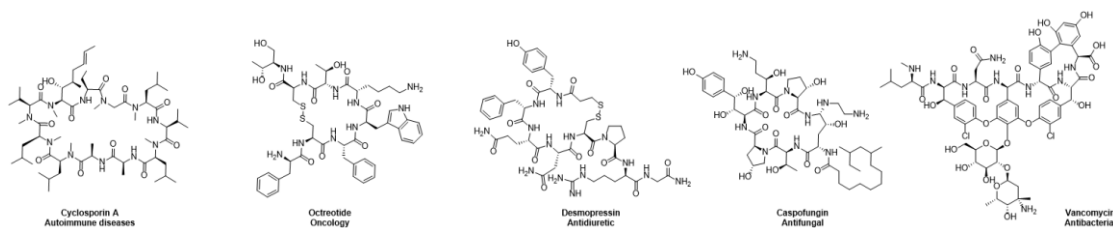


图2. (a) FDA批准的大环药物分子^{1a}; (b) 代表性的大环药物分子的结构

除了直接作为药物分子外,大环化合物与其它分子形成的偶联物在疾病诊断和递送方面同样具有很大的应用空间及开发价值²。偶联物的种类比较多,包括:(1)放射性核素:Lutathera® ($[^{177}\text{Lu}]$ Lu-DOTA-TATE) 于2018年被FDA批准用于治疗生长抑素受体阳性的胃肠胰神经内分泌肿瘤;(2)荧光分子:环肽与荧光分子结合可以产生针对特定蛋白的荧光探针;(3)多肽分子:Qiu等报道了使用环状RGD修饰的多脂肽胶束提高Monomethyl auristatin E (MMAE) 的负载量以及靶向递送;(4)核酸分子:Hirano等报道了magainin 2衍生的订书肽能够将pDNA、mRNA和siRNA递送至细胞中。

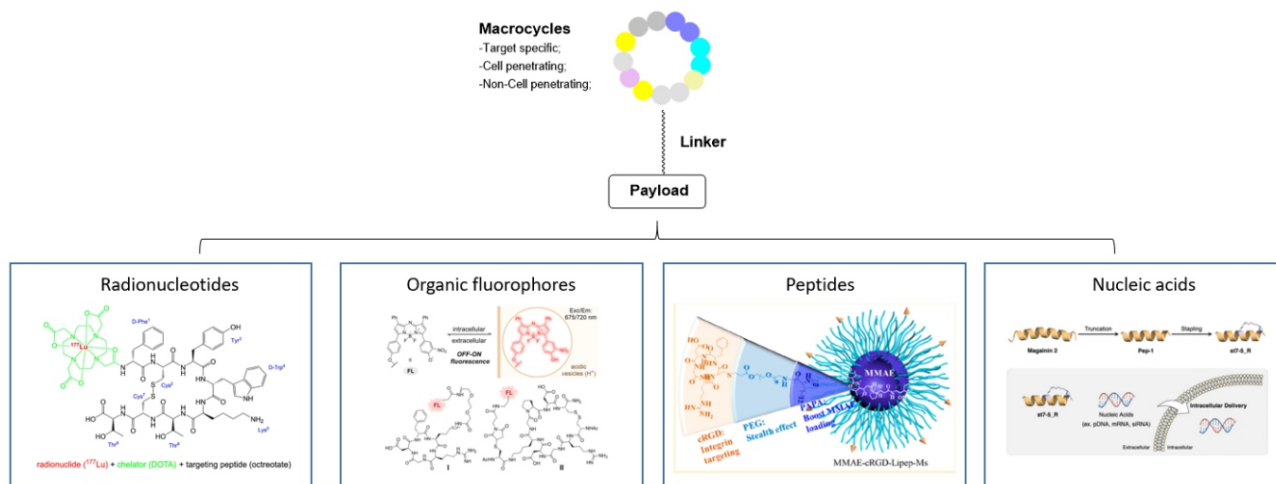


图3. 大环偶联物²

» 大环药物的特征

文献^{1a}中分析了相关临床研究中大环药物的性质:大环药物通常存在于Ro5规则外的化学空间中,但30%~40%的药物和临床候选药物具有口服生物利用度。简单的模型,即HBD ≤ 7 ,结合MW<1000Da或cLogP>2.5,可以用于初步区分大环化合物是口服药物还是注射药物,为未来大环药物的设计与发现提供一些指导(图4)。

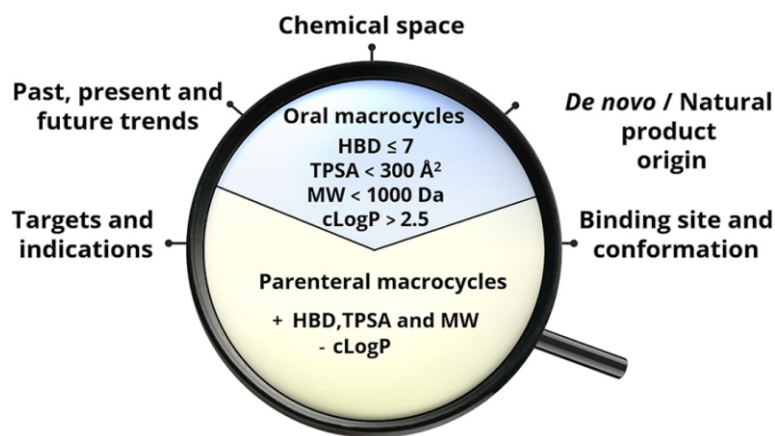


图4. 大环药物的特征^{1a}

» 大环药物的发现方法

大环药物的发现依赖于天然产物的衍生和启发,但是由于有些天然产物结构复杂,通过化学方法合成比较困难,因此从头设计的大环化合物也受到了人们的关注。随着合成和筛选技术的不断发展,噬菌体展示技术和mRNA展示技术在大环药物的发现方面也有着广泛的应用前景。但这两种技术主要使用天然氨基酸合成环肽库,会导致环肽的多样性受限。

相比于生物展示技术，DNA编码化合物库(DEL)技术更加容易引入非天然的氨基酸序列作为分子砌块，结合不同的关环方式，可以拓宽大环化合物的化学空间和结构多样性³。通过对结构的合理设计和分子砌块的选择能够在大环化合物的骨架和侧链进行改造，调节大环分子的性质。大环DEL除了可以直接用于目标靶点的筛选得到具有高亲和力的配体，还可提供丰富的与靶点富集分子信息，为后续分子优化提供一个良好的起点。数十亿级别的大环分子库和高通量筛选的结合，使得DEL技术在大环药物发现方面有着独特的优势。目前大环DEL已用于多个靶点的筛选，发现了多个大环苗头化合物(图5)。

