

· 专家论坛 ·

药物分子与靶蛋白相互作用的研究进展

李安¹, 周小青², 孙阔¹, 杨谨如², 朱勇飞², 陆一鸣¹ (1. 海军军医大学药学院, 上海 200433; 2. 湖南师范大学医学院, 湖南长沙 410013)

[摘要] 药物发挥作用是以药物分子与其靶标的相互作用为基础的, 对药物-靶点相互作用的定性分析与定量检测贯穿于从新药筛选发现到走向临床的整个过程。经过几十年的发展, 研究药物分子与靶蛋白间相互作用的手段已经从传统的生化实验方法转变为以先进的分子生物学、生物物理学理论为支撑的高效、准确、多样化的技术体系。笔者从靶点发现与验证、亲和力测定、相互作用位点与结构分析几个方面对代表性的方法和技术进行介绍, 以期对药物研发与机制探索提供参考。

[关键词] 相互作用; 靶蛋白; 药物筛选; 亲和力; 结合位点

[中图分类号] R962 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)01-0001-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.001

Research advance on the interaction of pharmaceutical molecules with target proteins

LI An¹, ZHOU Xiaqing², SUN Kuo¹, YANG Jinru², ZHU Yongfei², LU Yiming¹ (1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013, China)

[Abstract] The function of drugs is based on the interaction between drug molecules and their targets. Qualitative analysis and quantitative detection of drug-target interactions run through the whole process from drug discovery to clinical practice. After decades of development, the study methods on the interaction between drug molecules and target proteins have been transformed from traditional biochemical experiments to a diversity of efficient and accurate technology systems supported by advanced molecular biology and biophysics theory. In this review, representative methods and techniques were introduced from aspects of target discovery and validation, affinity determination, interaction sites and structural analysis, which might provide some references for drug discovery and mechanism exploration.

[Key words] interaction; target protein; drug screening; affinity; binding sites

药物活性分子的靶点中 80% 以上为蛋白质, 包括膜表面的各类受体和离子通道、胞内受体、酶、细胞因子和信号转导分子等。药物通过与靶点结合, 即相互作用, 在体内外发挥各种药理功能。无论是在新药筛选开发或是靶点发现的过程中, 检测药物分子与靶点的相互作用都是研究药物作用机制、靶点确证及改造和优化先导活性分子的关键一步。随着分子生物学和生物物理学技术的快速发展, 研究人员已经能够利用多种技术手段从药物分子与靶蛋白相互作用的亲和力、结合解离动力学、热动力学以

及药物-靶点结合界面的结构生物学信息等多个方面探索药物的作用机制。本文对近年来最新发展的实验技术进行总结, 针对药物研发进程中的不同阶段, 介绍这些方法研究药物与靶蛋白相互作用的原理、提供的信息以及优势与不足。

1 靶蛋白的寻找与确证

1.1 细胞热转变分析(CETSA)

当药物分子结合到靶蛋白上时, 蛋白通常会变得更加稳定。利用这一生物物理学原理, Karolinska 研究所的研究人员开发出了一种检测药物与细胞内和组织样品内的靶蛋白结合的方法, 他们通过对加药处理后提取的细胞或组织蛋白进行梯度递增加热, 结合 Western-blot 技术得到待测蛋白的热稳定性曲线, 比较蛋白热稳定性的变化来评估药物分子与靶蛋白的结合作用。因这种方法类似于体外的热漂移实验(TSA), 他们便将其命名为 CETSA

[基金项目] 国家自然科学基金(81773627); 国家重点研发计划(2018YFC0310900); 上海市科委“科技创新行动计划”生物医药领域科技支撑项目(16431904400)

[作者简介] 李安, 博士研究生, 研究方向: 多肽药物开发与机制研究, Email: ezioleon@foxmail.com

[通讯作者] 陆一鸣, 博士, 副教授, 研究方向: 多肽药物开发与机制研究, Tel: (021)81871333, Email: bluesluyi@sina.com

