

# 药物设计中的 量热法与热力学

Jonathan B. Chaires

詹姆斯·格雷厄姆·布朗癌症中心，路易斯维尔大学，肯塔基州路易斯维尔市 40202；  
电子邮箱：j.chaires@louisville.edu

《生物物理学年度评论》2008 年，第 37 卷：135 - 151 页

首次于 2008 年 1 月 24 日在线作为“提前发表的评论”  
发布

《生物物理学年度评论》可在 [biophys.annualreviews.org](http://biophys.annualreviews.org) 网站在线阅读。

这篇文章的 DOI: 10.1146/annurev.biophys.36.  
040306.132812

版权 © 2008 年，归年度评论所有。保留所有权利。

1936-122X/08/0609-0135\$20.00 (此  
内容为文献编号及费用信息，通常用于  
学术期刊的引用和收费说明，因此  
直接照译。)

## 关键词

自由能、焓、熵、结合、合理药物设计

## 摘要

现代量热分析仪器能够直接测定生物分子结合反应和构象转变的焓值。对于感兴趣的反应，可以相对简便地获得包含自由能、焓和熵在内的完整热力学曲线。这类曲线在药物设计中具有极大的价值，因为它们提供了仅靠结构或计算方法无法获取的驱动力平衡信息。本文展示了热力学数据在药物设计中所提供的若干见解。

## 目录

简介 .....	136
基本热力学	
关系 .....	136
现代的	
微量热法 .....	138
高通量	
热力学和	
量热法 .....	140
案例研究: 装订	
通往核酸 .....	141
同构并非同能 ..	141
热力学特征	
DNA 结合模式 .....	142
测量超紧密DNA	
通过数字签名证书 (DSC) 进行绑	143
案例研究: 蛋白质 .....	
相互作用的约束 ...	144
优化 HIV-1 亲和力	
蛋白酶抑制剂 .....	144
焓漏斗 .....	145
案例研究: 高端	
选择性不	
高亲和力需求 ...	145
结论 .....	147

## 介绍

生物热学可追溯至 18 世纪 80 年代, 当时拉瓦锡和拉普拉斯利用他们的冰量热计测量活体动物的新陈代谢热 (35、36、40)。例如, 他们通过称量在给定观察期内量热计中融化的冰来研究豚鼠的新陈代谢, 然后根据水的熔化潜热将该值转换为能量。这种新陈代谢热与同一时间段内产生的二氧化碳量相关联, 从而提供了生理学领域最早的一些定量数据。直到不久前, 生物物理学和分子生物学中对热学的应用还仅限于少数几个能够自行建造具有足够灵敏度的仪器来测量生物分子反应热的实验室, 这些生物分

子通常数量有限。阿克尔斯和博伦 (1) 将这一时期称为“热学崇拜”时期, 当时热学掌握在少数人手中, 对许多人来说难以企及。如今, 这种崇拜已有所扩展。用于生物化学和生物物理应用的高灵敏度微量热计已投入商业使用, 这使得量热法在生物物理学和分子生物学领域得到了相当广泛的应用。这种广泛的应用或许不可避免地伴随着一些滥用现象, 这令人有些担忧 (70)。

近年来, 药物发现工作主要以基于结构的设计理念为主导。在基于结构的设计中, 通过将先导化合物的形状与受体活性位点的互补形状进行匹配来寻找先导化合物, 而受体活性位点的结构是通过 X 射线晶体学或核磁共振获得的已知结构。然而, 此前已指出, 在药物设计中, 热力学研究是结构研究的重要且必要的补充 (25)。仅靠结构数据, 即便结合当前最先进的计算方法, 也无法完全阐明结合相互作用的驱动力, 甚至无法准确预测其结合亲和力。热力学提供了定量数据, 有助于阐明这些驱动力, 并从更深层次评估和理解取代基变化对结合亲和力的影响 (74)。

这篇综述探讨了几个实例, 在这些实例中, 热力学研究提供了补充数据, 有助于增强药物设计工作。由于篇幅限制, 无法对药物发现中的热力学进行全面综述, 因此所选实例具有一定的随意性。对于那些我未提及的重要研究成果的作者, 我在此提前表示歉意。

## 基本热力学关系式

基本热力学关系 (15) 在侧边栏中进行了总结。平衡

常数可用于通过吉布斯关系 (方程 1.1) 计算标准自由能变化 ( $G^\circ$ )。标准自由能变化指的是任意且通常不切实际的标准状态, 通常为 1 M 的反应物浓度。自由能变化 ( $\Delta G$ ) 可根据  $\Delta G^\circ$  和由比值  $Q$  (方程 1.2) 定义的特定反应条件来计算。比值  $Q$  是实际产物和反应物浓度比值的函数, 其确切的数学形式取决于确切的反应机制。焓值 ( $\Delta H$ ) 可通过量热法直接测定, 也可通过平衡常数对温度的依赖性以及范特霍夫关系 (方程 1.4) 间接确定。自由能可分解为其焓 ( $\Delta H$ ) 和熵 ( $\Delta S$ ) 成分 (方程 1.3)。焓值可能随温度变化, 表明热容变化不为零 ( $C_p$ ; 方程 1.5)。如果热容变化不为零, 则需要更复杂的自由能表达式 (方程 1.8)。要获得某一特定反应的完整热力学特征, 需要在给定温度下测定其自由能、焓和熵, 如果焓随温度变化, 还需测定热容的变化。

自由能  $G$  是关键参数, 因为在特定的反应物浓度下其值决定了生物分子平衡的方向。如果其符号为负, 则结合反应或构象转变将自发进行, 其程度由  $G$  的大小决定。如果其符号为正, 则  $G$  的大小指出了形成产物所需的能量。自由能是焓和熵之间的平衡。焓变反映了达到特定状态所需的热能的量, 而熵则衡量了这种能量在各种分子能级之间分布的难易程度。对于结合反应, 负焓值很常见 (但并非普遍存在), 这反映了系统倾向于向更低能量状态转变的趋势。

## 基本热力学关系式

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad 1.1$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln Q \quad 1.2$$

$$Q = \frac{f(\text{product concentrations})}{f(\text{reactant concentrations})}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad 1.3$$

$$\Delta H_{VH} = -R \left( \frac{\delta \ln K_a}{\delta (1/T)} \right) \quad 1.4$$

$$\Delta C_p = \left( \frac{\delta \Delta H}{\delta T} \right)_p \quad 1.5$$

$$\Delta H_T = \Delta H_r + \Delta C_p (T - T_r) \quad 1.6$$

$$\Delta S_T = \Delta S_r + \Delta C_p \ln \left( \frac{T}{T_r} \right) \quad 1.7$$

$$\Delta G = \Delta H_r - T\Delta S_r + \Delta C_p \left[ (T - T_r) - T \ln \left( \frac{T}{T_r} \right) \right] \quad 1.8$$

注释:  $G$ , 自由能变化;  $H$ , 焓变;  $S$ , 熵变;  $\Delta C_p$ , 热容变化。  $T$  和  $T_r$  分别表示温度和任意参考温度。带有“ $T$ ”或“ $r$ ”下标的热力学参数分别表示相应温度下的参数。

通过成键作用降低能量水平。结合反应的熵值通常为正值, 这反映了无序化的自然趋势, 通常是由溶剂化作用的破坏以及随之而来的结合水的释放所导致的。

所有结合反应都必须克服不可避免的熵损失 (2, 3, 6, 20, 33, 42, 60)。第一个损失源于两个反应物结合形成一个复合物时, 旋转和移动自由度的丧失。由于复合物形成时移动和旋转运动受到限制, 至少会损失六个自由度。这种损失可能造成高达 +15 千卡  $\text{mol}^{-1}$  的能量消耗, 不过具体数值尚有争议 (2, 3, 6, 20, 33, 42, 60)。第二个损失源于复合物形成时单个键旋转受到限制, 例如,

