

DNA 编码化合物库技术实现新颖 BRD4 蛋白降解剂的发现

DNA 编码化合物库技术在蛋白降解剂发现上的优势

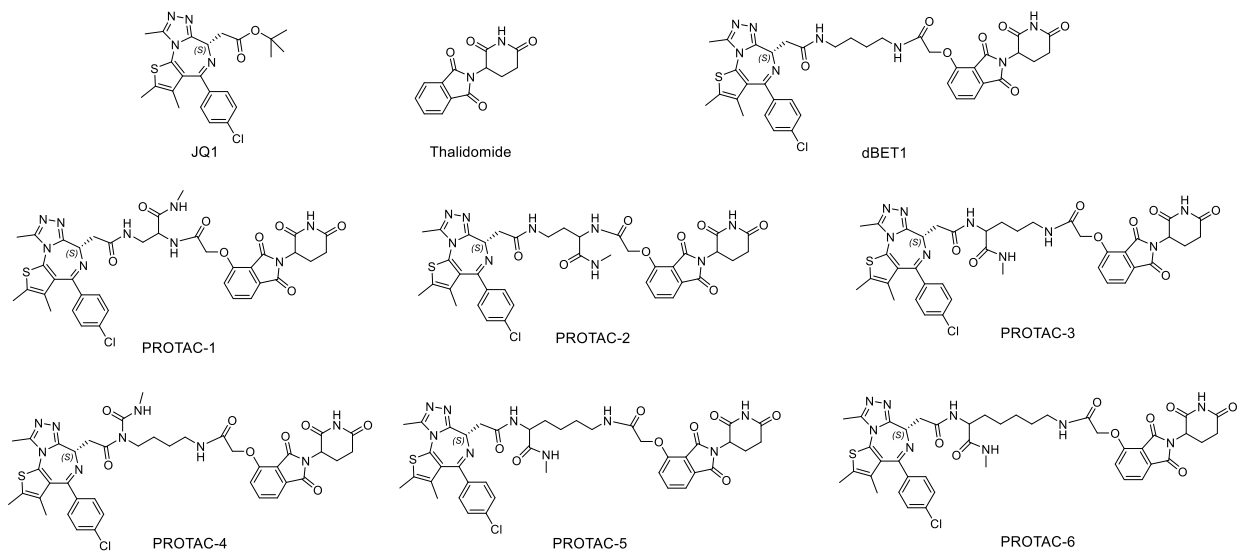
DNA 编码化合物库实现是一种基于亲和力的方法来识别与靶相互作用的化合物，这些化合物可能具有抑制或激动的功能或仅仅与蛋白质结合。DNA 编码化合物的结构与蛋白质水解靶向嵌合体 (PROTAC) 非常相似，如下图所示。DEL 化合物和 PROTAC 分子都需要两个具有已知连接点的分子共价连接，这两个连接点对结合的影响最小。

更重要的是，DNA 编码化合物库筛选能够识别感兴趣的蛋白质 (POI) 和 E3 连接酶的亲和力结合物，因此通过它们的组织分布差异，在创造更强的知识产权和探索新型 E3 连接酶的治疗效益方面具有优势。

在传统的 DNA 编码化合物库筛选当中，目标是寻找化合物，筛选的直接读数是 DNA 序列的绝对数 (理想情况下是化合物的绝对数量)。原则上，当 POI 和 E3 连接酶都用在 DNA 编码化合物筛选时，我们可以使用 POI 和/或 E3 连接酶作为对照来鉴定与这两种蛋白质同时结合的化合物。

