

文章编号 1006-8147(2017)04-0310-04

论 著

计算机辅助选择性 CDC25B 抑制剂的设计

张裕泽, 李 昱, 李红莲, 王润玲, 马 英

(天津医科大学药学院, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070)

摘要 目的: 设计出针对 CDC25B 的抑制剂, 证明其理论活性。方法: 以 CDC25B 为靶点, 利用计算机辅助药物设计的方法设计出抑制剂, 应用分子对接证明其理论活性。结果: 设计出了一个全新的化合物, 运用理论证明其抑制活性高于已有化合物 4f。结论: 进一步探索了 CDC25B 抑制剂在治疗癌症中的前景, 为 CDC25B 抑制剂的结构改造及活性测定奠定基础。

关键词 计算机辅助药物设计; 选择性 CDC25B 抑制剂; 癌症

中图分类号 R914.2

文献标志码 A

Computer aided design of selective CDC25B inhibitors

ZHANG Yu-ze, LI Yu, LI Hong-lian, WANG Run-ling, MA Ying

(School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To design a CDC25B inhibitor and prove its theoretical activity. **Methods:** CDC25B was used as the target, and the inhibitors were designed by computer aided drug design. Its theoretical activity was measured by molecular docking. **Results:** A new compound was designed and its inhibitory activity was higher than that of 4f. **Conclusion:** The prospect of CDC25B inhibitors in the treatment of cancer is further explored, which lays the foundation for the structure modification and activity assay of CDC25B inhibitors.

Key words computer aided drug design; selective CDC25B inhibitors; cancer

癌症的共同特征是细胞周期会发生紊乱并且细胞会恶性增殖, 而细胞的增殖需要通过细胞周期来调控^[1]。CDC25B 在细胞周期的 S 期开始表达^[2]。据研究发现, CDC25B 在结肠癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌等多种发病率较高的人类恶性肿瘤中呈现为高表达^[3-7]。因此以 CDC25B 磷酸酯酶作为靶标的新型小分子抗癌药物的研发具有重要意义。多年以来, 虽然对 CDC25B 抑制剂的研究取得了一定成果, 但至今仍无药物上市。CDC25B 抑制剂的开发受困于它的选择性^[8]。因为 PTP 家族成员高度同源, 且功能各异, 若抑制剂的选择性不强, 将造成不可想象的副作用。CDC25B 的过度表达通常伴随着细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2) 的过度活跃, 并导致恶性增殖, 不良预后, 高级别肿瘤。通过发现靶向 CDC25B 的小分子抑制剂, 抑制 CDC25B 的过度表达, 控制癌细胞的恶性增殖, 可达到控制甚至治疗癌症的目的。因此, CDC25B 抑制剂的研究对于开发新的抗癌药物具有极其重要的意义。虽然 CDC25B 属于 PTP 家族成员之一, 与其他成员具有高度同源性, 但在 CDC25B 的催化域附近(7-16Å)有一个确

定的第二活性位点—“Swimming pool”。这使设计选择性 CDC25B 抑制剂成为可能。直接药物设计中受体结构已知, 通过结构测定技术得到了受体或受体-配体复合物的三维结构, 这样可在受体活性部位直接进行药物设计。现已有报道 CDC25B 晶体结构及其与配体的复合物三维结构, 所以本实验采用直接药物设计方法, 而计算机辅助直接药物设计具有巨大的科学价值和经济效益。本文旨在以 CDC25B 为靶标, 以现有 CDC25B 抑制剂 4f 为模板^[9], 利用“Core Hopping”模块对其进行修饰, 利用分子对接的方法, 分别对 CDC25B、SHP-2、PTP1B 和 TCPTP 蛋白的结合作用效果进行预测和评价, 以期发现选择性 CDC25B 小分子抑制剂。最后, 选取代表性的化合物进行分子动力学模拟, 找到受体与配体的分子识别机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与数据库 计算机辅助药物设计软件 Studio; 布鲁克海文蛋白数据库。

