

# 通过对包含 235 种化合物的文库的高通量筛选分析发现潜在的可溶性环氧化物水解酶抑制剂

## 作者

David Hoffman 博士  
科学总监  
合同服务部

Cayman Chemical

Melissa Parsey 博士  
科学内容开发员  
Cayman Chemical

安捷伦联系人员：Donna Levy  
[donna.levy@agilent.com](mailto:donna.levy@agilent.com)

## 要点

- 可溶性环氧化物水解酶 (sEH) 抑制剂是治疗炎症和心血管疾病的一种颇具前景的策略
- 目前已开发出一种自动化的高通量筛选 (HTS) 平台，该平台用于鉴定小分子抑制剂，能够在几天内使用极少样品检测大量化合物，而无需耗费数周时间
- 使用该方法对 Cayman 抗炎筛选库中的所有 235 种化合物进行了筛选，并确定其中 36 种化合物为潜在的 sEH 抑制剂
- 这种 HTS 平台加速了药物发现。该平台还可用于基于 Cayman 或其他化合物库的许多其他酶活性检测

## 前言

环氧化二十碳三烯酸 (EETs) 是花生四烯酸的细胞色素 P450 (CYP450) 代谢产物，由 CYP450 表氧化酶形成，包括 4 种位置异构体：5(6)-EET、8(9)-EET、11(12)-EET 和 14(15)-EET<sup>[1]</sup>。研究表明，EETs 具有广泛的抗炎作用和心脏保护作用<sup>[2]</sup>。但 EETs 会被可溶性环氧化物水解酶 (sEH) 迅速水解为各自的二羟基二十碳三烯酸 (DiHETrEs)，这一转化会导致其生物活性显著降低。因此，使用 sEH 抑制剂增加 EET 的积累是治疗炎症和心血管疾病的一种颇具前景的策略。

本应用简报介绍了一种高通量筛选 (HTS) 平台, 使用改进版本的 Cayman 可溶性环氧化物水解酶抑制剂筛选分析试剂盒, 实现自动化并提高通量。通过自动执行该检测, 仅 3 天时间便获得了通常需要 1-2 周才能生成并分析的数据。此外, 通过自动化显著改善了重现性, 并降低了检测内和检测间的差异。在筛选中, 我们评估了由 235 种具有生物活性和结构多样性的抗炎化合物组成的 Cayman 抗炎筛选库。选择这个筛选库是因为它与 sEH 作为炎症治疗靶标的相关性。

## 方法

### 化合物库和对照

在 Cayman Chemical 的 HTS 实验室中执行了 sEH 抑制剂的 HTS。Cayman 抗炎筛选库包含 235 种化合物, 在 3 个 96 孔管架中以 10 mmol/L DMSO 储备液的形式提供。将化合物重组为单个 384 孔母板, 用于 HTS。用母板制备 7 个条形码标记的稀释板, 每个稀释板中包含 32 种化合物的溶剂、阳性对照以及 10 pt  $\frac{1}{2}$ log 浓度响应曲线。按上述方法制备了另一个包含 16 种化合物的稀释板。将 DMSO 用作溶剂 (阴性) 对照, sEH 抑制剂 AUDA 用作阳性对照。

### 自动化的 HTS 分析

本 HTS 分析使用由三台自动化仪器组成的全自动平台进行 (图 1)。所有液体处理步骤均使用配备 384 ST 移液头的 Agilent Bravo 自动化液体处理平台进行。检测板和稀释板分别储存于单独的储板器中, 并根据需要使用 Agilent BenchCel 4R 微孔板处理器放置在 Bravo 的移液台板上。将检测板从 Bravo 台板转移至 Agilent BioTek Synergy Neo2 Hybrid 多功能微孔板检测仪台面进行数据采集。

在条形码标记的 384 孔黑色非结合板中对待测化合物进行两次重复分析。首先, 用 sEH 分析缓冲液稀释人源重组 sEH, 并将 39.5  $\mu$ L 该溶液转移到检测板的每个孔中。然后, 将 0.5  $\mu$ L 待测化合物从稀释板转移至检测板。在室温下将反应组分预孵育 5 分钟。