(cellular thermal shift assay)^[1]。利用这种方法成功鉴定了药物分子与一系列重要的临床靶标之间的相互作用,并监测了药物在肿瘤细胞内的脱靶与耐药效应。Shaw 等运用 CETSA 技术报道了在前列腺癌细胞系内鉴定与雄激素受体(AR)直接结合的药物分子,同时他们以此方法对一个小分子化合物库进行了高通量筛选,验证并测算了 AR 与其拮抗剂分子在细胞内环境下的亲和力与 K_i 值^[2]。CETSA 很好地解决了无法直接观察药物分子与细胞内靶点结合的难题,在靶点发现和验证领域将能得到广泛应用。

1.2 邻近蛋白标记

2012年,Roux 等提出了一种在细胞内标记蛋白相互作用的方法:邻近蛋白标记(BioID)^[3]。其基本原理是将诱饵蛋白和生物素连接酶在细胞中融合表达,在加入生物素后,与诱饵蛋白发生相互作用或距离很近的蛋白会被生物素连接酶标记上生物素,再通过亲和素纯化被生物素标记的蛋白,利用质谱鉴定纯化产物即可获知与诱饵蛋白结合的蛋白。BioID 非常适用于研究难溶或者难以提取的亚细胞、细胞器结构蛋白,能够检测到较弱的瞬时相互作用,并且鉴定到的是胞内天然相互作用,接近体内的真实生理环境。

然而 BioID 也有明显的缺点,就是无法判断待测蛋白与诱饵蛋白是直接相互作用还是间接的相互作用。为了解决这个问题,来自加利福尼亚大学的 Zhuang 等人,基于类泛素分子 NEDD8 E2 结合酶以及 IAP(凋亡抑制因子)羧基端的泛素连接酶 E3 结构域设计了一种嵌合连接酶 NEDDylator,当 IAP 的底物进入 E3 活性位点时,NEDD8 从 E2 转移至 E3 接近底物蛋白并与其表面的赖氨酸发生共价结合(NEDD 化),利用这套标记工具,他们发现了 50 多种 IAP 的候选底物,很好地捕捉到了经典 pull-down 方法难以检测到的胞内蛋白间的瞬时相互作用。同时,由于 NEDD8 只能通过直接攻击位于 E3 活性部位硫酯之上的底物蛋白赖氨酸实现对底物的标记,确保了诱饵蛋白 IAP 与底物蛋白为直接接触^[4]。作为这项技术的衍生, Hill 等^[5]对 NEDDylator 进行了改造,引入了 SNAP 标签,其一端与 NEDD8 E2 融合,另一端携带活性小分子,当小分子与靶蛋白质结合时,生物素化的 NEDD8 可以共价连接到靶蛋白的分子表面,通过后续的富集鉴定可以准确知晓小分子的靶蛋白。他们用这种方法在复杂的细胞裂解物中验证了药物达沙替尼引导的 NEDD 化作用与已知内源性蛋白的相互作用有

关,这为鉴定小分子的靶标提供了一种新的策略。

2 体外结合能力的测定

2.1 表面等离子共振技术

表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)是一种经典的检测生物分子相互作用的分析技术,近 20 年来广泛应用于药物筛选、蛋白质组学、抗体-抗原表位识别等领域,可实时监测多肽、蛋白质、DNA 和寡聚糖等各类生物分子相互作用的整个过程,灵敏度高、特异性强,在获得亲和力 K_D 值的同时能反映受体-配体的结合速率、解离速率、结合常数 K_a 和解离常数 K_d 等相互作用的动力学信息^[6]。然而由于 SPR 需将目的蛋白以氨基偶联的方式包被在传感器芯片上,蛋白的某些位点和区域的局部结构可能会受到影响,因此实验结果不排除存在假阳性或假阴性的数据^[7]。

作为 SPR 技术的延伸,表面等离子共振显微镜(SPR microscopy, SPRM)的应用是近年来的一项重要进展。传统 SPR 需要提取细胞内的蛋白或体外表达纯化蛋白,用以偶联到芯片表面,对于难溶和难以体外表达的膜蛋白无疑是一个巨大的挑战和烦琐的过程。而 SPRM 可以直接将活细胞固定在芯片阵列上并进行培养,无需提取膜蛋白,可在原位实时地研究药物配体分子与细胞的结合过程。同时,SPRM 具有微米级高分辨率,单个细胞膜上蛋白的整体和局部的结合反应都能被即时的监测到,可以很好地反映药物与天然状态下膜蛋白的结合动力学过程^[8]。除了真核细胞外,SPRM 还能在芯片上包被培养细菌或病毒颗粒,在原位研究抗生素、抗体、抑制剂等药物分子与生物大颗粒的相互作用^[9-10]。

