



药物筛选技术革命—— DNA编码化合物库技术 (DNA Encoded Chemical Library, DEL)

指导老师：施章杰教授

汇报人：黄逸飞

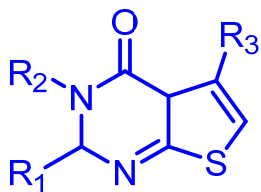
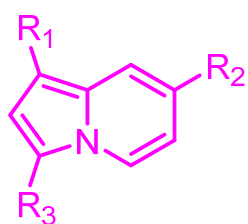
时间：2022/11/9



- 一. 背景介绍——药物筛选方法
- 二. DEL库的合成方法
- 三. DEL技术的筛选方法
- 四. DEL技术的应用
- 五. 总结与展望



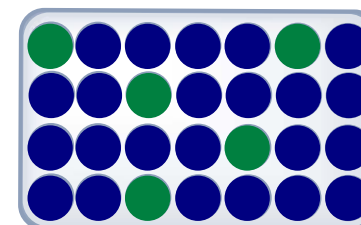
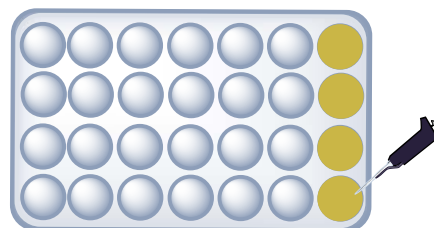
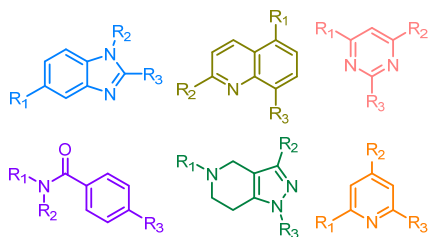
一. 药物筛选——高通量筛选



先导化合物

药物

高通量筛选



已合成的大型化合物库
(百万级)

逐一测试与目标蛋白的亲合力

筛选出先导化合物

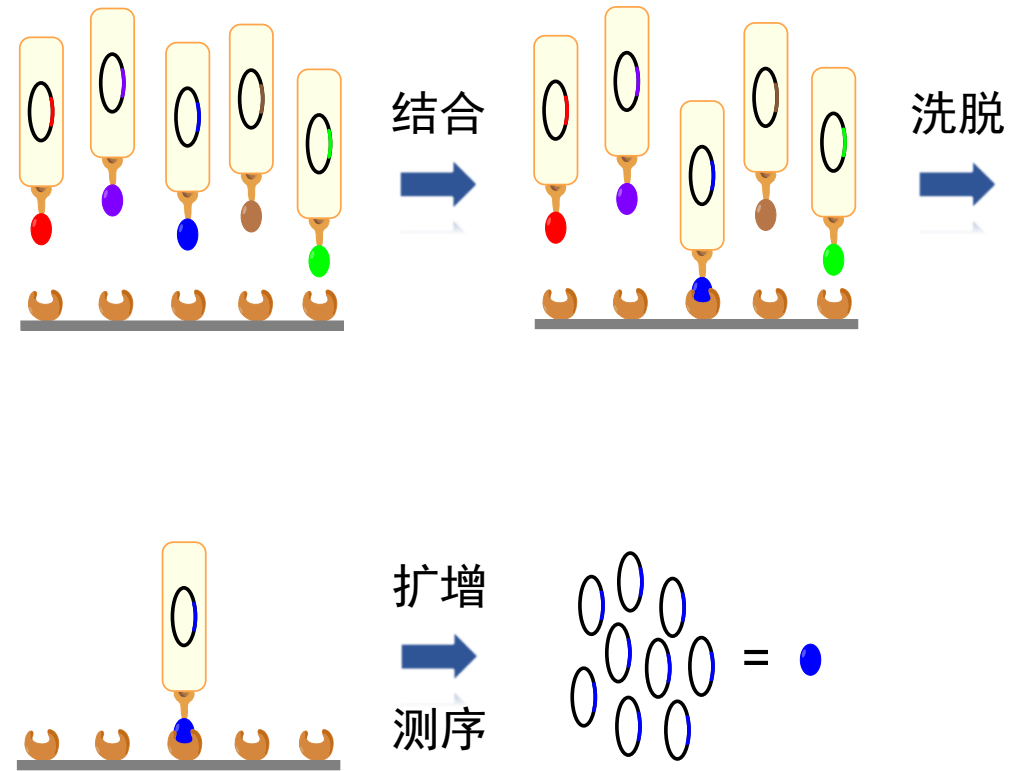
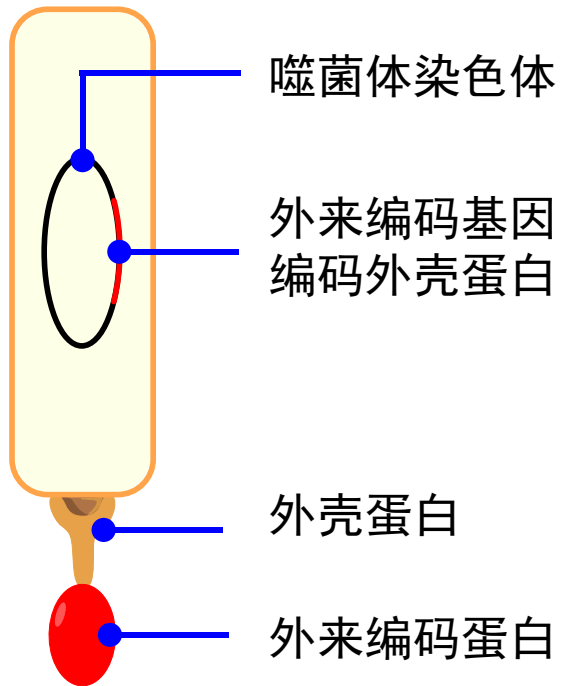
高额储存与分析成本

