

# DNA 编码化合物库技术新进展及其在生物医药领域的应用与展望

李小芳, 方萍萍, 徐沛\* (中国计量大学生命科学学院, 杭州 310018)

**摘要:** 随着医药领域对靶向调节特定生命活动过程的新分子化合物的需求日益增加, 高效、低成本地发现亲和配体分子的新型小分子药物筛选技术——DNA 编码的化合物库(DNA encoded compound library, DEL)筛选技术应运而生。DEL 作为组合化合物库, 可以是简单小分子化合物的集合, 也可以是具有高级空间结构的复杂小分子库, 每个化合物都以共价方式与特异的 DNA 序列偶联, 因而可将库中所有化合物与靶标蛋白进行合并筛选, 随后使用高通量测序对 DNA 编码序列进行测序来鉴定结合的配体分子。近年来, 应用 DEL 技术筛选开发候选药物的例子已越来越多地被报道, 本文回顾和总结了 DEL 技术的实施流程, 特别是 DEL 库构建和亲和筛选方法的最新研究进展, 展示了利用 DEL 技术筛选开发最新亲和配体分子, 并对 DEL 技术在生命科学领域的应用前景作了展望。

**关键词:** DNA 编码化合物库技术; 组合化学; 亲和筛选; 药物发现

中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)05-0712-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20220854

引用本文: 李小芳, 方萍萍, 徐沛. DNA 编码化合物库技术新进展及其在生物医药领域的应用与展望[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(5): 712-720.

## Progress of DNA Encoded Compound Library Technology and Its Applications and Perspectives in Biomedicine

LI Xiaofang, FANG Pingping, XU Pei\* (College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

**ABSTRACT:** With the increasing demand of discovering new molecules that specifically modulate certain biological processes in pharmaceutical industry and life sciences, a novel small molecule screening technology for efficient and cost-effective discovery of affinity ligand molecules, the DNA encoded compound library(DEL) screening technology has been developed. DEL is a combinatorial chemical library comprising an unprecedented number of either simple chemicals or those with highly sophisticated structures. Each compound in the library is attached to a unique DNA tag in a covalent manner, allowing the compounds to be pooled and screened against a target protein. The binding hits can subsequently be identified based on the DNA codes through high-throughput sequencing. In recent years, the application of DEL technology in the development of clinical drug candidates has been widely reported. This paper reviews and summarizes the process and progress of DEL technology, especially recent advancements in DEL library construction and affinity screening methods, demonstrates the latest affinity ligand molecules screened and developed by DEL technology. The perspectives of the application of DEL in life sciences including biomedicine and other fields are discussed.

**KEYWORDS:** DNA encoded compound library; combinatorial chemistry; affinity screening; drug discovery

新型药物的发现始于获得与生物靶点有效结合的特异性配体<sup>[1]</sup>, 在基础研究中, 破解复杂生化过程也常常依赖于使用药理学手段, 如应用本质为活性小分子的“化学探针”来进行功能研究<sup>[2]</sup>。因此, 制药公司和学术机构对高效、低成本的靶标分子筛选技术需求十分巨大。在此背景下, 一种新型的可快速高通量筛选多种不同亲和配体分子的新技术——DNA 编码的化合物库(DNA encoded compound library, DEL)技术应运而生。

DEL 的概念由 Sydney Breener 和 Richard Lerner 于 1992 年提出<sup>[3]</sup>, 是用组合化学的“均分

混合”策略来大量合成百万级乃至百亿级带有 DNA 编码的化合物文库。利用一段独特的 DNA 序列标记反应过程中的每一个化学构建块(building block, BB), 从而对库中的每一个化合物进行编码。构建好的化合物文库与靶标蛋白进行亲和筛选, 获得能够与蛋白有效结合的化合物集合。这些化合物的 DNA 序列部分通过 PCR 扩增后经二代测序技术进行解码, 即可得到与靶标蛋白结合的化合物分子结构。相较于传统的高通量筛选方法, DEL 不仅可以同时对多个或同一靶标蛋白的多个条件进行筛选, 且在化合物库规模、

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2021C02041)

作者简介: 李小芳, 女, 硕士生 E-mail: p20091055012@cjlu.edu.cn

\*通信作者: 徐沛, 男, 博士, 教授 E-mail: peixu@cjlu.edu.cn

建库难度、筛选效率和耗费上都具有巨大优势<sup>[4]</sup>。

DEL 技术流程的优化是推动其更有利于药物发现的必要前提,包括 DNA 编码化合物库构建的优化、筛选策略的优化以及解码结果分析方法的优化等。近年来,利用 DEL 筛选获得新型先导化合物的报道陆续出现<sup>[5-6]</sup>,比如针对肿瘤坏死因子介导的炎症中起作用的受体相互作用蛋白-1 (receptor-interacting protein 1, RIP1) 激酶筛选得到的抑制剂,以及为治疗慢性阻塞性肺病而针对可溶环氧化物水解酶筛选得到的抑制剂均已进入临床试验阶段。本文基于 DEL 近 30 年的发展,总结其操作流程和相关技术进展,概述该技术在医药领域的应用现状,并对其在生命科学其他领域的应用前景作了展望。

### 1 DNA 编码化合物库的构建

DNA 编码化合物库由小分子共价偶联到单链或双链 DNA 形成的嵌合化合物组成<sup>[7]</sup>, DEL 文库的构建是 DEL 应用的第一步。大多数 DEL 文库的构建方法都基于经典的组合化学中“均分-混合-均分”策略<sup>[8]</sup>,在这种策略下, $n$ 组各自包含  $m$  个不同的 BB,通过  $n$  步均分混合产生具有  $m^n$  个化合物的文库。每一个化合物均连着一段特异的 DNA 标签。通过这种策略可以构建包含百万甚至上亿级化合物的 DEL 文库(图 1)。大量新型构建模块的合成以及更多 DNA 兼容的化学反应技术的优化,使得 DEL 库的化合物拥有了更高的化学多样性和成药性,进而显著提高了目标蛋白亲和分子筛选的命中概率。