**DSC:** 差示扫描量热法  
**ITC:** 等温扫描量热法

当小分子与受体位点结合时被锁定在特定构象中。限制键旋转的代价估计约为每键  $0.6 \text{ 千卡 mol}^{-1}$  (44)。如果存在足够的结构数据来指导设计, 确保与受体位点的精确匹配, 那么通过在候选配体药物中引入刚性键, 这种代价可能会降低。这些不可避免的熵损失必须通过其他有利的相互作用来平衡和克服, 才能实现结合。这是药物设计中的一个基本考虑因素。

尽管将焓和熵的贡献分配给生物结合相互作用中重要的少数几种非共价相互作用(氢键、疏水作用和静电作用以及范德华力)看似容易, 但要将它们对生物分子相互作用和转变的热力学的各自贡献区分开来却很困难(14)。尽管如此, 还是有人尝试将药物与DNA结合相互作用的自由能分解为各个成分的贡献(9, 22, 23, 55)。或许, Freire及其同事提出的观点更好也更稳妥, 他们认为结合焓是衡量键形成(氢键和范德华键)的指标, 因而也是衡量结合特异性的指标, 而结合熵主要衡量的是非特异性的疏水作用(56, 66, 68)。下面将讨论这种观点的实用性示例。关于如何根据分子间相互作用的成分来解释热力学数据, 已有若干文献进行了讨论(9, 14, 20, 22, 27, 28, 33, 60, 72)。

焓变可以通过量热法获得, 原则上也可以通过范特霍夫关系, 利用随温度变化的平衡常数来计算。在理想情况下, 对于给定的反应, 如果在数据处理和分析中使用了正确的反应机制, 量热法测得的焓变值和范特霍夫法计算出的焓变值应该是等同的。正确的反应机制可能包括诸如质子化、离子结合与释放或构象变化

等耦合过程。有报道称量热法和范特霍夫法测得的焓变值存在差异(39, 43)。然而, 利用范特霍夫分析来获取焓变值却充满了误差和困难(10, 29)。一个根本的问题在于, 即使平衡常数的测定存在较小的误差, 由非零热容变化导致的范特霍夫图中的弯曲也可能不明显。在这种情况下, 忽略热容变化对数据进行线性拟合, 会导致系统性偏差的焓变值, 与量热法测得的值会有显著差异(10)。

## 现代微量热法

现代微量热法的革新得益于灵敏的商用仪器的出现。在生物物理学和生物化学领域, 差示扫描量热法(DSC)和等温扫描量热法(ITC)这两种量热法占据主导地位(15)。

这两种方法所用的仪器通常都采用功率补偿设计。在差示扫描量热法(DSC)中, 当样品池和参比池的温度以精确控制的方式升高时, 会监测两者的温差。样品池中发生的热驱动反应会导致两池之间出现温度不平衡。一旦出现这种情况, 就会调节两池加热器的功率, 使样品池和参比池重新达到平衡。所记录的主要数据是补偿功率与温度的关系。功率作为一种基本物理量, 很容易转换为焦耳或卡路里这样的能量单位。有关最新DSC仪器设计的描述已发表(49, 54)。

图1展示了具有代表性的差示扫描量热(DSC)数据。过渡曲线下的面积定义了反应的焓变。如果热容发生变化, 则过渡前后的基线之间会存在差异。在这种情况下, 两条基线之间的距离定义了热值。

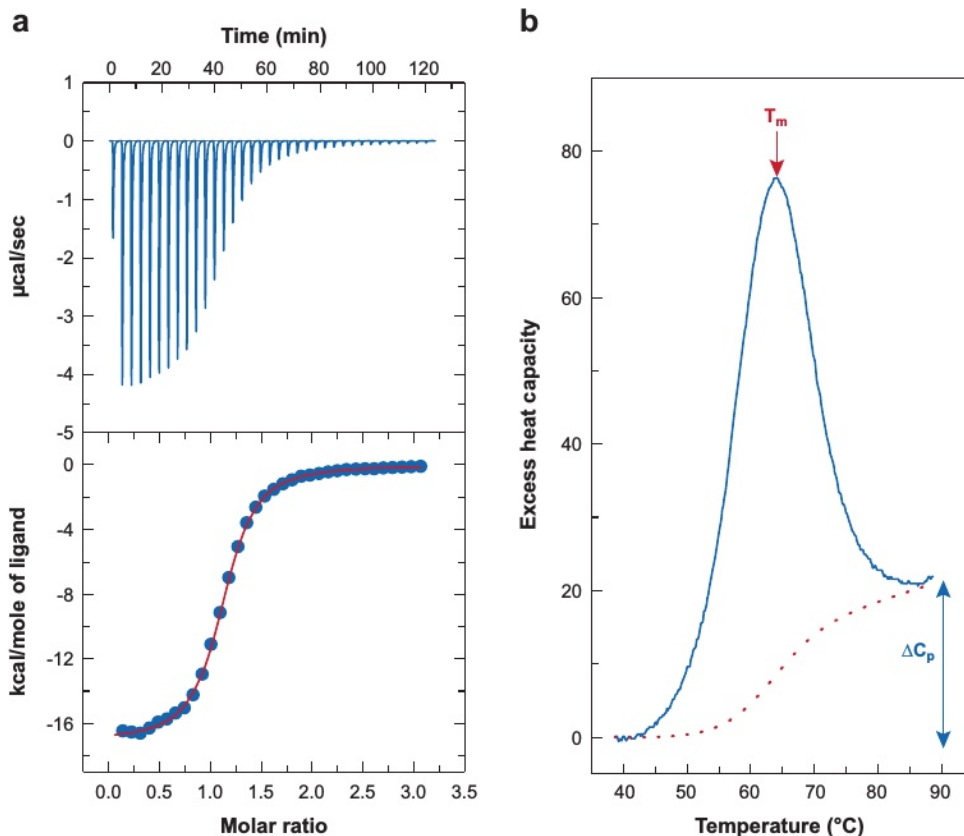


图 1

代表性的 ITC (a) 或 DSC (b) 数据。ITC 数据为 2'-CMP 与核糖核酸酶 A 的结合情况。上图展示的是原始滴定数据，下图则是根据原始数据构建的结合等温线。所展示的 DSC 转变是蛋白质泛素的热变性过程。图中指出了熔解转变温度  $T_m$  和比热容变化  $\Delta C_p$ 。

容量变化。在任何温度下转变的程度可通过转变曲线的积分来定义。有关差示扫描量热法 (DSC) 数据的正确展示和处理的建议最近已发表 (26)。

在差热滴定法 (ITC) 中，同样监测样品池和参比池之间的温差。与差示扫描量热法 (DSC) 不同的是，此处两个池都保持恒定温度。滴定系统向样品池输送反应物。任何反应物结合产生的热量都会导致参比池和样品池之间的温度失衡，这种失衡通过调节施加于池加热器的功率来补偿。

一篇关于 ITC 仪器的描述已发表 (77)。

图 1 展示了典型的 ITC 数据。上图显示的是原始数据，其中功率随时间变化。通过一系列返回基线的峰可以明显看出程序设定的滴定递增步骤。每个峰的面积代表每次添加反应物时的反应热。随着受体结合位点趋于饱和，峰面积的大小逐渐减小。下图则展示了将原始 ITC 数据转换为结合等温线的形式。这样的结合等温线