加入 10  $\mu$ L sEH 底物 PHOME 引发酶促反应。立即将检测板置于 Synergy Neo2 多功能微孔板检测仪 (预先使用 BenchCel 4R 微孔板处理器将温度设置为 25 °C) 中。使用 360 nm 激发滤光片和 460 nm 发射滤光片 (360 激发/460 发射), 每 3 分钟进行一次动力学测量, 过程共计 20 分钟。完成后, 将检测板和稀释板分别储存于单独的储板器中。在不同的孔板之间换用新的酶和底物储备液以及抑制剂和底物移液头。

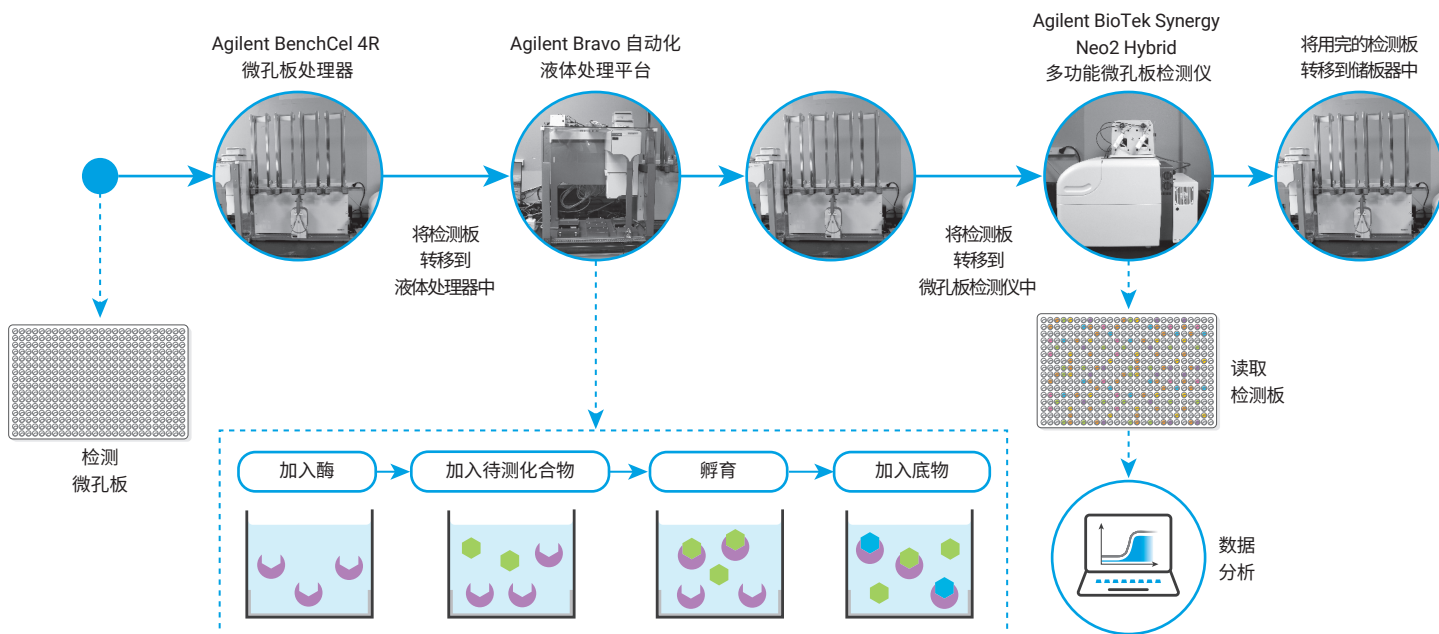


图 1. HTS 分析工作流程和反应条件。Agilent Bravo 自动化液体处理平台执行 HTS 分析中的所有液体转移步骤。该平台与 Agilent BenchCel 4R 微孔板处理器集成，使 Agilent BioTek Synergy Neo2 Hybrid 多功能微孔板检测仪能够进行自动化微孔板处理

## 质量控制

Z' 因子是一种广泛使用的标准，用于评估检测在 HTS 应用中的适用性<sup>[3]</sup>。通过确定阳性和阴性对照之间的分离来衡量检测的可靠性。使用以下公式计算 Z' 因子：

公式 1.

