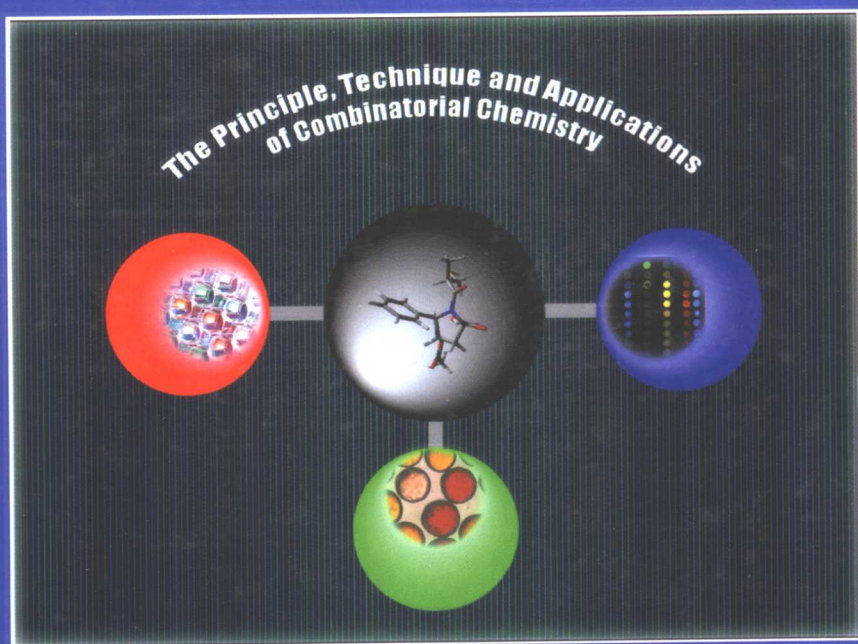


组合化学原理、技术及应用

主编 王德心



中国协和医科大学出版社

组合化学

原理、技术及应用

主 编 王德心

副主编 许家喜

杜冠华

参编人员 (以姓氏笔画为序)

王月华 王德心 田桂杰

杜冠华 刘艾林 许家喜

张 莉

中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

组合化学原理、技术及应用 / 王德心主编. —北京: 中国协和医科大学出版社, 2004.9

ISBN 7-81072-588-2

I. 组… II. 王… III. 有机合成-有机化学 IV. 0621.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 094044 号

组合化学原理、技术及应用

主 编: 王德心
责任编辑: 张俊敏 马兆文

出版发行: 中国协和医科大学出版社
(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65260378)

网 址: www.pumcp.com
经 销: 新华书店总店北京发行所
印 刷: 北京丽源印刷厂

开 本: 787×1092 毫米 1/16 开
印 张: 41.5
字 数: 600 千字
版 次: 2005 年 1 月第一版 2005 年 1 月第一次印刷
印 数: 1~3000
定 价: 88.00 元

ISBN 7-81072-588-2/R·581

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其他质量问题, 由本社发行部调换)

内 容 简 介

本书为高校有机化学、药学及药化专业研究生教材，同时也可作为从事药物研究、制药及其他生物医学研究人员使用的参考工具书。全书从基本原理入手，对组合化学的三高（高通量合成、高通量筛选及高通量结构识别）主题进行了系统、全面的讨论。文字描述中尽可能配合图形表达是本书的一个特点，力求使读者比较容易地理解书中的内容。本书还附有详细的缩略语对照表及文献来源，使其体现工具书的价值。

前言

组合化学是一门起源于 20 世纪 80 年代、兴起于 90 年代的应用学科。它涉及了有机化学、药物化学、分析化学、药理学、分子生物学及免疫化学等多门学科的内容。它的出现改变了传统的单一合成/单一筛选的模式,给传统的药物研究方式带来了空前的冲击。有关组合化学内容的研究论文、综述及专题书籍已报道、出版了很多。然而迄今为止,国内外尚无一本全面、系统地介绍组合化学基本原理、技术特点、大量研究实例,兼具教材及工具书双重功能的著作。

