

亲和超滤 HPLC-MS 法的研究进展

赵宏艳, 张勇忠, 肖春玲*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 亲和超滤 HPLC-MS 法是将超滤技术与 HPLC-MS 联用, 主要用于从组合化学库和天然产物粗提物中筛选与可溶性靶点相结合的小分子活性物质, 在药物代谢和描述受体-配体结合特征两方面也有所应用。用该方法筛选和发现药物被认为是传统药物发现方法的一种补充。本文综述了亲和超滤 HPLC-MS 法的原理及其在药物研究中的应用。

关键词: 亲和超滤 HPLC-MS 法; 小分子活性物质; 筛选和发现药物; 药物研究

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2009) 10-1084-05

Advances in the study of affinity selection-ultrafiltration/HPLC-MS

ZHAO Hong-yan, ZHANG Yong-zhong, XIAO Chun-ling*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Affinity selection-ultrafiltration/HPLC-MS is the combination of the ultrafiltration and HPLC-MS, mainly used for screening small active molecular substances from combinatorial libraries and natural product extracts, which can bind to solution-phase targets. Besides, it can be used in metabolic screening and characterization of ligand-receptor binding. It is a complement to the traditional methods of screening and identifying drugs. This review describes its principle and application in drug study.

Key words: affinity selection-ultrafiltration/HPLC-MS; small molecular activity; screening and identifying drug; drug study

亲和超滤 HPLC-MS (affinity selection-ultrafiltration/HPLC-MS) 是 20 世纪 90 年代中期诞生的一种药物筛选方法, 主要用于生物活性小分子物质的发现和研究。质谱检测技术的应用增强了该方法的敏感性和特异性, 使得化合物在较低浓度时也可被检测出来。十多年来, 亲和超滤 HPLC-MS 得到了迅速发展, 成为新药研究领域非常重要和有效的筛选方法之一, 已成功应用于特定靶标药物的筛选^[1]。

1 概述

1.1 亲和超滤 HPLC-MS 法原理

亲和超滤是由亲和捕获与超滤技术结合而成, 采用超滤膜分离与生物大分子 (>10 kD 的蛋白和 DNA) 相结合的小分子化合物^[1]。亲和超滤 HPLC-MS

法的原理是在亲和靶标 (受体, 酶等) 与多组分的混合物样品混合孵育的过程中, 与靶标具有一定亲和力的小分子化合物与其活性位点结合形成复合物, 通过超滤的方法将复合物与未结合的小分子化合物分离, 然后利用适当的方法 (加入有机溶剂, 改变 pH 等) 将蛋白变性, 从而使配体从复合物上解离下来, 再利用 HPLC-MS 分析初步鉴定配体的结构^[2, 3]。主要过程如图 1^[4]。

1.2 亲和超滤 HPLC-MS 法特点

与其他筛选配体的亲和方法相比, 如前沿亲和色谱法、毛细管亲和电泳法, 亲和超滤法存在显著的优点^[5]: 首先, 亲和超滤受体和配体的结合是在溶液中进行, 避免了由于标记或将受体和配体化学偶联到一种固体支持物上而引起的受体和配体性质的改变 (构象的改变, 主要残基的失活), 从而保持了二者的天然构象和相互结合作用; 第二, 在超滤过

收稿日期: 2009-02-16.

*通讯作者 Tel: 86-10-63020226, E-mail: xiaoc1318@163.com

程中,受体可以恢复活性重新利用——这一特点在其他亲和筛选方法中并不是普遍存在的,如亲和色谱法,当受体量不足或价格昂贵时,这一特点十分重要,但是当配体共价结合到受体时,如酶的活性抑制剂与其不可逆结合,使得受体活性的恢复在某种程度上受到一定的限制;第三,脉冲超滤可以与在线质谱仪相连,直接描述特异性配体的分子量、元素组成、结构和纯度,而一些亲和方法,如离心超滤与在线质谱仪不相容。