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

其中  $\sigma_p$  为阳性对照 (AUDA) 的标准偏差， $\sigma_n$  为阴性对照 (DMSO) 的标准偏差， $\mu_p$  为阳性对照的平均值， $\mu_n$  为阴性对照的平均值。将 Z' 因子介于 0.5 和 1 之间的检测视为优异。

## 数据分析

通过反应线性部分的斜率计算荧光随时间的增加，从而确定酶解率。在 20 分钟处获得最强荧光。

根据含有溶剂对照 (100% 活性) 以及含有阳性对照 (sEH 抑制剂 AUDA) 的孔计算待测化合物的活性百分比值。使用 GraphPad Prism 和四参数非线性回归曲线拟合计算 IC<sub>50</sub> 值。

一些化合物在高浓度下表现出背景荧光特性。这通过在检测开始时绘制化合物荧光与化合物浓度的关系图来确定。省略化合物荧光对检测或数据分析造成显著干扰时的数据。保留化合物背景荧光未对 sEH 抑制率造成显著影响时的数据。

## 检测性能

代表性溶剂和阳性对照响应如图 2 所示。所有检测的平均 Z' 因子为 0.60，表明检测性能可靠。使用方法部分所述的自动化 HTS 方法获得了 20 种化合物/小时的通量（数据未显示）。

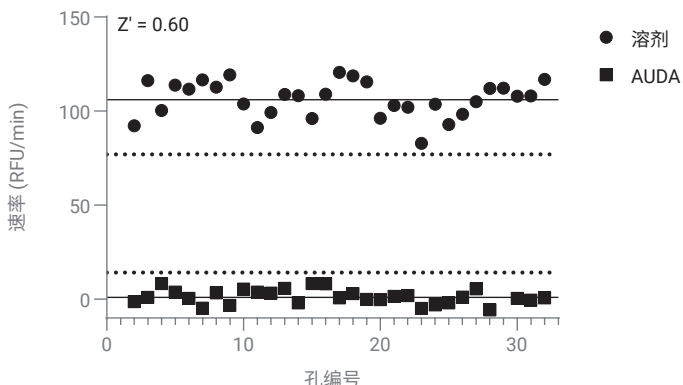


图 2. 用于 sEH 抑制剂 HTS 分析中代表性 384 孔板 Z' 因子计算的溶剂对照 (实心圆; DMSO) 和阳性对照 (实心正方形; AUDA) 样品的散点图。每个点代表一块板上的一个孔 (每个对照 n = 32)。实线代表阳性对照和阴性对照的平均荧光速率。虚线表示高于或低于平均值 3 倍标准差。用该数据计算得到的 Z' 因子为 0.60，表明检测性能出色

## 结果与讨论

图 3 显示了在 HTS 分析中获得的所有 235 种抗炎化合物的 sEH 抑制 IC<sub>50</sub> 值。以 IC<sub>50</sub> 值 10 μmol/L 作为基线值，对所有化合物进行比较。将 IC<sub>50</sub> 值低于 10 μmol/L 的化合物视为潜在的 sEH 抑制剂，将 IC<sub>50</sub> 值高于 10 μmol/L 的化合物视为非潜在性 sEH 抑制剂。选择 10 μmol/L 捕获较弱的次级靶标活性，符合我们对已知主要靶标的化合物的预期。在本 HTS 中，共发现 36 种抗炎化合物的 sEH IC<sub>50</sub> 值低于 10 μmol/L。