本书是基于最近十多年来在中国协和医科大学研究生院及北京大学研究生院的授课实践基础上编写成的。除了各高校的本科生、研究生外,许多教师、药物研究单位、制药企业及生物技术公司的工作人员也先后向作者表示了对此书内容的关注。在这种需求下,撰写此书算是一种尝试。如果对广大的同行及学生们有一点点启发,起到抛砖引玉之效果,就达到了编写此书的目的了。全书共分为十一章,出现的顺序主要是按照组合化学的实施过程及因果关系由浅至深的方式来表达。首先介绍固相有机合成原理(第二章),使读者以此为基础,能够更容易了解随后介绍的组合库合成。在第三章首次归纳出高通量的四大方式,首次运用 OBOP、OCOP、OSOP 及 OVOP 方式表达相应的产物库。第四章把固相肽合成专门作为一章,重点介绍,是因为其中涉及的合成方法、反应试剂及保护基策略对其他各章的产物库合成均有参考意义。第五章及第六章详细地介绍了各种结构类型产物库的制备方法,尽量展示结构多样性的特点。液相组合化学涉及的内容体现了组合化学已经发展到更广的范围及深度,因此集中至第七章专门论述。第九章的高通量筛选从其重要性上讲,占有组合化学中半壁江山的地位。必须有高通量筛选的密切配合,才能使高通量合成有用武之地。

在第十章内容中,本书也是首次提出了“高通量结构识别”这一表

达形式，并在具体介绍各种方式后归纳了组合化学在活性先导物结构识别方面的后分析、少分析及无分析的“后、少、无”的特点。第十一章专门综合了组合化学技术在世界范围内成功开发出的各种活性先导物的最新（1999~2002）结果。

以上各章内容均具相对独立性。分别把基本原理、技术应用及文献来源相互配合表达，力求使不同的读者特别是对在校学习的本科生、研究生及一些从未研读过组合化学文献的广大同仁均有所收获。虽然作者力求把此书编撰得更好一些，但因个人水平及经验所限，书中内容会有许多不妥之处。再因为组合化学发展极快、新的研究成果及文献不断涌现，本书不可能毫无遗漏地将组合化学的方方面面全部展现给读者。这些不足之处请广大读者提出宝贵意见，以利今后进一步充实与提高。本书在撰写过程中得到了同事及学生林浩、邱传亮、刘喆、王月华、罗茜、杨潇骁等同志的大力协助，作者表示衷心感谢。

王德心

2004年10月于中国医学科学院药物研究所

目 录

第一章 导论	(1)
第一节 发展史	(2)
第二节 组合化学的特点	(5)
第三节 分子组合库	(7)
第二章 固相有机合成原理	(13)
第一节 固相载体	(15)
第二节 linker 的功能与分类	(16)
第三节 linker 的键合	(28)
第四节 linker 的裂解	(35)
第五节 保护基与 linker 的关系	(65)
第六节 功能树脂的实用性比较	(70)
第三章 高通量合成	(89)
第一节 间隔平行式合成	(89)
第二节 分-混式合成	(98)
第三节 集组式合成	(103)
第四节 库生库合成	(107)
第四章 固相肽合成	(116)
第一节 基本原理	(116)
第二节 缩合试剂	(119)
第三节 C 端第一个氨基酸与载体的键合	(126)
第四节 肽链组装	(130)
第五节 肽产物的释放	(143)
第六节 环肽合成	(156)
第五章 非肽寡聚物库	(181)
第一节 从肽到非肽寡聚物的发展	(181)
第二节 寡聚核苷酸库的合成	(184)
第三节 寡聚核苷酸类似物库的合成	(185)
第四节 寡聚肽核酸 (PNA) 库的合成	(188)