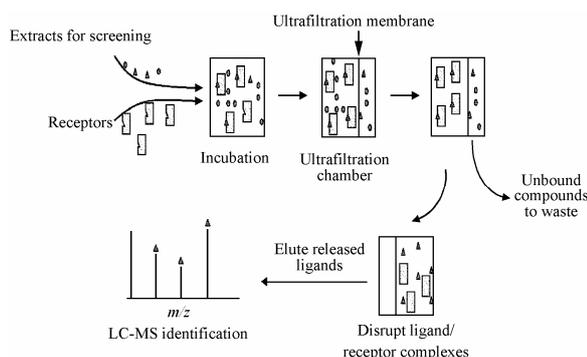


Figure 1 Experimental design of affinity ultrafiltration HPLC-MS^[4]

1.3 亲和超滤 HPLC-MS 法分类

亲和超滤 HPLC-MS 分为超滤 HPLC-MS (ultrafiltration/HPLC-MS) 和脉冲超滤 HPLC-MS (pulsed ultrafiltration/HPLC-MS) 两类,这两种方法在具体操作及所使用的仪器设备、原理和应用范围上存在着一些差异,并且各有优缺点,二者的详细比较见表1。脉冲超滤室(图2)由两个小室组成,中间由主要超滤膜分开。下室即结合室,受体和配体被注入该室,在此结合。下室内含有一个磁力搅拌器,保持进入室内的样品充分混匀并防止高分子量的化合物发生极性化或黏附在膜上。下室内的组分通过超滤膜流入上室,然后直接流出^[6,7]。构成小室的材料主要是聚砜或聚醚醚酮,超滤膜为纤维素膜或甲基纤维素膜,二者均不易与蛋白结合^[5]。在实验过程中,向室内注入混合样品后,用缓冲液漂洗 10~15 min,洗下的是未与受体结合的小分子化合物,可直接弃掉。漂洗后,用变性液使结合的配体从受体上解离下来,流出物可用在线电喷雾 MS 分析,也可先储存到 HPLC 柱内然后进行 LC-MS 或 LC-MS/MS 分析检测^[8]。

超滤离心(图3)是一个亲和选择过程,通过多次超滤离心达到富集配体的目的,从而增加了配体的 MS 信号强度。在实验过程中,将孵育混合物转移到超滤管中,通过离心将受体-配体复合物与未结合的

小分子化合物分离,受体-配体复合物被滞留在超滤膜之上,多次离心后,用适当的有机溶剂提取配体,进行 HPLC-MS 检测^[9]。

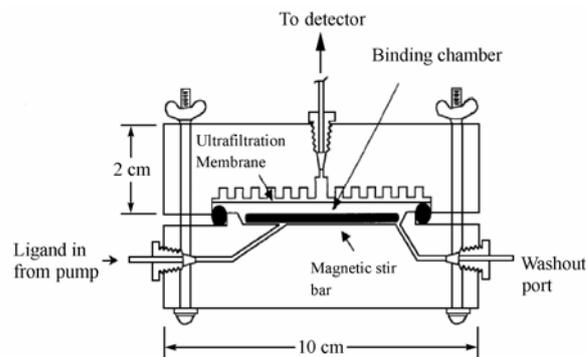


Figure 2 Diagram of pulsed ultrafiltration cell^[6]

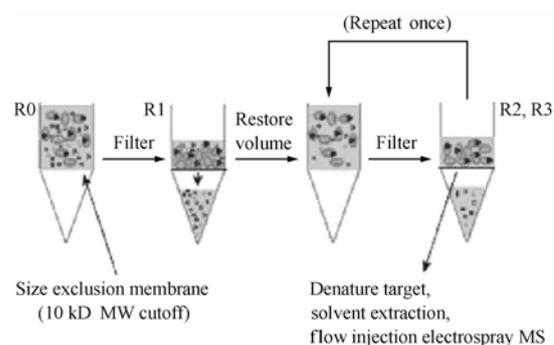


Figure 3 Schematic ultrafiltration experiment format^[9]

1.4 影响亲和超滤 HPLC-MS 法筛选的因素

在用亲和超滤 HPLC-MS 法筛选活性物质时,影响因素有很多,包括靶标与被筛选物的浓度、孵育时间、漂洗、超滤膜孔径及通量的大小等各种因素。

1.4.1 靶标与被筛选物的浓度 在整个筛选过程中,靶蛋白的浓度是整个筛选过程的关键。当配体的浓度超过靶标浓度时,由于各种配体竞争结合靶标的活性位点,只有与靶标具有最高亲和性的配体被筛选出来,所以配体的浓度应小于靶标,以保证与靶标结合的配体不流失^[10]。同时注意在人工配制配体溶液时,尽量使各种配体的浓度相等,以保证每种配体与靶标的结合率相同,使筛选结果更准确。但是如果被筛选配体的量过大,会相应增加非特异性结合的量,造成选出的物质中杂质质量增加^[11]。

