

小分子药物靶点鉴定的方法汇总

小分子通常指分子量小于 900 道尔顿 (Da) 的分子。根据小分子来源的不同, 可分为内源性小分子和外源性小分子。小分子药物是一大类重要的外源性小分子, 在 FDA 批准的药物里面, 小分子药物占 80%, 具有非常广阔的发展前景。

本文将重点介绍小分子药物靶点鉴定的方法, 即发现未知蛋白质-小分子相互作用的方法。

一、小分子药物靶点鉴定的重要性

对候选药物进行先导识别从而发现活性分子是药物发现的重要步骤, 该步骤可进一步分为基于靶点的药物发现 (target-based drug discovery) 和基于表型的药物发现 (phenotype-based drug discovery)。

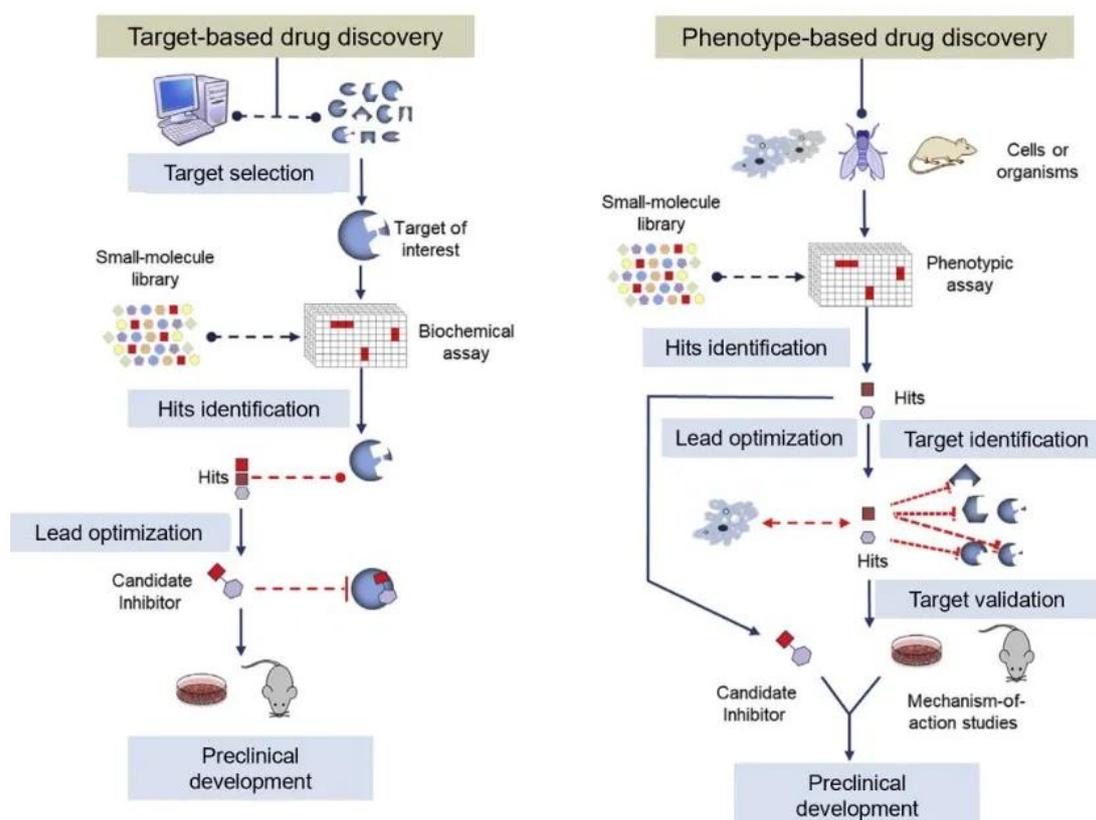


图 1-1 基于靶点和基于表型的药物发现方法

基于靶点的药物发现是几十年来制药领域的主流方法，然而目前已知的药物靶点仅有700个左右，仅能覆盖少数疾病发生通路，仍有大量潜在靶点尚未被发掘；此外临床试验表明现有药物靶点存在脱靶效应。因此，寻找和开发新的药物靶点是当下药学研究领域的主要任务。