可将其拟合到特定的结合模型中,以获得结合常数、结合焓以及结合的化学计量比。有关 ITC 数据拟合的一些必要考虑因素,可参见参考文献(18, 32, 61-64)。

## 高通量热力学与量热法

差示扫描量热法(DSC)和等温滴定量热法(ITC)在操作上较为繁琐且耗时。即使是有经验的研究人员,通常每天也只能完成几项实验。制药行业的需求要求更高的通量,而现有的单样品池 DSC 和 ITC 仪器通常无法满足这一要求,这往往使量热法只能作为辅助筛选方法或用于验证其他检测方法。为了克服这些局限性,人们已尝试多种方法来提高量热法和热力学测量的通量。

或许最令人瞩目的尝试是 3D 制药公司(现为强生公司所有)开发的 ThermoFluor™ 技术(47)。ThermoFluor™ 可用于药物研发中的高密度微型热变性分析筛选。该技术通过测量能感知蛋白质变性的荧光染料的荧光来实现。使用可按设定速率加热的 384 孔微孔板。可以利用坚实的热力学原理对小分子库进行筛选,以寻找与特定蛋白质靶点结合的小分子。配体结合与蛋白质变性反应在热力学上是耦合的。优先与天然折叠状态结合的配体将稳定蛋白质,提高其熔点。熔点的升高幅度与结合亲和力有关,尽管其他结合特性也会产生影响(71)。因此, ThermoFluor™ 技术能够单独或在候选药物存在的情况下对感兴趣的靶蛋白的热变性进行表征,从而提供一种定量的高通量筛选方法,可获得准确

的热力学信息。通过这种方法,利用包含数万种化合物的化合物库与数百种不同的蛋白质靶点进行结合成为可能,极大地促进了药物研发进程。ThermoFluor™ 技术的另一个新颖用途是识别生物功能。例如,设计了一种针对未知功能的必需基因的蛋白质产物的配体结合筛选方法(8)。利用 ThermoFluor™ 技术,对这种蛋白质进行了筛选,筛选库包含 3000 种化合物,这些化合物经过专门挑选,旨在提供有关可能生物功能的信息,结果仅发现该组化合物中的特定配体与之结合,这为该蛋白质的生物学作用提供了线索。

ThermoFluor™ 尽管技术强大,但其并非真正的量热法,只能提供范特霍夫焓的估算值。高通量量热仪仍是迫切需求。目前最佳的方法是将灵敏的差示扫描量热仪(DSC)与用于样品处理的机器人系统相结合(48)。这种方法仍受限于串行量热测定,但机器人系统可实现细胞装载、数据采集以及实验之间的清洗自动化。样品被放置在 96 孔板中,并在温度受控的环境中保存,直至被送入量热仪。该系统在初始设置完成后可无人值守运行,每天可进行 10 至 50 次实验。

已报道了两种利用微尺度技术制造微型量热计的尝试。一种焓值阵列装置能够将两滴各 250 纳升的液体混合,从而便于测量结合热或酶促反应的热值(65)。可以制造出这样的反应器阵列,从而实现真正的高通量筛选所需的并行焓值测量。还描述了一种微加工热电流流量计,其样品体积为 5 微升(69),这种设计适合制造阵列以实现并行数据采集。尽管这两种装置

这些装置代表了迈向高通量热法的有希望的初步步骤，并且能够使用大幅减少的样品体积进行操作，但与现有的商用微量热计相比，其性能和灵敏度充其量只能算是一般。

## 案例研究：与核酸结合

### 同构不等能

蒽环类抗生素阿霉素和柔红霉素是癌症化疗的主要药物，已临床使用了三十多年（52, 75）。这两种化合物仅在 C14 位置存在羟基这一点上有所不同。阿霉素与 DNA 的结合比柔红霉素更紧密，结合自由能约低 1 千卡  $\text{mol}^{-1}$ （11）。这两种化合物给基于结构的设计带来了难题。高分辨率 X 射线晶体学研究表明，阿霉素和柔红霉素在与 DNA 结合位点结合时结构几乎相同

（19, 30）。它们各自复合物中观察到的分子相互作用是相同的，阿霉素中增加的羟基似乎并未参与任何额外的特异性相互作用。这两种化合物与 DNA 结合的结构见图 2。阿霉素复合物中额外的结合自由能从何而来？这两种化合物的热力学曲线（图 2c）为这个问题提供了线索。当将结合自由能分解为焓变和熵变成分时，就会呈现出不同的模式

（11）。多柔比星的结合得益于焓和熵的有利贡献。相比之下，柔红霉素的结合包含不利的熵成分。独特的热力学特征揭示了它们在高分辨率结构中不易察觉的细微差异。两种化合物熵的差异表明存在一些难以直观观察到的重要因素，也许是溶剂或离子组织方面的差异，即便在高分辨率结构中也无法看到（30）。尽管多柔比星和柔红霉素与 DNA 形成的复合物结构相同，但它们的能量却不相同。那

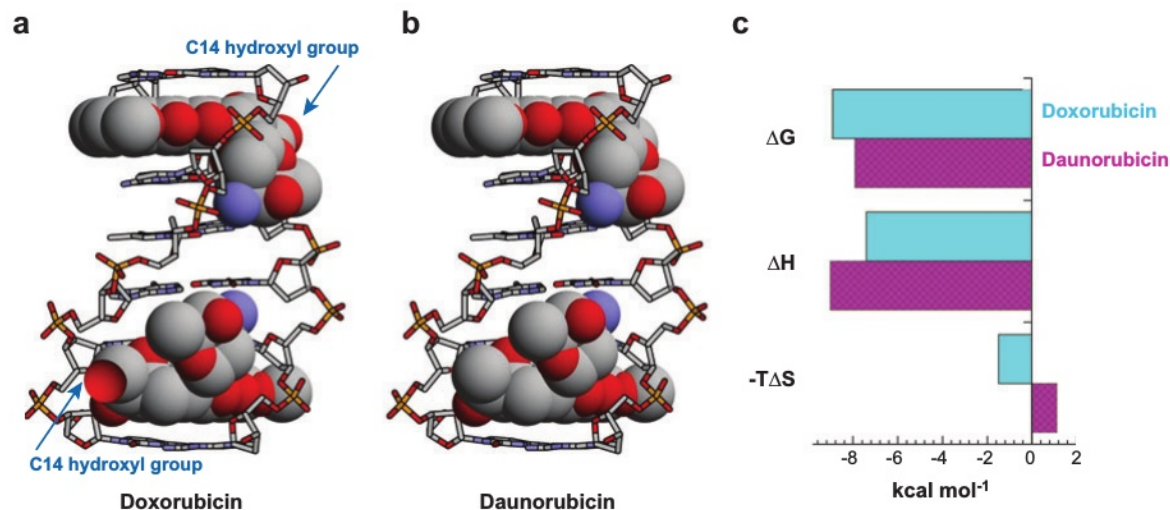


图 2

(a) 阿霉素和 (b) 柔红霉素与 DNA 形成的复合物结构。图 a 中的箭头指示阿霉素中存在的 C14 羟基。图 c 展示了阿霉素和柔红霉素与 DNA 结合的热力学曲线。