目前,DEL 化合物库的 DNA 编码方法包括

DNA 记录法、DNA 模板法<sup>[9]</sup>、编码自组装化学法(encoded self-assembling chemical, ESAC)<sup>[10-11]</sup>和基于 yoctoReactor 方法的 DNA 连接法等<sup>[12-13]</sup>。尽管构建策略有技术上的不同,但所有编码策略的共同目标是创造大量的小分子,其中每个小分子都与一个特异的 DNA 标签共价结合。

#### 1.1 DNA 记录法

利用 DNA 记录法对化合物进行 DNA 编码的过程中,化合物每增加一个 BB 便引入一段编码其身份的双链 DNA,通过双链 DNA 的逐步连接完成编码。文库的构建通常以合成先头 DNA 起始,即一段含黏性末端并具有发夹结构和氨基修饰的双链 DNA。以合成一个含  $m^n$  个组合化合物的 DEL 文库( $n$  组 BBs 集合,每组含  $m$  个 BB)为例, $m$  个先头 DNA 与标签 DNA 通过聚合酶或连接酶将黏性末端相连,其氨基位置通过酰化作用与不同结构的 BB 偶联,形成  $m$  个 DNA-BB 模块,即每个 BB 被一段特异双链 DNA 标记。经第 2 轮均分并反应,形成  $m^2$  个被 2 段相应 DNA 标记的 2 个 BBs 的组合化合物,经  $n$  轮反应后,则形成  $m^n$  个录入  $n$  段 DNA 标记含  $n$  个 BBs 的组合化合物,构成 DEL 文库<sup>[14]</sup>,该合成过程在液相条件下进行。近年来,Paegel 和 Kodadek 团队开发了基于固相的 DEL 构建流程<sup>[15-16]</sup>,预先合成好的双链 DNA 片段可酶联到固相载体上进行“均分-混合-均分”的化合物编码策略。DNA 记录法是 DEL 技术问世以来最早的化合物库 DNA 编码法,相对简单、易操作,通过此法容易构建一个数量巨大的化合物库,目前应用最为广泛。

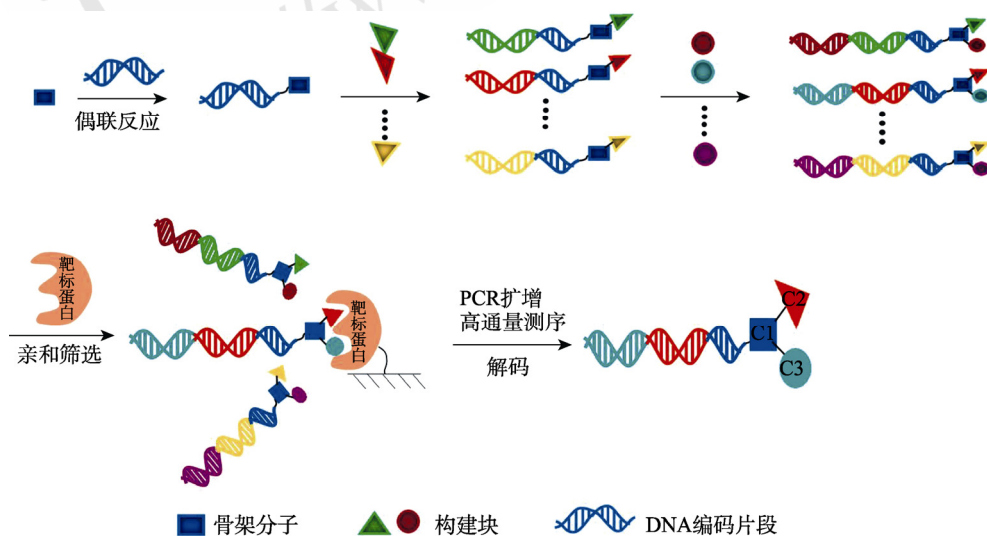


图 1 DNA 编码化合物库的构建及筛选流程

Fig. 1 Construction and screening process of DNA-encoded chemical library

## 1.2 DNA 模板法

DNA 记录法中的化合物每合成一个 BB, 便同时加入对应的标记其身份的一段双链 DNA。与之不同的是, DNA 模板法是在相同的 DNA 链上进行合成步骤的构建, 即需要提前合成 DNA 模板链。简单地讲, 如果要合成一个含  $m^n$  个组合化合物的 DEL 文库( $n$  组 BBs, 每组含  $m$  个 BB), 首先需要合成  $m^n$  个 DNA 片段, 每个 DNA 片段对应一个 BB, 通过“均分-混合-均分”合成步骤形成  $m \times n$  条由  $m$  个 DNA 片段组合形成的 DNA 模板序列。单个 BB 与作为供体链的短单链 DNA 片段相连, 通过互补原理与模板 DNA 长链杂交, 化学部分通过形成共价键转移到模板链上, 然后进行裂解反应去除供体链。近年来, Liu 团队<sup>[9]</sup>对该方法的细节进行全面优化, 开发了第 2 代 DNA 模板库, 以期促进该方法在行业中的应用。

相较于 DNA 记录法, DNA 模板法可通过杂交诱导 2 种反应物互相接近而加速化学反应, 在反应构建过程中可去除那些不能准确编码的化合物, 提高 DNA 模板库的纯度, 从而提高命中率。但它也具有 2 个主要缺陷: 一是需要精细的 DNA 序列设计以标记数以千计的不同 BBs, 以确保 DNA 杂交的保真度, 避免错配, 因此需要大量的工作; 二是要求构库的 BB 至少含 2 个功能基团, 一个用来连接 DNA, 另一个用于模板合成反应。