图 4 显示了六种具有极低 IC<sub>50</sub> 值和/或清晰浓度响应曲线的匹配化合物。这六种匹配化合物的主要抗炎靶标、主要靶标效价和 sEH IC<sub>50</sub> 值汇总于表 1。在 HTS 分析中，NF-κB 抑制剂 SC-75741 和已知的 sEH 抑制剂反式-AUCB 经鉴定为有效的 sEH 抑制剂<sup>[4,5]</sup>。两种化合物对 sEH 的抑制效价均超出了检测浓度范围 (10 nmol/L–10 μmol/L)。因此，这些化合物的 IC<sub>50</sub> 值 < 10 nmol/L。根据这些效价值确定这些化合物是二次筛选的主要候选者。

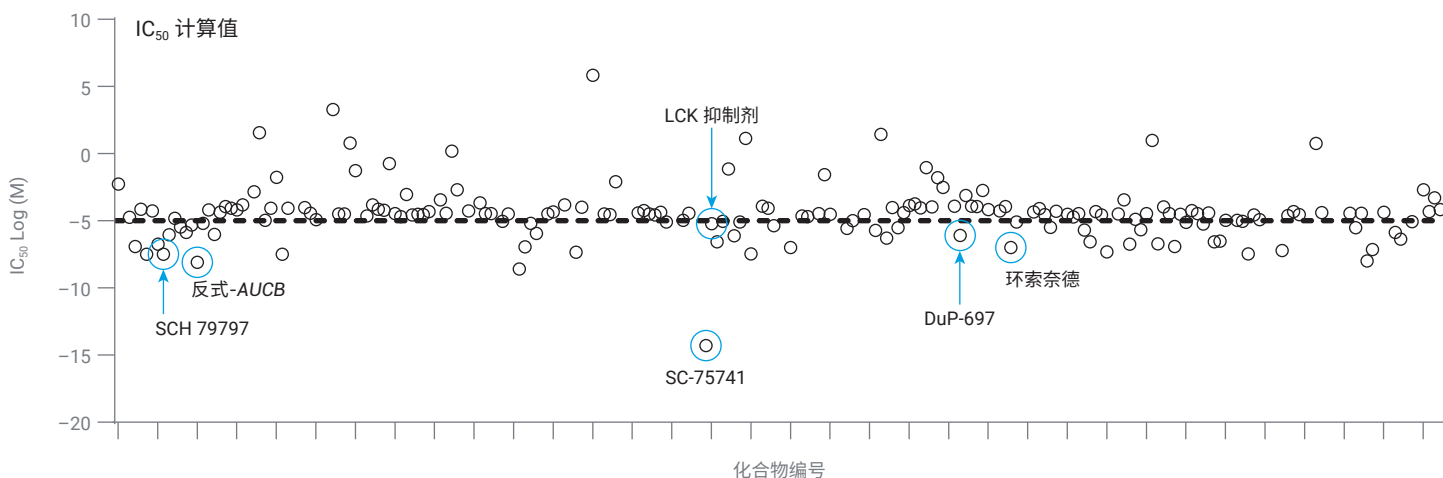


图 3. 测试化合物的 IC<sub>50</sub> 值散点图。用于比较所有化合物的基线值为 10 μmol/L (-5 Log (M))。将 IC<sub>50</sub> 值低于 10 μmol/L 的化合物视为潜在的 sEH 抑制剂，将 IC<sub>50</sub> 值高于 10 μmol/L 的化合物视为非潜在性抑制剂。蓝色圆圈内为具有极低 IC<sub>50</sub> 值和/或清晰浓度响应曲线的化合物