第五节	寡糖库的合成	(196)
第六节	糖肽库的合成	(208)
第七节	非天然肽库	(220)
第八节	β -多肽库	(222)
第九节	γ -肽库	(226)
第十节	由肽库制备的其他寡聚物库	(227)
第十一节	类肽库	(229)
第十二节	寡聚氨基甲酸酯库	(231)
第十三节	寡聚脲	(233)
第十四节	氮杂肽库	(236)
第十五节	氮杂 β -肽库	(237)
第十六节	氧杂 β -肽库	(238)
第十七节	膦酰肽	(240)
第十八节	磺酰肽库	(248)
第十九节	寡聚酯库	(258)
第二十节	寡聚异恶唑啉库	(259)
第六章	有机小分子库设计与固相合成	(274)
第一节	组装的形式	(274)
第二节	固相合成反应及产物类型	(284)
第三节	非环化合物的固相合成	(285)
第四节	单杂原子杂环的固相合成	(292)
第五节	多杂原子杂环的固相合成	(322)
第七章	液相组合合成	(363)
第一节	液相组合合成中的快速分离纯化方法	(364)
第二节	液相组合合成常用的合成策略	(393)
第三节	多官能团模板核心的液相组合合成法	(398)
第四节	酶催化的液相组合合成	(418)
第五节	多组分缩合的液相组合合成	(420)
第八章	固相液相联用	(455)
第一节	固相清除型合成	(456)
第二节	固相试剂参与的合成	(463)
第三节	固相捕获型合成	(469)
第四节	可溶性高聚物为载体的半固相合成	(474)

第五节 固液相串联扩增合成.....	(476)
第九章 高通量药物筛选	(481)
第一节 高通量药物筛选的形成过程.....	(481)
第二节 高通量药物筛选的理论基础——反向药理学.....	(483)
第三节 药物靶点与组合化学库的设计.....	(485)
第四节 高通量筛选生物活性评价方法.....	(488)
第五节 高通量筛选常用分析技术.....	(495)
第六节 高通量药物筛选常用设备及策略.....	(501)
第七节 高通量药物筛选的基本程序.....	(509)
第八节 以高通量药物筛选为基础的药物发现基本过程.....	(511)
第九节 结语.....	(512)
第十章 高通量识别结构	(520)
第一节 直接识别.....	(520)
第二节 间接识别.....	(521)
第三节 多轮次求证活性结构.....	(535)
第十一章 组合化学的应用	(551)
第一节 组合库与靶标的关系.....	(551)
第二节 蛋白裂解酶抑制剂.....	(556)
第三节 非蛋白裂解酶抑制剂.....	(576)
第四节 G 蛋白偶联受体结合剂.....	(590)
第五节 非 G 蛋白偶联受体.....	(606)
第六节 细胞毒及抗感染先导物.....	(612)
第七节 组合化学的其他功用.....	(621)
英文略语	(642)

第一章 导 论

近几十年由于分子生物学及基因技术的不断发展,用分子生物学方法识别及制备一些酶、受体及离子通道等靶点物质已成为现实。测定这些靶点的化学结构对于从分子水平上认识疾病及实现合理的药物设计(rational drug design)至关重要。更为重要的是对这些靶点的应用进一步产生了筛选大批量配体的新方法,即每次可完成数百个微量样品活性检测的高效筛选——HES (high-efficiet screening)。相比之下,传统的有机合成方式已难于满足高效筛选对大量样品的需求。统计表明,世界上每制备一个新的化学实体约需 7500 美元;而成功地推出一个新药上市更要消耗 4 亿美元及 10 年的时间。可见,传统的研究方式造成的巨大投入已严重制约了新药开发的速度。当今药物化学面临的另一个现实是针对为数不少的先导化合物如何快速、有效地进行结构优化。

组合化学(combinatorial chemistry)又名组合技术(combinatorial technology)正是基于上述情况逐步发展而成的。组合化学是一个集合性的概念,并非限于单纯的化学范围。它综合了多种现代学科与技术中的成就;涉及了有机化学、药物化学、分子生物学、计算机化学、固相合成、高通量合成——HTSy (high-throughput synthesis)、高通量筛选——HTSc (high-throughput screening)及结构识别方式等多种学科及新技术。从图 1-1 可见组合化学在当代药物研究与开发过程中参与了先导化合物的寻找及进一步优化结构这两个重要环节。

