

搭建结构与功能的桥梁

等温滴定量热技术——小分子药物开发不可或缺的标准信息

微量量热技术介绍

等温滴定量热技术 (ITC) 是一种监测由结合成分的添加而起始的任何化学反应的热力学技术, 它已经成为鉴定生物分子间相互作用的首选方法。

当物质结合, 热量要么产生, 要么吸收。由于ITC直接测量生物分子结合事件中释放或吸收的热量, 它便成为在单个实验中直接测定所有结合参数的唯一技术, 如化学计量 (n)、亲和力 (Kd)、焓 (H) 和熵 (S)。这些信息提供了生物分子相互作用的真实写照。

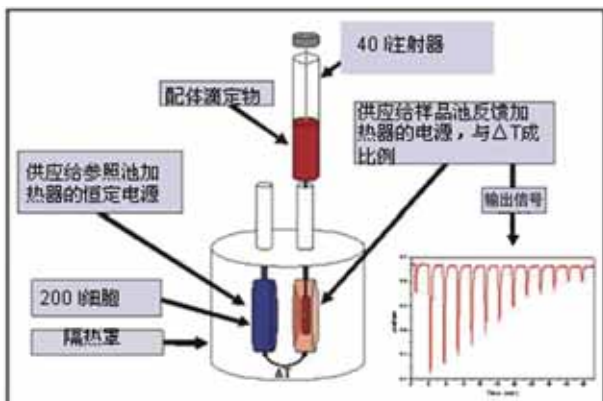


图1: 在恒温下, 注射器中的“配体”溶液滴定到包含“高分子”溶液的池中。当配体注射到池中, 两种物质相互作用, 释放或吸收的热量与结合量成正比。当池中的高分子被配体饱和时, 热量信号减弱, 直到只观察到稀释的背景热量。

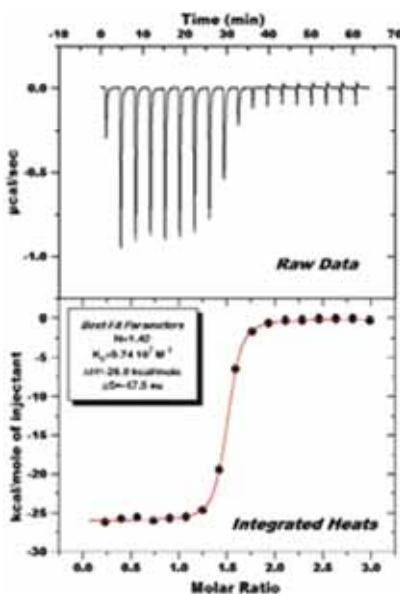


图2: 典型的ITC数据。配体溶液20次注射到ITC池的蛋白溶液中。每个注射峰(上图)下方的区域与注射所释放的总热量相等。当这种综合的热量相对添加到池中的配体摩尔比作图时, 就获得了相互作用的完整结合等温线(下图)。用单位点模型来验证数据。化学计量、结合常数及焓的数值都显示在框内。

微量量热技术的最新突破-iTC₂₀₀TM及Auto-iTC₂₀₀TM

等温滴定量热技术在全世界的药物开发实验室已经获得了广泛的认可。大型的制药公司、生物技术公司以及研究机构, 都在利用ITC来充分鉴定生物分子间相互作用。ITC所确定的结合参数常常被认为是“金标准”值, 并经常作为其它技术的参考。

随着现代ITC仪器的发展, 这些仪器变得更加灵敏、快速且易用。MicroCal公司最新的iTC₂₀₀和Auto-iTC₂₀₀使用200µl细胞, 将获得完整结合图像所需的样品量降低至10µg蛋白。这种小型化的样品池设计以及超灵敏的电子元件解决了过去限制这种强大技术的样品消耗和时间约束。

iTC₂₀₀提供的平衡时间比传统ITC仪器要快得多, 从而将实验通量提高了2-4倍。

对于那些需要更高通量的应用, MicroCal开发出Auto-iTC₂₀₀这种全自动的版本。这个自动化系统利用iTC₂₀₀作用量热仪的核心, 实现了每天多达75个样品的无人值守通量。

唯有iTC200能够满足药物开发的多个阶段



验证与靶点的结合	蛋白质工程	Kd确认	QC筛选先导物
探索与相关靶点的结合	排除高通量筛选的假阳性	确定化学计量	评估各阶段先导物
确定结合位点/机制	验证性筛选	SAR结合“签名”	比较竞争性的药物
验证筛选分析	基于片段的筛选	结合机制确认	
		与NMR及X射线结构数据的相关性	