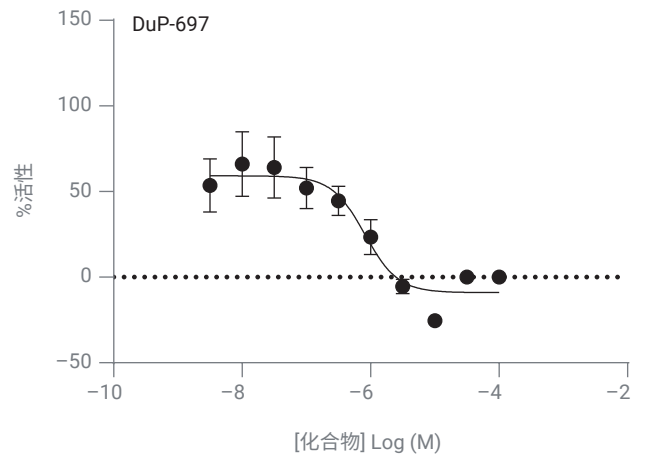
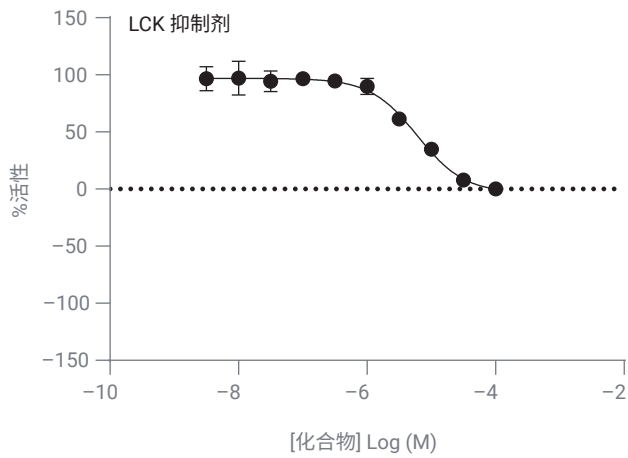
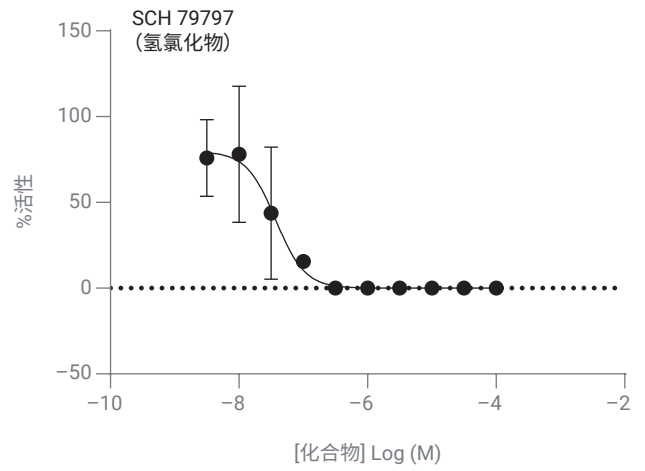
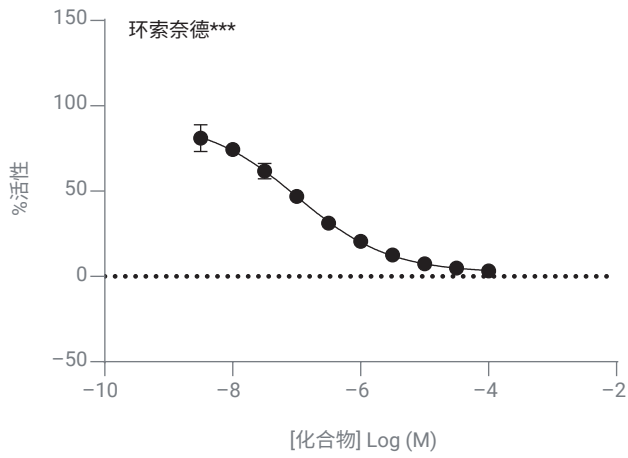
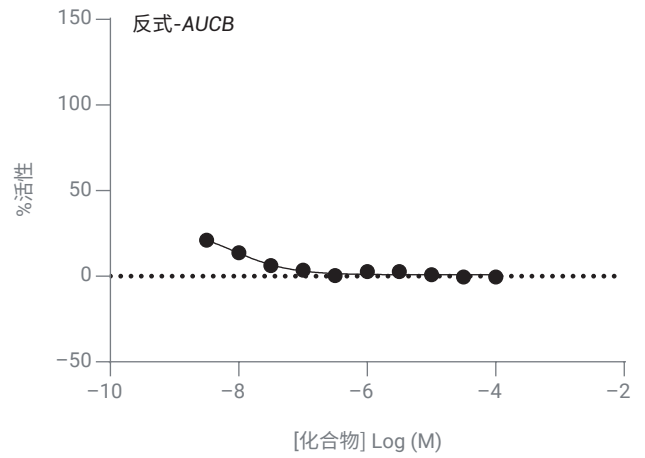
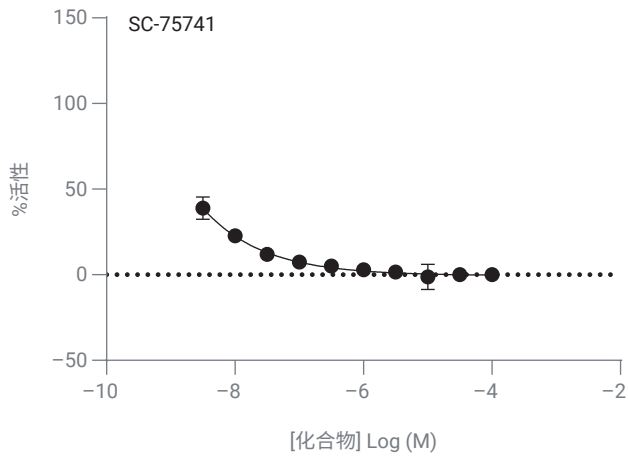