2.2 等温滴定量热法

除了动力学检测和荧光检测方法外,微量热技术(microcalorimetry)也是研究较多的一种方法。受体和配体发生结合反应时,体系要么产生热量,要么吸收热量,等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)就是在恒温条件下将配体样品逐滴滴入包含受体分子的样品池中,直接测量反应体系释放或吸收的热量变化来量化两种分子间的相互作用。进行一次滴定反应除可得到亲和力 K_D 值外,还可以提供总能量变化 ΔG 、焓变 ΔH 、熵变 $T\Delta S$ 及化学计量比等热力学参数,分析结合反应的类型和作用机制,有助于理解哪种相互作用(氢键、范德华力、疏水作用或构象变化)对总体结合亲和力的贡献较大。相对于 SPR 和 MST,ITC 既不需要固定化偶联修饰蛋白,亦无需荧光标记蛋白,反映了天然溶

液状态下的分子相互作用,较接近体内生理环境状态,与其他分子相互作用方法相比有着独特的优势。ITC所确定的亲和力参数常常被认为是“金标准”值,在生命科学和制药领域已得到了广泛认可^[11]。Justin等开发了一对互补等温滴定量热法技术来测量酶抑制动力学,他们用这种方法研究了脯氨酰寡肽(POP)与其共价和非共价抑制剂的相互作用,检测到了跨越3个数量级的动力学速率,包括过快的结合反应以及低于标准ITC检测阈值的pM级别的亲和力,大大拓展了经典ITC的测定范围^[12]。

2.3 微量热泳动

微量热泳动(microscale thermophoresis, MST)是近几年来新兴的一项基于荧光检测分子相互作用的研究技术。在微观的温度梯度场中,生物分子会发生定向运动,即热泳动现象,而生物分子在发生相互作用形成复合物之后,其分子量、分子构象、水化层及带电性质会发生改变,引起定向运动尺度的改变,即在结合配体前后生物分子的热泳动程度存在变化。MST将荧光检测与热泳动相结合,通过荧光标记生物大分子,在温度梯度毛细管中检测分子的荧光分布变化,来分析标记物与配体的亲和力^[13]。MST快速、灵敏、精确,样品耗量少,且不需要将蛋白偶联到固相表面,可直接测量溶液环境中分子间亲和力,目前已有许多运用在蛋白-蛋白、蛋白-小分子和蛋白-核酸相互作用的研究实例^[14-16]。对于蛋白质与多肽相互作用的检测,也有研究人员采用MST成功测定了植物肽类激素PSK与受体蛋白PSKR的结合作用^[17]。除了对特定的药物分子-靶点相互作用进行研究,NanoTemper公司还推出了一种全自动机型Monolith NT. Automated,该机型将亲和力检测与自动移液设备结合,30 min即可测定100个样品,非常适合药物先导分子的高通量筛选。Gerhard Klebe比较了不同方法从化合物库中筛选先导片段分子,采用MST方法的命中率达到27%,高于TSA(8%)和传统生化实验的命中率(17%)^[18]。

3 结合位点与作用机制的鉴定

3.1 X射线晶体衍射

药物分子与靶蛋白形成复合物共结晶是其与靶标结合的最终验证,也是最直接、最可靠的证据。X射线晶体衍射(X-ray diffraction)是目前和未来较长一段时间内在原子水平确定生物大分子及复合物三维结构的最为有效的手段,其分辨率能够达到0.1 nm以下。随着蛋白表达纯化系统、晶体培养平

台、X射线衍射仪器和数据处理分析软件的不断升级换代,蛋白质晶体结构解析正在迈向高通量、自动化。通过蛋白-小分子共结晶或小分子浸泡靶蛋白晶体的方法来获得蛋白-小分子复合物的晶体,再利用X射线衍射收集数据并处理解析,就可以获得靶蛋白与药物分子结合的结构信息^[19]。