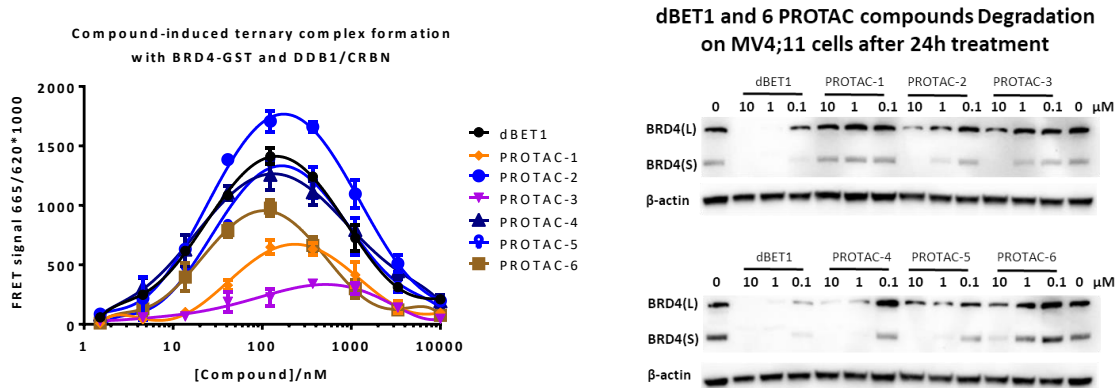
POI-化合物-E3 连接酶复合体稳定性是蛋白降解剂优化的关键

为了验证上述理论，我们以 JQ1 为 BRD4 亲和化合物，沙利度胺为 CRBN 结合化合物，用不同长度的连接体来测试是否能够区分三元键合的稳定性。具体地，我们合成了六个 PROTAC 分子和 dBET1 (一个著名的 BRD4 降解剂, *Biochem Biophys Res Commun*. 2018, 497 (1): 410-415)，并测量其 IC₅₀ 值 (下图)。从 IC₅₀ 值上，我们无法知道哪一个结合 BRD4 和 CRBN 形成更稳定的复合物。



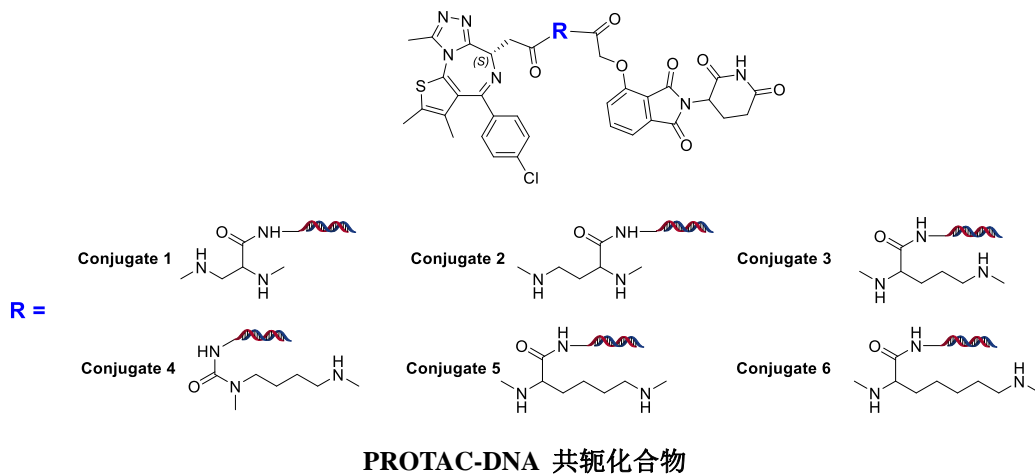
| 化合物 | dBET1 | PROTAC-1 | PROTAC-2 | PROTAC-3 | PROTAC-4 | PROTAC-5 | PROTAC-6 |
|----------------------------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| BRD4 IC ₅₀ (nM) | 43 | 130 | 92 | 88 | 50 | 72 | 120 |