1.4.2 靶标与被筛选物的孵育时间 作用时间过短,靶标与被筛选样品的作用不充分,造成漏筛或筛选出的活性成分浓度过低,给分析鉴定带来困难,甚至不能检出;一般选择靶标在最佳作用时间下与被筛选物作用,如果作用时间过长,靶标可能与活性成分发生反应,使活性成分结构改变,这会导致下一步的

鉴定结果的错误。因此, 应选择能充分结合的最适宜时间^[11]。

1.4.3 增加漂洗的步骤 超滤的方法不能完全将非特异性结合的配体从受体-配体复合物中除去, 从而干扰了 MS 对特异性结合的配体检测, 除非特异性结合的配体量足够大, 因此在亲和超滤中漂洗步骤是必需的^[11]。但当用蒸馏水和缓冲液漂洗时, 又可能导致特异性结合配体从受体-配体复合物中的解离或造成结合力弱的配体的丢失^[12]。

1.4.4 超滤膜孔径及通量的大小也会影响筛选结果 一般选择的超滤膜截留量为 10 kD, 如果超滤膜孔径过大大会造成靶标和复合物的流失; 孔径过小易造成膜阻塞, 且易使靶标表面聚集较多非特异性结合的成分, 造成筛选的假阳性率增加^[11]。

除了上述因素外, 孵育温度、溶液 pH 值、离心转速、配体的性质等因素都会对筛选结果有所影响。

Table 1 The comparison between ultrafiltration/HPLC-MS and pulsed ultrafiltration /HPLC-MS

	超滤 HPLC-MS	脉冲超滤 HPLC-MS
仪器设备	超滤离心管	脉冲室
原理	通过超滤离心, 将与靶标结合的化合物与未结合的化合物分离	将靶标与配体的混合物置于超滤膜之上, 施加一定的压力后, 与靶标有一定亲和力的配体被选择
优点	如筛选大的化合物库, 可在 2 个月内至少筛选 200 000 个化合物	适用于一些其他分离法无法筛选且色谱特点甚少的靶标
缺点	多次重复离心; 受体-配体复合物与游离配体的不完全分离造成背景干扰	靶标与超滤膜的结合会干扰配体与靶标的结合; 需要漂洗
应用范围	应用范围小, 主要用来筛选小分子活性化合物; 不可以与在线 MS 相连	应用范围广, 用来筛选小分子活性化合物; 计算受体-配体结合的热力学参数和动力学参数; 考察药物在代谢过程中的稳定性等; 可以与在线 MS 相连, 从而筛选更大的化合物库

2 亲和超滤 HPLC-MS 法在药物研究中的应用

亲和超滤 HPLC-MS 法在药物研究中的应用主要体现在小分子药物筛选, 其次在药物代谢和描述受体-配体结合特征两方面也有所应用。

2.1 小分子药物筛选

近年来, 科学家在探讨组合化学库中活性成分的筛选时, 经常采用亲和超滤和质谱检测技术相结合的筛选模式, 并筛选出一些重要靶点的新颖抑制剂。Ray 等^[13]应用离心式超滤器与 HPLC-MS 联用, 利用免疫亲和反应对苯二氮杂萘的混合物库 (20~