1.2 目标化合物的设计

1.2.1 靶点选择及靶点蛋白的优化 CDC25B 靶点蛋白晶体结构从布鲁克海文蛋白数据库下载, 遵循以下条件: 所选靶点晶体结构为人源的; 晶体结构中氨基酸残基没有突变; 晶体结构分辨率小于 2.6

基金项目 天津市自然科学基金重点项目基金资助(16JCZDJC32500)

作者简介 张裕泽(1991-), 男, 硕士在读, 研究方向: 药物化学; 通信作者: 马英, E-mail: maying@tmu.edu.cn。

Å。依据以上条件,下载人 CDC25B、SHP-2、PTP1B 和 TCPTP 靶点晶体结构 (PDB ID: 1CWT、3O5X、2VEW、1L8K)的 PDB 文件作为研究对象。CDC25B 含有 PTP 家族的 HCX₅R 催化位点。H(His)是一个高度保守的组氨酸残基,C(Cys)是起催化作用的半胱氨酸,X₅是5个残基形成的 P-loop 区,R(Arg)是一个高度保守的精氨酸,这在与磷酸化的氨基酸结合时是必需的。另外在 CDC25B 的催化域(Catalytic pocket)附近有一个确定的第2活性位点。蛋白结构处理由 Schrodinger Suite2009 软件中的 Protein preparation wizard 模块完成。将下载的 CDC25B、SHP-2、PTP1B 和 TCPTP 靶点晶体结构导入 Schrodinger Suite2009,先对蛋白质结构进行修正,加氢,处理金属离子,除去蛋白质晶体中的水分子和杂原子;再对蛋白质结构进行优化,氢键优化参数为 Sample water orientations,优化立场选择 OPLS_2005,以 RMSD0.5Å 为收敛标准。

1.2.2 分子对接和结构改造 对分子进行配体优化处理,此步在 LigPre 模块中完成。受体盒子生成在 Glide 模块中完成,选择 receptor grid generation。分子对接利用 Schrodinger Suite 2009 软件中的 Glide 模块进行,以原始配体小分子为中心,自动生成对接盒子文件。对接精度为 SP(标准精度)。

Core-Hopping 模块具有替换片段和分子对接两大功能,所以成为新药设计的尖端技术。在“Core Hopping”过程中,第一步是定义模板化合物。首先定义需要替换的片段,这一任务由 Define Combinations step 完成。第二步需要定义受体盒子。第三部分准备分子片段,分子片段来自于 drug-like 数据库和 ZINC 数据库中的片段数据库。第四步把小分子片段连接到母核上,得到的结构对接到受体里。最后,依据对接得分进行筛选,得分的绝对值越大,亲和力越强,结合力越好。

1.2.3 分子动力学 分子动力学模拟由 Gromacs4.0 完成。使用 SPC 水模型模拟人体内环境。为了使系统的密度维持恒定,我们采用周边性边界条件。为了得到电中性的环境,我们在蛋白质中加入 0.15 mol/L 钠离子和氯离子,离子在模型中自动排布。用 Nose-Hoover 定温计算法,调整平衡体系的温度到 300 K。用 NPT 系统保持体系温度、压强和原子数量不变,压强为 1 atm。最后进行系统能量最小化,用 relax 去掉局部高能量,防止原子碰撞。2 ns 之后系统达到平衡,然后进行了 10 ns 的模拟。

1.2.4 ADMET 预测 运用 Discovery studio 3.5 中的 ADMET Descriptors 模块对 4f 和 compound 1-

compound 9 进行 ADMET 预测。ADMET 预测包括:25 摄氏度下水溶解度(aqueous solubility);血脑屏障通透性(blood brain barrier penetration, BBB);细胞色素 P450 2D6 抑制性 (cytochrome P450 2D6 inhibition);肝毒性(hepatotoxicity);人类肠道吸收性 (human intestinal absorption)。