测试结合力过程繁琐且低效



一. 药物筛选——噬菌体展示技术

丝状噬菌体



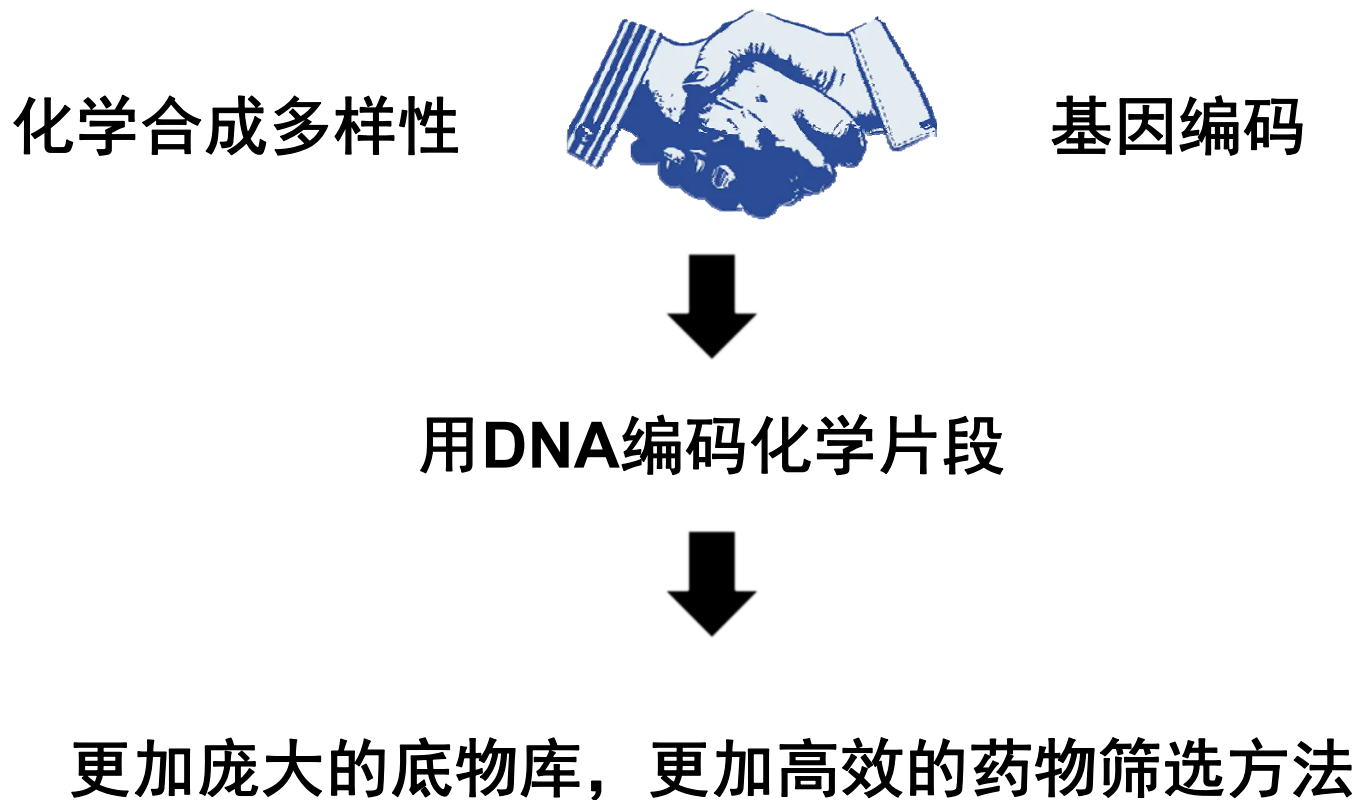
庞大的DNA库得以
轻松构建庞大的蛋白库

噬菌体的进化有时不可控
受限于生物蛋白质合成



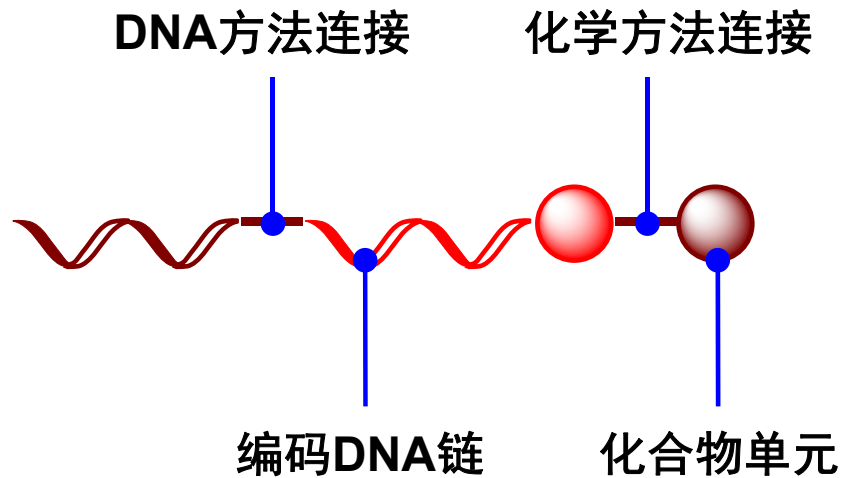
一. 药物筛选——DEL技术的提出

1992年的一个思想实验：





一. 药物筛选——DEL技术



最初的想法:

- 化合物单元（分子砌块）：肽
- 添加一个肽后添加一个特定的DNA链

1993年，首次合成并应用DEL技术:

- 成功通过这种方法构建了一个肽库（约 10^6 ）
- 通过荧光激活细胞分选技术得到目标结合物
- 通过PCR鉴定目标结合物
- 如何制备DEL库
- 如何筛选并解码

Brenner, S.; Lerner, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 5381–5383.

Nielsen, J.; Brenner, S.; Janda, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9812–9813.

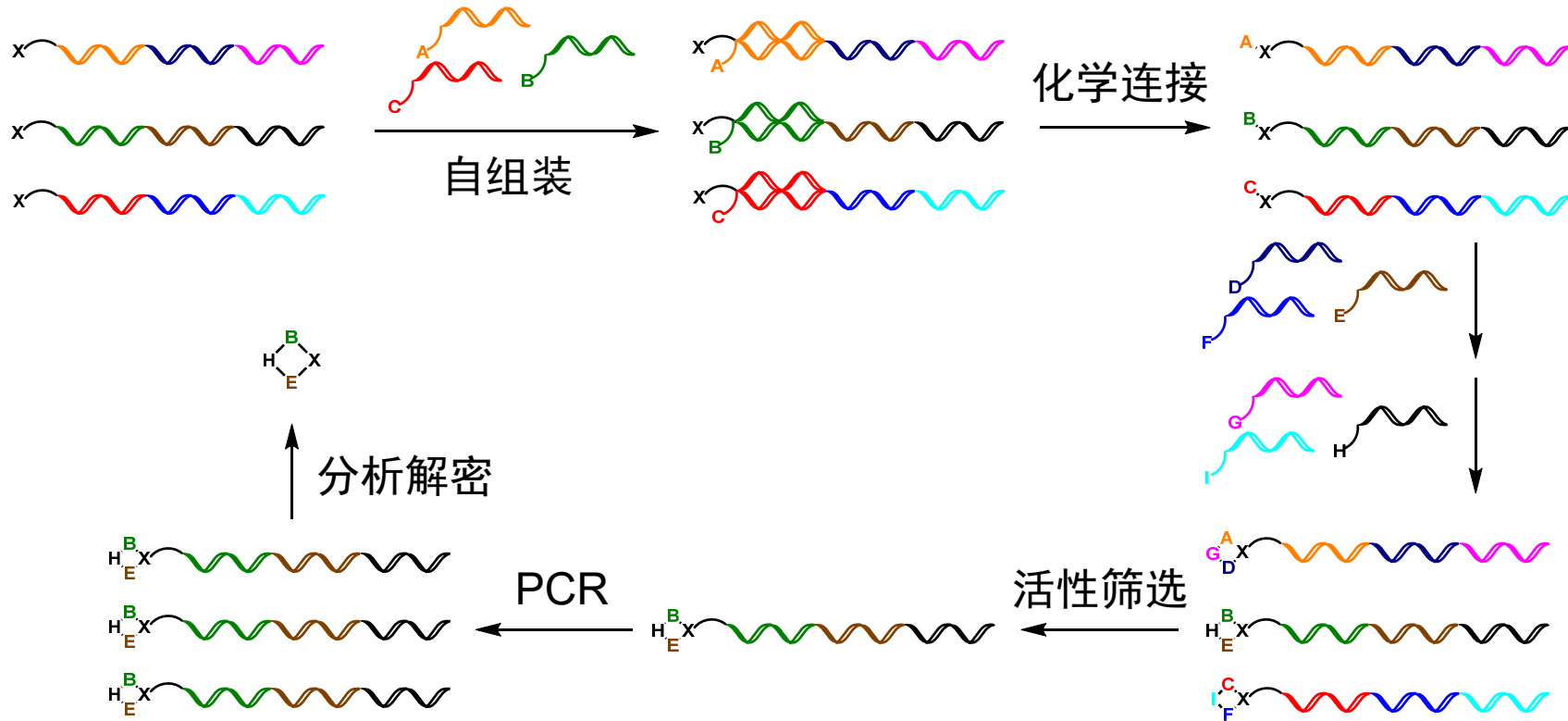


二. DEL库的合成方法——DNA模板合成法

2004年, Liu:

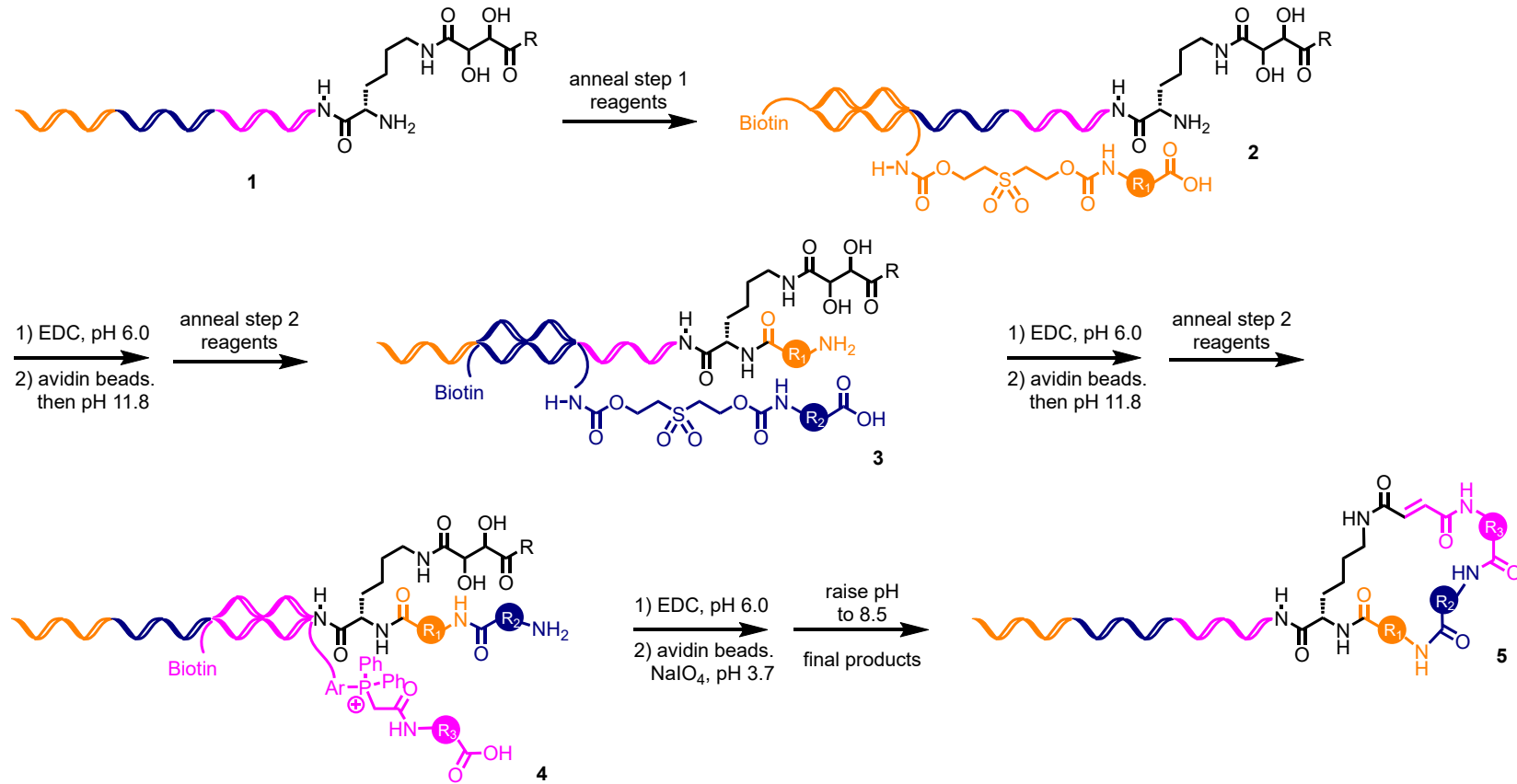
利用DNA的自组装特性

先合成编码链, 后连接化合物





二. DEL库的合成方法——DNA模板合成法



适用于构建大环肽链库

库是设计好的，合成成本高，只宜构建较小的库

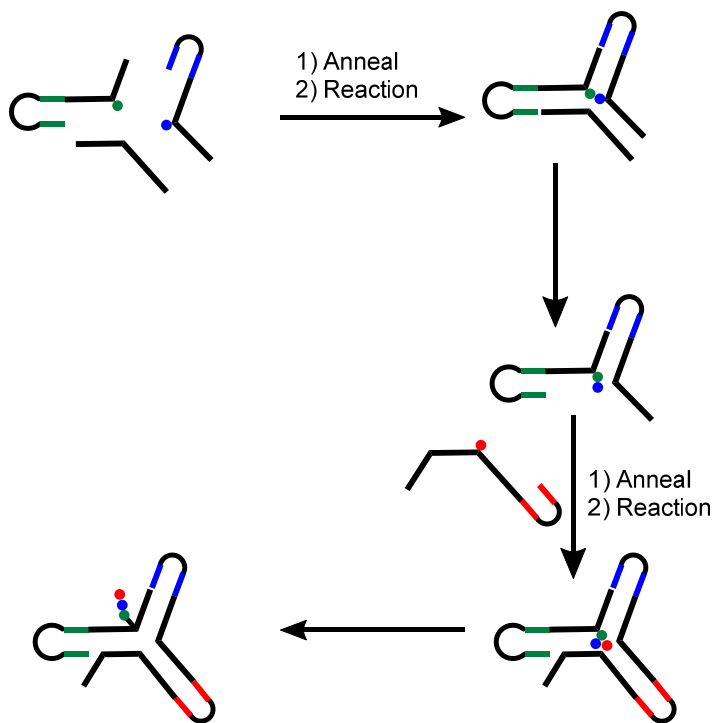


二. DEL库的合成方法——约克托反应器技术

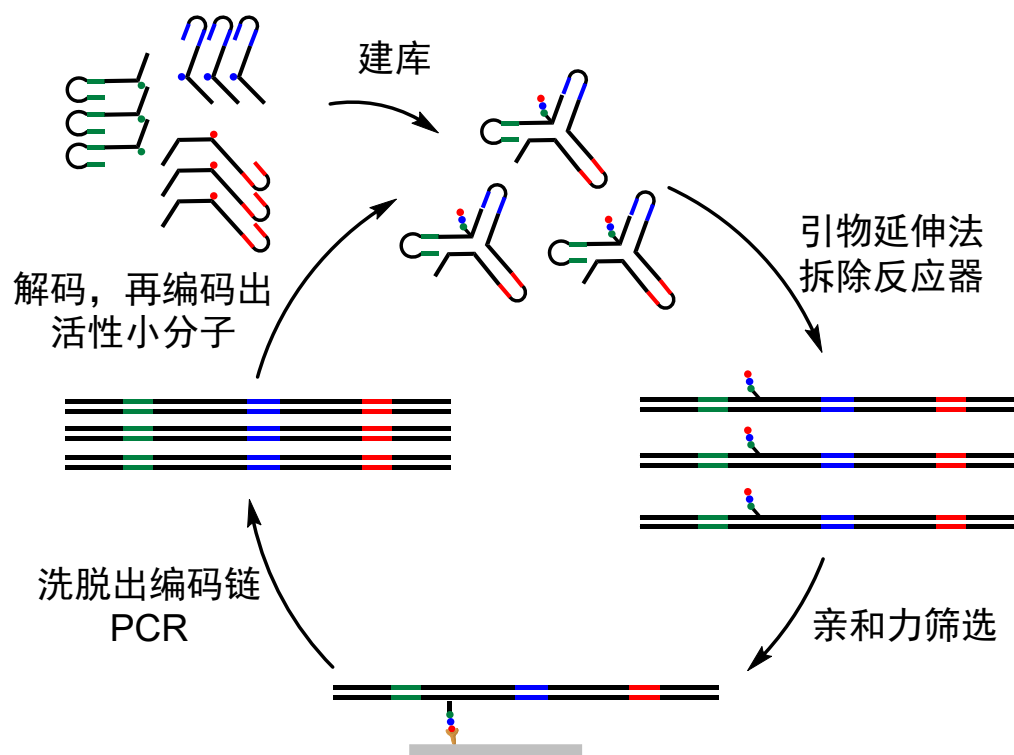
2009年, Hansen:

DNA自组装为一个分子容器, 反应规模小至约克托升 (10^{-24} L, 分子级)