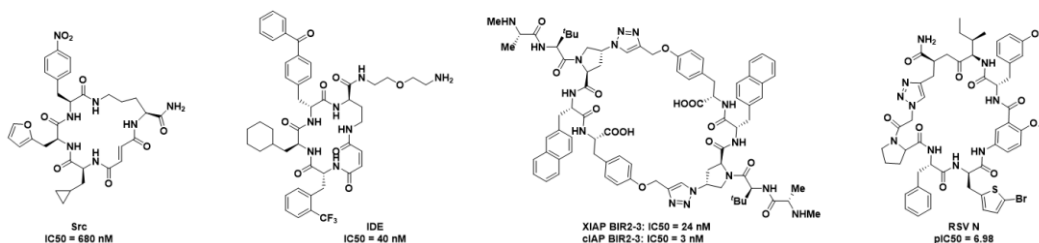


图5. 通过DEL发现的大环苗头化合物的例子³

成都先导的大环DELs

成都先导通过多维度的综合考量，构建了不同环系大小的高质量大环DEL(图6)，可直接用于靶点的筛选。成都先导的大环DEL有如下几个特征：

- ▶ 库规模：400亿化合物
- ▶ 分子砌块多样性：>500个天然/非天然氨基酸和>300个短肽；
- ▶ 肽链长度：2-13个氨基酸；
- ▶ 引入了一定数量的特殊氨基酸(N-Me修饰、亲脂侧链等)来调节大环化合物库的分子量、LogP、HBA/HBD等性质；
- ▶ 关环方式多样化：click关环、硫醚键、二硫键和其他未报道的关环方法。

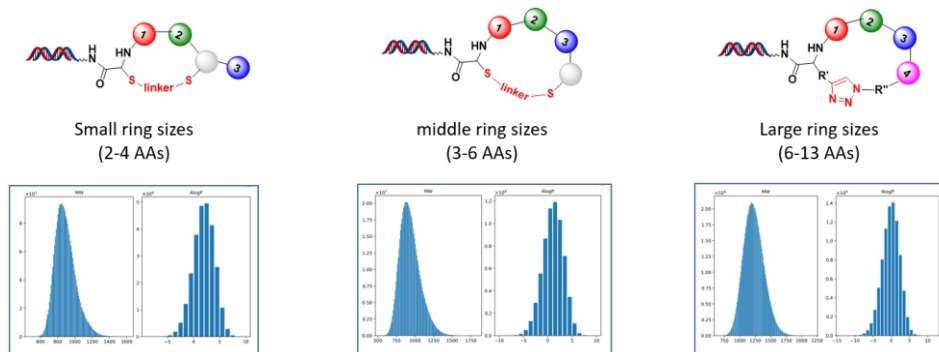


图6. 成都先导的大环DEL

大环DEL的应用

成都先在大环DEL的筛选方面有着丰富的经验，目前已经将大环DEL用于多个靶点的筛选，并获得了成功的筛选案例(图7)。

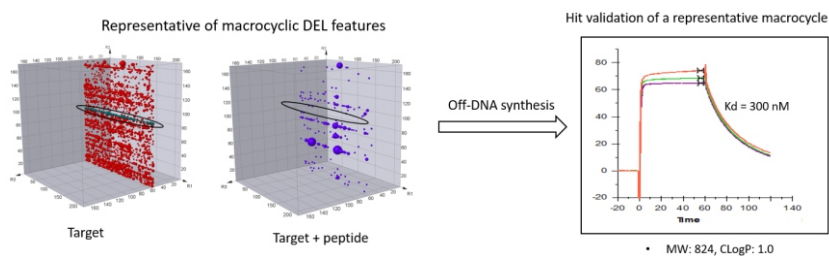


图7. 大环DEL筛选结果以及大环活性验证的案例

大环DEL与目标靶点筛选得到的大环苗头化合物除了直接作为配体外,还可以用于递送系统的开发,如递送小分子、抗体和核酸等(图8)。

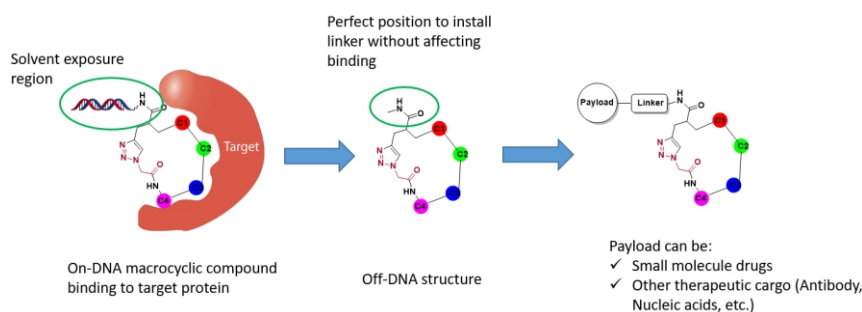


图8. 大环DEL在递送系统方面的应用

成都先导PCP业务

成都先导通过整合自身多肽平行合成服务、肽类DEL合成与筛选服务等,建立了综合性的PCP (Peptide-conjugate Platform) 平台(图9)。该平台可以提供特殊氨基酸/多肽类分子砌块的合成(用于DEL库设计与合成)、肽类偶联分子的合成(用于筛选前/后的活性验证)、DNA编码肽类化合物库的设计与合成、肽类DEL库的筛选和高通量 off-DNA肽类化合物的重合成等相关业务。

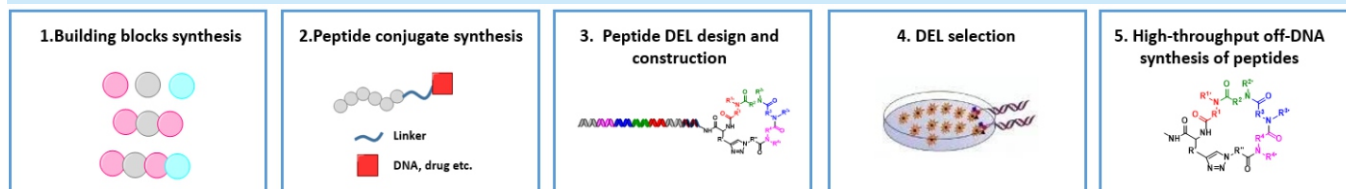


图9. 成都先导PCP业务

成都先导提供的大环类化合物相关服务包括:

- 基于特定需求的环肽/线性肽DEL的定制合成;
- 超400亿规模的大环DEL可直接用于目标靶点的筛选;
- 高通量off-DNA肽类化合物的合成;
- 环肽/线性肽偶联物的合成。

成都先导深耕DEL领域多年,依托成熟的DEL技术,能够提供多样性好且质量高的DNA编码环肽/线性肽分子库的合成、肽类DEL库的筛选和快速的肽类hit确认相关服务,可极大地助力环肽/线性肽配体的发现工作。