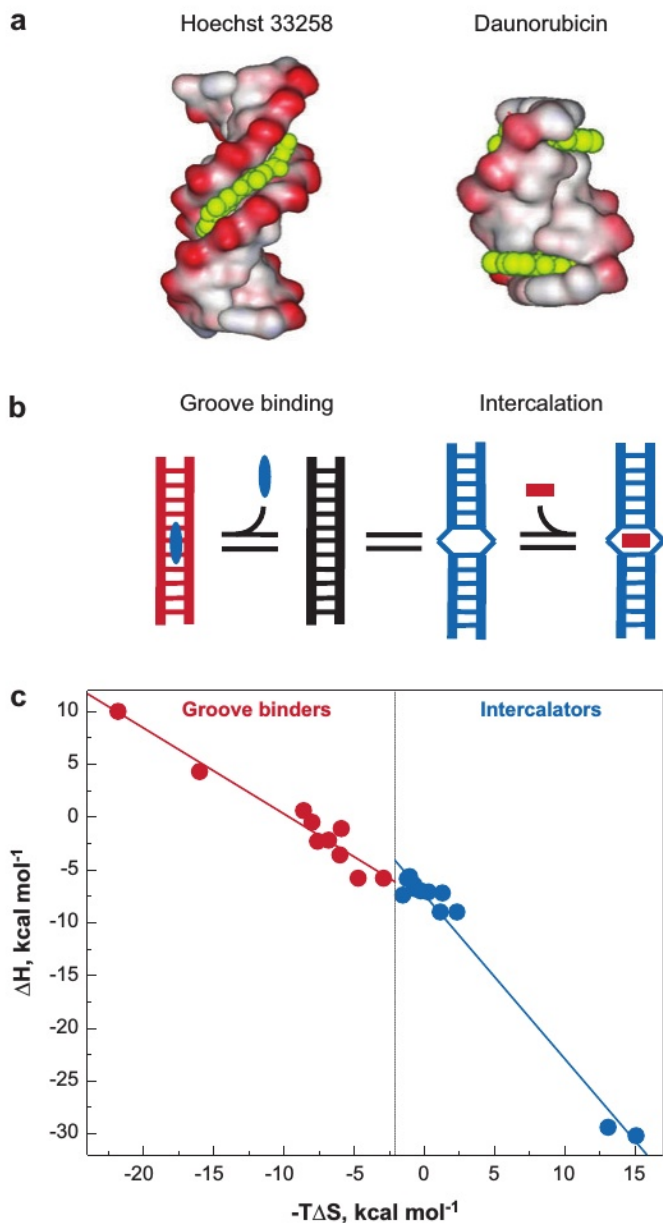


图 3

小分子与 DNA 结合模式的热力学特征。(a) 沟槽结合剂 Hoechst 33258 (左) 和柔红霉素 (右) 与 DNA 形成的复合物结构。(b) 结合机制示意图。(c) 沟槽结合剂和嵌入剂与 DNA 结合的焓变和熵变贡献。

“同构不意味着同能”这一观点最早由布雷斯劳尔实验室提出，他们发现多种 DNA 损伤对双链 DNA 的整体结构影响甚微，但却对热力学稳定性有着深远的影响 (50)。

## 一种用于 DNA 结合模式的热力学特征

小分子与双链 DNA 的结合主要有两种方式：嵌入和沟槽结合。这两种结合方式在图 3 中有所展示。在沟槽结合中，DNA 结构基本不受影响 (76)。沟槽结合剂嵌入 B 型 DNA 的小沟中，而不改变其形状，这类似于锁钥机制。相比之下，嵌入剂通过插入碱基对之间进行结合，其结合过程伴随着 DNA 必然的构象变化，即螺旋被解开并伸长，形成一个开放的嵌入腔 (4, 73)。嵌入作用类似于诱导契合机制。最近，通过使用从 20 种结合机制已明确的化合物所获得的热力学数据，对这两种结合模式的独特的热力学特征进行了阐明 (12)。该数据集仅由具有量热法测定的焓值的化合物组成。结果表明，沟槽结合剂的结合是由熵驱动的，而嵌入剂的结合则是由较大的有利焓值贡献所驱动的。这些趋势在图 3 中有所体现，图中数据以焓与熵贡献  $-\Delta S$  的关系图形式呈现。

所有沟槽结合剂都位于焓值较小 (从负值到正值) 且熵值为负值 (有利) 的图象象限中。相比之下，嵌入剂具有有利的负焓值，以及接近零的不利的正  $-\Delta S$  值。对于嵌入作用，DNA 必须重新组织成一种更有利于嵌入剂结合的形式。



这种结构刚性较大且熵值较低。必须通过焓值来克服熵值的不利影响，而焓值至少部分源自碱基对与嵌入的发色团之间有利的范德华力堆积作用。对于 DNA 结合蛋白的情况，研究揭示了不同的趋势 (34)。使 DNA 弯曲或扭曲的蛋白质是由熵驱动的，而不会显著改变 DNA 结构的蛋白质则是由焓驱动的。

## 通过差示扫描量热法 (DSC) 测量超紧密 DNA 结合

差示扫描量热法 (DSC) 的一个优点是能够测定超紧密结合反应的缔合常数

(7)。热变性方法为研究核酸结合配体的特异性和亲和力提供了一种特别有力的手段 (58, 59)。我们利用这一能力对一类新型双嵌入式蒽环类抗生素进行了研究 (31, 37, 51, 53)。这些新型双蒽环类化合物的设计基于图 2 所示的结构

(13)。在这些结构中，可以看到蒽环单体以尾对尾的方式与 DNA 结合，其反应性胺基在小沟中仅相隔 7 埃。设计策略很简单，即通过一个能精确嵌入小沟且不会干扰蒽醌环在碱基对之间嵌入或达努司胺部分在小沟中的契合的基团将这些胺基共价连接起来。图 4 展示了一种此类双嵌入式蒽环类化合物的结构

(51)。预计这种双嵌入剂的结合亲和力约为单体结合常数的平方 (17)。由于柔红霉素的结合常数约为  $10^8 \text{ M}^{-1}$ ，双柔红霉素预计会以皮摩尔级的亲和力进行结合。对于如此紧密的结合，由于多种原因，传统的光谱学方法在测量结合方面变得极其困难，其中最主要的原因在于难以进行操作。

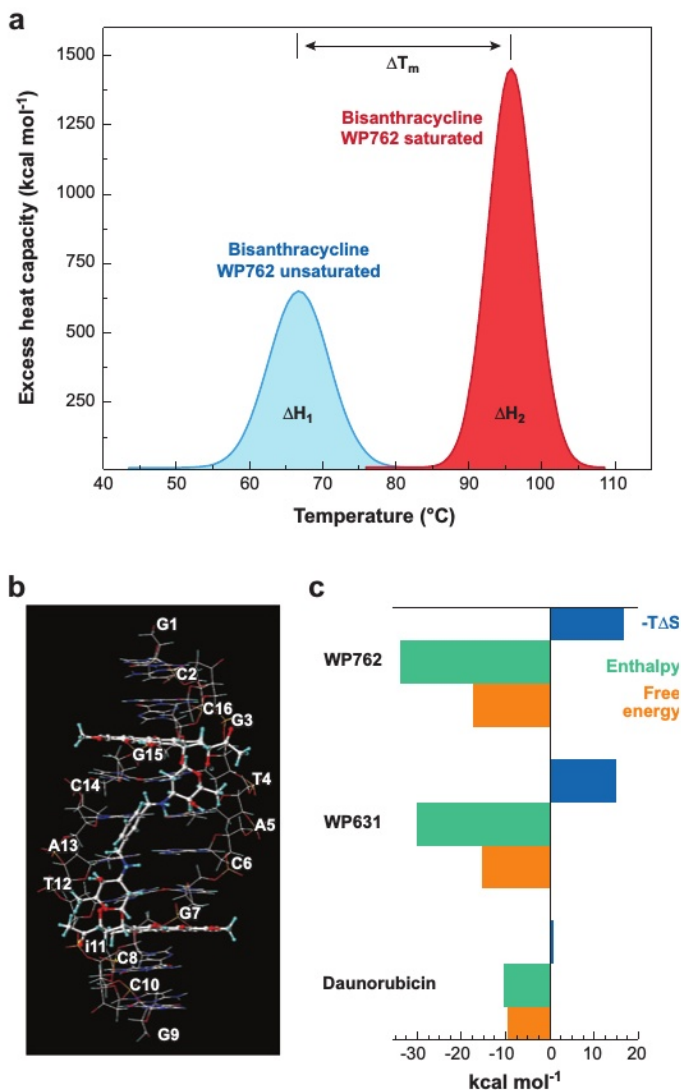


图 4

双蒽环类化合物与 DNA 的超紧密结合。(a) 在无蒽环化合物 WP762 存在及存在饱和量 WP762 的情况下，观察到的 DNA 的差示扫描量热 (DSC) 热谱图示意图。