## 1.3 DNA 连接法

丹麦 Vipergen 公司和 Gothelf 团队开发了一种“yoctoReactor”策略<sup>[17]</sup>。应用该策略建库, DNA-BB 通过多步骤 DNA 连接形成组合化合物, DNA 的连接通过酶催化实现。应用 DNA 连接法构库无需 DNA 模板池, 不涉及错配问题, DNA 序列的设计相对简单, 但该库在后续解码中不直接适用于 PCR 扩增和测序技术。

## 1.4 ESAC 法

根据化合物是附着于双链寡核苷酸的 1 条链还是 2 条链, DEL 化合物库分为单药效团 DEL 和双药效团 DEL。DNA 记录法、DNA 模板法和 DNA 连接法构建的库都隶属于单药效团库, 即 DNA 双链中的其中 1 条链连接 BB, 最终的组合化合物由不同的 BB 通过多步“均分-混合-均分”反应合成。与之不同的是, 双药效团 DEL 中的 2 个 BBs 分别附着在寡核苷酸的相邻位点上, 如双链 DNA 的末端或者杂交到一个共同模板的 2 个寡核苷酸的结

合点。2004 年, MELKKO 等<sup>[18]</sup>提出的 ESAC 是双药效团 DEL 的主要代表, 该策略下, 2 个分别连接在寡核苷酸单链的化合物通过互补作用自行组装, 且过程中不存在化合物间的化学反应。相较其他方法, ESAC 法建的库纯度更高, 因为每一个 DNA-BB 都可以单独被纯化且 BB 间不存在化学反应, 更适用于基于片段的药物发现<sup>[1]</sup>, 但 ESAC 建库规模有限, 需要建库人员设计连接基团用以连接一对 BBs 以获得完整配体, 并进行后续优化和活性测试, 这通常耗费劳力且依赖经验。

表 1 DNA 编码化合物库编码方法的优缺点比较

Tab. 1 Comparison of advantages and disadvantages of DNA-encoded compound library coding methods

DEL 库分类	编码方法	优点	缺点
单药效团库	DNA 记录法	操作简单, 化合物数量巨大	DNA 序列易错配, 化合物库纯度较低
	DNA 模板法	化学反应快, DNA 模板库的纯度高	精细的 DNA 序列设计, 构库的 BB 至少含 2 个功能基团, 工作量大
	DNA 连接法	无需 DNA 模板池, 不涉及错配问题, DNA 序列设计相对简单	后续解码中不直接适用于 PCR 扩增和测序技术
双药效团库	编码自组装化学法	每一个 DNA-BB 都可以单独被纯化且 BB 间不存在化学反应, 库纯度高	建库规模有限, 需设计连接基团用以连接一对 BBs

## 2 利用 DNA 编码化合物库进行亲和筛选的策略

传统的筛选方法通过蛋白的功能变化来识别苗头化合物, 需要对化合物逐一进行筛选。而 DEL 的筛选基于亲和筛选, 将靶标蛋白直接和整个 DEL 库共孵育, 直接找到与蛋白具有结合力的苗头化合物, 这种筛选方式具有明显的速度和成本优势<sup>[19]</sup>。

### 2.1 固相靶点蛋白与化合物库的亲和筛选

目前应用最广的 DEL 筛选基于液相孵育体系。固相载体对靶标蛋白的吸附使得与靶标蛋白亲和的化合物富集在固相上, 而不能和靶标蛋白结合的化合物则可以被洗脱下来。这里的固相可以是溴化氢活化琼脂糖或磁珠, 它们可以共价偶联蛋白<sup>[20]</sup>或附着带 His-<sup>[6]</sup>、Flag-<sup>[21]</sup>或生物素标记的蛋白<sup>[22]</sup>。当固相载体抓取蛋白后, 与 DEL 文库共孵育, 这时与蛋白质结合的小分子通过重复洗涤步骤富集, 非结合的小分子则被洗脱, 然后通过加热变性或竞争性结合蛋白的试剂洗脱与目标

蛋白结合的小分子,纯化后进行解码。在每一步洗脱后,可以使用荧光定量 PCR 技术进行筛选质量的监控<sup>[23]</sup>。近年来,洗脱步骤等筛选过程被不断优化,实现了 1 次操作筛选多个靶标的苗头化合物,大大提高了筛选的效率和规模<sup>[24]</sup>。

## 2.2 非固靶点蛋白与化合物库的亲亲和筛选

如上所述,固靶点蛋白并开展 DEL 库亲和筛选的前提是获得纯化的重组可溶性靶蛋白。但有些蛋白难以表达或纯化以及固化到载体,部分蛋白受固化条件的影响可能丢失正确的结构和功能,特别是具有复杂结构的蛋白复合体,如膜蛋白等<sup>[25]</sup>。为了在筛选过程中维持靶标蛋白的生物活性,研究者开发了几种无需固化蛋白的筛选方法。

2010 年,McGregor 等<sup>[26]</sup>提出了 Interaction Dependent PCR(IDPCR)法。其原理是将靶标蛋白与一段单链 DNA 共价偶联,与 DEL 文库孵育后,与之亲和的化合物和靶蛋白复合体形成假发夹结构,用于后续的引物延伸和 PCR 扩增。基于 IDPCR 法,针对非纯化靶标蛋白,研究者们又开发了 Interaction Determination Using Unpurified Proteins (IDUP)法<sup>[25,27]</sup>。IDUP 法利用抗体孵育或 SNAP 标签以非共价的方式将包含引物结合位点的 DNA 探针标记到靶蛋白上。该方法适用于难纯化、难溶、活性不稳定和容易聚集的蛋白,且能保持这些蛋白翻译后修饰以及与配体蛋白结合等生物活性。