图 4. 选定匹配化合物的浓度响应曲线。所有数据均为两个技术重复样品的平均值  $\pm$  标准偏差。包含这些化合物的检测板的 Z' 因子值均  $> 0.5$ 。带三个星号 (\*\*\*) 标记的化合物在高浓度下具有背景荧光特性

环索奈德是糖皮质激素受体激动剂去异丁酰基环索奈德的前体药物<sup>[6]</sup>。糖皮质激素是最著名的抗炎化合物之一。尽管环索奈德在高浓度下显示背景荧光，但测定结果表明，环索奈德抑制 sEH 的 IC<sub>50</sub> 值为 100 nmol/L。环索奈德在水溶液中的溶解度有限。在本 HTS 分析中使用的较高化合物浓度可能已经接近其水溶性限值，从而导致高背景荧光。

在本次筛选中发现，蛋白酶激活受体 1 (PAR1) 拮抗剂 SCH 79797 具有 sEH 抑制活性 (IC<sub>50</sub> = 372 nmol/L)<sup>[7]</sup>。SCH 79797 抑制血管平滑肌细胞和内皮细胞的 PAR1 活化以及 α-凝血酶诱导的血小板聚集。SCH 79797 的 sEH 抑制活性是否在一定程度上参与了这些心脏保护作用，有待在后续研究中进行探讨。

研究发现，选择性 COX-2 抑制剂 DuP-697 是一种潜在的 sEH 抑制剂 (IC<sub>50</sub> = 813 nmol/L)<sup>[8]</sup>。鉴于 COX-2 在炎症中的广泛作用，这一发现尤其令人关注。COX-2 的主要作用是催化花生四烯酸转化为前列腺素 (PGs)，花生四烯酸是导致多种炎症的一系列脂质信号分子。使用 COX-2 和 sEH 的双重抑制剂 (如 DuP-697)，在增加组织 EET 积累的同时阻止 PG 的产生，是一种有效的炎症治疗方法。

LCK 抑制剂抑制 Src 家族非受体蛋白酪氨酸激酶 LCK<sup>[9,10]</sup>。LCK 由 T 细胞表达并介导 IL-2 的产生，IL-2 是 T 细胞活化的标志，响应 T 细胞受体信号。在本研究中，我们发现 LCK 抑制剂还抑制 sEH 活性 (IC<sub>50</sub> = 6070 nmol/L)。因此，未来研究的关注点可能在于确定 LCK 抑制剂是否会增加 EET 水平，以及这是否是抑制异常 T 细胞活性的可行策略。