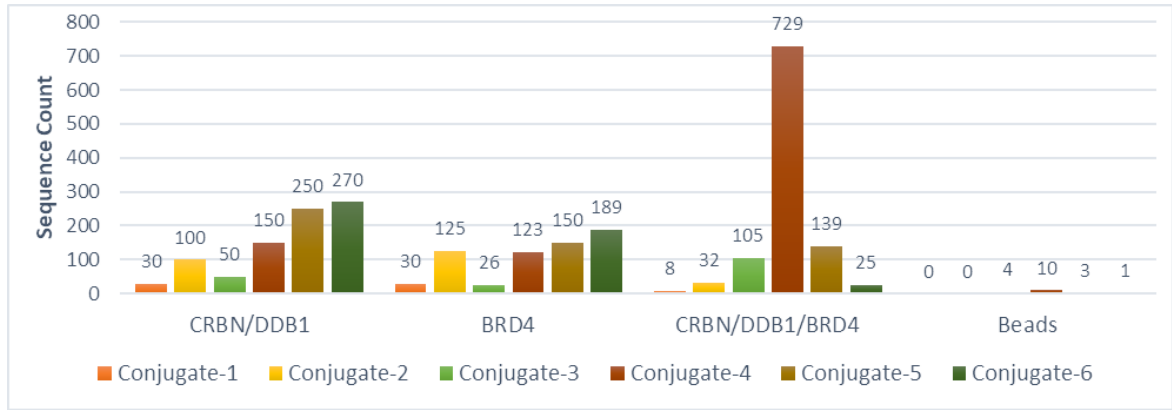
然后用基于 FRET 的三元复合物稳定性实验对这 6 个 PROTAC 分子和 dBET1 进行了评价，它们在三元复合物稳定性实验中表现不同。BRD4 在 MV4; 11 中的降解实验也证实了这 6 个 PROTAC 分子的降解差异（见下图）。



DNA 编码化合物筛选信号与三元复合物稳定性正相关

为了证实 DEL 筛选能够区分复合物的稳定性，我们制备了 6 个相应的 PROTAC-DNA 共轭化合物（如图），以观察 DEL 筛选是否可以观察到不同的回收率。在“共轭化合物回收实验”中，将共轭化合物 1~6 汇集到我们的 DNA 编码化合物库中，进行 DEL 筛选，并比较相应的 DNA 序列计数，如图所示(DEL 筛选请参考“PROTAC DEL 筛选方法”)。共轭化合物-4 是公认的最佳降解分子，因为它有显著更高的测序计数，这是对应的数量化合物结合到 CRBN-BRD4 复合物。该链接链的长度与 dBET1 中的最佳链接器长度一致。另外，从仅针对于 CRBN 和 BRD4 筛选的样本中共轭化合物的回收实验并不能预示哪个链长的共轭化合物具有最佳的链长。

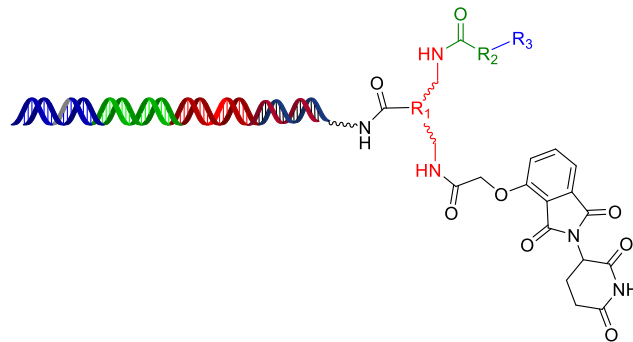




DNA 编码化合物库筛选中共轭化合物的回收 (CRBN, BRD4, CRBN+BRD4)

通过 DNA 编码蛋白降解化合物库进行新颖 BRD4 蛋白降解剂的发现

我们的 DNA 编码蛋白降解化合物库包括 E3 连接酶结合化合物和数量巨大的多样性化合物结构以及不同长度的链长。下图是 PROTAC DEL 的通式一，其中沙利度胺靶向结合 CRBN，R1、R2、R3 分别是化合物库的链和不同化合物的砌块。