2016 年,Vipergen 公司开发了名为 Binder Trap Enrichment(BTE)的方法<sup>[13]</sup>,研发了基于水-油系统的选择性 PCR 以分离得到苗头化合物。该方法中,DNA 标记的靶标蛋白与 DEL 文库孵育后在水-油系统中达到平衡,将样品稀释破坏平衡后,只有与靶标高度亲和的化合物可以继续与靶标结合。由于只有蛋白-化合物结合体既具有化合物上的 DNA 标记和又具有蛋白上的 DNA 标记,即携带 2 个 PCR 引物识别位点,通过 PCR 扩增可得到与蛋白高度亲和的苗头化合物。

Li 等<sup>[28-29]</sup>报道的 DNA-programmed Photo-Affinity Labelling(DPAL)法不仅免去了蛋白的固化,且无须对蛋白进行标记。该方法使用的 DEL 化合物库中,标记化合物的 DNA 序列与一段 5' 端经苯基叠氮化物光交联修饰的寡核苷酸链杂交。当 DNA 编码的小分子与靶标蛋白结合后,光交联剂触发蛋白与化合物 DNA 间的共价偶联,保护 DNA 避免被后续加入的核酸酶分解,而未偶联

的非配体化合物 DNA 在核酸酶作用下被消化。Sannino 等<sup>[30]</sup>采用类似方法并使用对碳酸酐酶 IX 具有不同亲和力的配体进行模型实验,对光交联方法的不同参数进行了严格评估。结果表明,与固定在固相载体上的蛋白质的常规亲和捕获程序相比,光交联提供了对背景信号的低亲和力碳酸酐酶 IX 配体的更好区分,因此可用作与亲和捕获程序的串联方法。

## 2.3 固靶点蛋白与固化化合物库的亲亲和筛选

在早期研究中,化合物库的合成与 DNA 的编码基于固体载体上并行,因此筛选是通过将可溶性靶标蛋白直接与固化的化合物库孵育进行。One-bead one-compound(OBOC)文库的筛选最初使用荧光素标记的靶标蛋白,以分离出可以高度亲和靶标的附着化合物。Cochrane 等<sup>[31-32]</sup>开发了更加先进的基于活性 DNA 编码的 OBOC 库筛选方法。对 OBOC 文库进行 DNA 编码后,DNA 与化合物间的共价结合可影响化合物与靶标的亲和而影响筛选结果,因此开发了几种 off-bead 的筛选形式,即将化合物从固体载体上释放出来,使得靶标与化合物文库的孵育在液相中进行。

## 2.4 基于细胞的筛选

药物设计中细胞表面的膜蛋白是重要的靶点,然而它们往往难以表达和纯化,且在纯化及筛选步骤中容易发生结构的改变而影响功能的稳定<sup>[33]</sup>,在筛选中直接用活体细胞作用靶标进行孵育可以解决上述问题。2015 年,葛兰素史克公司描述了第 1 个基于细胞的 DNA 编码文库筛选工作。该研究中,作者将速激肽受体神经激肽 3(tachykinin receptor neurokinin 3, NK3)在转导的 HEK293 细胞中过表达后,将包含大约 150 亿种化合物的 DEL 库与活细胞一起孵育,使用叠氮化钠和剪切的鲑鱼精子等试剂以避免靶内化和非特异性结合,经过一系列洗涤步骤后,结合分子通过细胞的热变性洗脱,离心后收集所得上清液。作者能够从 4 个不同的 DEL 文库中识别出一系列不同的 NK3 拮抗剂,其中一些化合物的拮抗效力和特异性可与其他已知 NK3 拮抗剂 Talnetant 和 Osanetant 相媲美<sup>[34]</sup>。2019 年,Cai 等<sup>[35]</sup>进行了针对胞质溶胶或活细胞表面蛋白质靶标的 DEL 筛选。他们在人胚胎肾细胞系中使用与 DNA 编码分子结合的环状细胞穿透肽来促进小分子渗透到细胞质中,结果显示靶标特异性富集,获得了细

胞质内和细胞膜上的蛋白配体。2021年, Vipergen公司的科学家描述了一种新型活细胞 DEL 筛选方法, 该方法使用非洲爪蟾卵母细胞在细胞质中特异性表达靶标蛋白, 并将 DEL 化合物库注射到卵母细胞中, 从而解决跨细胞膜递送 DEL 化合物进行体内筛选的困难<sup>[36]</sup>。基于活体细胞的筛选在生理相关条件下进行, 消除了对高度纯化的活性靶蛋白的依赖, 扩展了 DEL 可适应的靶向空间。

### 3 DEL 筛选结果的解码与分析

尽管对化合物的合成和筛选方法在不断优化, 但从背景噪声中有效识别微摩尔范围内的配体仍然是一项关键挑战。为了富集化合物并减少筛选过程中的噪声干扰, 根据 DEL 库的规模, 往往进行 1~3 轮亲和筛选。DEL 筛选后的解码和数据分析一般基于高通量测序, 低成本、基因组规模的 NGS 技术的可用性是 DEL 成为强大筛选平台的关键因素。通过比较化合物库中每个 DNA 编码在筛选前后出现的相对频率来识别筛选出的苗头化合物的结构。多种评估和比较 DEL 实验的统计方法亦被研究, Paegel 及其同事首先报道了使用泊松分布来计算假阴性率<sup>[37]</sup>。2018年, Kuai 等<sup>[38]</sup>使用经典 DEL 筛选平台的相同模型得出了类似的结果。2019年, Faver 等<sup>[39]</sup>使用了 z 分数度量方法来确定 DEL 筛选期间化合物的富集度, 该方法注意选择抽样偏差。最近, Kómár 和 Kalinić 使用机器学习来增强从背景噪声中区分和确定真正的潜在结合物的能力<sup>[40]</sup>。

### 4 重合成和验证

解码出与靶标蛋白相结合的小分子后, 将这些用于构建文库时用的同样的合成路线和方法进行 ON-DNA 的重合成, 进行进一步的 ON-DNA 亲和质谱分析。亲和质谱分析的基本原理: 首先获得配体与靶蛋白结合的复合物, 而后采用某种纯化方法将复合物与溶液中未结合的配体分离, 最后对从复合物中解离下来的配体进行液质联用分析, 从而鉴定其配体结构, 大大减小假阳性的概率, 得到真正与靶蛋白结合的配体<sup>[41]</sup>。