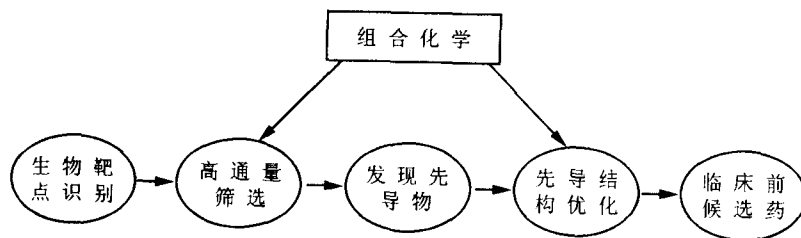


图 1-1 组合化学的概念

第一节 发展史

20 世纪 60 年代初 Merrifield 创造的固相肽合成法是组合化学早期所用方法的最重要的技术基础,使得 20 世纪 80 年代中期的平行多重合成及肽库 (peptides library) 得以问世。肽库合成实际上是组合化学初级阶段的主要内容。90 年代初已由肽库合成发展至其他寡聚物分子库以及非寡聚的有机小分子库的高通量合成、高通量筛选,使组合化学进入全面发展阶段。有关学科之间的配合与渗透对组合化学的高通量合成至关重要。从图 1-2 所示的学科关系中可见有机化学的两个分支——多肽化学及高分子化学是发展肽库及小分子库固相合成的重要基础。此外,药物化学多年积累的大量先导结构及构效关系同样为组合化学的结构优化提供了丰富信息。

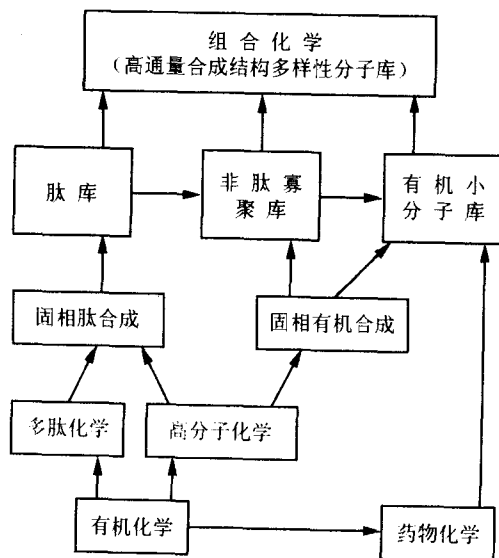


图 1-2 组合化学的发展过程

值得指出的是 20 世纪 80 年代开始,一些新技术的出现 (表 1-1) 对组合化学体系的完善具有重要的意义,其中某些关键技术可谓组合化学发展的里程碑。例如,多针 (poly pin) 合成法制备了第一个化学合

成的肽库；分-混方式的固相合成技术可以生成“一珠一肽”或“一珠一产物”(one-bead one peptide or one bead one product)简称 OBOP 式大规模分子库。至今 OBOP 式组合库的合成与筛选仍在组合化学高通量方式中占主导地位，如苯二氮草组合库的合成则标示组合化学已经扩展至有机小分子范围，大大提高了组合库的分子结构多样性；核心库、索引库的应用技术不但使组合化学进入液相合成与筛选的范围，而且具有高通量同步识别先导结构、无需任何化学分析的出色功能。