约克托反应器库的构建步骤



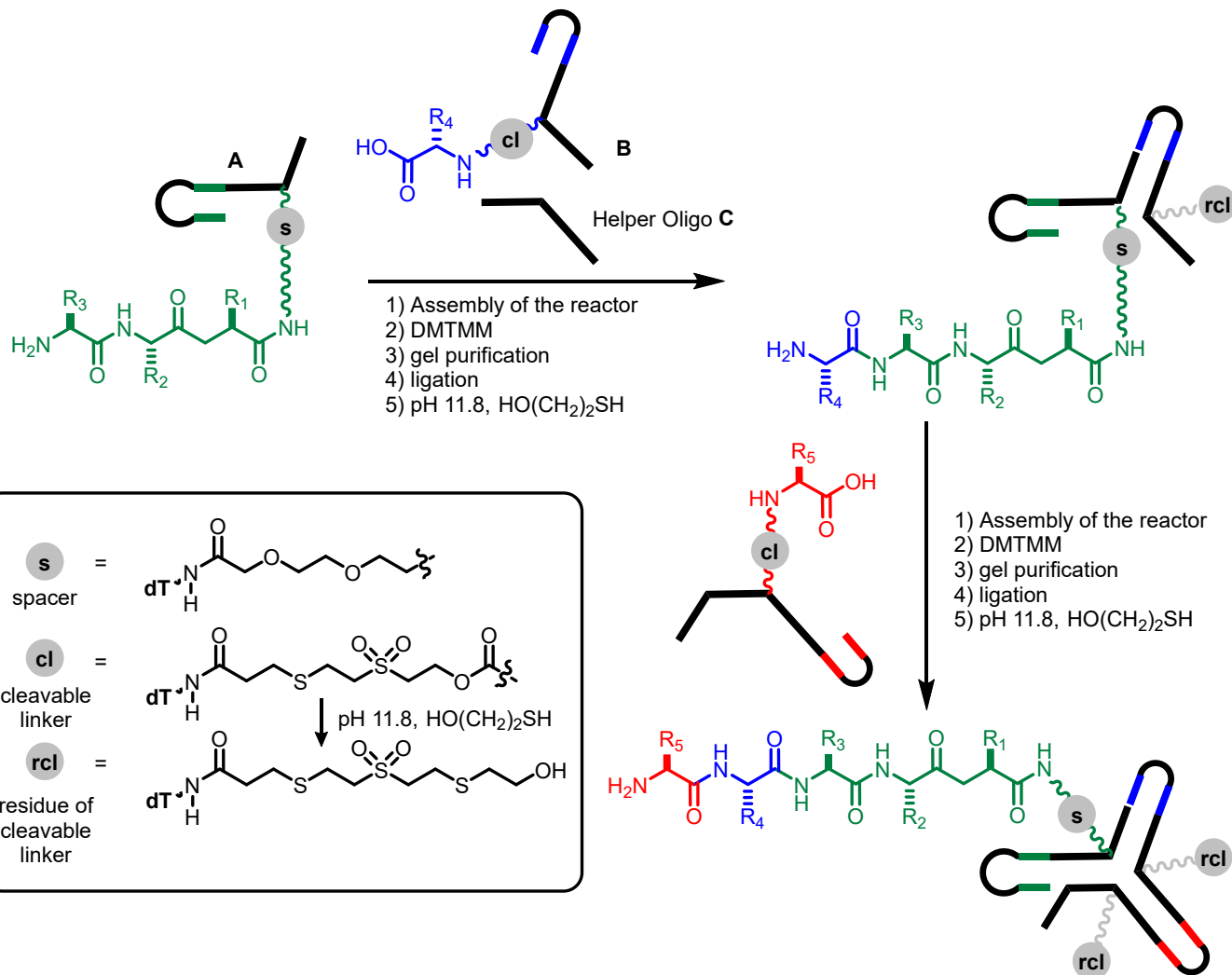
约克托反应器库用于药物筛选基本步骤



Hansen, M. H.; Blakskjær, P.; Petersen, L. K.; Hansen, T. H.; Højfeldt, J. W.; Gothelf, K. V.; Hansen, N. J. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1322–1327.



二. DEL库的合成方法——约克托反应器技术



分子级容器中
驱动高效合成

得到的库相对较
小，成本略高

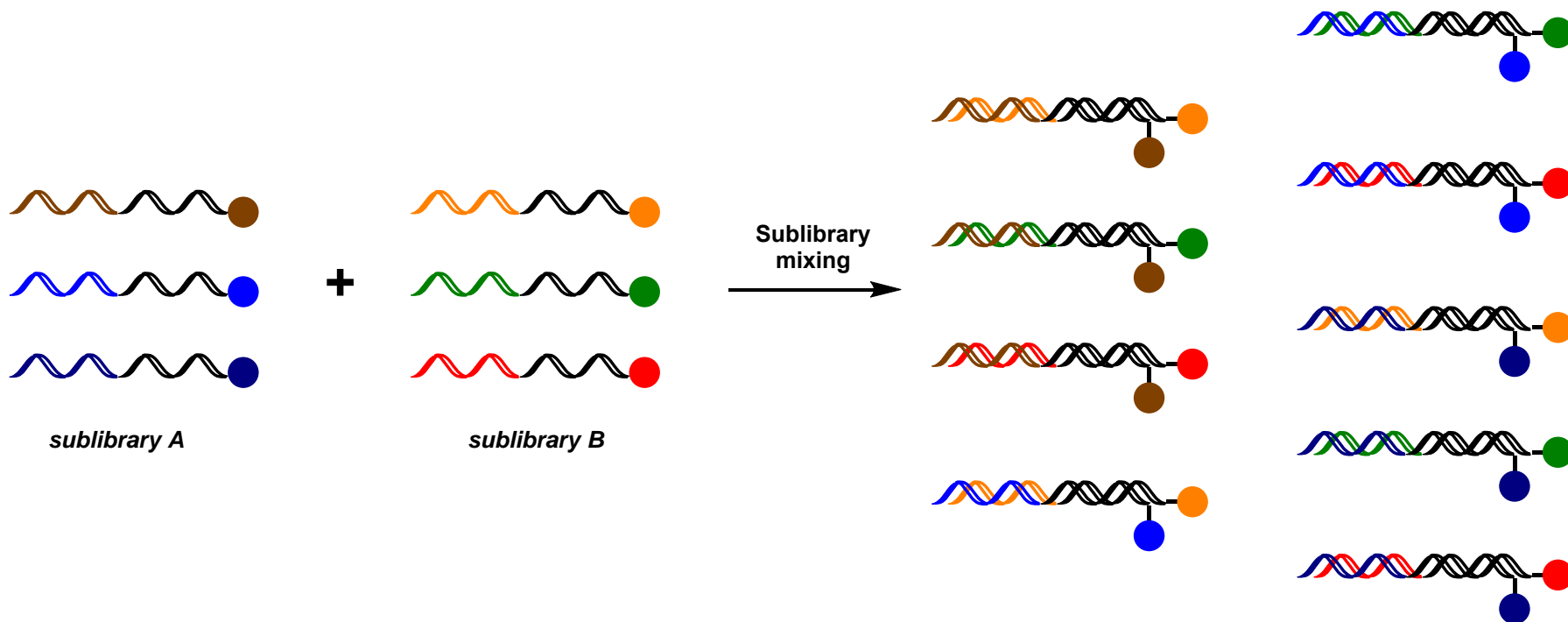


二. DEL库的合成方法——编码自组装化学库

2004年, Neri:

利用DNA的自组装特性

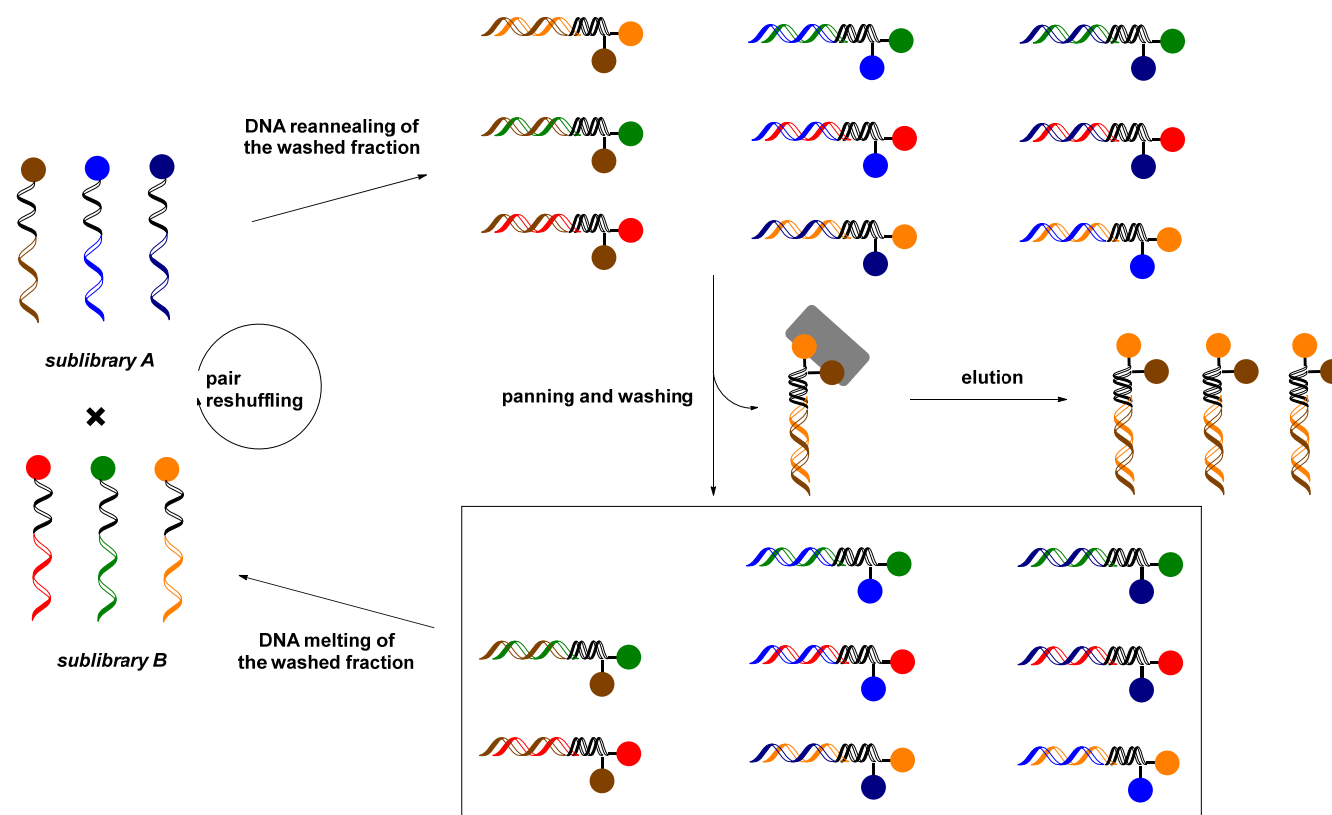
不连接化合物, 直接构建双药效团库





二. DEL库的合成方法——编码自组装化学库

2015年, Zhang, DNA编码的动态自组装化学库:



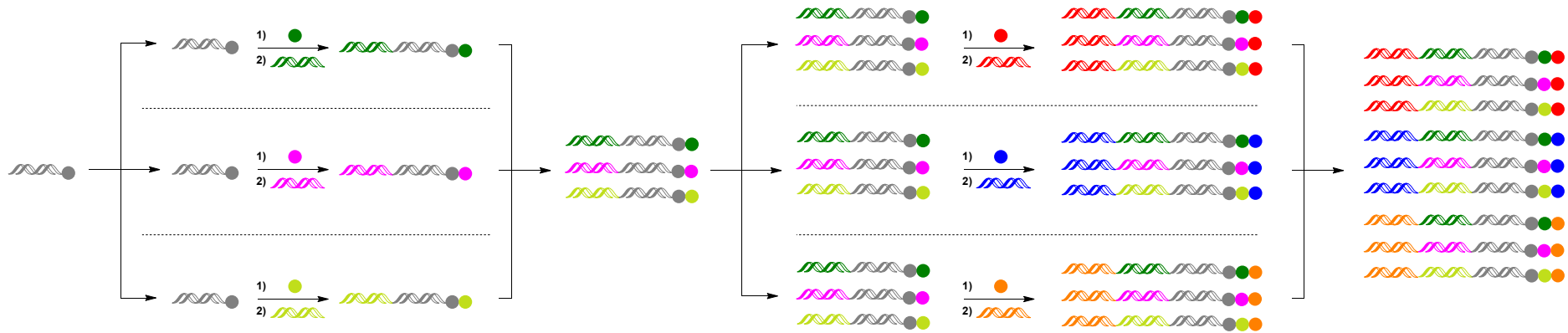
动态结合, 与靶标蛋白的结合更为灵活

筛出分子可能实际药效不高



二. 更为普适的DEL库合成方法

2009年, Morgan:

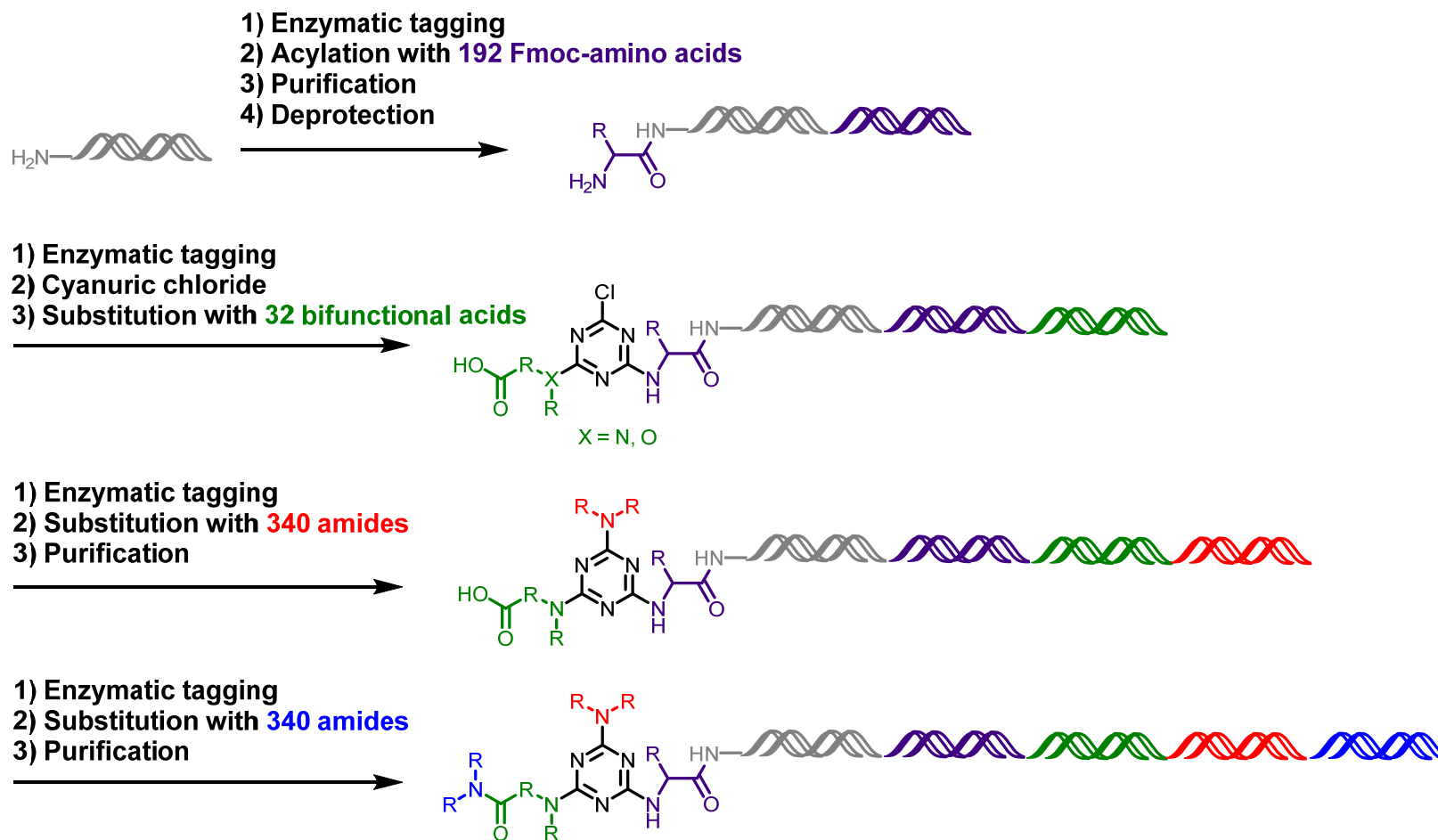


1. 从称为头段 (headpiece) 的DNA链出发
2. 连接分子砌块 (BBs)
3. 通过酶连接编码该砌块的DNA链
4. 重复第2、3步, 完成DEL库的构建

- 快速高效
- 分子库庞大 (亿级)



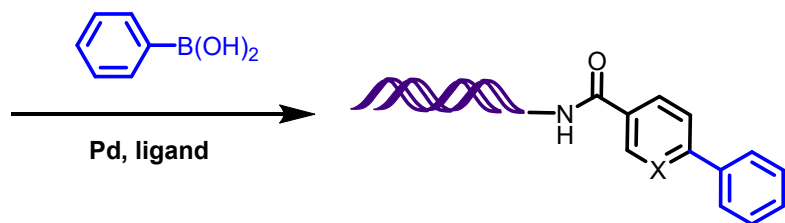
二. 更为普适的DEL库合成方法



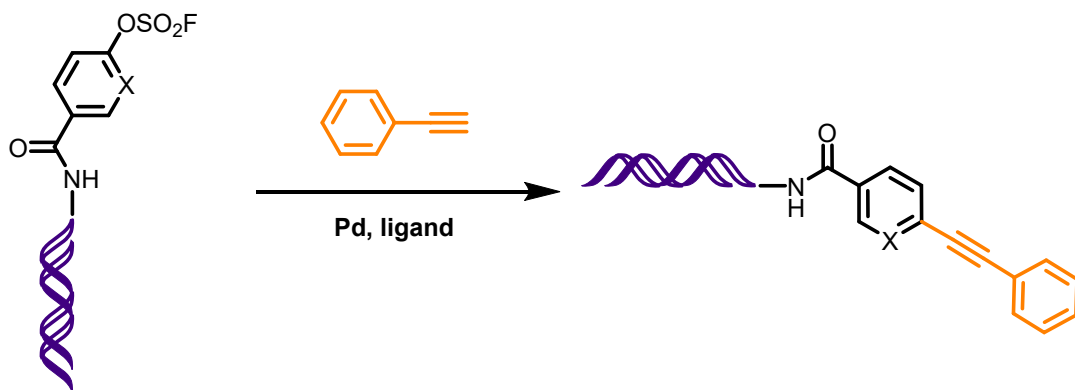
- DNA不溶于有机溶剂，仅适合于水溶性化学反应
- 反应需要具备极佳的化学选择性，避免破坏富含官能团的DNA编码链