对上述得到的配体进行生物化学、生物物理学分析, 并结合其物理信息、毒性官能团等分析, 进一步筛选出分子量大小合适、无明显毒性基团、有较强家族信息、可被改造进一步提高活性和选择性及成药性的分子进行 OFF-DNA 的重合成, 在测试其结合亲和力和生物学活性后, 少数最优的

苗头化合物再通过药物化学的方法进行优化, 从而得到候选药物。

### 5 DEL 技术在医药领域的成功应用举例

新型 DEL 库的合成、筛选方法以及筛选结果的评估的不断优化, 提高了 DEL 技术在靶向筛选具有新颖结构和功能的大规模化合物库的能力, 已使其广泛应用于新药研发领域, 见表 2。

#### 5.1 DEL 技术在单个靶标蛋白抑制剂筛选中的应用

目前, 至少有 3 种 DEL 衍生分子正在进行临床试验。2017年, 葛兰素史克公司报道了一种利用 DEL 技术开发的强效选择性可溶环氧化物水解酶抑制剂 GSK2256294, 作为治疗慢性阻塞性肺病的 I 期临床候选药物, 该候选药物是第一个从 DEL 平台发现并进入临床试验的分子<sup>[6]</sup>。Harris 等<sup>[5]</sup>以肿瘤坏死因子介导的炎症中的 RIP1 激酶为靶标, 通过 3 个氨基酸构建模块的组合化学方法构建了一个包含 77 亿种化合物的文库。通过亲和筛选确定了一个非典型的苯并氮杂酮衍生物作为激酶抑制剂的核心结构, 其对 RIP1 具有完全的单激酶选择性, 并且对灵长类和非灵长类 RIP1 具有独特的物种选择性。经结构优化后, 得到了临床候选药 GSK2982772<sup>[42]</sup>, 用于治疗银屑病、类风湿性关节炎和溃疡性结肠炎, 其口服生物利用度高, 半衰期长, 已完成 I 期临床研究, 目前正在进行 II 期临床试验。另一个可溶环氧化物水解酶的有效抑制剂是由 X-Chem 公司使用创新的 DECL 编码策略开发的, 该化合物库利用三组构建块(2 259 个伯胺、222 个溴芳基酸和 667 个硼酸)合成了一个包含 3.34 亿种分子的 DEL 库, 并且利用催化炔烃叠氮化环加成进行 DNA 片段的连接, 其筛选的苗头化合物对可溶环氧化物水解酶的 IC<sub>50</sub> 为 2 nmol·L<sup>-1</sup><sup>[43]</sup>。Cuozzo 等<sup>[44]</sup>采用分裂池合成策略, 通过 3 个化学循环构建了一个包含 2.25 亿分子的化合物库, 以带有 FLAG 标签的自黏蛋白为靶标蛋白进行筛选, 鉴定得到了一种新的抑制剂 X-165。与人血浆中的 GLPG1690 相比, 该抑制剂显示出近 20 倍的效力, 并且在大鼠和狗的 28 d 毒性研究、标准安全药理学研究和遗传毒性研究中被证明是安全的, 因此 X-165 最近获得 FDA 批准用于 I 期人体临床研究。

Dawadi 等<sup>[45]</sup>从已知的蛋白酶抑制剂药效团出发, 参考一种含有精氨酸的拟肽凝血酶抑制剂阿

加曲班的结构，将许多已知蛋白酶抑制剂的官能团如胍、磺胺、尿素和氨基甲酸酯部分整合到 DEL 库，筛选了凝血酶的抑制剂。其中一种带有脲和胍官能化的化合物显示出显著的凝血酶活性抑制作用，抑制常数为  $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，其效力比临床药物阿加曲班高约 10 倍。Vipergen 公司使用 yoctoReactor 策略构建了由 2 组氨基酸和 1 组羧酸构建模块组成的含 1 260 万种分子的 DEL 库，使用 BTE 技术进行筛选，鉴定得到高度特异的丝裂原活化蛋白激酶 14 抑制剂， $\text{IC}_{50}$  为  $7 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  [13]。Kim 等 [46] 利用拟肽 DNA 编码化合物库富集可被蛋白酪氨酸激酶 c-Src 磷酸化的分子，得到的先导化合物表现出作为底物并且促进 ATP 水解的能力。在抑制实验中，富集化合物的  $\text{IC}_{50}$  为  $8 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。先导化合物的酯衍生物在细胞培养中表现出抑制 src 依赖信号的细胞活性。