基于表型的药物发现提供了一种利用药理学模型筛选细胞、组织或生物体中分子的分析方法，且这些在正常生理状态下显示出特定功能的分子在临床试验中也更有可能表现出出色的治疗效果，为成功开发药物提供可能。然而，与基于靶点的药物筛选方法相比，基于表型的药物筛选所评估的是小分子在机体中的整体作用，对确切靶点或作用机制是未知的，可能具有非特异性。因此对于基于表型的药物筛选，靶点识别和验证同样不可缺少。

二、小分子药物靶点鉴定的方法

目前已有的鉴定小分子药物靶点的方法可以根据原理的不同分为以下四大类：(1) 基于亲和力的蛋白质-小分子相互作用识别方法，如亲和纯化。(2) 基于遗传的方法。通过点突变、蛋白质过表达或敲低等方式选取具有小分子抗性或敏感性的关联基因，从而进一步鉴定得到小分子靶点。(3) 基于表型的方法。分析感兴趣的化合物在细胞或生物体中引起的表型变化，并与某个作为参考的已知化合物所引起的生物学特征比较，从而推测相互作用的潜在信息。(4) 计算机模拟的方法，如根据化学相似性预测药物靶点。在这四种方法中，方法一是直接法，其余三种均为间接法，本文重点介绍方法一。

1、传统经典的亲和纯化方法：

亲和纯化 (affinity purification, AP) 是最基本、使用最广泛的直接寻找小分子靶点的方法。该方法的基本流程如图 1-2 所示，首先利用化学手段将目标小分子与特定的亲和标签 (如生物素) 偶联或将小分子通过连接体直接固定在树脂材料上 (如琼脂糖) 作为亲和探针。之后将经过上述化学修饰的目标小分子与细胞裂解液孵育，使靶蛋白与小分子结合。此步骤中，与标签偶联的小分子又可渗透进入活细胞，并在活细胞环境下与靶蛋白相互作用。孵育完成后，通过大量的洗涤步骤除去与小分子非特异结合的杂蛋白。最后用 SDS-PAGE 电泳分离出与小分子探针特异性结合的蛋白，并利用质谱或蛋白质 N 端测序的方法鉴定相互作用的蛋白。

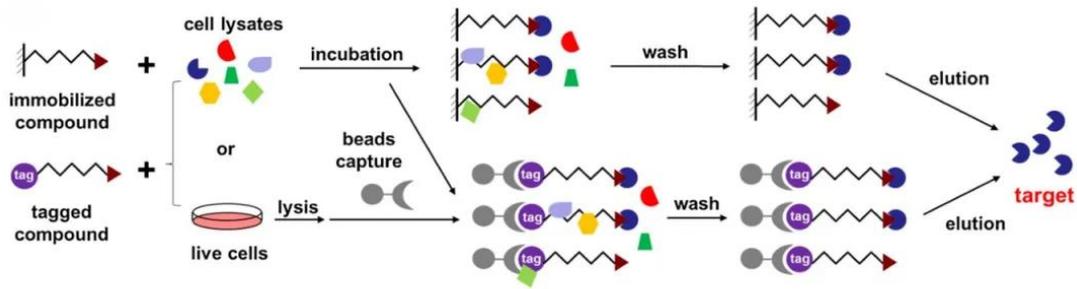


图 1-2 亲和纯化的原理图

2、基于活性的蛋白质组分析：

基于活性的蛋白质组分析（activity-based protein profiling, ABPP）是一种化学蛋白质组学策略，能够在天然状态下对小分子相互作用的靶蛋白进行稳定捕获。ABPP 方法利用化学探针在复杂的生物学体系中共价靶向待研究的蛋白质，根据小分子与蛋白质的相互作用机制（不可逆的共价相互作用或可逆的非共价相互作用）进一步分为两类，如图 1-3 所示。