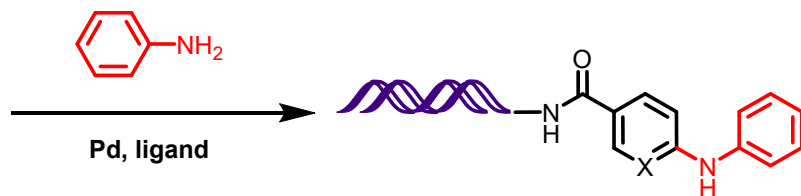
二. 更为普适的DEL库合成方法



Suzuki-Miyaura Coupling Reaction



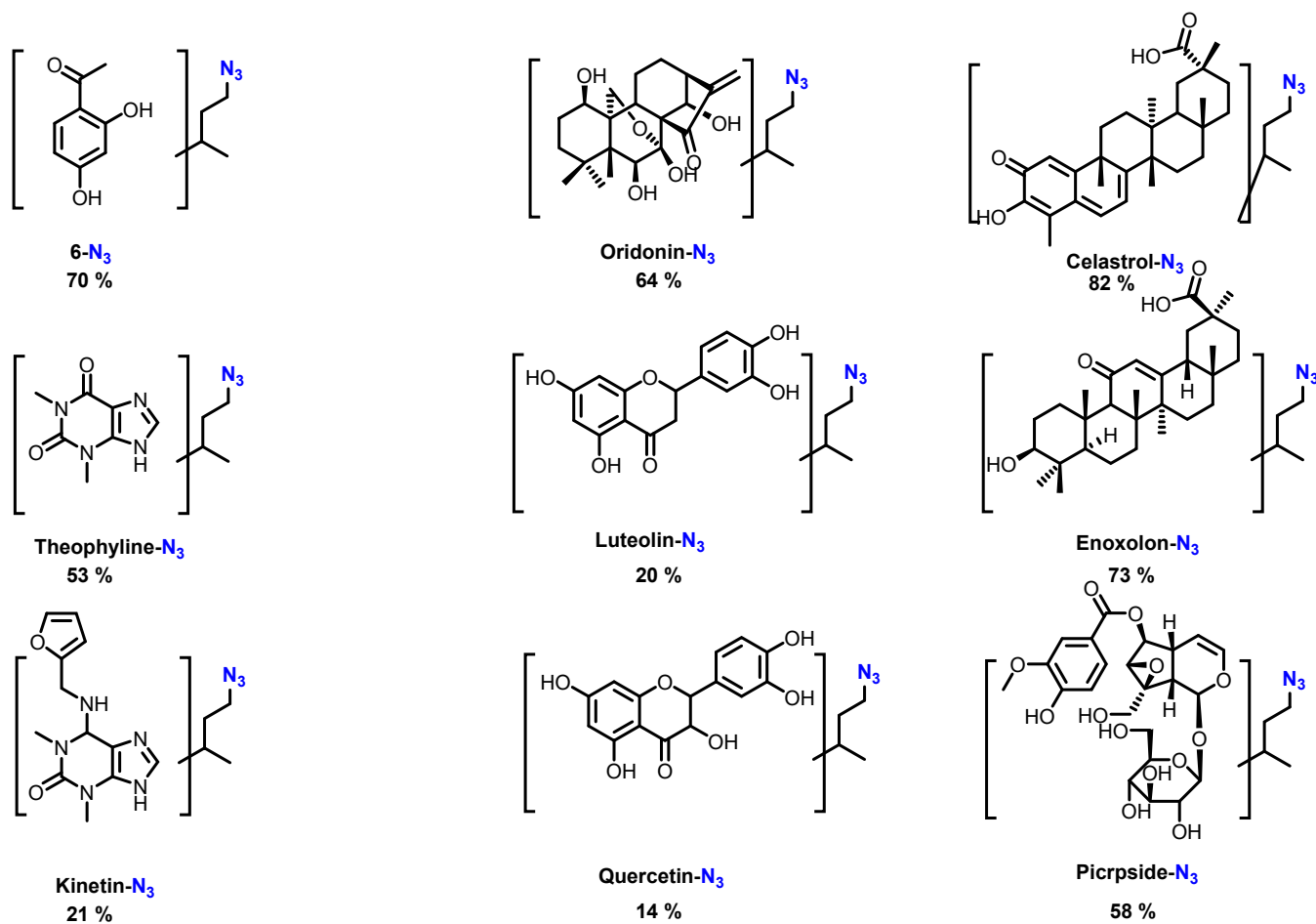
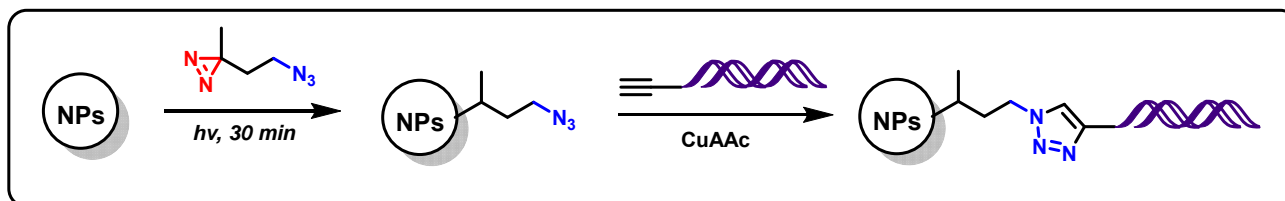
Sonogashira Coupling Reaction



Buchwald-Hartwig Coupling Reaction



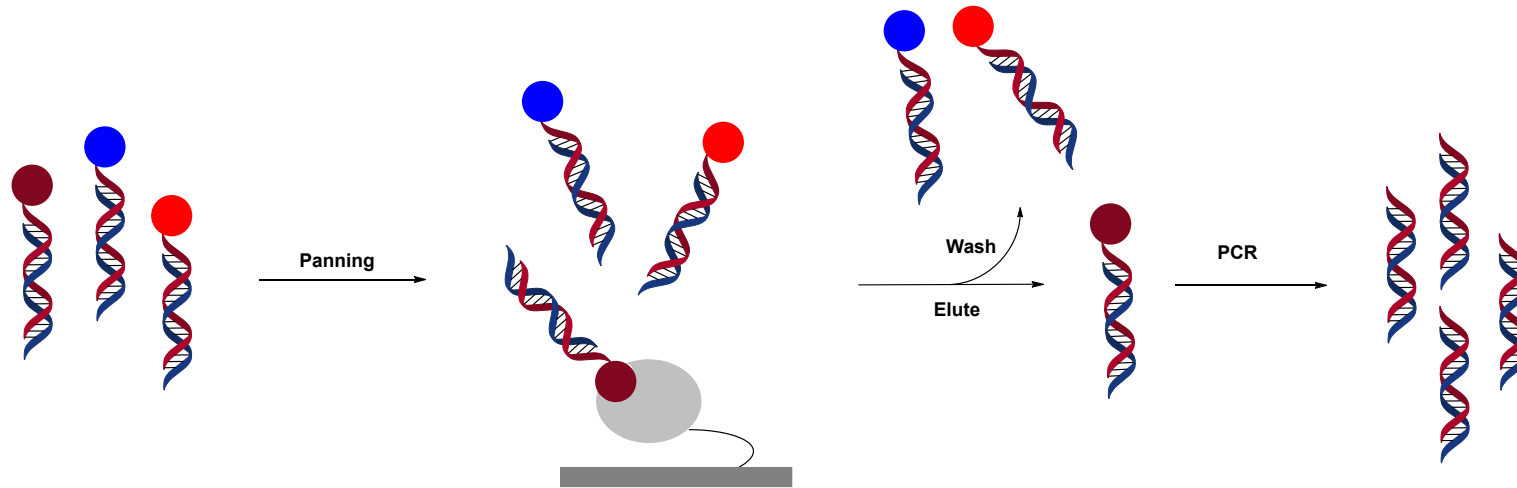
二. 更为普适的DEL库合成方法



Ma, P.; Xu, H.; Lerner, R. A. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 9254-9261.