参考文献

- [1] (a) Jimenez, D. G.; Poongavanam, V.; Kihlberg, J. Macrocycles in Drug Discovery-Learning from the Past for the Future. *J. Med. Chem.* **2023**, 66, 5377. (b) Ji, X.; Nielsen, A. L.; Heinis, C. Cyclic peptides for drug development. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, 63, e202308251.
- [2] (a) Gong, L.; Zhao, H.; Liu, Y.; Wu, H.; Liu, C.; Chang, S.; Chen, L.; Jin, M.; Wang, Q.; Gao, Z.; Huang, W. Research advances in peptide-drug conjugates. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2023**, 13, 3659. (b) Cooper, B. M.; Iegre, J.; O' Donovan, D. H.; Halvarsson, M. Ö.; Spring, D. R. Peptides as a platform for targeted therapeutics for cancer: peptide-drug conjugates (PDCs). *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 1480. (c) Hennrich, U.; Kopka, K. Lutathera®: The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *Pharmaceuticals* **2019**, 12, 114. (d) Mendive-Tapia, L.; Wang, J.; Vendrell, M. Fluorescent cyclic peptides for cell imaging. *Peptide Science* **2021**, 113, e24181. (e) Qiu, M.; Wang, X.; Sun, H.; Zhang, J.; Deng, C.; Zhong, Z. Cyclic RGD-Peptide-Functionalized Poly(lipopeptide) Micelles for Enhanced Loading and Targeted Delivery of Monomethyl Auristatin E. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, 15, 4854. (f) Hirano, M.; Yokoo, H.; Goto, C.; Oba, M.; Misawa, T.; Demizu, Y. Magainin 2-derived stapled peptides derived with the ability to deliver pDNA, mRNA, and siRNA into cells. *Chem. Sci.* **2023**, 14, 10403.
- [3] Plais, L.; Scheuermann, J. Macrocyclic DNA-encoded chemical libraries: a historical perspective. *RSC Chem. Biol.* **2022**, 3, 7.

DEL for 药物分子优化场景中的应用

DNA编码化合物库 (DNA Encoded Library, DEL) 技术代表了一种药物发现领域的革命性方法。与传统方法不同, DEL技术能够无与伦比地探索化学空间, 从而迅速发现具有高效活性的新颖的化合物。DEL不仅在发现新分子方面具有巨大潜力, 还在优化已知化合物方面展现出强大的能力。研究人员可以利用DEL技术系统性地探索化合物的化学空间, 识别并生成多样的类似物和衍生物 (见图1)。通过设计聚焦性DEL (Focused DEL), 研究人员可以以高通量的方式高效筛选具有结构相关性的分子。这一方法以已知分子为起点, 有助于进一步识别具有更优良属性的化合物, 包括更高的活性、更好的选择性、更好的类药性或更低的毒性。DEL作为精炼已知起点化合物的有力工具, 将大幅加速整个优化过程, 并提高药物开发与转化的可能性。利用DEL技术进行化合物优化进一步突显了DEL技术在药物发现领域的多功能性和影响力。

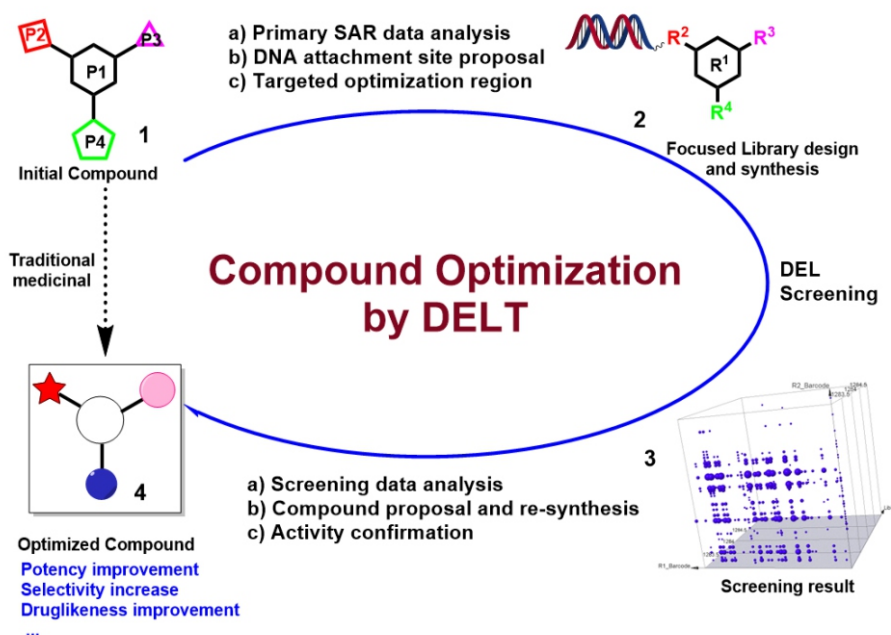


图1. DEL技术在分子优化中的应用

» 利用DEL技术进行分子片段的拓展 (fragment expansion)

分子片段的药物发现 (FBDD) 作为一种成熟的方法之一, 已经在以小型、低亲和力化合物为起点的药物发现领域崭露头角。然而, 这些低亲和力碎片在进一步演化为具有理想亲和力的化合物方面仍存在挑战。分子片段优化的主要方法为多轮迭代的分子片段扩展, 该方法的复杂性与长时耗性持续困扰着相关领域的研究人员。

2022年, 成都先导团队和Vernalis团队的合作实现了PAC-FragmentDEL的开发, 报道了一种涉及DNA编码分子片段库的光催化共价捕获的新方法 (RSC Med. Chem., 2022, 13, 1341-1349)。这种方法促进了与特定靶点结合的分子片段的快速识别, 在药物发现中体现了显著优势。PAC-FragmentDEL只需要少量标签标记的蛋白质 (每个样品250 pmol), 减少了筛选所需的生物靶点的量。此外, 该方法相对迅速, 可在几周内完成包括DEL筛选、测序和数据解析, 从而快速识别出活性分子。值得注意的是, 与传统方法相比, PAC-FragmentDEL可以涵盖大量溶解度较低的分子片段, 扩大了可筛选化合物的范围。此外, 通过PAC-FragmentDEL识别的分子片段具有明确的DNA链接位点信息, 为片段分子与对应靶蛋白结合的相互作用提供了重要的结构信息。

纽卡斯尔大学的Mike Waring教授报道了一种利用DNA编码化合物库中间体进行分子片段活性优化的创新策略(Chem. Sci., 2023, 14, 8288-8294)。多样性的DEL中间体制为研究人员系统地研究化学空间提供基础,促进了碎片分子向具有高效和选择性的药物候选化合物的快速转化。与Waring教授的方法不同,成都先导通过PAC-FragmentDEL识别的碎片分子具有更为明确的DNA标记点和功能基团信息,为进一步用于碎片分子结构拓展的DNA编码化合物库提供设计起点(见图2)。