图3: 现在, iTC₂₀₀和Auto-iTC₂₀₀让等温滴定量热技术在药物筛选早期阶段的有效利用成为可能。

ITC：用生物相关模型系统架起桥梁

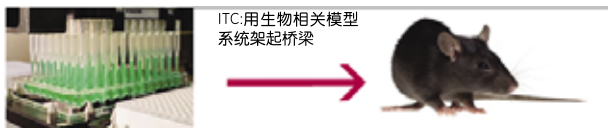


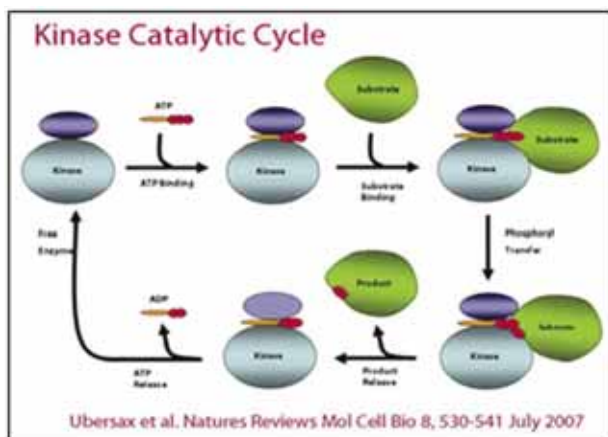
图4：ITC的关键优势之一是创建生物相关实验的独特能力。再没有其他技术能提供完全无标记且液相的分析环境，同时无需靶点高分子或配体的固定。ITC的应用在相关模型生物系统的建立和验证中起了重要的作用。

作用机理研究与分析开发¹⁻⁸

在药物靶点鉴定之后，需要进行严格的评估来证明靶点的调节将有着理想的治疗作用。这包括深入的体外及体内研究，它为药理学干预的效果提供了信息，让人们深入了解小分子生物活性的作用机理。这些努力的结果是建立足够的了解，以便生理学相关模型系统能被开发成下游筛选的分析。这对于降低因临床失败而带来的候选药物损耗率有着重大影响。

等温滴定量热技术在确定具体靶点通路的作用机理（MOA）上扮演着关键的角色。由于ITC直接测量生物分子结合事件中所释放或吸收的热量，那么无需提前了解生物过程，也无需标记。生物分子的相互作用可在天然状态下用内源的酶、底物或配体来监测。这有一个额外的好处，就是显著缩短了分析开发的时间。

ITC已经证明是分析开发的有用工具，即检验所设计分析系统的生物相关性，该系统利用替代



的指标来显示生物活性。这些结果可以与原始的内源机理进行比较，让人相信它们是适当地互相模拟。这包括所有形式的配体和受体复合物，以及酶-底物反应和动力学。整个结合机理都能够系

统地鉴定。例如，配体结合的比较可在催化过程的所有阶段进行（图5），用自由的酶、酶-底物复合物或酶产品，也不管酶是否有活性。这能够产生竞争性、非竞争性和无竞争性配体结合的真实图像。

这个ITC数据有助于了解结合机理。焓、熵这些因子能暗示结合的结构机理。此外，结构上相似的抑制剂在热力学图像上的差异则意味着不同的结合模式^{2,3}。在评估表达蛋白的功能百分比上，化学计量是一个有用的工具¹。它还有助于更好地了解抑制机理，即0.5的化学计量表明同型二聚体蛋白靶点的半位点反应³。

ITC还能用于研究激动剂相对拮抗剂与核激素受体、G偶联蛋白受体及门控离子通道受体的结合。热力学属性有助于了解共激活或共抑制的作用机理⁴。结合研究还能与定点突变等技术结合进行，以便确定催化结构域和其他“热点区域”的定位⁵。

阳性化合物（hit）验证

一般说来，大约有1%的高通量筛选（HTS）化合物会在分析运动中表现出拮抗或激动的作用，因此被归为阳性化合物。下一步是通过重复初筛分析来验证它们。这些阳性化合物将进入二次筛选的阳性化合物选择过程，以便选出最好的候选物进入先导物优化。

二次筛选将产生更详细的剂量反应信息，实现化合物与靶点亲和力的比较。这通常表示为 IC_{50} 数据，好的阳性化合物效价 $<10 \mu M$ 。唯有ITC提供了直接的结合亲和力（ K_d ）测定，此数据与 IC_{50} 有着很好的相关性（图6）。然而关于哪些阳性化合物能进入下一轮的决策通常只基于总的结合亲和力。