三. DEL技术的筛选方法



通常的筛选流程：

1. 库与靶标蛋白（负载在链霉亲和素上）进行亲和力筛选
2. 洗脱与靶标结合的库分子
3. 鉴定有效结合的小分子结构

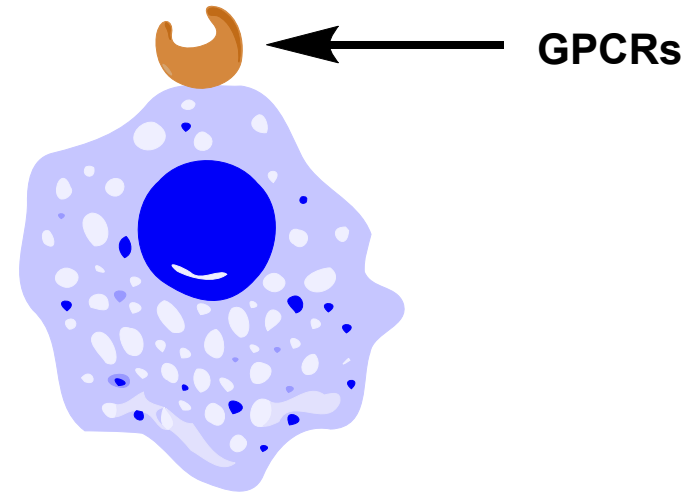
- 这种方法仅适合对可溶、可分离和可纯化的目标蛋白质进行筛选。
- 诸如筛选条件、亲和到目标蛋白的条件、洗涤过程、蛋白质固定过程等实验参数的变化都会对选择结果产生巨大影响。



三. DEL技术的筛选方法

2015年，葛兰素史克公司：

- 针对在细胞表面过度表达的G蛋白偶联受体（GPCRs）进行DEL库的筛选
- 目标蛋白（一种称为NK3的速激肽G蛋白偶联受体）被细胞过度表达，并有效地固定在细胞表面
- 针对过量表达该受体的细胞群体以及无过度表达的细胞群体对照组进行DEL筛选
- 将过量表达的细胞群的筛选结果与未过度表达的细胞群的筛选结果进行比较，扣除与不过度表达的细胞群结合的分子后，便能得到最后筛选出的DEL分子



亮点

使难以分离和纯化的G蛋白偶联受体与 DEL 结合，切实扩大了DEL技术可筛选的目标蛋白组



三. DEL技术的筛选方法

上述方法都不是真正意义上的小分子-蛋白质结合，而是连接在编码DNA链上的小分子与目标蛋白质的结合。



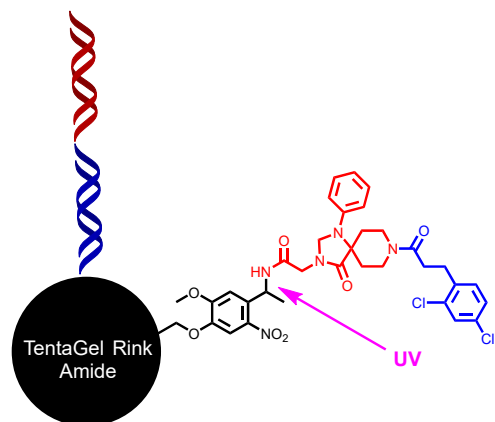
编码DNA链的存在难免对目标蛋白的筛选有所影响，许多相关的病理学研究也证明了通过上述方法筛选出的DEL小分子无法独立地与目标蛋白结合，这些筛选出的小分子最终在体外或体内都丧失了活性。



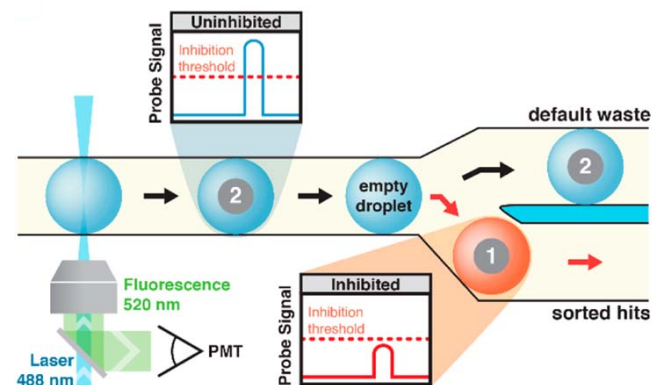
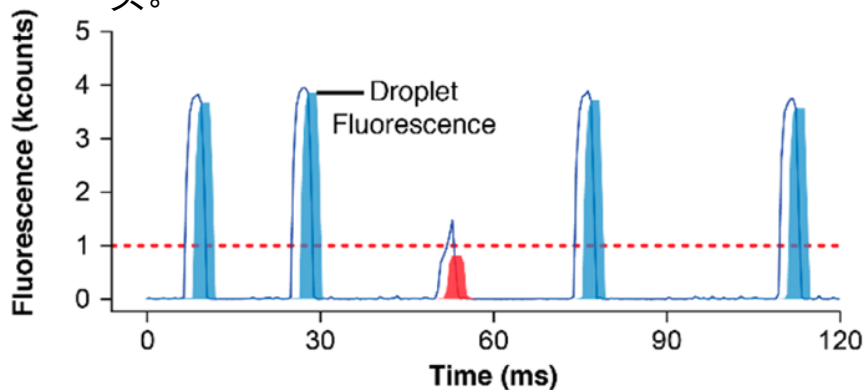
需要更为复杂且精细的生化分析手段直接测出DEL库成员的活性。



三. DEL技术的筛选方法——一珠一化合物法



库分子砌块通过光可裂解的键组装在 TentaGel Rink Amide 载体上；编码的 DNA 通过正交连接的方式连接到载体另一头。



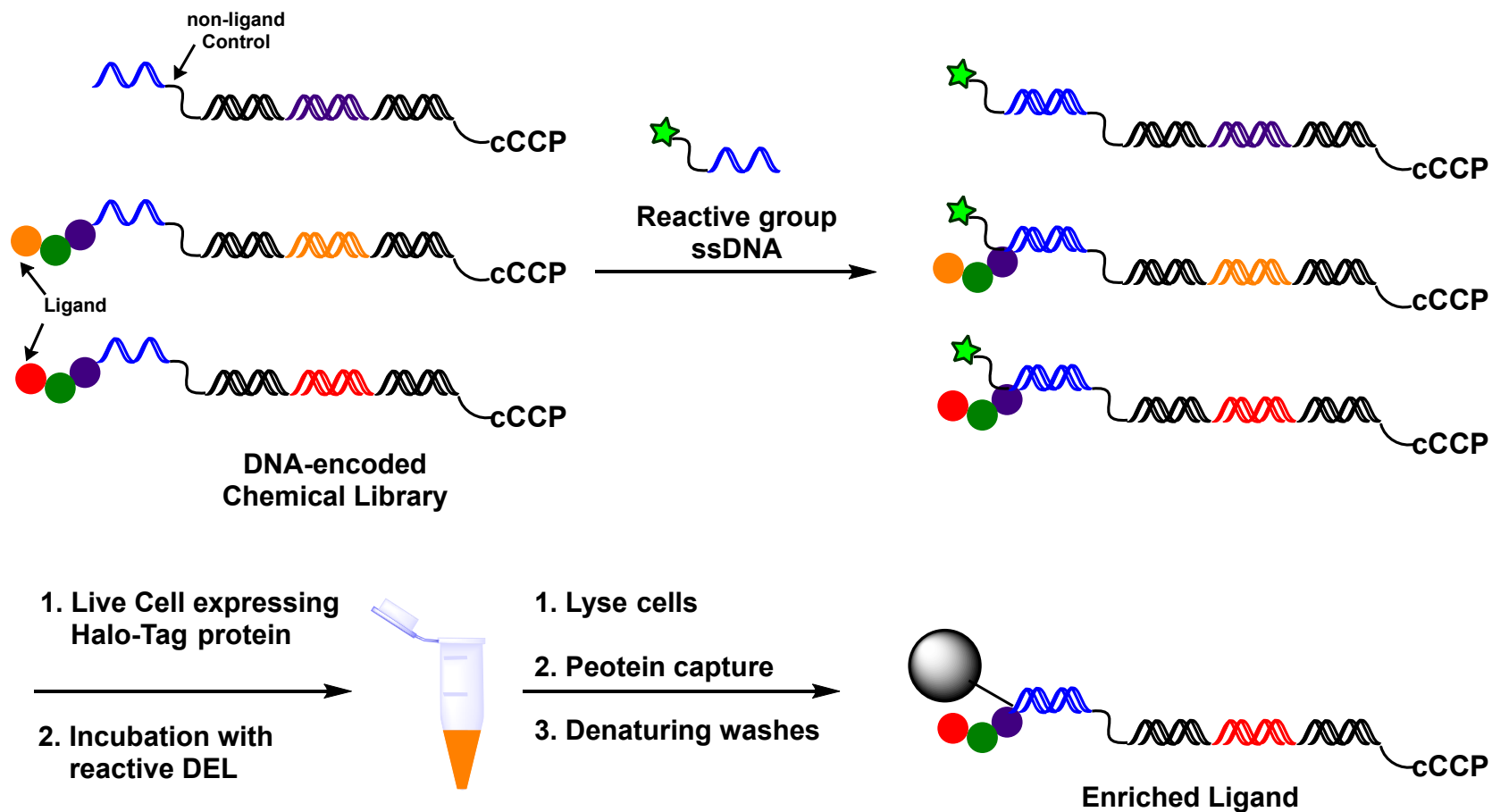
微流控设备使每个载体都包含在其自己的液滴中，液滴中包含用于磷酸二酯酶自分泌生物素测定的所有成分，可直接测定活性，用365 nm 的紫外线切下载体上的分子砌块。