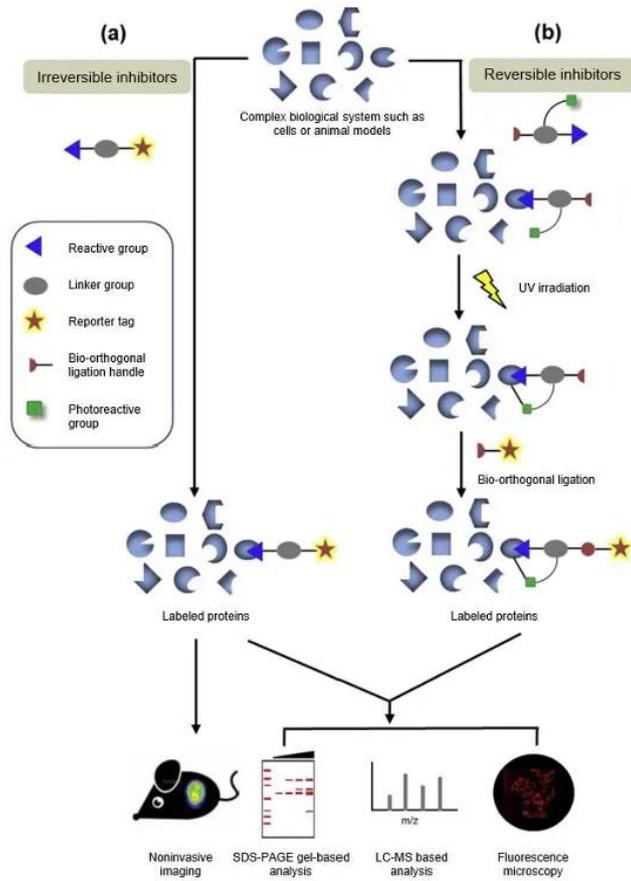


图 1-3 基于活性的蛋白分析(ABPP)策略

对于能够以共价方式不可逆地结合于蛋白质活性位点的小分子，ABPP 利用连接体将小分子与报告基团直接相连以构成化学探针，与活性位点的残基反应，从而标记蛋白质的活性形式。对于发生非共价相互作用的小分子和蛋白质，为了能够实现对靶蛋白的共价捕获，此类化学探针往往被设计为三功能基团 (tri-functional affinity probes)。其通常携有一个用于富集的亲基团 (如生物素)，一个用于与靶蛋白结合的小分子探针，以及一个用于共价交联的反应基团。尽管基于光亲和交联的 ABPP 方法能够将蛋白质靶标与小分子之间弱的、瞬时的非共价相互作用转换为牢固的共价作用，但蛋白质的非特异性标记是光亲和交联的主要问题。

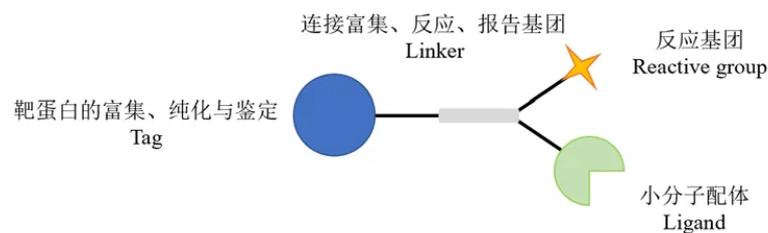


图 1-4 三功能共价亲和探针

3、依靠表达克隆技术的亲和纯化方法：

上述提及的亲和纯化方法多采用小分子化学探针与细胞裂解液孵育或在活细胞内直接捕获相互作用蛋白。然而如果靶蛋白在胞内的表达丰度低或不稳定，则会对检测带来困难。基于表达克隆技术的亲和纯化方法可以较好的解决该问题。该类技术最初用于发现和验证蛋白-蛋白以及蛋白-核酸的相互作用，后来通过改进也能用于检测蛋白质-小分子的相互作用。