以 CRBN 为 E3 连接酶的 DNA 编码蛋白降解库结构

蛋白降解库的筛选和项目目标

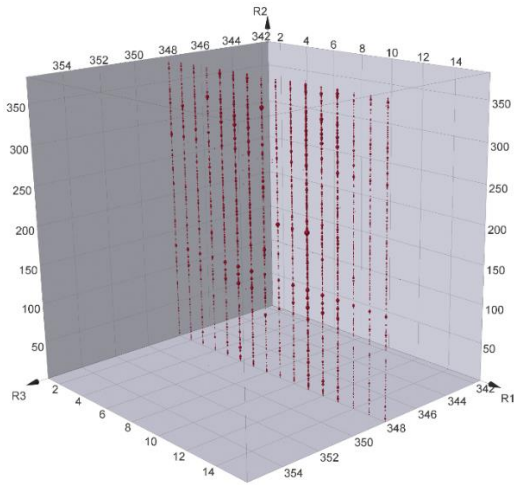
在这个 DNA 编码的蛋白降解化合物库中，沙利度胺为公认的 CRBN 结合化合物，在本案中针对 CRBN 的筛选样本被忽略。具体实验方案如下：

| 编号 | 靶标 | 化合物库 | Purpose |
|----|-------------|----------|-------------------------|
| 1 | BRD4 | 蛋白降解 DEL | 识别所有结合 BRD4 的化合物 |
| 2 | BRD4 & CRBN | 蛋白降解 DEL | 识别同时结合 BRD4 和 CRBN 的化合物 |
| 3 | No Protein | 蛋白降解 DEL | 识别所有结合 beads 的化合物 |

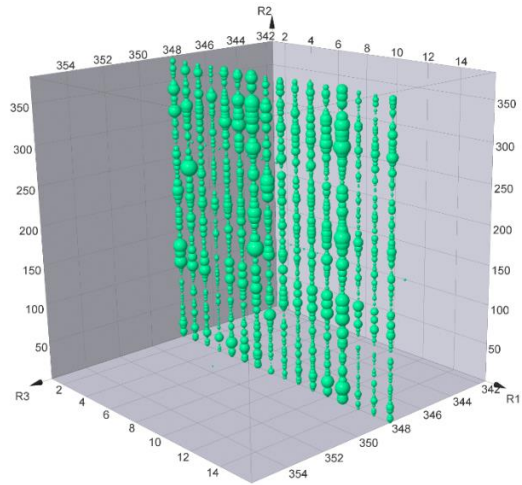
本项目的目的是获得与 BRD4 和 CRBN 结合的新化合物，然后证明样品 2 中具有强信号的 PROTAC 分子能更好地降解 BRD4。