### 5.2 DEL 技术在蛋白-蛋白相互作用抑制剂筛选中的应用

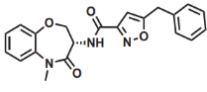
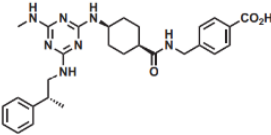
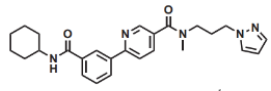
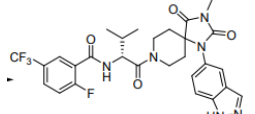
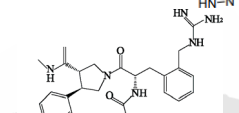
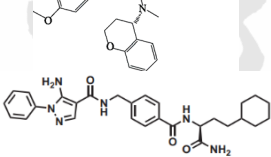
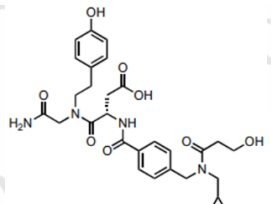
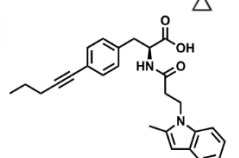
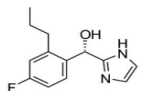
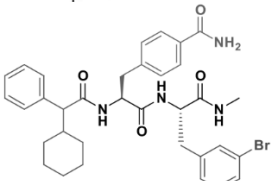
蛋白-蛋白相互作用对调节生物过程至关重要，对提供疾病治疗靶标位点具有重要指导意义，DEL 技术在具有蛋白-蛋白相互作用的靶标蛋白的抑制剂筛选方面亦有广泛应用。具有重要药理学意义的促炎因子白细胞介素 2 是蛋白-蛋白相互作用的代表性靶标。Leimbacher 等 [47] 通过 100 种不同的氨基酸与 300 种不同的羧酸偶联构建了仅包含 2 组构建块的含 3 万个类药化合物的高质量 DEL 库，并通过优化亲和筛选方案，筛选得到了一种新型的对人类白细胞介素-2 具有强效、高选择性和生物活性的配体。经荧光偏振测量，该配体的解离常数  $K_d$  值为  $(2.5 \pm 0.3) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过不同实验条件下的筛选结果比较发现 2-甲基咪唑部分对白介素-2 识别的重要性，为后续形成先导化合物提供了结构基础。此外，已报道的 DEL 技术发现的蛋白-蛋白相互作用抑制剂还有 B 细胞淋巴瘤(Bcl xL)拮抗剂 11 [48] 和淋巴细胞功能相关抗原 1 拮抗剂 13 [49] 等。

### 5.3 DEL 技术在跨膜蛋白抑制剂筛选中的应用

对于许多具有潜在药物靶点的跨膜蛋白，应用 DEL 技术也筛选得到了有效结合的小分子化合物。Cheng 等 [50] 通过靶向 G 蛋白偶联受体家族的蛋白酶激活受体 2，经 DEL 筛选得到了化合物 16，揭示了一个以前未知的抑制蛋白酶激活受体 2 活化的变构小分子结合位点。Ahn 等 [51] 通过靶向  $\beta_2$  肾上腺素受体筛选含 1.9 亿分子的 DEL 库，得到

表 2 DEL 技术筛选鉴定的苗头化合物

Tab. 2 Examples of hit compounds identified from DNA-encoded chemical libraries

靶标蛋白	化合物结构	解离常数 $K_d$	参考文献
受体相互作用蛋白 1(RIP1) 激酶		$10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{IC}_{50})$	[5]
可溶性环氧化物水解酶 (sEH)		$7.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{IC}_{50})$	[6]
可溶性环氧化物水解酶 (sEH)		$2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	[43]
自黏蛋白			[44]
凝血酶		$1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	[45]
丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14)		$7 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{IC}_{50})$	[13]
蛋白酪氨酸激酶 (c-Src)		$7.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	[46]
白细胞介素 2 (IL-2)		$(2.5 \pm 0.3) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	[47]
蛋白酶激活受体 2 (PAR2)		$0.63 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	[50]
$\beta_2$ 肾上腺素受体 (B2AR)		$(1.7 \pm 0.8) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	[51]

了化合物 15，其与靠近  $\beta_2$  肾上腺素受体 G 蛋白结合位点的独特细胞内袋结合，通过变构调节抑制受体功能，因此被命名为“变构  $\beta$  受体阻滞剂”。

综上所述，DNA 编码的化合物库可以成为选择性先导化合物的有效来源，这些先导化合物经结构优化后可成为临床候选药物，用于治疗人类疾病。

## 6 总结与展望

DEL 的主要操作流程包括 DNA 编码化合物库的合成、靶向蛋白亲和筛选、化合物分子的解码与结构分析、非编码化合物重新合成、化合物与靶向蛋白生物活性验证。该技术是化学、生物学、测序、数据分析等多领域技术的集合，它们的组合赋予了 DEL 巨大的竞争优势，如高通量、短周期、低成本等。但 DEL 技术尚待进一步改进，一是 DEL 文库的规模与质量影响筛选的效率与可靠性，因而要扩大分子库规模并同时保持化合物的类药性和库纯度；二是 DEL 文库的构建基于化学构建模块，并依赖化学构建模块与 DNA 间的化学反应，因此有必要开发化学构建模块并优化化学构建模块与 DNA 相容的化学反应，增加 DEL 文库的多样性；三是目前 DEL 筛选多选用纯化的重组可溶性蛋白做靶标，并在筛选前将蛋白进行标记或固化到固体载体上，然而标记及固化过程容易使蛋白丢失原有结构和功能，并且药物发现中一些难以表达、纯化，或者溶解性不高、容易聚集的蛋白(如膜蛋白)往往更有成为靶点的意义。因此需要进一步优化筛选流程以降低靶点蛋白的门槛并保持蛋白的生物活性。

应用 DEL 技术已经成功发现了针对多种靶蛋白的新型化合物，已成为制药行业和科学研究中新兴的、极具应用前景的新型化合物发现技术。虽然 DEL 技术的应用目前仅局限于药物发现领域，但其原理却通用于动植物，因此理论上可以用于农业领域植物蛋白的靶标性作用分子筛选。尽管目前尚无利用 DEL 筛选植物生长调节剂的公开报道，但是类似的组合化学筛选技术最近已在开发脱落酸受体激动剂方面取得成功。Vaidya 等<sup>[52]</sup>报道用 2 个脱落酸受体对一个包含所有商业化配体的 ZINC 数据库进行“虚拟筛选”，鉴定能够与受体中保守赖氨酸互作的候选激动剂。通过此方法，研究者成功鉴定到了取代苯基乙酰氨基-环己烷羧酸类脱落酸受体泛激动剂。经进一步化学修饰改造，最终获得了与脱落酸受体高度亲和、可作为抗蒸腾剂的脱落酸类似物 Opabactin，其功效比天然脱落酸高近 10 倍，可显著缓解干旱下小麦的衰老，提高产量，并且在多种单、双子叶中都有高活性。因此，高通量化合物库筛选技术已不再限于新药开发领域，其在植物上应用的新时代已经到来。相信通过筛选与植物生长发育及抗逆