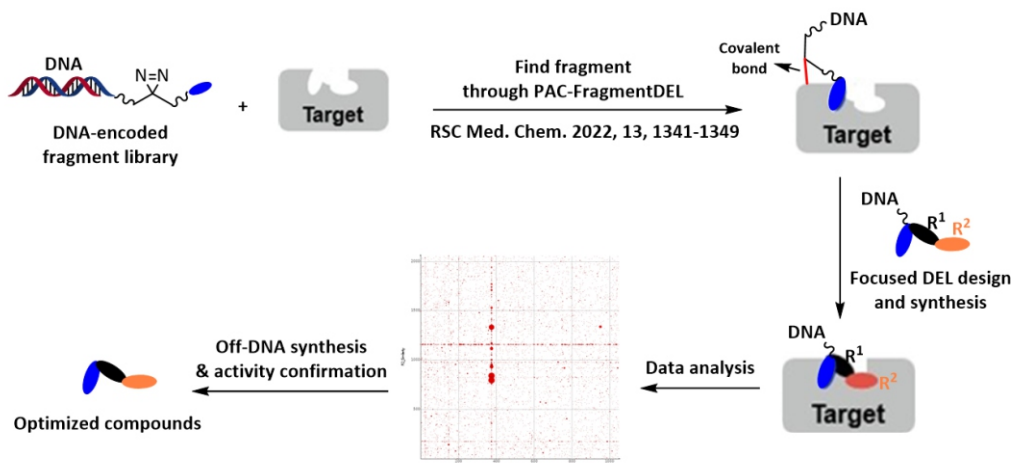


图 2. PAC-FragmentDEL的筛选及分子片段拓展的聚焦DEL设计

从最初通过PAC-FragmentDEL (RSC Med. Chem., 2022, 13, 1341-1349) 识别出的作用于蛋白激酶PAK4的分子片段出发,结合多样的成都先导内部DNA编码化合物库中间体 (DEL intermediates), 在两周内迅速构建分子数达数亿的碎片分子聚焦库 (fragment-focused DELs)。所构建的聚焦库仅需采取传统亲和筛选法对PAK4进行筛选。在经过快速且全面的数据分析、off-DNA分子合成及活性确认后,识别了多个系列的活性在百纳摩尔水平的全新化合物。整个过程高效迅速,可在4-5周内完成多样化的活性化合物确认,包括库设计和合成、库筛选和数据分析,以及off-DNA化合物合成和后续活性验证(见图3)。

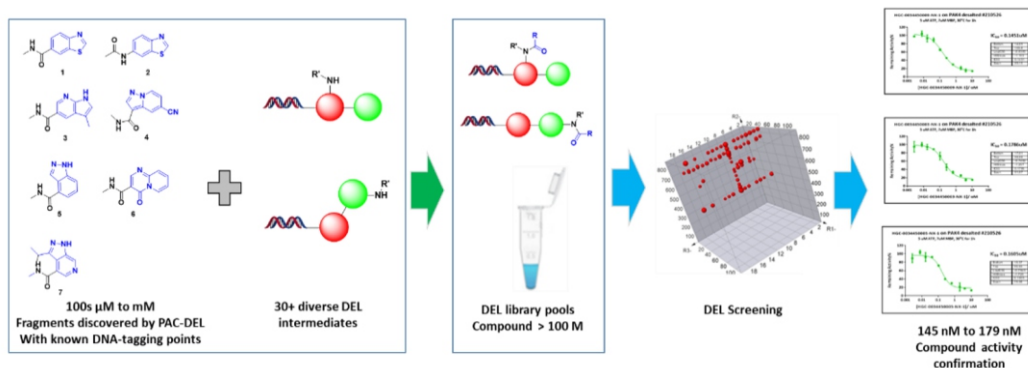


图 3. 基于碎片分子的聚焦DEL生产及分子片段拓展分子的快速发现与验证

» 利用聚焦性DEL技术进行Hit/Lead的优化

在成都先导,DNA编码化合物库 (DEL) 技术已被广泛应用于已知化合物的优化。这一创新技术使研究人员能够系统地探索已知活性化合物的化学空间,从而生成并筛选大量多样化的聚焦性DEL化合物。该方法旨在增强已知活性化合物的效力、选择性以及类药性。

为增强一种已报道化合物的选择性,根据需求分析,成都先导设计了两个聚焦性DNA编码化合物库,其中包含数百万个化合物。该设计涵盖多个维度,包括DNA链接点的确认,核心骨架结构的设计和合成,以及物理化学性质的优化与控制(见图4)。成都先导利用自有的筛选平台,可确保大量DEL筛选实验同时运行。利用“智能筛选”策略,将DEL筛选场景与蛋白质类型(野生型、突变等)的组合以需求导向作为第一优先级,实现分子选择性需求与筛选策略高度融合。通过滤除重叠的结合物,确定了一系列特异性抑制剂,并通过验证,在保持优良活性的同时,实现了卓越的选择性。

DEL for 药物分子优化场景中的应用

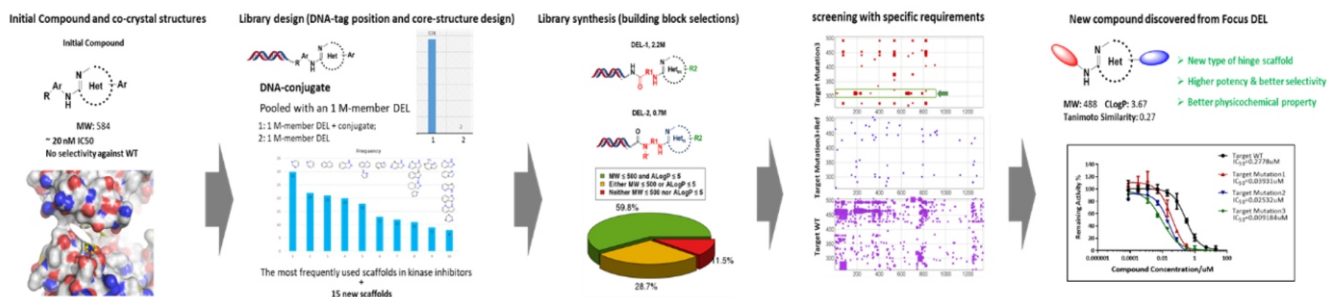


图 4. 利用聚焦性DEL技术进行Hit/Lead的优化

成都先导DNA编码化合物库技术在药物分子优化中的应用

DNA编码化合物库(DEL)技术除了新活性化合物发现外,对于已知化合物优化而言也展示出了极大的潜力与价值。与传统方法不同,DEL技术能够不可比拟地探索化学空间,从而实现高效的化合物优化。值得一提的是,该技术流程可大幅缩短“设计-合成-测试-分析(Design-Make-Test-Analyze, DMTA)”的迭代循环,极大地简化了优化过程。通过聚焦性DEL(Focused-DEL)的设计与合成,成都先导实现了以下场景:

- 实现Fragment-to-Lead的优化:成都先导将PAC-FragmentDEL与后续的focused fragment-expansion DEL技术相结合,开拓并实现基于DEL技术的Fragment发现到Lead化合物优化的全流程。
- 实现已知活性化合物的定向优化:成都先导利用Focused DEL技术优化已知活性化合物,可有效获得具有更高活性、选择性或类药性的分子。

成都先导持续致力于DEL技术的突破与创新,不仅在新活性化合物的发现方面具有巨大的价值,也为化合物优化领域提供了强大的工具,有效避免繁琐的迭代步骤,加速药物研发历程,有望为新药开发带来重要突破。