(b) WP762 - DNA 复合物的结构。(c) 亲本单体柔红霉素以及两种双蒽环化合物 WP631 和 WP762 与 DNA 结合的热力学曲线，这两种化合物的连接体几何形状不同。图中显示了自由能、焓和  $-T\Delta S$ 。

在足够低的配体浓度下工作，以避免定量配位但仍能保持可测量的信号。许多成熟的统计力学理论表明，结合常数可以可靠地

通过受体大分子熔点的变化来测定 (7、16、41、57)，不过在应用这些方法时需要谨慎 (71)。

图 4 展示了该方法在表征双蒽环类药物与 DNA 结合特性方面的应用。结合后，差示扫描量热 (DSC) 热谱图向上移动了超过  $30^\circ$ 。该  $T_m$  的移动可用于计算双蒽环类药物在升高的  $T_m$  下的结合常数。DSC 还具有额外的优势，即结合焓也可通过存在和不存在结合配体的热谱图面积差来估算。仅 DNA 的热谱图面积所获得的焓值，以及双蒽环类药物 - DNA 复合物熔解的总焓值，可结合应用赫斯定律来推断双蒽环类药物结合反应的焓值。这样就可以得出结合反应的完整热力学曲线。

柔红霉素和两种仅在连接体几何形状上有所不同的双柔红霉素的相对结合曲线如图 4 所示。双柔红霉素分子的结合自由能几乎翻倍。

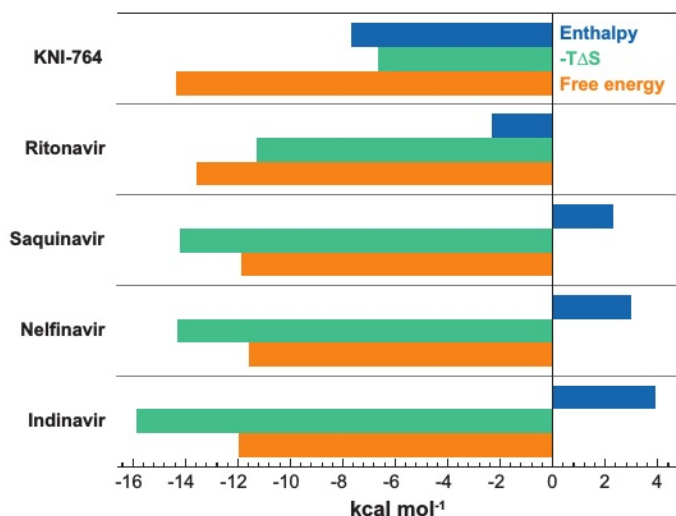


图 5

HIV 蛋白酶抑制剂的焓优化。第一代和第二代 (KNI-764) HIV 蛋白酶抑制剂结合的热力学特征。显示了自由能、焓和  $-T\Delta S$ 。

其热力学特性与母体单体的特性如预期和所设想的那样。然而，热力学曲线表明，双蒽环类化合物存在较大的不利熵贡献。这种不利熵的来源可能是由于在结合时连接键的旋转受到限制 (44)。热力学数据表明，如果能设计出一种连接键旋转受限，同时又能保持双嵌入 DNA 正确几何构型的化合物，那么结合亲和力和预计会从目前的皮摩尔范围提高到飞摩尔或更高。

## 案例研究：蛋白质结合相互作用

### 优化 HIV-1 蛋白酶抑制剂的亲和力

HIV 蛋白酶抑制剂属于竞争性抑制剂，因此其效力与结合亲和力直接相关。弗雷尔实验室开展了一项研究计划，旨在通过考虑结合相互作用的热力学来优化 HIV 抑制剂的结合 (45, 46, 67, 68)。他们的出发点在于认识到结合自由能是焓和熵的函数，并且许多焓 (H) 和熵 ( $T\Delta S$ ) 值的组合可以产生相同的自由能 ( $\Delta G$ ) 值。然而，焓优化或熵优化的抑制剂可能具有不同的特异性或不同的药理学特性，尽管它们与目标蛋白酶的相互作用可能具有相似的自由能。焓的贡献主要反映了抑制剂与蛋白酶的结合相互作用强度 (氢键；范德华力) 相对于溶剂结合的情况。自由能的熵贡献主要反映了抑制剂从溶剂转移到其结合位点时溶剂熵的变化。

图 5 展示了第一代 HIV 蛋白酶抑制剂茚地那韦、奈非那韦、沙奎那韦和利托那韦的热力学曲线。对于所有这些抑制剂而言，结合过程都是

这些抑制剂的结合是由熵驱动的, 其中三种的结合还伴随着不利的正焓变。由于这些抑制剂的构象受到限制, 结合熵主要反映了由于疏水转移而带来的较大溶剂化熵增益。新一代抑制剂的热力学结合特征存在明显差异, 如图5中的一个例子所示。KNI-764的结合比任何第一代抑制剂都要紧密, 自由能至少低1 kcal mol<sup>-1</sup>。这种有利的自由能来自几乎相等的有利焓变和熵变贡献。因此, KNI-764与蛋白酶的结合相互作用得到了改善。对一系列HIV蛋白酶抑制剂的热力学特征进行分析得出结论, 极高的结合亲和力需要有利的结合焓变, 并提出了焓变优化作为药物设计原则的概念(46)。最优结合焓变并非简单地与氢键供体或受体的数量相关, 而是取决于结合口袋内形成的氢键质量与抑制剂-溶剂氢键相互作用之间的相对关系。

## 焓漏斗

弗雷雷实验室对疟原虫生命周期中负责降解血红蛋白的关键酶——血红蛋白酶II的抑制剂进行了进一步研究, 从而进一步证实了焓优化的价值(56)。血红蛋白酶II是抗疟疾药物研发的一个新靶点。基于模拟感染患者血红蛋白分子主要裂解位点的苯并氮杂环庚烷骨架, 开发出了一种先导化合物。从该先导化合物衍生出的化合物优化了焓对结合自由能的贡献。对71种苯并氮杂环庚烷抑制剂的亲和力进行了测定, 并将其分解为焓和熵的成分, 结果如图所示。