30 个化合物) 进行了筛选。在实验过程中, 该方法可以从苯二氮杂萘结构相似的化合物中和加入未知化合物的复杂化合物库中捕获苯二氮杂萘。实验证明, 亲和超滤与 HPLC-MS 联用可以用来从组合化合物库中筛选并确定药物候选物。Comess 等^[9, 14]应用亲和超滤和 EI-MS 技术对抗感染靶点链球菌细胞壁合成酶 MurF 的特异性配体进行筛选, 在一天内完成了对 123 405 个化合物的初筛, 经过复筛, 最终得到两个特异性配体; 并应用亲和超滤和 EI-TOF/MS 技术从 237 797 个化合物中筛选到 DNA 激酶 Chk1 的配体 58 个, 筛选率达到 0.024 4%。以上实验证明了该方法的可行性, 并说明亲和超滤 HPLC-MS 法是一种高效, 快速的筛选方法。Qian 等^[15]以凋亡蛋白 Bcl-xL 为靶点, 应用亲和超滤技术从 263 382 个化合物中筛选到 12 个亲和力低于 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的配体, 同时应用荧光极化技术从 370 400 个化合物筛选到 11 个 $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的配体, 其中有 6 个化合物在两种筛选方法中重复出现。实验表明, 对同一靶点应用两种不同的方法独立筛选, 可增加筛选到的配体结构种类, 减少假阳性配体的数量, 并进一步说明多种筛选方法的联合使用可以减少活性化合物的漏筛。

亲和超滤 HPLC-MS 不但适用于筛选组合化学库, 还可推广到筛选天然产物粗提物和微生物发酵提取液中活性成分。Nikolic 等^[16]应用含有磁力搅拌的脉冲超滤池与 HPLC-MS 联用, 用人重组环氧化酶 II (COX-2) 作为亲和性靶标对 COX-2 的抑制剂进行了筛选。筛选对象为溶于 DMSO、植物提取液和微生物发酵提取液的不同类型的 COX-2 抑制剂 (IC_{50} : 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1} \sim 10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 共 18 份样品。结果表明, 在每份样品中均可检出 2 或 3 个 COX-2 配体。每份样品中含有靶标和配体浓度在 150 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 仍能检出, 灵敏度很高, 而作为溶剂的植物提取液、微生物发酵液提取液对实验无干扰。Liu 等^[4]用超滤和 LC-MS 技术, 以核受体 RXR α 为受体, 将受体的已知抑制剂分别溶于 DMSO、植物提取液和微生物发酵提取液进行筛选。实验表明, 作为抑制剂溶剂的 DMSO、微生物发酵液提取液对实验结果无干扰。Johnson 等^[17]用脉冲超滤和 LC-MS/MS 技术, 以肝微粒体细胞色素 P450 为代谢酶, 以谷胱甘肽 GSH 作为亲和性靶标对植物提取物及其代谢产物中亲电性毒性醌类化合物进行了检测, 考察了植物饮食添加物的安全性, 在整个实验过程中, 提取物的成分对筛选结果无影响, 可见, 脉冲超滤和 LC-MS/MS 技术有望成为一种考察

药物和植物饮食添加物毒性的快速、经济的体外方法。

2.2 药物代谢

Richard 等^[18]将含有磁力搅拌的超滤池与在线 HPLC-MS 联用, 以肝微粒体细胞色素 P450 作为亲和性靶标对异丙嗪等三环类精神药物的代谢速度和程度进行了快速评价, 并描述了代谢物的主要特征。实验表明, 脉冲超滤与 HPLC-MS 联用可以实现药物代谢产物的收集、提取和分析, 及发现不稳定的活性代谢产物。Richard 等认为脉冲超滤 HPLC-MS 联用有望实现自动、快速, 关键决定于: ① 该药物是否为细胞色素 P450 的底物; ② 药物代谢的速度和程度; ③ 哪种 P450 同工酶参与药物代谢。Geun 等^[19]应用脉冲超滤和 LC-MS/MS 技术, 用肝微粒体细胞色素 P450 作为亲和性靶标对 8 种 β -阻断剂的未代谢部分进行了定量检测, 以考察药物在代谢过程中的稳定性。实验表明, 脉冲超滤 LC-MS/MS 联用技术可以体外考察药物在代谢过程中的稳定性, LC-MS/MS 的应用实现了同时定量检测多种化合物; 脉冲超滤 LC-MS/MS 联用技术与其他体外考察相比最大的优点是避免了由于化合物对酶的反馈抑制而使实验结果产生偏差。