DEL for 蛋白降解剂开发

蛋白降解剂(最常见为PROTAC或分子胶)是一个直接或间接地招募目标蛋白(POI)和E3连接酶,诱导POI的多泛素化使之随后被蛋白酶体介导降解的事件驱动的过程。与蛋白抑制剂不同,蛋白降解剂不需要对蛋白有抑制活性,因此,它适用于更广泛的靶标类别,包括无法成药的蛋白、支架蛋白、突变蛋白等。

» PROTAC

靶向蛋白降解嵌合体(PROTAC)是一种双功能分子,由POI结合分子、E3连接酶结合分子和连接两个分子的连接子组成。将抑制剂和已知的E3连接酶结合分子(最常见的是CRBN和VHL结合分子)用适当的连接子连接开发成PROTAC在过去的几年中非常流行,也产生了多个进入临床的PROTAC项目(图1)。相较于传统的抑制剂,PROTAC以其较低的给药剂量,持久的效果以及对突变蛋白有效方面展现了较大优势。

» 分子胶

分子胶(MG)是一种单价分子,可以粘合两个蛋白并在多种情况中有相应的应用。在蛋白降解中,它诱导POI:MG:E3复合物的形成,其发挥作用有以下几个可能的方式:1) MG显著增强POI:E3的相互作用;2) MG结合到POI,然后被E3识别;3) MG结合到E3连接酶,使E3连接酶能够识别新的底物。只有适当的结合位置和构象才能引起POI的泛素化和蛋白酶体降解。分子胶是一种理想的蛋白降解剂,但是其发现的挑战更大,应用的靶标更少且在临床中的项目也更少。

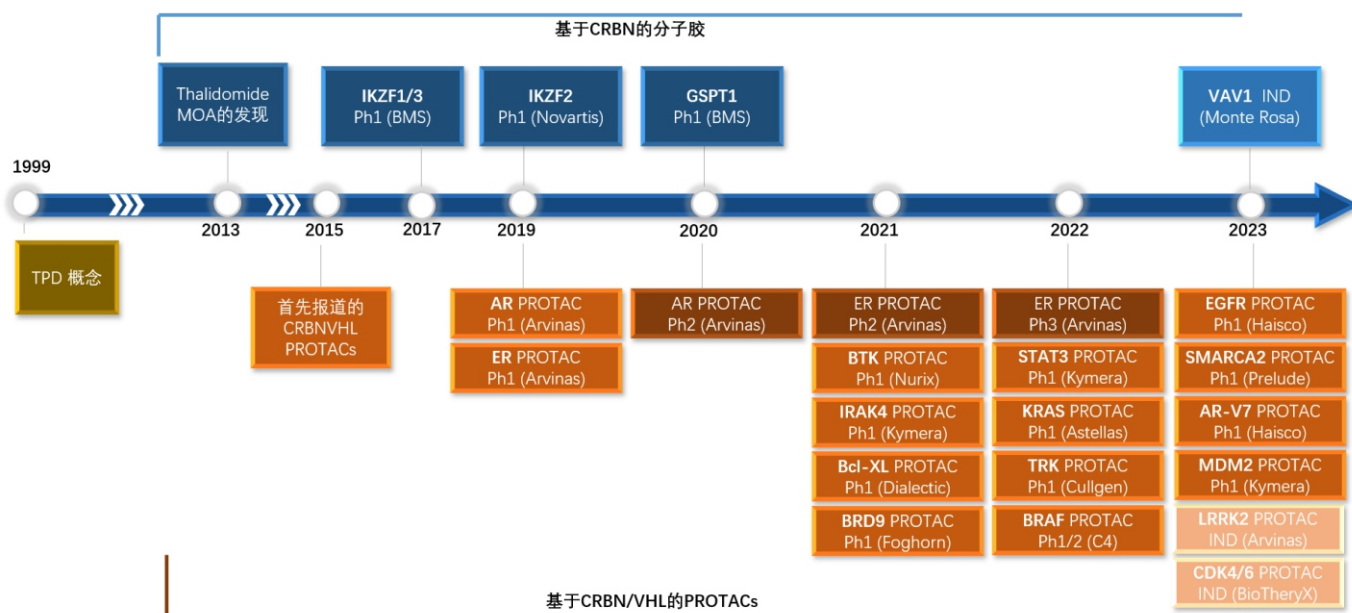


图1. 蛋白降解剂的发现历史

» 基于PROTAC的DEL筛选

DNA编码化合物库 (DEL) 是一种非常强大的蛋白结合分子发现技术,因为它具有超大化学空间(成都先导拥有万亿级化合物库),能以快速、低蛋白消耗和低成本的方式进行筛选。并行筛选样本,深度的数据分析和累积的数据也保证了筛选分子对靶蛋白具有选择性。此外,DEL化合物的DNA偶联位点也为PROTAC开发提供了天然的连接子连接位点。成都先导最近开发了一种基于POI:降解剂:E3复合物形成的筛选方法,使用专门的PROTAC DEL和POI/E3双蛋白同时进行筛选,相应筛选方法和结果已在[ACS Chem. Biol. 2023, 18, 25-33](https://doi.org/10.1021/acscchembio.3c00133) (ACS编辑的选择,图2)上发表。