表 1-1 组合化学发展史上的里程碑

时间	关键技术	意 义	文 献
1984	多针法合成肽库	肽库问世	Geysen 1984
1985	茶袋法合成肽库	平行、多重肽合成	Houghten 1985
1986	DNA 库启动子的选择	用生物合成分子库识别配体	Horwitz 1986
1988	分-混法合成肽库	首次尝试高通量合成	Furka 1988
1990	光印法合成肽库	玻片式大规模集成肽库	Fodor 1991
1990	噬菌体展示高容量肽库	生物法合成库识别配体	Cwirla 1990
1991	OBOP 法合成与筛选肽库	形成高通量合成的主体	Lam 1991
1991	多轮澄清法合成筛选分子库	液相组合化学的重要方式	Houghten 1991
1992	Peptoides 及寡脲分子库合成	出现非肽寡聚组合库	Simon 1992
1992	苯并二氮草分子库合成	第一个有机小分子组合库	Bunin 1992
1993	编码法合成与识别	用于非肽分子库的高通量筛选	Brenner 1992
1994	核心分子组合库合成	液相组合化学的减员失活法	Dunayevskiy 1995
1994	循序澄清法	同步识别活性结构	Erb 1994
1994	活化 SN 型 linker	组合裂解方式实用化	Backes 1994
1995	索引组合库	液相组合化学的分析识别法	Pirrugg 1995a, 1995b
1995	射频编码组合库	物理手段编码	Nicolaou 1995
1996	潜活化法合成	简便、高效合成寡糖组合库	Boons 1996
1996	细胞结合法筛选组合库	简便、直观的高通量筛选	Pennington 1996
1999	支架分子组合库的合成	复杂、刚性分子的结构优化	Tan 1999
2000	人工合成天然产物化合物库	大量开发、优化天然产物	Wessjohann 2000

参 考 文 献

一、综述

1. Lam KS, Lebl M and Krchnak Y. The "one-bead-one-compound" combinatorial library method. *Chem Rev*, 1997, 97:411 - 448
2. Spencer RW. High throughput screening of histonic collections: observations on file size, biological targets, and file dirersity. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 61:61 - 67
3. Corbett JW. Recent progress in solid phase heterocycle synthesis. *Org Prepn Proc Int*, 1998, 30:489 - 550
4. Guillier F, Orain D, Bradley M. Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry, *Chem Rev*, 2000, 100:2091 - 2157
5. James IW. Linkers for solid phase organic synthesis. *Tetrahedron*, 1999, 55:4855 - 4946
6. A compendium of solid-phase chemistry publications. In: Moos WH, et al eds. *Annual Reports in Combinatorial Chemistry and Molecular Dirersity*. Vol 1. 326 - 344. ESCOM, Leiden, The Netherlands.
7. Recent advance in solid-phase synthesis of natural products. In: BurgessK ed. *Solid-phase Organic Synthesis*. New York: Wiley-Interscience, 2000
8. Virtual screening: an alternative or complement to high throughput screening. *Perspectives in Drug Discovery & Design*, 2000, 20:1 - 287
9. Dolle RE. Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 1999. *J Comb Chem*, 2000, 2:383 - 433
10. Golebiowski A, Klopfenstein SR, Portlock DE. Lead compounds discovered from libraries. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5:273 - 284

二、期刊

1. *Tetrahedron Letters*
2. *J Med Chem*
3. *Bioorg Med Chem Letts*
4. *J Org Chem*
5. *J Am Chem Soc*
6. *Tetrahedron*
7. *J Comb Chem*
8. *Science*
9. *Drug Discov Today*

10. Proc Natl Acad Sci USA
11. Angrew Chem Int Ed Engl

三、专著

1. Devlin JP. High Throughput Screening: The Discovery of Bioactive Substances. New York: Marcel Dekker Inc, 1997
2. Czarnik AW and Dewitt Stt. A Practical Guide to Combinatorial Chemistry. Am Chem Soc, Washigto, D C, 1997
3. Wilson SR and Czarnik AW. Combinatorial Chemistry Synthesis and Applications. New York: John Wiley & Sons Inc, 1997
4. Gordon EM and Kerwin JFJ. Combinatorial Chemistry and Molecular Dirersity in Drug Discovery. New York: John Wiley & Sons, 1998
5. 许家喜, 麻远译. 组合化学 (Combinatorial Chemistry, Terrett NK 著), 北京: 北京大学出版社, 1999

第二节 组合化学的特点

与传统的有机合成相比, 组合化学的一个基本特点是具有相同功能基的多种构件 (building blocks) 同时进行同种成键反应, 从而生成多种产物。根据构件的投入形式不同, 组合化学反应可分为平行合成 (parallel synthesis) 和组联合成 (combinational synthesis) 两大类 (图 1-3)。