2.3 描述受体-配体结合的特征

脉冲超滤可以用来计算受体-配体复合物的两个重要结合参数: 亲和常数 K 与结合位点数 n ^[20]。Chen 等^[6]分别考察了 3 对结合模型 Trp/BSA, 2'-CMP/RNase, Warfarin/HAS 的亲和常数 K 与结合位点数 n , 并与其他方法所提供的结果一致。该实验说明脉冲超滤法可快速定量研究单个或多个结合位点受体-配体的结合情况及温度变化的影响。Gu 等^[21]利用脉冲超滤法分别计算了人血白蛋白的几个配体丹曲林钠, 丹酰胺, 7-anilinocoumarin-4-acetic acid 和华法林的第 1 个亲和常数 (K_{a1}), 并证明该法可广泛应用于分析人血白蛋白与配体的结合情况, 同时在实验中说明: ① 通过减少超滤室的体积可以使脉冲超滤法的分析速度提高 3 倍; ② 脉冲超滤与 LC-MS 联用且当受体的量远多于配体的量时, 可同时比较白蛋白与多种配体的结合情况并按亲和常数分级配体。

3 发展前景

亲和超滤 HPLC-MS 法是一种发现和鉴定药物先导化合物的有效手段, 这种发现和确定具有新颖性和特异性配体的筛选方法, 可适应于大多数可溶性蛋白靶点和多种化合物库。随着基因组学和蛋白组学的

发展, 大量的靶标被克隆表达并分离纯化^[22], 亲和超滤 HPLC-MS 法将筛选出更多的具有新颖性的先导化合物。另外, 随着分析工具的微型化和自动化, 尤其是质谱和液相, 将会使该方法得到广泛和创新性的应用, 从而使亲和超滤 HPLC-MS 法对新药药物研发产生更深远意义的影响^[1]。同时, 具有更高分辨率和特异性的接口的引进, 如串联色谱、串联 MS, 可加快描述分离出的化合物的结构特征^[23]。但是该方法仍然存在一些缺点: 当筛选的配体为亲脂性化合物时, 容易与超滤膜和脉冲超滤室高度非特异性结合, 造成假阳性筛选。所以应采用一些办法减少这种非特异性结合, 如可在配体解离和洗脱前, 更换新的超滤膜, 使筛选结果更准确^[4, 12]。

References

- [1] Annis DA, Nickbarg E, Yang X, et al. Affinity selection-mass spectrometry screening techniques for small molecule drug discovery [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2007, 11: 518-526.
- [2] Comess KM, Schurdak ME. Affinity-based screening techniques for enhancing lead discovery [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004, 7: 411-416.
- [3] Cloutier TE. Library screening using ultrafiltration and mass spectrometry [M] // Wanner KT, Höfner G. *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2007: 157-184.
- [4] Liu D, Guo J, Luo Y, et al. Screening for ligands of human retinoid X receptor- α using ultrafiltration mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 9398-9402.
- [5] Johnson BM, Nikolic D, van Breemen RB. Applications of pulsed ultrafiltration-mass spectrometry [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2002, 21: 76-86.
- [6] Chen CJ, Chen S, Woodbury CP, et al. Pulsed ultrafiltration characterization of binding [J]. *Anal Biochem*, 1998, 261: 164-182.
- [7] van Breemen RB, Huang CR, Nikolic D, et al. Pulsed ultrafiltration-mass spectrometry: a new method for screening combinatorial libraries [J]. *Anal Chem*, 1997, 69: 2159-2164.
- [8] Beverly MB, West P, Julian RK. Evaluation of a micro pulsed ultrafiltration cell for screening ligands in non-covalent complexes [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2002, 5: 65-73.
- [9] Comess KM, Schurdak ME, Voorbach MJ, et al. An ultra-efficient affinity-based high-throughput screening process: application to bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurF [J]. *J Biomol Screen*, 2006, 11: 743-754.
- [10] Sun YK, Gu CG, Liu XM, et al. Ultrafiltration tandem mass