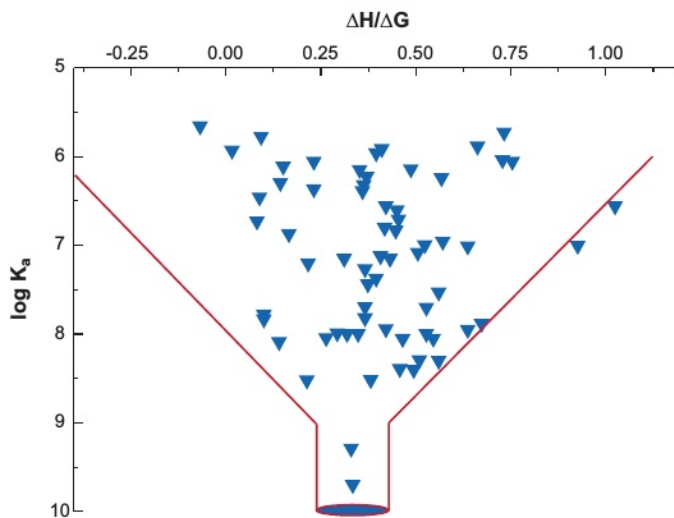


图6

焓漏斗。展示了71种抗疟疾蛋白酶抑制剂结合的热力学数据。结合焓与自由能的比值作为结合常数对数的函数给出。

图6所示的结果定义了一个相当显著且独特的焓漏斗, 在其中, 焓/熵组合随着亲和力(以log表示)的增加而变窄。在这种情况下, 自由能的最佳平衡似乎出现在焓占三分之一、熵占三分之二时。在整个优化过程中, 始终注意实现这种热力学平衡对于成功的设计工作至关重要。

## 案例研究: 高选择性并不需要高亲和力

尽管在药物设计中高亲和力通常是主要目标, 但它并非选择性和特异性的绝对要求。回顾一项DNA适配体的研究成果有助于阐明这一点。通过指数富集配体系统进化(SELEX)方法(21), 发现了一种能识别L-精氨酸的DNA适配体(24)。该适配体对L-精氨酸的选择性约为其他几种精氨酸类似物和其他氨基酸的100倍。

高分辨率核磁共振结构显示，截短版适配体在精氨酸缺失的情况下，大部分 DNA 处于无序状态，但在精氨酸存在时，会形成一种高度有序的结构，其中氨基酸被包裹在一个独特的 DNA 折叠中 (38)。我们实验室的——（注：原文似乎不完整，最后的“labo-”可能是“laboratory”的缩写，但未完整给出，因此翻译中保留了原文的不完整形式。）

该研究小组首次对该系统中适配体结合进行了详细的热力学表征，并结合了分子动力学模拟 (5)。

图 7 展示了连接和未连接的精氨酸适配体的结构。在没有精氨酸的情况下，我们的热力学和分子动力学模拟表明，DNA 形成了经典的发夹环结构，环中包含 10 个未配对的碱基。精氨酸与 DNA 的高度选择性结合的自由能变化仅为  $-5.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ，对应的结合常数仅为  $6000 \text{ M}^{-1}$ 。将自由能分解为其焓和熵的分量表明，结合伴随着一个较大的有利焓变  $-8.7$  至  $-9.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ 。结合受到不利的  $-T\Delta S$  贡献的阻碍，其值为  $+3.6$  至  $+4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$  (图 7)。这种情况清楚地说明了诱导契合机制，在这种机制中，结合与受体 DNA 的重大构象变化紧密相关。原本无序且动态的环结构发生重大构象变化，形成一个稳定的结合口袋，精氨酸被固定其中。这种有序化在熵上是不利的，正如所测量的那样，必须通过有利的焓变的特异性键合相互作用来克服。相反的焓变和熵变贡献产生了一个适度有利的自由能变化。从而获得了高特异性，但并非高亲和力。

图 7 展示了与 DNA 结合的小分子的热力学特征的演变过程。该演变始于一种熵驱动的沟槽结合剂，它不会破坏 B 型 DNA 结构，并且结合时焓值为正。两种具有不同解旋角的 DNA 插入剂显示出比例更大的不利熵贡献，但结合焓值大致相等。最后，精氨酸适配体由于其巨大的构象变化，表现出最大的相反熵贡献。

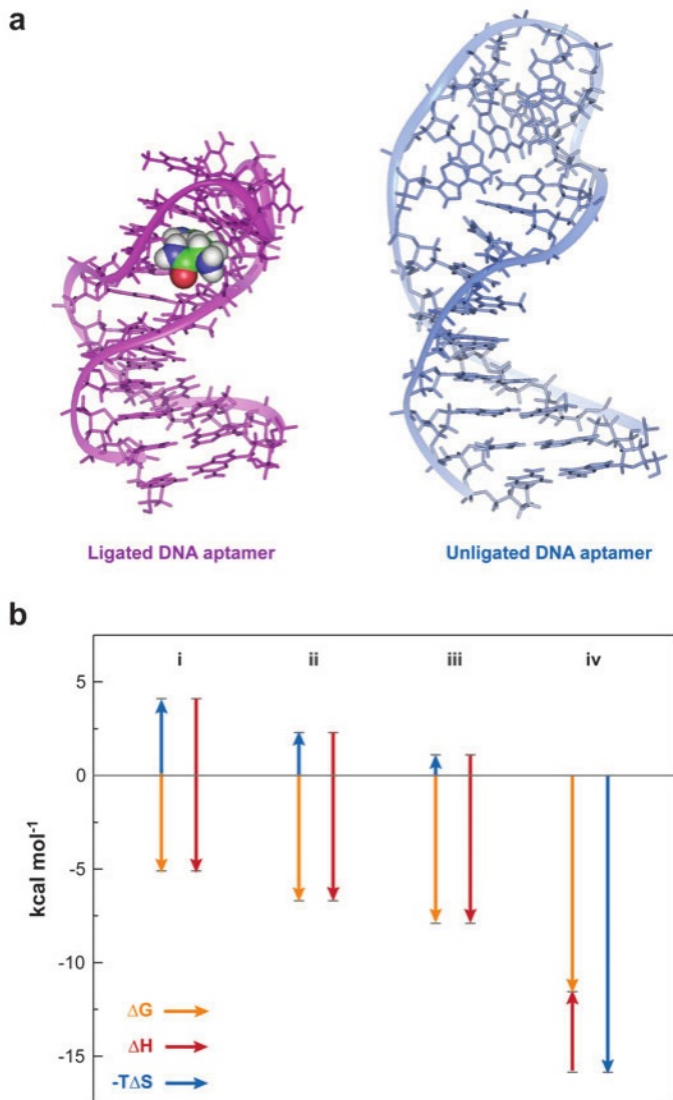


图 7

L-精氨酸与其 DNA 适配体的结合。(a) (左) 连接态和 (右) 未连接态 DNA 适配体的结构。(b) (i) L-精氨酸与适配体结合的热力学曲线，(ii) 乙锭嵌入 DNA 的热力学曲线，(iii) 柔红霉素嵌入 DNA 的热力学曲线，(iv) Hoechst 33258 与 DNA 沟槽结合的热力学曲线。

## 结论

这几个例子说明了热力学数据如何补充结构数据（如果针对特定系统存在这些数据的话）。热力学曲线

图展示了结合自由能的焓变和熵变贡献，并指出了驱动复合物形成的力的性质。此类信息能够指导药物开发，提示出最有可能优化与大分子靶点结合的修饰性质。

### 要点总结

1. 热力学数据是药物开发以及优化先导化合物过程中对结构数据的重要补充。
2. 一个完整的结合相互作用的热力学概况包括结合自由能 ( $\Delta G$ )、焓变 ( $\Delta H$ )、熵变 ( $\Delta S$ ) 以及热容变化 ( $C_p$ )。
3. 热力学曲线表明了驱动结合相互作用的主要力。
4. 同构配合物不一定具有相同的能量。
5. 有利的焓变贡献主要源于有利的氢键作用和范德华力相互作用，而有利的熵变贡献则主要来自疏水作用和脱溶作用。
6. 热变性方法为快速筛选结合化合物库以及定量测量超紧密结合相互作用提供了有价值的工具。
7. 高特异性并不需要高亲和力和。