高分辨率的晶体结构往往有助于药物开发者直接判定结合位点,并以此为基础对药物先导分子进行结构改造来发展亲和力更强或靶点选择性更高的候选药物,同时也可以明确药物的作用机制与方式。然而,共结晶晶体的获得是此技术最大的限制,许多活性分子可能由于结合动力学、热动力学的性质而不适于浸泡蛋白形成共结晶,因此也可能导致关于底物结合与否的假阴性判断^[20]。

3.2 核磁共振

相比于静态的晶体结构,核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)可以测定生物大分子在溶液状态下的一系列动态结构,可能更接近于生物分子在体液、细胞内或核内环境下的结构状态。NMR在探测配体-蛋白相互作用和药物筛选方面也有广泛应用。可分为两种模式:基于配体(小分子)的相互作用观察,可通过NMR波谱的化学位移直接验证小分子与受体蛋白的结合,得到亲和力等参数,但不能获悉结构学方面的信息,不能看到结合位点^[21-22];基于蛋白的相互作用观察,对靶点进行¹⁵N或¹³C同位素单标记,可以进行二维滴定来明确配体结合到蛋白的哪个部位,而将蛋白同位素双标记则可以测定复合物的溶液三维结构与动力学特征^[23-24]。NMR应用的技术瓶颈一是蛋白分子量的限制,分子量往往需要在40 000甚至30 000以下,而大部分具有重要功能的蛋白质都超过了这个范围。同时,蛋白在溶液中的状态也必须非常均一稳定,一般为单体。二聚体或多聚体的样品由于谱峰信号重叠严重,往往不适合NMR实验。另一大难点是NMR需要大量同位素标记的蛋白样品,同位素标记试剂的高成本和蛋白在更换培养基后的表达量问题亦会成为很大的阻碍。

3.3 X射线小角散射

X射线小角散射(small angle X-ray scattering, SAXS)可用于研究蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA和蛋白-小分子之间在溶液中的相互作用,提供有关靶蛋白的折叠、聚集状态、内在柔性以及复合物的形状、尺寸、外壳结构等信息^[25]。虽然SAXS的分辨率仅能达到1~2 nm,但它可以用来监测配体对蛋白-蛋白相互作用的调节效应和对靶蛋白构

象、寡聚状态的影响,对揭示药物分子的药理机制有很大帮助。SAXS能够通过检测溶液微环境的变化而检测到较弱的相互作用,同时提供配体-蛋白结合解离过程的平衡态、化学计量学等信息,对于超大分子量的或超聚体复合物,可以联合单个分子的X线晶体结构或NMR结构来构建蛋白-配体复合物的低分辨率结构模型,从而直观地反映高分子复合物的组装动力学过程^[26]。

4 总结与展望

随着分子生物学和生物物理学的不断突破与进展,基于各种原理的分子相互作用研究手段在进行飞快的更新与升级换代。研究者在药物研发和靶点机制的探索过程中已不仅限于采用单一的方法来分析药物-靶点的相互作用,联合运用多种相互作用检测技术往往能大幅提高新药筛选的通量和效率。同时,多种方法之间可以互相取长补短以增强研究结果的可靠性,能够最大限度地避免假阳性或假阴性的误判^[27-29]。另外,药物分子与靶点的结合也逐渐由单纯的体外亲和力测定发展为溶液、胞内和体内生理状态下的鉴定模式,诸如CETSA和BioID这类技术能帮助我们更直接地探查药物在体内的真实效能与作用方式,虽然在方法上还存在诸多不足需要改善,但相信不久的将来会成为研究药物相互作用的有力手段。