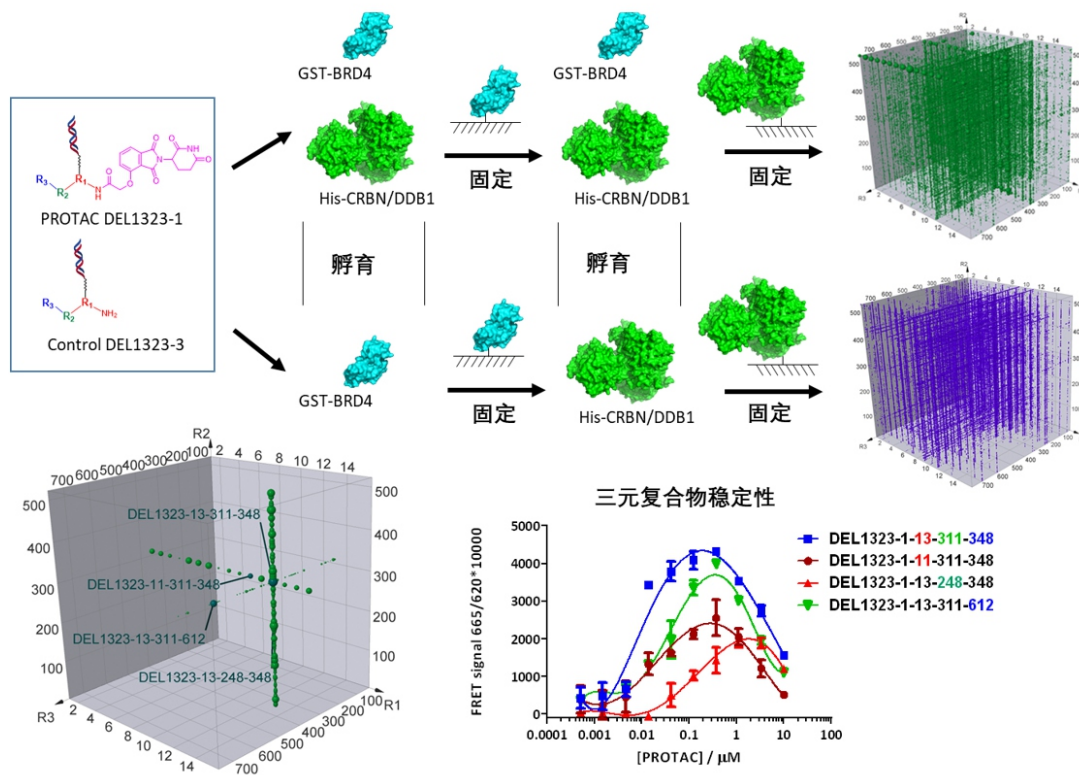


图2. 基于三元复合物的DEL筛选

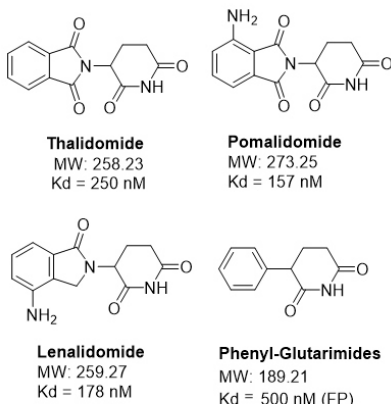
» 从DEL衍生的PROTAC和MG的开发

PROTAC的发现和开发现在已经不限于肿瘤疾病领域,组织/细胞特异的E3连接酶表达也成为差异化开发的一个有效策略。如上所述,DEL技术是一种非常强大的配体发现技术,即使在蛋白功能没有被完全阐明的情况下,如大多数E3连接酶,也能实现以寻找结合分子为目的的筛选。目前,成都先导已经表达、纯化并筛选了几十种E3连接酶,从成都先导万亿级DNA编码化合物库中也鉴定得到了许多特异性的E3结合分子,尤其是一些没有报道过任何结合分子的E3。这些分子也逐渐被开发成PROTAC且被证实对靶蛋白能实现有效降解。同时,我们也发现了一些E3结合分子具有潜在的分子胶功能(更多细节可进一步咨询提供)。

» 基于DEL衍生的CRBN分子的PROTAC开发

相较于报道的CRBN结合分子,我们从DEL筛选中发现的新分子显示出了更高的结合亲和力,其PROTAC对许多热门靶标有着更强的降解能力,同时,新的CRBN配体和对应的PROTAC都没有免疫调节剂(IMiD)功能(图3)。

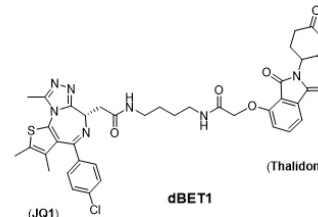
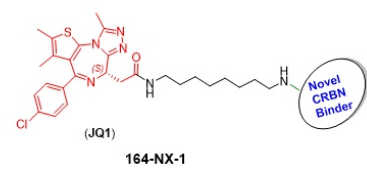
□ 报道的CRBN结合分子



□ HitGen全新的CRBN结合分子

Compound	Pomalidomide	HG CRBN Binder
Similarity	1	0.34
Chiral #	1	0
MW (Da)	273	354
CLogP	-0.19	-1.26
tPSA	109.57	98.82
Kd (nM)/ITC	2200	15
LMS T _{1/2} (min)	>120	>120
Plasma Stability T _{1/2} (min)	57	114

□ HitGen全新的CRBN结合分子介导的BRD4降解

Compound ID	MW	CLogP	tPSA	IC ₅₀ (CRBN) (nM)	DC ₅₀ (nM)	Dmax %	GI ₅₀ (nM)
d-BET1	785.27	2.49	191.30	33.6	50.71	75.0%	46.32
164-NX-1	853.45	5.05	165.00	4.0	0.58	81.0%	4.57

图3. 新的基于DEL衍生的CRBN PROTAC能实现显著的POI降解

» 基于DEL衍生的BIRC7分子的PROTAC开发

BIRC7 (在肿瘤细胞中特异性表达) 配体是首个从成都先导万亿级DNA编码化合物库中筛选得到的高结合活性分子, 其衍生的PROTAC在BIRC7高表达细胞系中也显示出了对靶标蛋白的选择性降解(图4)。

- ✓ 选择性表达的E3
- ✓ 广泛表达但在疾病组织中突变的靶点
- ✓ BRAF在BIRC7高表达细胞中降解, 低表达细胞中无明显降解

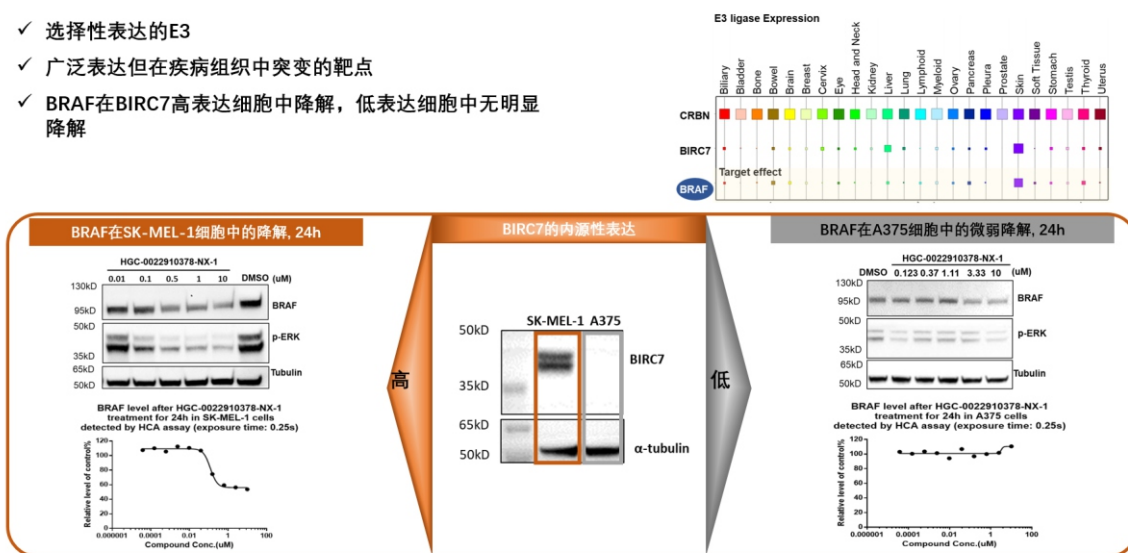


图4. 基于BIRC7的PROTAC提供选择性的靶标蛋白降解

» 基于DEL衍生的TRIM21分子的PROTAC开发

从成都先导DEL库筛选中得到的TRIM21 (广泛表达, 但与CRBN表达谱不同) 结合分子已经被开发为PROTAC, 发现其具有非常强大的BRD4降解能力 (pM DC₅₀, 比基于CRBN的PROTAC强8000倍), 与基于CRBN的PROTAC相比, 具有差异化的激酶降解, 更重要的是, TRIM21配体具有潜在的分子胶功能 (图5)。