相关的靶点蛋白，可以发现能够特异性调控植物生长性状及抗性的新型植物生长调节剂，应用于现代农业。

## REFERENCES

- [1] ERLANSON D A, FESIK S W, HUBBARD R E, et al. Twenty years on: The impact of fragments on drug discovery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(9): 605-619.
- [2] ELLERMANN M, EHEIM A, RAHM F, et al. Novel class of potent and cellularly active inhibitors devalidates MTH1 as broad-spectrum cancer target[J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(8): 1986-1992.
- [3] BRENNER S, LERNER R A. Encoded combinatorial chemistry[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5381-5383.
- [4] GOODNOW R A Jr, DUMELIN C E, KEEFE A D. DNA-encoded chemistry: Enabling the deeper sampling of chemical space[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(2): 131-147.
- [5] HARRIS P A, KING B W, BANDYOPADHYAY D, et al. DNA-encoded library screening identifies benzo[b][1,4]oxazepin-4-ones as highly potent and monoselective receptor interacting protein 1 kinase inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(5): 2163-2178.
- [6] BELYANSKAYA S L, DING Y, CALLAHAN J F, et al. Discovering drugs with DNA-encoded library technology: From concept to clinic with an inhibitor of soluble epoxide hydrolase[J]. *Chembiochem*, 2017, 18(9): 837-842.
- [7] SCHEUERMANN J, NERI D. Dual-pharmacophore DNA-encoded chemical libraries[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2015(26): 99-103.
- [8] CLARK M A, ACHARYA R A, ARICO-MUENDEL C C, et al. Design, synthesis and selection of DNA-encoded small-molecule libraries[J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(9): 647-654.
- [9] USANOV D L, CHAN A I, MAIANTI J P, et al. Second-generation DNA-templated macrocycle libraries for the discovery of bioactive small molecules[J]. *Nat Chem*, 2018, 10(7): 704-714.
- [10] ZIMMERMANN G, RIEDER U, BAJIC D, et al. A specific and covalent JNK-1 ligand selected from an encoded self-assembling chemical library[J]. *Chemistry*, 2017, 23(34): 8152-8155.
- [11] BIGATTI M, DAL CORSO A, VANETTI S, et al. Impact of a central scaffold on the binding affinity of fragment pairs isolated from DNA-encoded self-assembling chemical libraries[J]. *Chem Med Chem*, 2017, 12(21): 1748-1752.
- [12] BLAKSKJAER P, HEITNER T, HANSEN N J V. Fidelity by design: Yoctoreactor and binder trap enrichment for small-molecule DNA-encoded libraries and drug discovery[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2015(26): 62-71.
- [13] PETERSEN L K, BLAKSKJÆR P, CHAIKUAD A, et al. Novel p38 $\alpha$  MAP kinase inhibitors identified from yoctoReactor DNA-encoded small molecule library[J]. *Med Chem Comm*, 2016, 7(7): 1332-1339.