DNA 编码蛋白降解化合物库筛选结果

下图中的样品 1 和样品 2 (未显示空白样品) 之间比较了 DEL 化合物富集的选定 R3 的化合物。

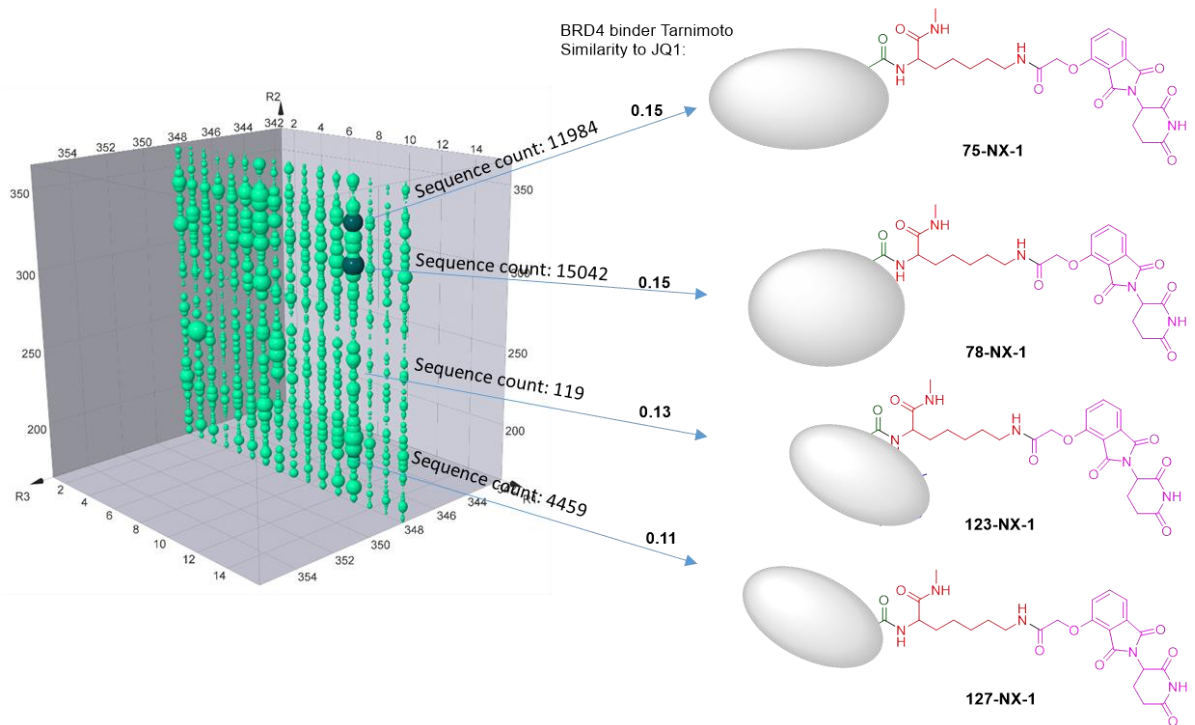


样本 1



样本 2

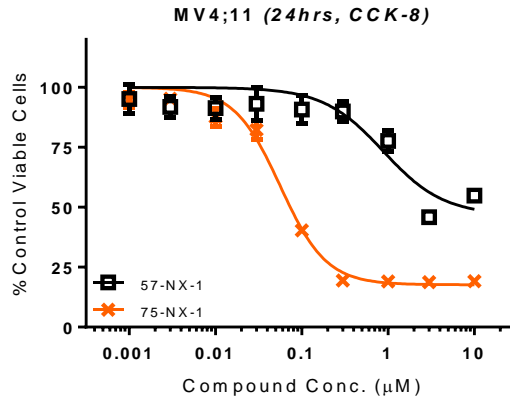
平面 R3=348 清楚地表明，这个平面上的许多化合物优先与两种蛋白质结合（样品 2），而不仅仅是 BRD4（样品 1）。同时，也有许多化合物与两种样品的结合强度相似。需要说明的是，所有用于 BRD4 结合的化合物结构都不同于 JQ1 或任何报道的 BRD4 结合物。为了比较二者的结构相似性，用 Tarnimoto 相似性来描述二者之间的差异。当 Tarnimoto 相似性大于 0.8 时，两个分子被认为是相似的。选择具有代表性的化合物，其 tarnimoto 相似性分数如图，说明我们发现的化合物为全新结构。



根据我们的推测，在样本 2 中气泡较大（测序计数较高）的化合物比气泡较小的化合物形成更稳定的复合物。为了证明这一点，我们在样品 2 中选择了 4 个具有不同序列计数（DNA 序列计数为 1198, 15042, 119, 4459）的代表性化合物，用于非 DNA 合成和蛋白质降解评价（western blot）。这 4 种化合物分别命名为 75-NX-1、78-NX-1、123-NX-1 和 127-NX-1。以 dBET1 为参照物，测序计数较高的化合物 75-NX-1、78-NX-

1 在 MV4; 11 细胞中观察到非常相似的 BRD4 降解；而化合物 123-NX-1 几乎没有观察到 BRD4 降解。化合物 127-NX-1 也没有显示 BRD4 降解。

在 MV4; 11 (CCK-8) 的抗增殖试验中，对 PROTAC 化合物 75-NX-1 及其 BRD4 结合部分 (57-NX-1, 未显示结构) 进行了评价，结果表明，化合物 75-NX-1 的活性远高于 57-NX-1 (化合物 57-NX-1 被发现是 BRD4 抑制剂)。



MV4;11 细胞抗增殖实验

综上所述，通过 DNA 编码蛋白降解剂库筛选是一种快速和有效发现稳定 POI: 化合物: E3 连接酶复合物的方法。我们充分意识到，还有其他因素可能影响蛋白质降解，如蛋白降解剂的溶解度、透膜性、结合方式等，但毫无疑问，DEL 筛选方法为三元复合物的形成 (蛋白质降解剂优化的一个重要步骤) 提供了非常有效的工具。