### 未来问题

将量热法和热力学全面融入药物发现过程，需要开发高通量量热仪以促进定量数据的获取。

2. 迫切需要从更基础的热力学角度来理解分子间相互作用（例如氢键、范德华力、疏水作用力、水和离子结合相互作用、静电作用力）对药物与其受体靶点之间非共价结合的调控机制。

## 披露声明

作者未察觉到任何可能被视为影响本综述客观性的偏见。

## 致谢

我的实验室工作得到了美国国家癌症研究所（CA35635）、美国国家普通医学科学研究所（GM077422）以及詹姆斯·格雷厄姆·布朗基金会的资助。



## 参考文献

1. Ackers GK, Bolen DW. 1997. The Gibbs conference on biothermodynamics: origins and evolution. *Biophys. Chem.* 64:3-5
2. Amzel LM. 1997. Loss of translational entropy in binding, folding, and catalysis. *Proteins* 28:144-49
3. Amzel LM. 2000. Calculation of entropy changes in biological processes: folding, binding, and oligomerization. *Methods Enzymol.* 323:167-77
4. Berman HM, Young PR. 1981. The interaction of intercalating drugs with nucleic acids. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10:87-114
5. Bishop GR, Ren J, Polander BC, Jeanfreau BD, Trent JO, Chaires JB. 2007. Energetic basis of molecular recognition in a DNA aptamer. *Biophys. Chem.* 126:165-75
6. Brady GP, Sharp KA. 1997. Entropy in protein folding and in protein-protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:215-21
7. Brandts JF, Lin L-N. 1990. Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry* 29:6927-40
8. Carver TE, Bordeau B, Cummings MD, Petrella EC, Pucci MJ, et al. 2005. Decrypting the biochemical function of an essential gene from *Streptococcus pneumoniae* using ThermoFluor technology. *J. Biol. Chem.* 280:11704-12
9. Chaires JB. 1997. Energetics of drug-DNA interactions. *Biopolymers* 44:201-15
10. Chaires JB. 1997. Possible origin of differences between van't Hoff and calorimetric enthalpy estimates. *Biophys. Chem.* 64:15-23
11. Chaires JB. 2003. Energetics of anthracycline-DNA interactions. In *DNA and RNA Binders*, ed. M Demeunynck, C Bailly, WD Wilson, pp. 461-81. Weinheim: Wiley-VCH
12. Chaires JB. 2006. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Arch. Biochem. Biophys.* 453:26-31
13. Chaires JB, Leng F, Przewloka T, Fokt I, Ling YH, et al. 1997. Structure-based design of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *J. Med. Chem.* 40:261-66
14. Cooper A. 1999. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:557-63
15. Cooper A, Johnson CM. 1994. Introduction to microcalorimetry and biomolecular energetics. *Methods Mol. Biol.* 22:109-24
16. Crothers DM. 1971. Statistical thermodynamics of nucleic acid melting transitions with coupled binding equilibria. *Biopolymers* 10:2147-60
17. Crothers DM, Metzger H. 1972. The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies. *Immunochemistry* 9:341-57
18. Fisher HF, Singh N. 1995. Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods Enzymol.* 259:194-221
19. Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, Van Der Marel GA, van Boom JH, et al. 1990. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 29:2538-49
20. Gilson MK, Given JA, Bush BL, McCammon JA. 1997. The statistical-thermodynamic basis for computation of binding affinities: a critical review. *Biophys. J.* 72:1047-69
21. Gold L. 1995. The SELEX process: a surprising source of therapeutic and diagnostic compounds. *Harvey Lect.* 91:47-57
22. Haq I, Jenkins TC, Chowdhry BZ, Ren J, Chaires JB. 2000. Parsing the free energy of drug-DNA interactions. *Methods Enzymol.* 323:373-405
23. Haq I, Ladbury JE, Chowdhry BZ, Jenkins TC, Chaires JB. 1997. Specific binding of Hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)2 duplex: calorimetric and spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* 271:244-57

24. Harada K, Frankel AD. 1995. Identification of two novel arginine binding DNAs. *EMBO J.* 14:5798-811
25. Henry CM. 2001. Structure-based drug design. *Chem. Eng. News* 79:69-74
26. Hinz H-J, Schwarz FP. 2001. Measurement and analysis of results obtained on biological substances with differential scanning calorimetry. *Pure Appl. Chem.* 73:745-59
27. Holdgate GA. 2001. Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *Biotechniques* 31:164-66
28. Holdgate GA, Ward WH. 2005. Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. *Drug Discov. Today* 10:1543-50
29. Horn JR, Russell D, Lewis EA, Murphy KP. 2001. Van' t Hoff and calorimetric enthalpies from isothermal titration calorimetry: Are there significant discrepancies? *Biochemistry* 40: 1774-78
30. Howerton SB, Nagpal A, Williams LD. 2003. Surprising roles of electrostatic interactions in DNA-ligand complexes. *Biopolymers* 69:87-99
31. Hu GG, Shui X, Leng F, Priebe W, Chaires JB, Williams LD. 1997. Structure of a DNA-bisdaunomycin complex. *Biochemistry* 36:5940-46
32. Indyk L, Fisher HF. 1998. Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol.* 295:350-64
33. Janin J. 1995. Elusive affinities. *Proteins* 21:30-39
34. Jen-Jacobson L, Engler LE, Jacobson LA. 2000. Structural and thermodynamic strategies for site-specific DNA binding proteins. *Structure* 8:1015-23
35. Lavoisier AL, Laplace PS. 1783. *Memoir on Heat*. Transl. H Guerlac, 1982, New York: Neale Watson (From French)
36. Lavoisier AL, Laplace PS. 1784. Memoire sur la chaleur. In *Memoir Academie Royale Scientifique 1784*, pp. 355-408
37. Leng F, Priebe W, Chaires JB. 1998. Ultratight DNA binding of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *Biochemistry* 37:1743-53
38. Lin CH, Patel DJ. 1996. Encapsulating an amino acid in a DNA fold. *Nat. Struct. Biol.* 3:1046-50
39. Liu Y, Sturtevant JM. 1995. Significant discrepancies between van' t Hoff and calorimetric enthalpies. II. *Protein Sci.* 4:2559-61
40. Lodwig TH, Smeaton WA. 1974. The ice calorimeter of Lavoisier and Laplace and some of its critics. *Ann. Sci.* 31:1-18
41. McGhee JD. 1976. Theoretical calculations of the helix-coil transition of DNA in the presence of large, cooperatively binding ligands. *Biopolymers* 15:1345-75
42. Murphy KP, Xie D, Thompson KS, Amzel LM, Freire E. 1994. Entropy in biological binding processes: estimation of translational entropy loss. *Proteins* 18:63-67
43. Naghibi H, Tamura A, Sturtevant JM. 1995. Significant discrepancies between van' t Hoff and calorimetric enthalpies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5597-99
44. Novotny J, Brucoleri RE, Davis M, Sharp KA. 1997. Empirical free energy calculations: a blind test and further improvements to the method. *J. Mol. Biol.* 268:401-11
45. Ohtaka H, Freire E. 2005. Adaptive inhibitors of the HIV-1 protease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 88:193-208
46. Ohtaka H, Muzammil S, Schon A, Velazquez-Campoy A, Vega S, Freire E. 2004. Thermodynamic rules for the design of high affinity HIV-1 protease inhibitors with adaptability to mutations and high selectivity towards unwanted targets. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:1787-99

46. 焓优化概念的阐述。

47. 对 ThermoFluor™ 技术及其应用的描述。

47. Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, Lobanov VS, Myslik J, et al. 2001. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screen.* 6:429–40

48. Plotnikov V, Rochalski A, Brandts M, Brandts JF, Williston S, et al. 2002. An autosampling differential scanning calorimeter instrument for studying molecular interactions. *Assay Drug Dev. Technol.* 1:83–90

49. Plotnikov VV, Brandts JM, Lin LN, Brandts JF. 1997. A new ultrasensitive scanning calorimeter. *Anal. Biochem.* 250:237–44

50. Plum GE, Breslauer KJ. 1994. DNA lesions. A thermodynamic perspective. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 726:45–55

51. Portugal J, Cashman DJ, Trent JO, Ferrer-Miralles N, Przewloka T, et al. 2005. A new bis-intercalating anthracycline with picomolar DNA binding affinity. *J. Med. Chem.* 48:8209–19

52. Priebe W, ed. 1995. *Anthracycline Antibiotics: New Analogues, Methods of Delivery and Mechanisms of Action*, Vol. 574. Washington, DC: Am. Chem. Soc.