2 结果

2.1 对 4f 结构进行修饰 4f 是 CDC25B 选择性抑制剂,对 CDC25B 抑制活性值为 IC₅₀:1.24 (μg/mL),而对 TCPTP、SHP-1、SHP-2、LAR 无抑制活性,但是对 PTP1B 的抑制活性值 IC₅₀:4.07 (μg/mL),选择性不高。因此本实验选取 4f 作为结构修饰的母核,以期提高它对 CDC25B 的抑制活性和选择性。具体修饰过程如图 1 所示:首先对 A 片段进行替换旨在找到结合更强的片段,找出 1 个优选片段。然后,对 B 进行替换以期找到选择性更强的片段,找出 9 个优选片段,这样就产生了 1×1×9=9 个化合物。考虑到 4f 的苯并 1,3,4-噻二唑与受体 CDC25B 的第二结合位点氨基酸残基结合能力很好,所以对 4f 的这个片段未作改动。根据这个分子修饰的原则,表 1 中列出了修饰后的 9 个 4f 的类似物分子,包括 4f 本身在内的对接结果。从表中可以看出优化后的化合物的选择性提高,对 PTP1B 的理论活性降低。图 2 为 4f、compound 1 与 CDC25B 结合模式图。compound 1 片段 A 部分的吡啶上的氮原子与对催化活性有重要影响的 Glu478 形成氢键;片段 B 部分的咪唑氮原子上的氢原子也与 Arg548 形成氢键;片段苯并 1,3,4-噻二唑部分的噻二唑与 Arg548、Ser549 形成 Pi 堆积作用;与 Phe486、Arg485 形成范德华力。

表 1 对接结果

Tab 1 The result of docking

化合物	对接得分(kcal/mol)			
	CDC25B	SHP-2	PTP1B	TCPTP
4f	-10.88	-3.90	-10.58	-3.46
compound 1	-13.66	-2.86	-3.63	-2.83
compound 2	-11.30	-2.83	-3.49	-2.33
compound 3	-11.10	-2.70	-2.63	-2.35
compound 4	-12.16	-2.34	-2.48	-2.38
compound 5	-13.16	-2.42	-3.41	-2.13
compound 6	-12.68	-2.67	-2.36	-2.78
compound 7	-12.15	-2.53	-3.08	-2.88
compound 8	-10.90	-2.55	-2.55	-2.68
compound 9	-11.46	-2.29	-2.07	-2.95