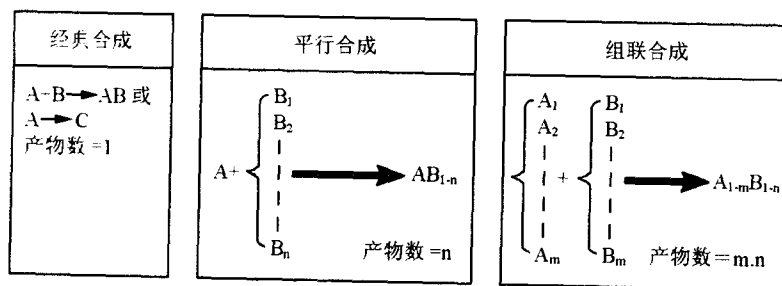


图 1-3 合成方式的比较

因此, 一次合成得到多种产物, 即高通量式合成 (HTSy) 是组合化学的主要特点之一。现以美国《化学文摘》已注册的合成产物数为例, 与当今组合化学中一种可行方式的合成产物数相比较 (表 1-2),

从中可明显看出高通量合成的速度与效率优势。

表 1-2 合成效率比较

合成方式	产物数	用时	人力
经典合成	1400 万种*	一百年	全球有机化学家
高通量合成	1400 万种	一星期	一个小组

* 《化学文摘》截至 2000 年已注册的化合物

高通量合成产物的结构多样性远不能与同数量的经典合成产物相比,但活性筛选的命中率毕竟与样品数有直接关系。随着高通量合成产物的结构多样性水平的提高,如倾向库(biased library)的设计与合成,会使组合化学的高通量合成特点在发现优化先导结构方面具有越来越大的优势。

组合化学的另一特点是活性筛选的高通量化。如前述,快速高效的筛选新方法促进了高通量合成的出现,而后者的逐步发展又造就了高通量筛选。在组合技术的实施过程中,高通量合成与高通量筛选必须相互配合,缺少任何一方,另一方就失去存在的意义。高通量筛选的最基本特点是它面对的每一份样品并不是一种化合物,而是含有几十、几百乃至成千上万种化学实体的混合物。这个混合物可以是一个组群(pool)、一个亚库(sub-library)甚至整个组库。所以其筛选效率是常规筛选效率无法相比的。

组合化学的第三个特点是最简化的分析原则,即对筛出的活性化合物采用后分析、少分析或无分析的方式(详见后文)。

从上述特点可见,组合化学技术的整体运作与传统方式存在很大差异。现以图 1-4 所示为例,假设优化一个先导结构的命中率为四千分之一,那么“合成一个,筛选一个,分析一个”的经典方式则需投入 4000 次的全套操作;而组合技术则可能简化至一次操作。

进入 20 世纪 90 年代以后,关于组合化学的研究论文已有近两千篇发表,另有一些较为全面的文献综述(Gallop 1994, Gordon 1994, Terrett 1995, Balkenhohl 1996, Thompson 1996, Szostak 1997, Terrett 1998, 袁越 1994, 王德心 1995, 刘刚 1995, 王国平 1996, 王德心 1997)对了解组合化学的基本原理、方法技术及发展趋势具有一定的参考价值。