**表 1.** 本自动化 HTS 分析中鉴定出的 6 种匹配化合物的主要靶标和 sEH IC<sub>50</sub> 值比较

化合物	主要靶标 — 靶标效价 (IC <sub>50</sub> ) <sup>*</sup>	sEH (IC <sub>50</sub> )
SC-75741	NF-κB — 200 nmol/L <sup>4</sup>	< 10 nmol/L
反式-AUCB	sEH — 0.5 nmol/L <sup>5</sup>	< 10 nmol/L
环索奈德	糖皮质激素受体 — K <sub>i</sub> = 37 nmol/L <sup>6</sup>	100 nmol/L
SCH 79797	PAR1 — 70 nmol/L <sup>7</sup>	372 nmol/L
DuP-697	COX-2 — 80 nmol/L <sup>11</sup>	813 nmol/L
LCK 抑制剂	LCK — < 1-2 nmol/L <sup>9,10</sup>	6070 nmol/L

<sup>\*</sup> 除非另有说明，所示数据均为 IC<sub>50</sub> 值

## 结论

在本应用简报中，我们建立了一种自动化的 HTS 平台，用于鉴定小分子抑制剂。这种自动化的 HTS 分析是针对特定靶标筛选化合物库的有效方法。出于对通量的考虑，可以将该分析轻松应用于更大的化合物库，以增大匹配率。借助该自动化平台，可以轻松修改多种分析，以覆盖广泛的目标酶和化合物库组合。这种自动化的 HTS 分析适用于基础研究和药物发现。

## 作者简介

David 在 2009 年获得罗彻斯特大学博士学位。在完成博士后工作后，他于 2011 年离开学术界，入职一家小型药物发现公司。他于 2013 年加入 Cayman Chemical，担任研发科学家，协助开发了多种针对线粒体功能的试剂盒。从 2018 年开始，他致力于构建 Cayman 的细胞代谢/高通量筛选服务团队，目前担任该部门的科学总监。

Melissa 于 2017 年获得密歇根州立大学博士学位。在完成博士后工作后，她于 2019 年加入 Cayman Chemical，担任技术编辑，并于 2022 年转入市场部，担任科学内容开发员。

[www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)

## 了解更多信息

[www.agilent.com/en/product/automated-liquid-handling](http://www.agilent.com/en/product/automated-liquid-handling)

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

RA45071.7372106481

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023  
2023 年 6 月 5 日，中国出版  
5994-6078ZHCN

## 参考文献

1. Lai, J.; Chen, C. The Role of Epoxyeicosatrienoic Acids in Cardiac Remodeling. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 642470
2. Spector, A. A.; Kim, H.-Y. Cytochrome P450 Epoxygenase Pathway of Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1851(4)*, 356–365
3. Zhang, J. -H.; Chung, T. D. Y.; Oldenburg, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4(2)*, 67–73
4. Leban, J. *et al.* A Novel Class of Potent NF- $\kappa$ B Signaling Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17(21)*, 5858–5862
5. Hwang, S. H. *et al.* Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of Urea-Containing Pyrazoles as Dual Inhibitors of Cyclooxygenase-2 and Soluble Epoxide Hydrolase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54(8)*, 3037–3050
6. Belvisi, M. G. *et al.* Preclinical Profile of Ciclesonide, a Novel Corticosteroid for the Treatment of Asthma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314(2)*, 568–574
7. Ahn, H. S. *et al.* Inhibition of Cellular Action of Thrombin by N3-Cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a Nonpeptide Thrombin Receptor Antagonist. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60(10)*, 1425–1434
8. Kargman, S. *et al.* Mechanism of Selective Inhibition of Human Prostaglandin G/H synthase-1 and -2 in Intact Cells. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52(7)*, 1113–1125
9. Burchat, A. F. *et al.* Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidines Containing an Extended 5-Substituent as Potent and Selective Inhibitors of Ick II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10(19)*, 2171–2174
10. Arnold, L. D. *et al.* Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidines Containing an Extended 5-Substituent as Potent and Selective Inhibitors of Ick I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10(19)*, 2167–2170
11. Cayman Chemical Company. Unpublished internal company data. **2000**