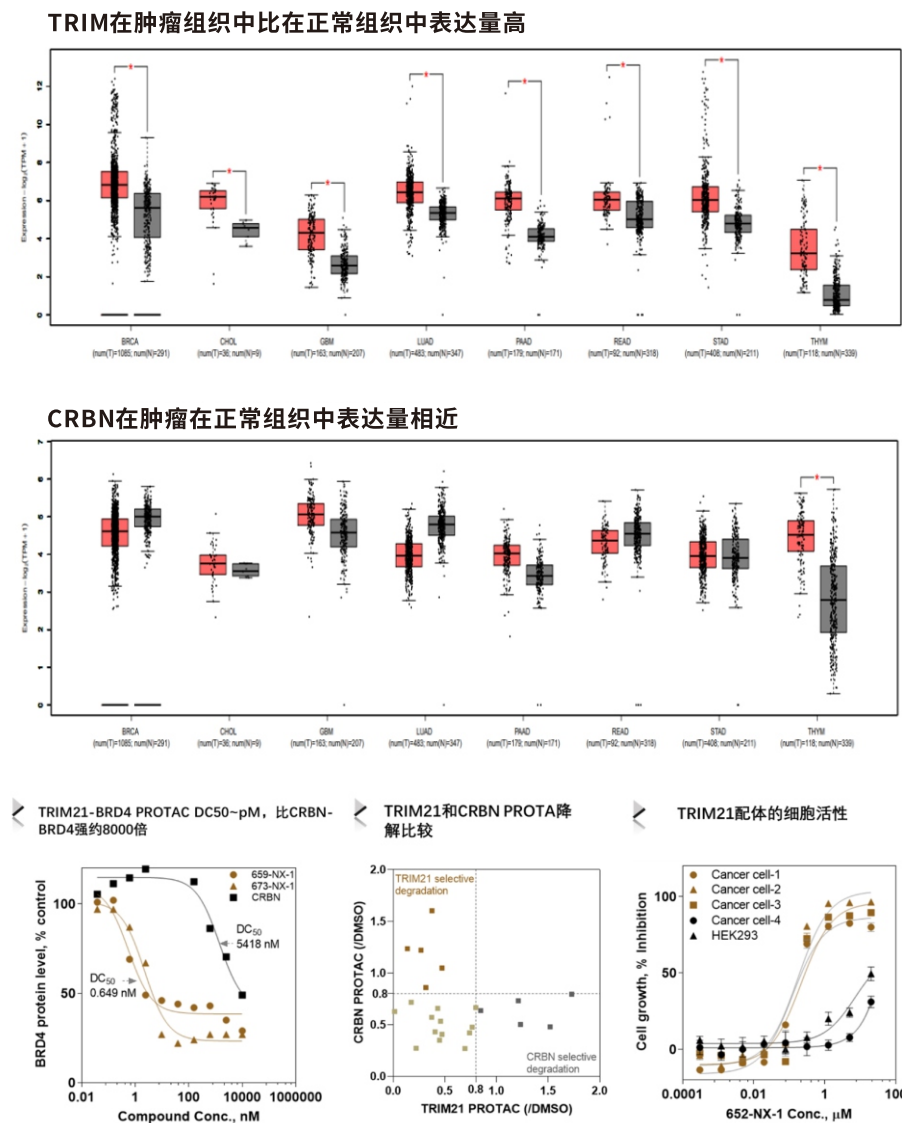


图5. 基于TRIM21的PROTAC提供更强大的降解能力和不同的降解特性

成都先导DEL筛选助力蛋白降解剂开发

综合我们的万亿级化合物库和专门的PROTAC DEL库, 成都先导提供定制化的筛选策略以助力蛋白降解剂开发:

- 成都先导的万亿级化合物库为结合配体筛选提供广阔的化学空间, 且不依赖于蛋白功能。
- PROTAC DEL能够提供直接基于三元复合物的筛选。
- 多E3连接酶的平行筛选可快速完成且能获得选择性信息。
- DEL分子衍生的化合物其PROTAC连接子位点已知。
- 新结构分子的鉴定和多筛选成功案例记录。

DEL for 无限可能

近几十年来，DNA 编码化合物库 (DEL) 技术取得了长足的进步。除了在小分子药物发现中发挥传统作用外，它与新兴领域的结合也开始引起越来越多的关注。这要归功于其庞大的化学空间、丰富的结构信号关系 (SSR) 以及其本身的DNA连接特性。在此背景下，我们将在本文中探讨DEL技术的其他应用。随着DEL领域的不断扩大和技术的不断进步，还有更多的应用有待发现。

DEL用于探针开发

DEL在为新药开发提供新起点方面的作用已得到广泛认可。成都先导建立的快速DNA和非 DNA化学合成方法不仅可以快速设计和构建DEL，还可以在筛选和优化方面快速开发基于亲和力的检测方法。通过DEL筛选确定的化合物系列既能保证良好的活性，又能保证提供用于标记的已知连接位点，而无需额外的验证工作。对于没有阳性化合物报道的挑战性靶点，任何潜在的结合分子都是有用的，不仅可以直接作为候选药物开发，还可以作为靶点验证和检测探针的开发。由于DEL筛选结果确保了DEL化合物系列之间良好接近性，再结合已知连接点所允许的各种标记技术，基于DEL筛选的探针开发非常直接且高效。