【参考文献】

- [1] MARTINEZMOLINA D, JAFARI R, IGNATUSHCHENKO M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay[J]. *Science*, 2013, 341(6141):84-87.
- [2] SHAW J, LEVERIDGE M, NORLING C, et al. Determining direct binders of the androgen receptor using a high-throughput cellular thermal shift assay[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):163.
- [3] ROUX K J, KIM D I, BURKE B, et al. BioID: a screen for protein-protein interactions[J]. *Curr Protoc in Protein Sci*, 2018, 91:1-15.
- [4] ZHUANG M, GUAN S, WANG H, et al. Substrates of IAP ubiquitin ligases identified with a designed orthogonal E3 ligase, the NEDDylator[J]. *Mol Cell*, 2013, 49(2):273-282.
- [5] HILL Z B, POLLOCK S B, ZHUANG M, et al. Direct proximity tagging of small molecule protein targets using an engineered NEDD8 ligase[J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(40):13123-13126.
- [6] LINKUVIENÉ V, TALIBOV V O, DANIELSON U H, et al. Introduction of intrinsic kinetics of protein-ligand interactions and their implications for drug design[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(6):2292-2302.
- [7] POLONSCHEI C, DAVID S, GáSPáR S, et al. Complementarity of EIS and SPR to reveal specific and nonspecific binding when interrogating a model bioaffinity sensor; perspective offered by plasmonic based EIS[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(17):8553-8562.
- [8] HALPERN A R, WOOD J B, WANG Y, et al. Single-nanoparticle near-infrared surface plasmon resonance microscopy for real-time measurements of DNA hybridization adsorption[J]. *ACS Nano*, 2013, 8(1):1022-1030.
- [9] WANG S, SHAN X, PATEL U, et al. Label-free imaging, detection, and mass measurement of single viruses by surface plasmon resonance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(37):16028-16032.
- [10] SYAL K, WANG W, SHAN X, et al. Plasmonic imaging of protein interactions with single bacterial cells[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63:131-137.
- [11] WELSCH M E, KAPLAN A, CHAMBERS J M, et al. Multivalent small-molecule pan-RAS inhibitors[J]. *Cell*, 2017, 168(5):878-889. e29.
- [12] DI TRANI J M, DE CESCO S, O'LEARY R, et al. Rapid measurement of inhibitor binding kinetics by isothermal titration calorimetry[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):893.
- [13] WIENKEN C J, BAASKE P, ROTHBAUER U, et al. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis[J]. *Nat Commun*, 2010, 1(7):100.
- [14] PARKER J L, NEWSTEAD S. Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1[J]. *Nature*, 2014, 507(7490):68-72.
- [15] SEIDEL S A, DIJKMAN P M, LEA W A, et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions[J]. *Methods*, 2013, 59(3):301-315.
- [16] JERABEK-WILLEMSEN M, WIENKEN C J, BRAUN D, et al. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2011, 9(4):342-353.
- [17] WANG J, LI H, HAN Z, et al. Allosteric receptor activation by the plant peptide hormone phyto-sulfokine [J]. *Nature*, 2015, 525(7568):265-268.
- [18] SCHIEBEL J, RADEVA N, KÖSTER H, et al. One question, multiple answers: Biochemical and biophysical screening methods retrieve deviating fragment hit lists[J]. *ChemMedChem*, 2015, 10(9):1511-1521.
- [19] BLUNDELL T L, PATEL S. High-throughput X-ray crystallography for drug discovery[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4(5):490-496.
- [20] HUBBARD R E, MURRAY J B. Experiences in fragment-based lead discovery[J]. *Meth Enzymol*, 2011, 493:509-531.
- [21] CALA O, GUILLIERE F, KRIMM I. NMR-based analysis of protein-ligand interactions[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406:943-956.
- [22] PELLECCCHIA M, BERTINI I, COWBURN D, et al. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7:738-745.

血症血浆脂蛋白情况下,可下调人血管内皮细胞和平滑肌细胞 HIF-1 表达,减轻冠状动脉壁缺氧和滋养血管生成^[13-14]。芹菜素和姜黄素等天然化合物通过降解 HIF-1 α 抑制 VEGF 表达从而抑制血管生成^[15]。本研究中采用洛伐他汀和姜黄素作为阳性对照药物,观察对模型体系中 HIF-1 α 表达的抑制作用。

在本研究中,笔者首先构建含人 HIF-1 启动子即 HRE 特定部位和 LUC 的嵌合体报告基因质粒(pGL3-HIF-HRE-Luc),进而转染巨噬细胞 THP-1,通过单细胞培养法建立稳定表达细胞株 THP-1-HIF-1 α -HRE-Luc,即高效 HIF-1 α 活性筛选模型。然后通过研究 HIF-1 α 抑制物工具药洛伐他汀和姜黄素对筛选模型进行功能鉴定。课题组针对泡沫细胞 HIF-1 α 采用报告基因法建立了高通量细胞筛药模型,该模型为研发防治 AS 的新药提供了有利工具。