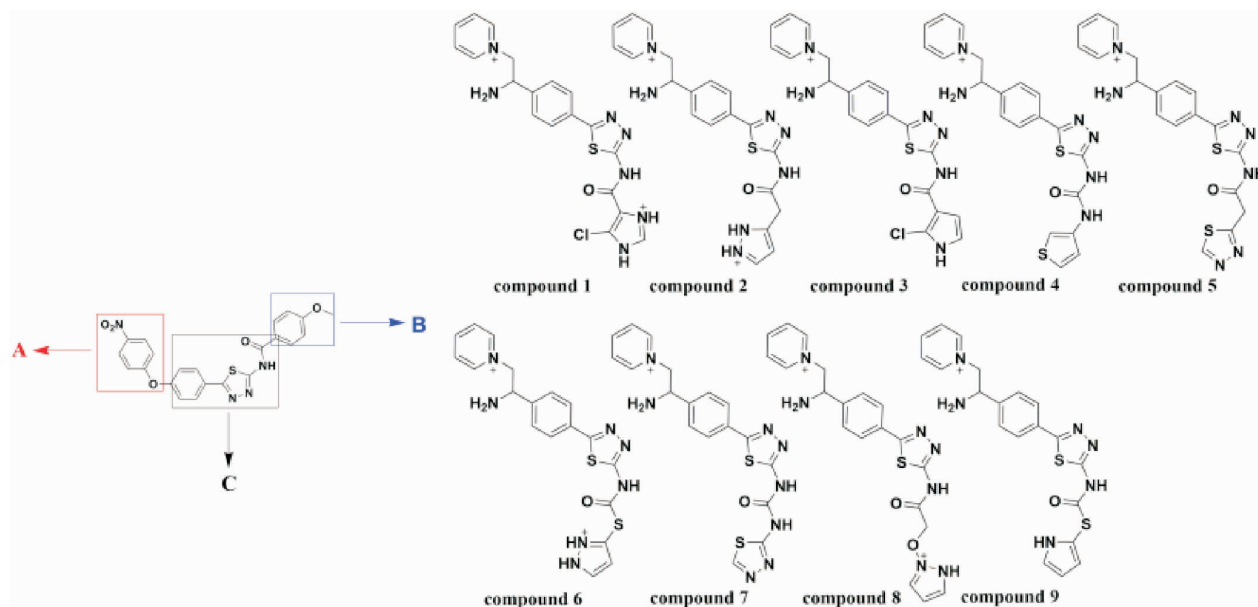


图 1 对 4f 结构进行修饰的过程

Fig 1 The process for modification of 4f structure

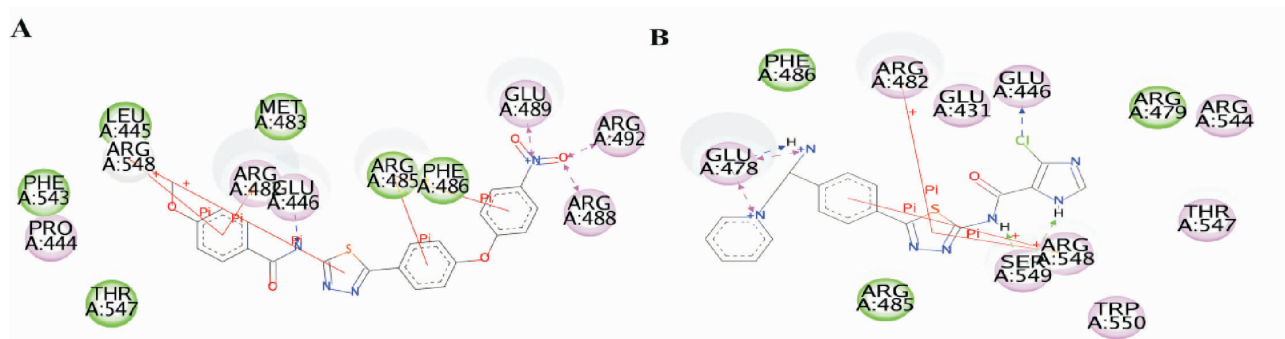


图 2 4f、compound 1 与 CDC25B 结合模式图

Fig 2 The binding patterns of 4f, compound 1 and CDC25B

2.2 动力学模拟

2.2.1 对 4f 结构进行修饰的抑制剂与 CDC25B 体系稳定性分析 模拟体系的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 以体系初始构象作为参考对象, 体现了体系结构在分子动力学模拟过程中的波动情况。图 3 是 CDC25B 的空载蛋白及靶点与配体小分子复合物 compound 1 和 4f 的骨架原子 RMSD 值随时间变化图。可以看出, 空载蛋白在 2 ns 左右达到了平衡, 对于 CDC25B 与配体复合物体系在 1 ns 左右就达到了平衡。

为进一步描述体系结构的波动情况, 计算了体系每个氨基酸残基的均方根波动 (root mean square fluctuation, RMSF), 体系氨基酸残基的 RMSF 值可以体现出受体在动力学模拟过程中相对灵活和稳定的区域, 结果如图 4 所示, CDC25B 的活性中心