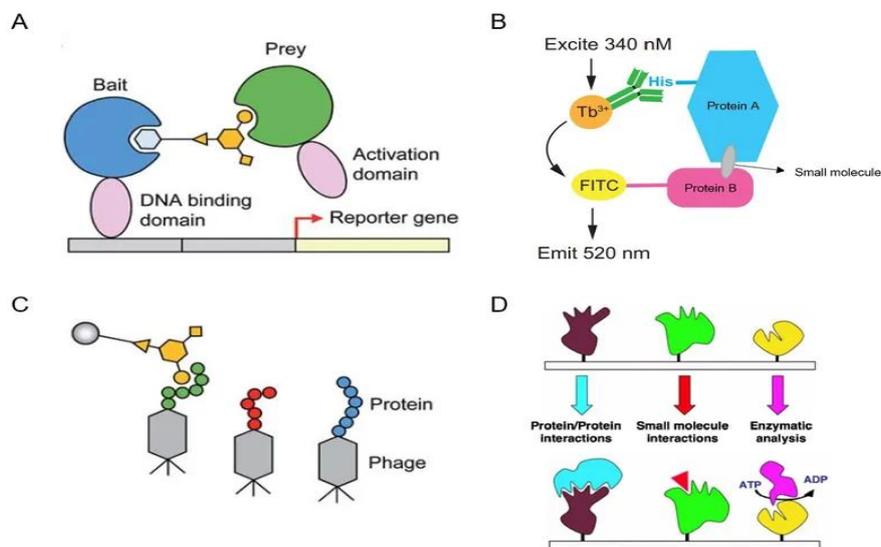


图 1-5 基于亲和力的克隆表达技术

4、非标记的蛋白质-小分子相互作用发现方法：

小分子抑制剂、DNA、辅因子等配体在结合蛋白质后会引发蛋白质折叠和热力学性质的改变，是蛋白结构更加稳定，从而对热、变性剂刺激等表现出更强的抵抗能力。

以 DARTS 为例，小分子结合蛋白质后会改变蛋白质的稳定性，此时用蛋白酶对蛋白质进行水解，小分子结合的蛋白质其水解图谱与对照组不同，通过蛋白电泳结合液相色谱质谱鉴定出差异片段，从而确定小分子的靶蛋白。

然而，该方法不适合鉴定低丰度靶蛋白，且不适合在细胞裂解液中检验蛋白的水解情况。

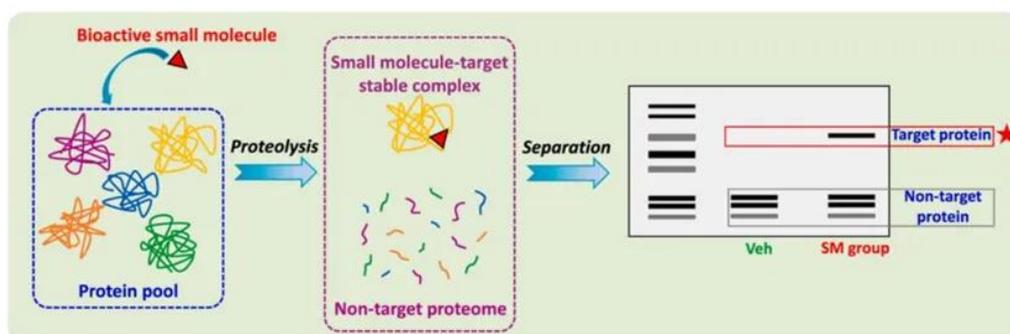


图 1-6 DARTS 方法的流程图

5、光交联小分子亲和介质的靶蛋白发现方法：

无论是传统的亲和纯化方法，还是共价连接等改进的亲和纯化方法，都需要对小分子添加特定的修饰基团，该工作需要耗费大量时间研究小分子 SAR 以选择影响最小的修饰位点，限制了亲和纯化的效率。因此，针对小分子的化学修饰问题，Osada 实验室首先提出了利用光亲和反应固定小分子的方法。该固定方法对小分子的官能团无选择性，小分子锚定方式具有随机性。然而该方法的得率较低，且对紫外线敏感的小分子不适用。