- [14] CLARK M A, ACHARYA R A, ARICO-MUENDEL C C, et al. Design, synthesis and selection of DNA-encoded small-molecule libraries[J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(9): 647-654.
- [15] PELS K, DICKSON P, AN H C, et al. DNA-compatible solid-phase combinatorial synthesis of  $\beta$ -cyanoacrylamides and related electrophiles[J]. *ACS Comb Sci*, 2018, 20(2): 61-69.
- [16] MENDES K R, MALONE M L, NDUNGU J M, et al. High-throughput identification of DNA-encoded IgG ligands that distinguish active and latent *Mycobacterium tuberculosis* infections[J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(1): 234-243.
- [17] HANSEN M H, BLAKSKJAER P, PETERSEN L K, et al. A yoctoliter-scale DNA reactor for small-molecule evolution[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(3): 1322-1327.
- [18] MELKKO S, SCHEUERMANN J, DUMELIN C E, et al. Encoded self-assembling chemical libraries[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(5): 568-574.
- [19] FRANZINI R M, BIENDL S, MIKUTIS G, et al. "cap-and-catch" purification for enhancing the quality of libraries of DNA conjugates[J]. *ACS Comb Sci*, 2015, 17(7): 393-398.
- [20] SCHEUERMANN J, DUMELIN C E, MELKKO S, et al. DNA-encoded chemical libraries for the discovery of MMP-3 inhibitors[J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19(3): 778-785.
- [21] DISCH J S, EVINDAR G, CHIU C H, et al. Discovery of thieno[3, 2-d]pyrimidine-6-carboxamides as potent inhibitors of SIRT1, SIRT2, and SIRT3[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(9): 3666-3679.
- [22] FRANZINI R M, EKBLAD T, ZHONG N, et al. Identification of structure-activity relationships from screening a structurally compact DNA-encoded chemical library[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(13): 3927-3931.
- [23] SANNINO A, GABRIELE E, BIGATTI M, et al. Quantitative assessment of affinity selection performance by using DNA-encoded chemical libraries[J]. *Chembiochem*, 2019, 20(7): 955-962.
- [24] MACHUTTA C A, KOLLMANN C S, LIND K E, et al. Prioritizing multiple therapeutic targets in parallel using automated DNA-encoded library screening[J]. *Nat Commun*, 2017(8): 16081.
- [25] MCGREGOR L M, JAIN T, LIU D R. Identification of ligand-target pairs from combined libraries of small molecules and unpurified protein targets in cell lysates[J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(8): 3264-3270.
- [26] MCGREGOR L M, GORIN D J, DUMELIN C E, et al. Interaction-dependent PCR: Identification of ligand-target pairs from libraries of ligands and libraries of targets in a single solution-phase experiment[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(44): 15522-15524.
- [27] CHAN A I, MCGREGOR L M, JAIN T, et al. Discovery of a covalent kinase inhibitor from a DNA-encoded small-molecule library  $\times$  protein library selection[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(30): 10192-10195.
- [28] LI G, LIU Y, YU X R, et al. Multivalent photoaffinity probe for labeling small molecule binding proteins[J]. *Bioconjug Chem*, 2014, 25(6): 1172-1180.
- [29] ZHAO P, CHEN Z T, LI Y Z, et al. Selection of DNA-encoded small molecule libraries against unmodified and non-immobilized protein targets[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(38): 10056-10059.
- [30] SANNINO A, GIRONDA-MARTÍNEZ A, GORRE É M D, et al. Critical evaluation of photo-cross-linking parameters for the implementation of efficient DNA-encoded chemical library selections[J]. *ACS Comb Sci*, 2020, 22(4): 204-212.
- [31] COCHRANE W G, MALONE M L, DANG V Q, et al. Activity-based DNA-encoded library screening[J]. *ACS Comb Sci*, 2019, 21(5): 425-435.
- [32] QVORTRUP K, NIELSEN T E. In-bead screening of hydroxamic acids for the identification of HDAC inhibitors[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(14): 4472-4475.
- [33] SEIGAL B A, CONNORS W H, FRALEY A, et al. The discovery of macrocyclic XIAP antagonists from a DNA-programmed chemistry library, and their optimization to give lead compounds with *in vivo* antitumor activity[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(6): 2855-2861.
- [34] WU Z N, GRAYBILL T L, ZENG X, et al. Cell-based selection expands the utility of DNA-encoded small-molecule library technology to cell surface drug targets: Identification of novel antagonists of the NK<sub>3</sub> tachykinin receptor[J]. *ACS Comb Sci*, 2015, 17(12): 722-731.
- [35] CAI B, KIM D, AKHAND S, et al. Selection of DNA-encoded libraries to protein targets within and on living cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(43): 17057-17061.
- [36] PETERSEN L K, CHRISTENSEN A B, ANDERSEN J, et al. Screening of DNA-encoded small molecule libraries inside a living cell[J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(7): 2751-2756.
- [37] MACCONNELL A B, PAEGEL B M. Poisson statistics of combinatorial library sampling predict false discovery rates of screening[J]. *ACS Comb Sci*, 2017, 19(8): 524-532.
- [38] KUAI L T, O'KEEFFE T, ARICO-MUENDEL C. Randomness in DNA encoded library selection data can be modeled for more reliable enrichment calculation[J]. *SLAS Discov*, 2018, 23(5): 405-416.
- [39] FAVER J C, RIEHLE K, LANCIA D R Jr, et al. Quantitative comparison of enrichment from DNA-encoded chemical library selections[J]. *ACS Comb Sci*, 2019, 21(2): 75-82.
- [40] KÓMÁR P, KALINIĆ M. Denoising DNA encoded library screens with sparse learning[J]. *ACS Comb Sci*, 2020, 22(8): 410-421.
- [41] ZIMMERMANN G, LI Y Z, RIEDER U, et al. Hit-validation methodologies for ligands isolated from DNA-encoded chemical libraries[J]. *Chembiochem*, 2017, 18(9): 853-857.
- [42] HARRIS P A, BERGER S B, JEONG J U, et al. Discovery of a first-in-class receptor interacting protein 1 (RIP<sub>1</sub>) kinase specific clinical candidate (GSK2982772) for the treatment of inflammatory diseases[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(4): 1247-1261.
- [43] LITOVCHICK A, DUMELIN C E, HABESHIAN S, et al. Encoded library synthesis using chemical ligation and the discovery of sEH inhibitors from a 334-million member library[J]. *Sci Rep*, 2015(5): 10916.
- [44] CUOZZO J W, CLARK M A, KEEFFE A D, et al. Novel

- autotaxin inhibitor for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: A clinical candidate discovered using DNA-encoded chemistry[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(14): 7840-7856.
- [45] DAWADI S, SIMMONS N, MIKLOSSY G, et al. Discovery of potent thrombin inhibitors from a protease-focused DNA-encoded chemical library[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(29): 16782-16789.
- [46] KIM D, SUN Y X, XIE D, et al. Application of a substrate-mediated selection with c-src tyrosine kinase to a DNA-encoded chemical library[J]. *Molecules*, 2019, 24(15): 2764.
- [47] LEIMBACHER M, ZHANG Y X, MANNOCCI L, et al. Discovery of small-molecule interleukin-2 inhibitors from a DNA-encoded chemical library[J]. *Chemistry*, 2012, 18(25): 7729-7737.
- [48] MELKKO S, MANNOCCI L, DUMELIN C E, et al. Isolation of a small-molecule inhibitor of the antiapoptotic protein Bcl-xL from a DNA-encoded chemical library[J]. *Chem Med Chem*, 2010, 5(4): 584-590.
- [49] KOLLMANN C S, BAI X P, TSAI C H, et al. Application of encoded library technology (ELT) to a protein-protein interaction target: Discovery of a potent class of integrin lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) antagonists[J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22(7): 2353-2365.
- [50] CHENG R K Y, FIEZ-VANDAL C, SCHLENKER O, et al. Structural insight into allosteric modulation of protease-activated receptor 2[J]. *Nature*, 2017, 545(7652): 112-115.
- [51] AHN S, KAHSAI A W, PANI B, et al. Allosteric "beta-blocker" isolated from a DNA-encoded small molecule library[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(7): 1708-1713.
- [52] VAIDYA A S, HELANDER J D M, PETERSON F C, et al. Dynamic control of plant water use using designed ABA receptor agonists[J]. *Science*, 2019, 366(6464): eaaw8848.
- 收稿日期: 2022-03-15  
(本文责编: 沈倩)

中国现代应用药学  
http://www.chinjmap.com