- spectrometry of estrogens for characterization of structure and affinity for human estrogen receptors [J]. *Am Soc Mass Spectrom*, 2005, 16: 271–279.
- [11] Pan YJ, Zhang H, Chen YZ. Study on quick screening for antineoplastic constituents by affinity selection-ultrafiltration/HPLC-EIMS [J]. *Chin Sci Bull*, 2002, 47: 1305–1308.
- [12] Shin YG, van Breemen RB. Analysis and screening of combinatorial libraries using mass spectrometry [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2001, 22: 353–372.
- [13] Wieboldt R, Zweigenbaum J, Henion J. Immunoaffinity ultrafiltration with ion spray HPLC/MS for screening small-molecule libraries [J]. *Anal Chem*, 1997, 69: 1683–1691.
- [14] Comess KM, Trumbull JD, Park C, et al. Kinase drug discovery by affinity selection/mass spectrometry (ASMS): application to DNA damage checkpoint kinase Chk1 [J]. *Biomol Screen*, 2006, 11: 755–764.
- [15] Qian J, Voorbach MJ, Huth JR, et al. Discovery of novel inhibitors of Bcl-xL using multiple high-throughput screening platforms [J]. *Anal Biochem*, 2004, 328: 131–138.
- [16] Nikolic D, Habibi-Goudarzi S, Corley DG, et al. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors using pulsed ultrafiltration mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2000, 72: 3853–3859.
- [17] Johnson BM, Bolton JL, van Breemen RB. Screening botanical extracts for quinoid metabolites [J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14: 1546–1551.
- [18] Richard B, van Breemen, Nikolic DJ, et al. Metabolic screening using on-line ultrafiltration mass spectrometry [J]. *Drug Metab Dispos*, 1997, 26: 85–90.
- [19] Geun Shin Y, Bolton JL, van Breemen RB. Screening drugs for metabolic stability using pulsed ultrafiltration mass spectrometry [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2002, 5: 59–64.
- [20] Winzor DJ, Sawyer WH. *Quantitative Characterization of Ligand Binding* [M]. New York: Wiley-Liss, 1995.
- [21] Gu C, Nikolic D, Lai J, et al. Assays of ligand-human serum albumin binding using pulsed ultrafiltration and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 1999, 2: 353–359.
- [22] Lerner CG, Beutel BA. Antibacterial drug discovery in the post-genomics era [J]. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 2002, 2: 109–119.
- [23] Siegel MM, Tabei K, Beberitz GA, et al. Rapid methods for screening low molecular mass compounds non-covalently bound to proteins using size exclusion and mass spectrometry applied to inhibitors of human cytomegalovirus protease [J]. *J Mass Spectrom*, 1998, 33: 264–273.

欢迎订阅 2010 年《药 学 学 报》

《药 学 学 报》(CN: 11-2163/R, ISSN: 0513-4870)是由中国药学会主办、中国医学科学院药物研究所承办、国内外公开发行的药学综合性学术期刊。辟有栏目：述评和综述、研究论文、研究简报、学术动态。本刊自 1953 年创刊以来，一直报道药学领域原始性、创新性科研成果，旨在促进国内外学术交流。刊登论文内容包括药理学、合成药物化学、天然药物化学、药物分析学、药剂学、生药学等。

《药 学 学 报》为我国自然科学核心期刊，据中国科学引文数据库的数据库统计，在中国科技核心期刊排行榜中，《药 学 学 报》名列前茅，在药学类期刊中居首位；本刊已被世界主要检索系统收录，为我国药学界高水平的学术刊物，在国际上享有一定知名度。本刊 1999 年荣获首届“国家期刊奖”，2001 年入选中国期刊方阵“双高”（高知名度、高学术水平）期刊；2002 年被评为第二届“国家期刊奖百种重点科技期刊”，并荣获第三届“中国科技优秀期刊奖”二等奖；2002~2008 年连续 7 届荣获“百种中国杰出学术期刊”称号；2008, 2009 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助（B 类）。

本刊为 112 页，月刊，大 16 开本。每期定价 30 元，全年定价 360 元。国内邮发代码：2-233，国外代码：M105。欢迎广大作者踊跃投稿，欢迎广大读者订阅。可采用的订阅方式如下：

- 通过当地邮局；
- 通过 E-mail (yxxb@imm.ac.cn) 或从网上 (www.yxxb.com.cn) 下载订阅单，填好后寄至编辑部；
- 通过本刊编辑部，联系人：李淑芬、张晓晔

电话：86-10-63165208，传真：86-10-63026192

编辑部地址：北京市先农坛街 1 号《药 学 学 报》编辑部

邮编：100050