53. Priebe W, Fokt I, Przewloka T, Chaires JB, Portugal J, Trent JO. 2001. Exploiting anthracycline scaffold for designing DNA-targeting agents. *Methods Enzymol.* 340:529–55

54. Privalov G, Kavina V, Freire E, Privalov PL. 1995. Precise scanning calorimeter for studying thermal properties of biological macromolecules in dilute solution. *Anal. Biochem.* 232:79–85

55. Ren J, Jenkins TC, Chaires JB. 2000. Energetics of intercalation reactions. *Biochemistry* 39:8439–47

## 56. 焓漏斗概念的提出。

56. Ruben AJ, Kiso Y, Freire E. 2006. Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective. *Chem. Biol. Drug. Des.* 67:2–4

57. Schellman JA. 1958. The factors affecting the stability of hydrogen-bonded polypeptide structures in solution. *J. Phys. Chem.* 62:1485–94

58. Shi X, Chaires JB. 2006. Sequence- and structural-selective nucleic acid binding revealed by the melting of mixtures. *Nucleic Acids Res.* 34:e14

59. Shi X, Chaires JB. 2006. Thermal denaturation of drug-DNA complexes: tools and tricks. In *Sequence-Specific DNA Binding Agents*, ed. M Waring, pp. 130–51. Cambridge, UK: RSC Publ.

60. Spolar RS, Record MT Jr. 1994. Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* 263:777–84

61. Tellinghuisen J. 2003. A study of statistical error in isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.* 321:79–88

62. Tellinghuisen J. 2004. Statistical error in isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol.* 383:245–82

63. Tellinghuisen J. 2004. Volume errors in isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.* 333:405–6

64. Tellinghuisen J. 2005. Statistical error in isothermal titration calorimetry: variance function estimation from generalized least squares. *Anal. Biochem.* 343:106–15

65. Torres FE, Kuhn P, De Bruyker D, Bell AG, Wolkin MV, et al. 2004. Enthalpy arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9517–22

66. Velazquez Campoy A, Freire E. 2005. ITC in the postgenomic era. . . ? Priceless. *Biophys. Chem.* 115:115–24

67. Velazquez-Campoy A, Luque I, Todd MJ, Milutinovich M, Kiso Y, Freire E. 2000. Thermodynamic dissection of the binding energetics of KNI-272, a potent HIV-1 protease inhibitor. *Protein Sci.* 9:1801–9

68. Velazquez-Campoy A, Todd MJ, Freire E. 2000. HIV-1 protease inhibitors: enthalpic versus entropic optimization of the binding affinity. *Biochemistry* 39:2201-7
69. Verhaegen K, Van Gerven P, Baert K, Hermans L, Mertens R, Luyten W. 1998. Design of a high-throughput microphysiometer. In *Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, ed. JE Ladbury, BZ Chowdhry, pp. 227-31. New York: Wiley
70. Wadso I. 1997. Neither calorimeters nor colorimetrists are what they used to be. *Thermochim. Acta* 300:1-5
- 71. Waldron TT, Murphy KP. 2003. Stabilization of proteins by ligand binding: application to drug screening and determination of unfolding energetics. *Biochemistry* 42:5058-64**
72. Ward WH, Holdgate GA. 2001. Isothermal titration calorimetry in drug discovery. *Prog. Med. Chem.* 38:309-76
73. Waring MJ. 1981. DNA modification and cancer. *Annu. Rev. Biochem.* 50:159-92
- 74. Weber PC, Salemme FR. 2003. Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:115-21**
75. Weiss RB. 1992. The anthracyclines: Will we ever find a better doxorubicin? *Semin. Oncol.* 19: 670-86
76. Wemmer DE. 2000. Designed sequence-specific minor groove ligands. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:439-61
77. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN. 1989. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179:131-37

---

71. 关于正确使用热变性方法测定结合能的警示。

---



---

74. 一篇关于量热法在药物研发中所起作用的实用且简明扼要的总结。

---

## 相关资源

- Hinz HJ. 1983. Thermodynamics of protein-ligand interactions: calorimetric approaches. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 12:285-317
- Jelesarov I, Bosshard HR. 1999. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* 12:3-18
- Ladbury JE, Chowdhry BZ, eds. 1998. *Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. New York: Wiley
- Luque I, Leavitt SA, Freire E. 2002. The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:235-56
- Sturtevant JM. 1974. Some applications of calorimetry in biochemistry and biology. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 3:35-51
- Sturtevant JM. 1987. Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38:463-88





纳米生物技术与细胞生物学: 微米和纳米级制造技术 用于研究受体介导信号传导的表面 亚历克西斯·J·托雷斯、吴敏、大卫·霍洛瓦卡和芭芭拉·贝亚德	265
蛋白质折叠问题 肯·A·迪尔、萨·巴努·奥兹坎、M·斯科特·谢尔和托马斯·R·韦克尔	289
RNA 的移位与解旋机制 和 DNA 解旋酶 安娜·玛丽·派尔	317
真核生物 RNA 聚合酶的结构 P. 克拉默、K.-J. 阿尔马赫、S. 巴姆利、S. 本克特、F. 布吕克纳、C. 布赫恩、 G.E. 达姆斯马、S. 登格尔、S.R. 格伊格、A.J. 贾西亚克、A. 杰瓦里、S. 詹内巴赫、 T. 卡门斯基、H. 凯滕贝格尔、C.-D. 库恩、E. 莱曼、K. 莱克、J.F. 西多、 以及 A. 瓦尼尼	337
基于结构的表皮生长因子受体研究视角 法规 凯瑟琳·M·弗格森	353
大分子拥挤与限制: 生物化学, 生物物理及潜在生理学后果 周焕祥、德国·里瓦斯、艾伦·P·明顿	375
捕获键的生物物理学 温迪·E·托马斯、维奥拉·沃格尔和叶夫根尼·索库连科	39
活细菌分子生物学的单分子方法 细胞 谢孙宁(音译)、保罗·J·崔、李根伟(音译)、李南基(音译)、朱塞佩·利亚(音译)	417
大型 RNA 的结构原理 斯蒂芬·R·霍尔布鲁克	445
双分子荧光互补 (BiFC) 分析 作为活细胞中蛋白质相互作用的探测手段 汤姆·K·克尔波拉	465
蛋白质折叠过程中的多条途径与结构异质性 Jayant b Udgaonkar	489
索引 第 33 卷至第 37 卷撰稿人累积索引	51

## 勘误表

可在以下网址找到《生物物理学年度评论》文章的在线勘误记录:

<http://biophys.annualreviews.org/errata.shtml>