除了总的结合亲和力，单个ITC实验也能了解结合机理；这包括“锁与钥匙”的作用力，如氢键、范德华相互作用（ H ）、这些是改善选择性的机会，疏水相互作用（ S ）和化学计量（ n ）。此信息对于排名次序的确定是非常宝贵的，并能排除假阳性，从而为传统的反式筛选技术提供了极佳的补充。Auto-iTC₂₀₀每天能提供最多75个样品的完整结合图像，为评估先导分子的质量提供了非常瞩目的平台。

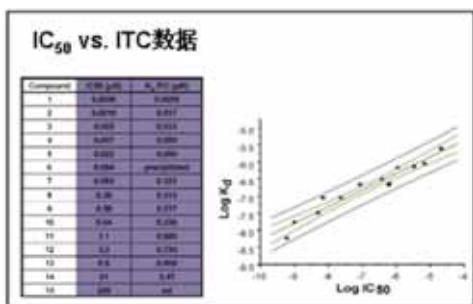


图6：IC₅₀数据与ITC Kd值的相关性良好。数据由美国圣弗朗西斯科Gilead Sciences的StephanieLeavitt博士在2007年微量热技术当前趋势的会议上展示。

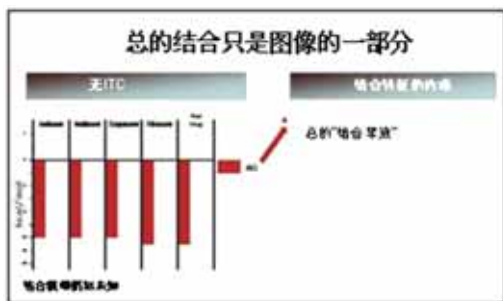


图7：(G)与总的结合亲和力直接相关，但不能了解结合机理。

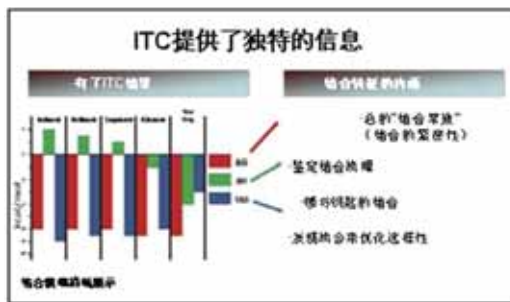


图8：ITC提供了(G)以及(H)和(S)，产生了结合机理的真实图像。

基于片段的筛选⁹⁻¹²

基于片段筛选背后的策略是用低分子量（< 200道尔顿）的片段来杂交蛋白靶点的配体结合域。目标是鉴定出靶蛋白上经常以小区域存在的结合“热点区域”。将配体分割成更小的片段有助于了解蛋白-配体相互作用中关键功能基团的作用。

与配体结合域表现出最佳结合的片段仍然有着极低的亲和力（在低mM范围）。选择具有最佳配体效率（分子量/亲和力）的片段随后结合起来，形成高亲和力结合物。原则上，占据受体位点的片段连接起来，将同时产生比它们单个亲和力总和更高的亲和力，即亲和力是协同作用的（图

9）。这些更复杂的片段分子随后进入先导化合物优化程序。

Auto-iTC₂₀₀为筛选片段文库提供了一些优势。由于它直接测量结合相互作用的热量，无需化学修饰或分析设计，因此生理相关的生物模型也能使用。它能够在mM到nM范围测量广泛的亲和力，每天最多产生75个化合物的完整热力学图像。此外，结合焓（ ΔH ）在基于片段的筛选上也扮演重要角色，因为它是非常特异的氢键和范德华相互作用的度量。ITC是唯一一种能直接测量此参数的技术。