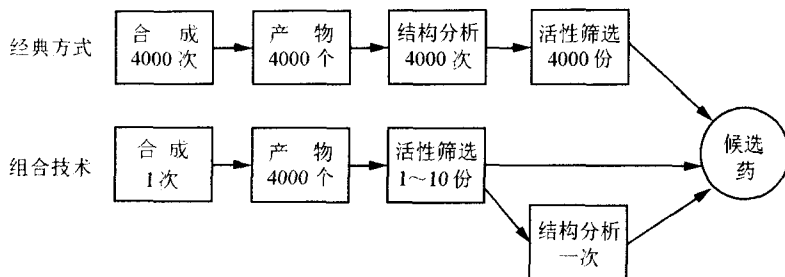


图 1-4 经典方式与组合化学的运作方式及效率比较

第三节 分子组合库

一、分类

生物在自然界漫长的进化过程中，通过组合方式利用核苷酸、单糖、氨基酸及许多小分子构件已经创造了难以计数的核酸、碳水化合物、蛋白质、肽及各类天然产物的巨大分子库。现代医学的一些难题要求我们不仅去充分发掘这个巨大的天然产物合成库，从中发现更多的有用分子，而且更要求我们利用已有的科技能力去设计并制造更有针对性的分子组合库。目前已经存在许多种类的分子库（图 1-5），其中的化学合成库是组合化学研究的主要对象，也是本书重点介绍的内容。

除了以图 1-5 的方式按分子库的自然状态或化学组成分类以外，还可根据高通量合成及筛选、识别的方法不同对化学合成库分为更多类别的组合库（详见后文）。

1. 基因重组分子库 最早的实验是把一段脱氧寡聚核苷酸嵌入线状噬菌体的 PⅢ 基因中，就可以在噬菌体上展示随机肽库。随之，有几个研究小组分别利用含数百万肽分子的噬菌体肽库分离出专一性单克隆抗体及 streptavidin。还可用类似技术分别在多核糖体库及质粒库上表述相关的活性肽库。

生物合成分子库的优点在于生成的肽分子大小不会受到限制，而且库容量大，一次生成的产物可多达 10^{12} 个，是化学合成难以达到的。但是，生物合成的肽库仅限于以 20 种天然氨基酸为构件。至今以非天然

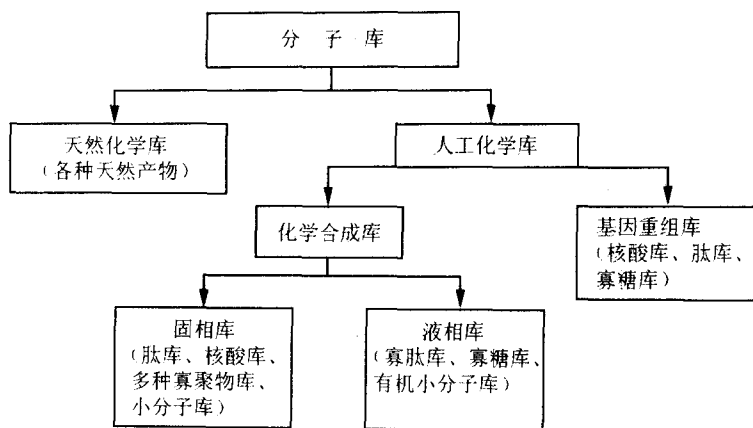


图 1-5 分子组合库的类型

氨基酸或其他小分子为构件嵌入生物合成分子库的方法尚难实现。所以生物合成分子库的产物成分比较单一，结构多样性程度不高。此外，对生物合成配体库的筛选只适于结合实验 (binding assay) 类型，其他多数常规的药物筛选方法均不适用。

2. 化学合成分子库 由于此种分子库的分子结构多样性程度高，可适用的筛选范围广，所以在组合化学中占主导地位。文献统计表明自组合技术出现以来，有关的研究与开发机构都将主要的精力放在化学合成分子库的设计、合成、筛选与结构识别研究上。

二、化学合成分子库的设计原则

化学合成组合库的设计可分两步进行，既虚拟库 (virtual library) 设计及实验库 (experimental library) 设计。

虚拟库及其设计是指对即将合成的一种核心结构 (core structure) 或称支架、主链等进行全部知识资源的综合。自 1779 年以来，人类已积累了大约 600 万个化学反应的知识及无数的有关数据。在此基础上，可以对一类 (不是一个) 目标结构设计出高达 $10^6 \sim 10^9$ 种化合物。很显然如果对近乎天文数字的产物进行合成及活性破译 (deconvolution) 应付出的投入是难以实现的。所以虚拟库的设计只能用作背景资料，是实验库设计的信息库，而实验库的设计是化学合成库的成败关键之一。设计的原则可参照如下几点：