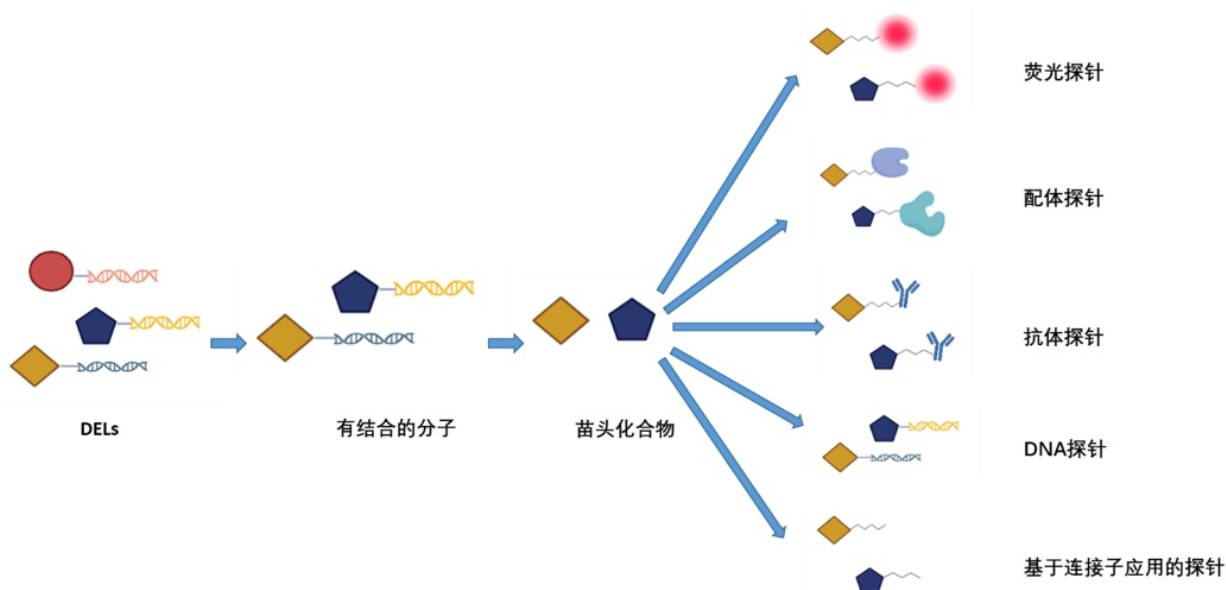


图1. 基于DEL筛选的探针开发工作流程示意图，不同的探针可以开发并用于FRET (荧光共振能量转移)、BRET (生物发光共振能量转移)、钓点垂钓、互作、qPCR (实时荧光定量聚合酶链式反应) 检测等

DEL用于传感器和诊断试剂开发

核酸适配体已经被开发作为一种识别元件，用于结合和监测特定生物分子的变化。DEL提供广泛的化学空间的能力是毋庸置疑的，因此通过DEL筛选识别可感知特定蛋白质、肽甚至小分子变化的分子，可用于某些分子监测传感器的开发。此外，疾病的发展通常与多种生物标志物的变化或各种靶标的功能失调有关，通过快速高效地筛选广阔的化学空间，DEL将在未来的诊断试剂开发中发挥重要作用。这可以通过针对感兴趣的靶标进行传统筛选实现，此外也可开发针对生物样本、组织甚至体内模型的DEL筛选，以确定对各种靶标或特定疾病模式和表型做出反应的多种分子。

» DEL用于核酸递送试剂开发

核酸递送一方面依赖于纳米颗粒材料,另一方面也利用特定受体介导的内吞策略。DEL不仅提供了广阔的化学空间,以传统的筛选策略鉴定这些受体的小分子配体可进行递送试剂开发。另一方面,DEL分子的DNA连接特性还提供了直接筛选核酸递送试剂的可能。DEL分子的DNA标记可以作为核酸递送的货载,直接基于细胞的内化筛选有助于直接从筛选中确定受体介导的核酸递送试剂。

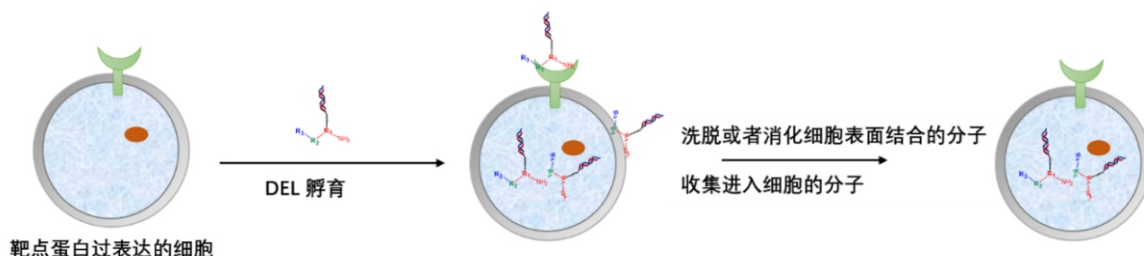


图2. 从DEL筛选中直接鉴定核酸递送试剂的示意图

» 基于功能的DEL筛选技术

目前DEL筛选主要是基于亲和力结合,然而,基于功能的DEL筛选以直接得到有功能活性的化合物被认为是一种有前景的方法。在基于功能的筛选中,“一珠一化合物”(OBOC) DEL筛选策略已实现应用,以确定能筛选到直接调节靶标活性的苗头化合物。DEL筛选也在各种基于细胞的形式上得到应用,无论是针对细胞表面靶点进行筛选,还是将DEL引入细胞,通过不同的实验设计,以产生对特定细胞结果产生偏向性影响的信号,如此实现一定的功能调节的筛选。通过针对不同的表型、细胞功能或特定的报告基因系统进行DEL筛选,研究人员可以在细胞层面发现调节这些功能的化合物或揭示出潜在的药理发现新靶点。

» 农药开发中的DEL筛选应用

DEL技术应用于农药开发具有与应用于药物发现类似的优势。它允许在不同条件下对大型化合物库进行平行筛选研究,并能识别出具有不同化学结构和潜在新作用模式的化合物。通过对广大人类靶点筛选数据的比较,在农药开发中可进一步保证化合物对农药靶点的选择性而降低其靶向人类靶点的选择性和毒性问题。同时,DEL广阔的化学空间也为靶向某些昆虫或真菌特定的靶点提供了可能,从而可以进一步减轻农药开发中可能的环境污染问题。利用DEL的强大功能,我们在一个农药靶点筛选中有效地确定了可开发的新化合物,并优化了其化学性质,提高了药效,这些化合物被进一步选作候选农药(图3)。

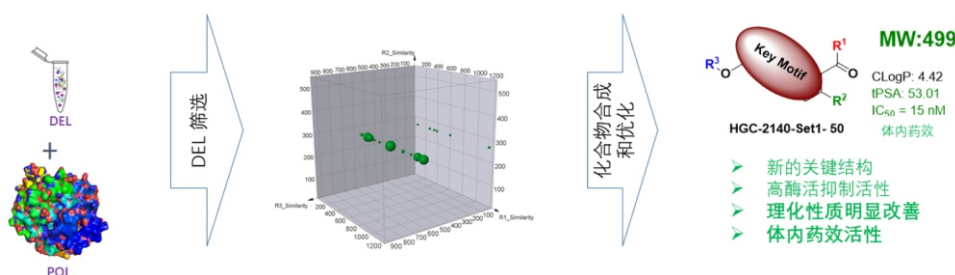


图3. 通过DEL筛选确定候选农药

展望

随着科学研究的不断进步,DEL技术的发展和应并不局限于上述应用领域,并且还在不断扩展。例如,利用DEL分子固有的连接和共轭等特性,其在开发抗体偶联药物(ADC)方面具有潜在的用途,不仅适用于新型细胞毒剂的鉴定,还可提供与连接子和偶联有关的信息。此外,DEL也是分析靶标可被靶向性的有力方法,它有助于获取与靶标相互作用的分子性质以及描绘各种靶标结合位点的关键信息。同时,从DEL筛选中获得的大量数据集可用于训练人工智能(AI)模型,从而帮助设计新分子。预计在不久的将来,将涌现出大量DEL技术的新颖应用,我们很高兴能见证这一浪潮。

新分子 找先导



成都先导药物开发股份有限公司

地址: 中国四川省成都市双流区(天府国际生物城)慧谷东一路8号C2栋

电话: +86 (28) 85197385 传真: +86 (28) 83310298 邮编: 610200

邮箱: BD@hitgen.com

网站: www.hitgen.com

—— 新 分 子 找 先 导 ——

HITGEN