液滴流过荧光检测器并基于活性进行分离（确定含小分子液滴与背景液滴相比是否具有显著的荧光值下降），并重新合成出筛选出的小分子，再次确认其活性。

✓ 直接测定小分子的生物活性



三. DEL技术的筛选方法



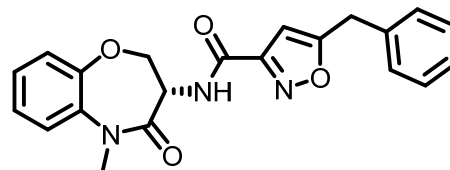
✓ 直接在天然细胞环境中对蛋白质
与DEL分子进行亲和力筛选



四. DEL技术的成功案例

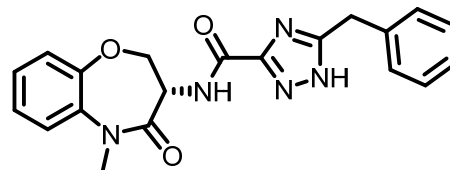
2016年，葛兰素史克公司：

对公司内77亿个DEL分子库进行了针对RIP1激酶（在调节肿瘤坏死因子中起主要作用）的活性筛选，得到**GSK 481**



GSK 481

[From DNA encoded library]
[RIP1 IC₅₀ = 1.3 nM]
[U937 cell IC₅₀ = 10 nM]
[Mono-kinase selectivity]
[Excellent PK profile in rodent]
[Lead compound]



GSK 2982772

[From GSK 481 after SAR]
[RIP1 IC₅₀ = 1.0 nM]
[U937 cell IC₅₀ = 6.3 nM]
[Excellent ADMET properties]
[Predicted low oral dose in human]

GSK 481

- ✓ 单激酶选择性
- ✓ 高效力
- ✓ 好的药代动力学性质

构效关系优化



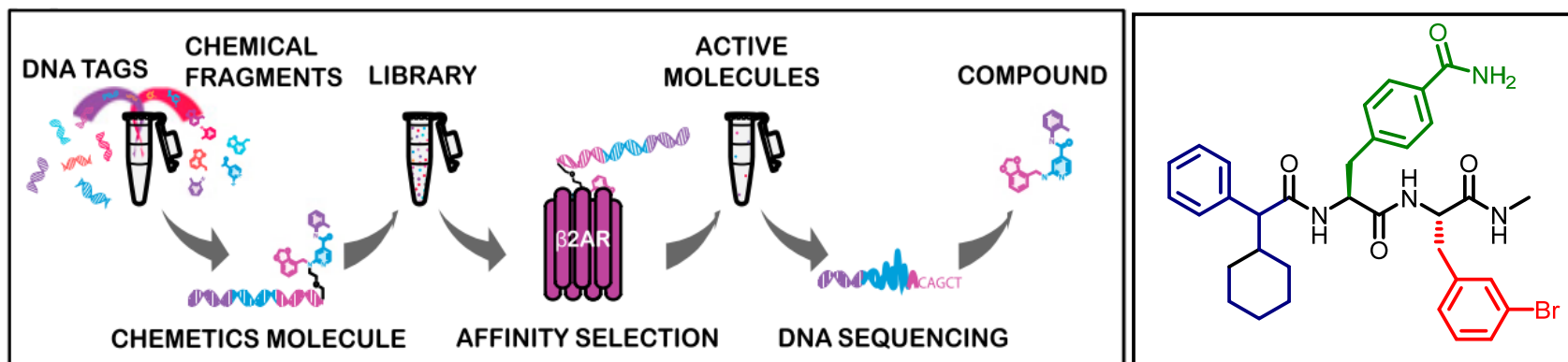
GSK 2982772

- ✓ 更好溶解度、亲脂性
- ✓ 激酶特异性、高活性
- ✓ 2017年进入银屑病、类风湿关节炎和溃疡性结肠炎患者的2a期临床试验



四. DEL技术的成功案例

2018年, Lefkowitz:



针对β2-肾上腺素受体（β2AR）筛选了一个含1亿9千万种化合物的DEL库

- ✓ 发现了首个作用于β2AR的小分子正变构调节剂
- ✓ 该化合物对β2AR具有微摩尔量级亲和力
- ✓ 该化合物对β2AR具备良好选择性



四. DEL技术的成功案例

年份	库设计	命中分子	靶标蛋白
2012			Interleukin-2
2015			HSA
2015			Tankyrase-1
2015			AGP
2017			Aurora A kinase

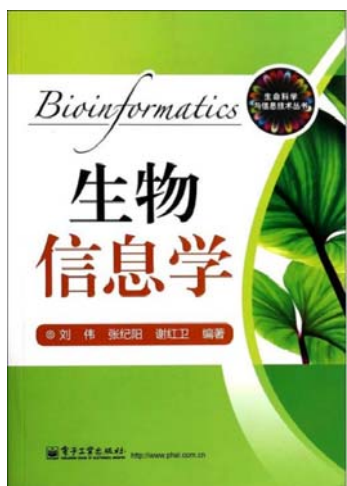


四. DEL技术的成功案例

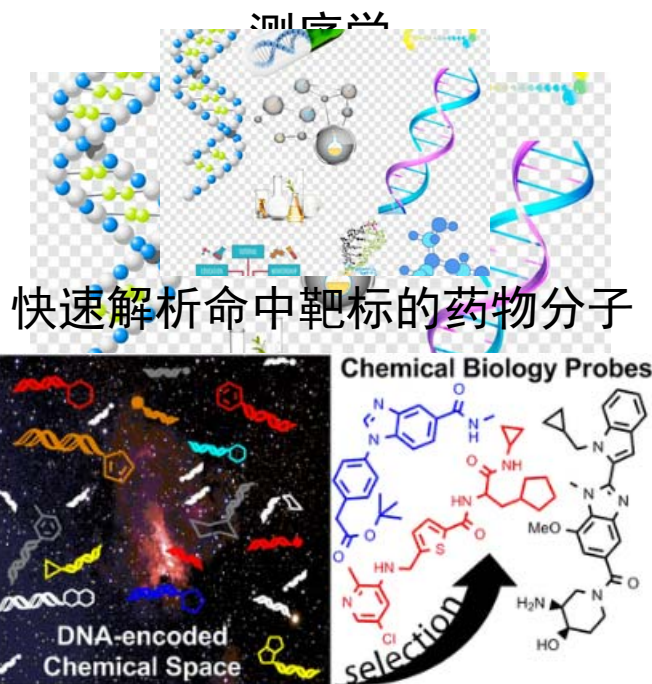
年份	命中分子	优化后结构	靶标蛋白	临床状态
2020	<p>$IC_{50} = 8 \text{ nM}$ $cLogP = 0.04$</p>	<p>$IC_{50} = 0.027 \text{ nM}$ $cLogP = -0.22$</p>	she GSK	Phase 2b
2019	<p>$IC_{50} = 86 \text{ nM}$ $cLogP = 4.13$</p>	<p>$IC_{50} = 55 \text{ nM}$ $cLogP = 3.69$</p>	ENPP2 X-Chem	Phase 1
2018	<p>$IC_{50} = 90 \text{ nM}$ $cLogP = 7.23$</p>	<p>$IC_{50} = 23 \text{ nM}$ $cLogP = 6.67$</p>	PAR2 AstraZeneca /X-Chem	Lead
2021	<p>$IC_{50} = 13 \text{ nM}$ $cLogP = 4.70$</p>	<p>$IC_{50} = 6 \text{ nM}$ $cLogP = 3.30$</p>	Wip 1 GSK	Lead
2017	<p>$IC_{50} = 251 \text{ nM}$ $cLogP = 4.76$</p>	<p>$IC_{50} = 13 \text{ nM}$ $cLogP = 2.92$</p>	BCATm GSK	Lead



五、总结与展望



处理更大的DEL库



建立更大的DEL库
更高效的合成方法



更多可用DEL技术
筛选的酶受体



Thanks!