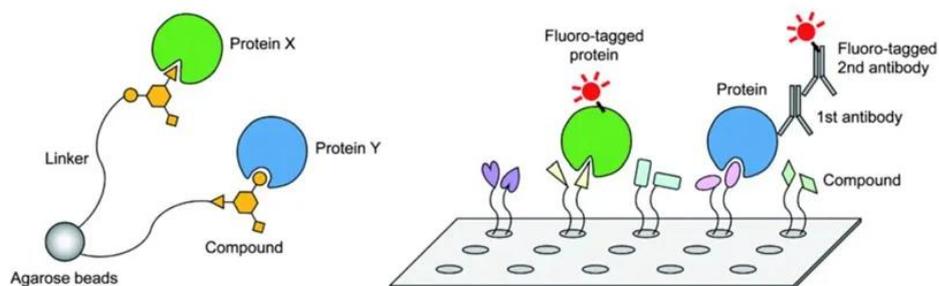
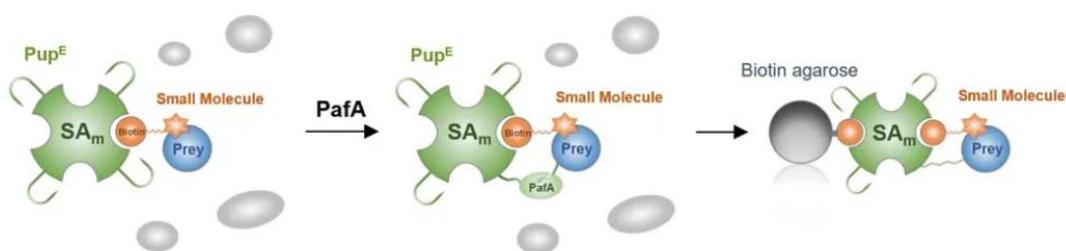


图 1-7 一种非选择性的光交联小分子偶联方法

6、SPIDER 邻近标记法：

根据 Pup 分子在体外能够招募 PafA 发挥邻近标记作用的实验原理，当靶蛋白（Prey）与生物素化小分子发生相互作用时，SA_m-PupE 会招募 PafA，将 PupE 的 C 末端与 Prey 表面的 K 残基共价相连，从而捕获靶蛋白，将蛋白与生物分子之间不稳定的非共价相互作用转化为稳定的共价相互作用，从而有利于后续靶标富集和分析。邻近标记技术的出现实现了在胞内天然状态下对分子靶标的共价捕获，且在相互作用分析中无需保持分子之间的结合状态，实验操作更为简便。



SPIDER 技术用于发现未知的蛋白质-小分子相互作用的流程图

SPIDER 技术源自上海交通大学科研团队开发的一项新型邻近标记技术（专利号 ZL202110069353.7），是小分子药物靶标鉴定的有力工具（陶生策团队开发新型邻近标记分子-蛋白质互作鉴定技术——SPIDER）。

2024 年 10 月，抗码芯瑞正式推出 SPIDERTM 邻近标记|小分子 Pull Down 试剂盒，为回馈与方便客户，助力科研，抗码芯推出 SPIDERTM 邻近标记 | 小分子 Pull Down 试剂盒免费赠送活动，该试剂盒是一种更好的小分子药物靶点鉴定工具，特异性高，灵敏度强，一网打尽所有药物靶点，助力广大顾客的研究工作。