【参考文献】

[1] ROSS R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. *New Engl J Med*, 1999, 340(2):115-126.
[2] KALIORA A C, DEDOUSSIS G V Z, SCHMIDT H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 187(1):1-17.
[3] LIM C S, KIRIAKIDIS S, SANDISON A, et al. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall[J]. *J Vasc Surg*, 2013, 58(1):219-230.
[4] PARATHATH S, MICK S L, FEIG J E, et al. Hypoxia is present in murine atherosclerotic plaques and has multiple adverse effects on macrophage lipid metabolism[J]. *Circ Res*, 2011, 109(10): 1141-1152.
[5] PARATHATH S, YANG Y, MICK S, et al. Hypoxia in murine atherosclerotic plaques and its adverse effects on macrophages[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2013, 23(3):80-84.

[6] SCHOLZ C C, TAYLOR C T. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(4):646-653.
[7] MAZI RE C, MAZI RE J C. Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein[J]. *Free Radic Bio Med*, 2009, 46(2):127-137.
[8] RODR GUEZ J A, NESPEREIRA B, P REZ-ILZARBE M, et al. Vitamins C and E prevent endothelial VEGF and VEGFR-2 overexpression induced by porcine hypercholesterolemic LDL[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(3): 665-673.
[9] ZHU X Y, RODRIGUEZ-PORCEL M, BENTLEY M D, et al. Antioxidant intervention attenuates myocardial neovascularization in hypercholesterolemia[J]. *Circulation*, 2004, 109(17):2109-2115.
[10] SHATROV V A. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) triggers hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) accumulation via redox-dependent mechanisms[J]. *Blood*, 2003, 101(12): 4847-4849.
[11] JIANG G, LI T, QIU Y, et al. RNA interference for HIF-1 α inhibits foam cells formation in vitro[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 562(3):183-190.
[12] MANOLESCU B, OPREA E, BUSU C, et al. Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway[J]. *Biochimie*, 2009, 91(11-12):1347-1358.
[13] WILSON S H, HERRMANN J, LERMAN L O, et al. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering[J]. *Circulation*, 2002, 105(4):415-418.
[14] DICHTL W. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 23(1):58-63.
[15] HOSSAIN C F, KIM Y P, BAERSON S R, et al. Saururus cernuus lignans-potent small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(3): 1026-1033.

【收稿日期】 2018-06-11 【修回日期】 2018-09-25

【本文编辑】 李睿旻

(上接第4页)

[23] HARNER M J, FRANK A O, FESIK S W. Fragment-based drug discovery using NMR spectroscopy[J]. *J Biomol NMR*, 2013, 56:65-75.
[24] WU B, BARILE E, DE S K, et al. High-throughput screening by nuclear magnetic resonance (HTS by NMR) for the identification of PPIs antagonists[J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15:2032-2042.
[25] VESTERGAARD B, SAYERS Z. Investigating increasingly complex macromolecular systems with small-angle X-ray scattering[J]. *IUCrJ*, 2014, 1(Pt 6):523-529.
[26] TUUKKANEN A T, SVERGUN D I. Weak protein-ligand interactions studied by small-angle X-ray scattering[J]. *FEBS J*, 2014, 281(8):1974-1987.

[27] NAGATOISHI S, YAMAGUCHI S, KATOH E, et al. A combination of 19F NMR and surface plasmon resonance for site-specific hit selection and validation of fragment molecules that bind to the ATP-binding site of a kinase[J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26(8):1929-1938.
[28] YAN C, LIU D, LI L, et al. Discovery and characterization of small molecules that target the GTPase Ral[J]. *Nature*, 2014, 515(7527):443-447.
[29] RENAUD J P, CHUNG C W, DANIELSON U H, et al. Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(10):679-698.

【收稿日期】 2018-09-19 【修回日期】 2018-11-16

【本文编辑】 李睿旻