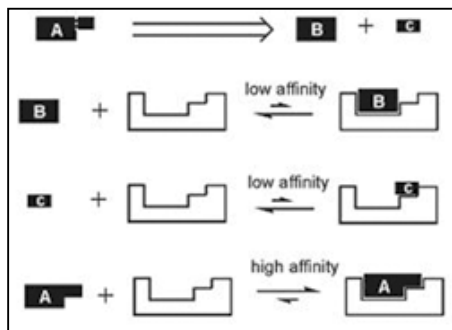


图9：片段与“热点区域”结合的示意图，此处结合亲和力是协同作用的¹¹。

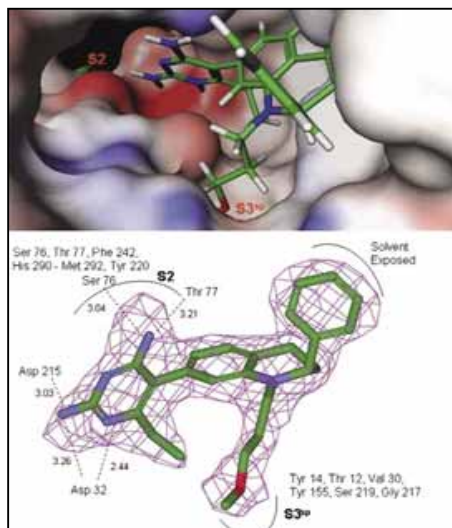


图10：肾素与抑制剂的X-射线晶体结构¹³。

先导化合物优化¹³⁻¹⁹

从阳性化合物到先导化合物开发中先导物的优化通常始于从二次筛选中选择特异性经过验证，且与目的靶点的结合亲和力最高的先导物。结合亲和力一般从1-10 μM 的范围开始，需要将效价提高多达5个数量级，它们才能被看作是可行的候选药物。先导物优化阶段常常伴随着来自配体-靶点的X射线晶体衍射数据的结构信息。

二次筛选中产生的数据如IC₅₀曲线能够将化学结构等同于结合亲和力。此信息能帮助推断有可能改善效价的结构修饰。然而，关于阳性化合物如何以及为什么与靶点结合的信息可能很少。选择最佳的化合物进入先导物优化将显著提高有着理想效价及选择性的候选物的几率。

等温滴定量热技术扮演了非常重要的角色，它提供了配体与它们靶点高分子的结合力信息。这是一种直接的读数技术，单个实验就能产生关于结合的大量数据。其中包括吸引力的定量测定，如氢键和范德华相互作用（H）、疏水相互作用（S）和化学计量（n）。来自ITC信息与X射线的结构数据互补，能用于协助指导药物化学过程，最终产生有着最佳效价及选择性的候选药物。

ITC提供了热力学数据，能用于指导先导化合物模板的合成。在这个例子中，肾素抑制剂经历了四回反复合成步骤（图11）。结果是先导化合物在结合亲和力上比最初的阳性化合物提高了45倍。此外，ITC与X-射线数据表明结合主要是由于氢键（H）。这比单纯的疏水吸引亲和力要理想得多。

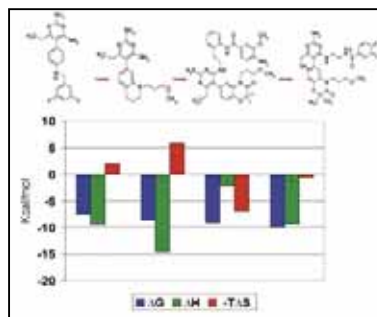


图11：ITC数据能用于指导先导化合物优化的过程。13

订货信息

Article No	Product Name (Description)	Product Group
28428952	SYSTEM, VP-ITC	950
28428955	SYSTEM, iTC200	951
28428983	Auto iTC200 System	952
28428984	Upgrade - iTC200 to AutoiTC200 system	952

搭建结构与功能的桥梁

利用差示扫描量热仪更好地指导抗体疗法的工艺开发

作者：Stephen Demarest博士，Biogen Idec

确定pH和离子强度对蛋白稳定性的影响对于可靠的蛋白质纯化步骤及配方策略的开发很关键。目前毛细管差示扫描量热仪（Capillary DSC）能够提供此类独特的信息，特别适合治疗性蛋白的开发。本文所描述的是DSC对作为药物的IgG1和IgE这两种抗体的pH/离子强度稳定性的研究。只有DSC能够对多结构域蛋白（如抗体）的单独结构域的稳定性进行研究。本文中DSC证明了IgE的恒定结构域片段（Fc）比IgG1 Fc对低pH/高盐条件更为敏感。这些结果表明IgG抗体常用的纯化和配方策略并不适用于IgE。本研究展示了DSC如何用于指导抗体和其他治疗性蛋白的工艺开发方法。

摘要

在目前的诊断或治疗应用中， γ 同型免疫球蛋白，特别是人IgG1的生产和纯化是十分常规的。而以免疫球蛋白E（IgE）为基础的治疗只是在最近才显现出一些势头。¹⁻³在工业规模上生产、处理和配制IgE或IgE的恒定区域（FcE）的标准方法尚未建立。尽管有关IgE生化功能及调控的很多知识都已知晓，但仍不清楚就热稳定性或pH敏感性而言，FcE与Fc γ 是否相似，以及处理IgG的标准方法是否适用于IgE。

IgE对于宿主抵御寄生虫和防御性炎症很重要。IgE介导的经其受体的信号通路还是过敏变态反应的焦点。⁴IgE的恒定区域（FcE）是同源二聚体，包含三个独特的Ig折叠结构域（C ϵ 2、C ϵ 3和C ϵ