(473–479) 波动减少。

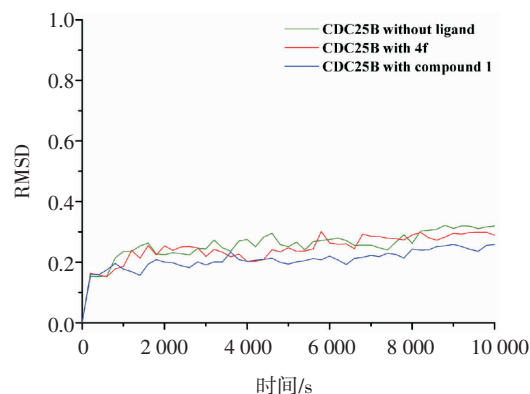


图 3 CDC25B 的空载蛋白及靶点与配体小分子复合物 4f、compound 1 的骨架原子 RMSD 值随时间变化图

Fig 3 The time variation chart for RMSD of CDC25B protein, 4f and compound 1

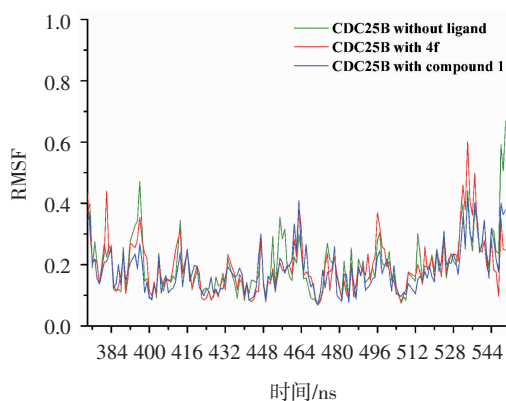


图4 CDC25B的空载蛋白及靶点与配体小分子复合物4f,compound1的骨架原子RMSF值随时间变化图

Fig 4 The time variation chart for RMSF of CDC25B protein, 4f and compound 1

2.3 ADMET 预测 化合物4f和compound1-compound9的预测结果见表2。

表2 ADMET 预测结果

Tab 2 The result of ADMET

化合物	ADMET 预测				
	25 °C下水溶解度	血脑屏障通透性	细胞色素 P450 2D6 抑制性	肝毒性	人类肠道吸收性
4f	2	4	false	true	2
compound 1	2	4	false	true	0
compound 2	2	4	false	true	0
compound 3	2	4	false	true	0
compound 4	2	3	false	true	0
compound 5	2	4	false	true	0
compound 6	2	4	false	true	0
compound 7	2	4	false	true	0
compound 8	4	4	false	true	1
compound 9	2	3	false	true	0

3 讨论

3.1 对4f结构进行修饰 对接得分为负数,其绝对值越大表明化合物与靶点结合的越紧密。通过表1的对接结果可以得知对比化合物4f,compound1与CDC25B第2活性位点的氨基酸(531-547)相互作用力增多,是compound1选择性增强的原因。选出得分最高的结构compound1进行动力学模拟,希望对以后的研究有一定的指导意义。

3.2 动力学模拟

3.2.1 对4f结构进行修饰的抑制剂与CDC25B体系稳定性分析 进行结构修饰的抑制剂与蛋白结合后达到平衡状态的时间比空载蛋白从波动达到平衡的时间短,表明在达到平衡状态后,CDC25B与配体复合物体系RMSD较空载蛋白时低,说明与配

体结合后,CDC25B的柔性降低了,有利于占住靶点。

与4f相比,进行结构修饰的抑制剂与CDC25B结合后活动中心波动减少,新设计的抑制剂使CDC25B受体结合区的第二结合区域(531-547)的波动小于4f,说明设计的抑制剂与CDC25B的匹配程度很高。设计的抑制剂的抑制能力和选择性高于4f。

3.3 ADMET 预测 25 °C下水溶解度被划分为0-5 6个等级,分别代表:极不可能溶;微溶;少溶;溶解性较好;溶解度适中;极易溶。血脑屏障水平被划分为0-4 5个等级,分别代表:极易透过;易透过;中等;不易透过;不能被定义。细胞色素P450 2D6抑制性:细胞色素P450 2D6参与各种药物在肝脏中的代谢水平,如果对细胞色素P450 2D6进行抑制,失去了细胞色素P450 2D6的功能,药物的浓度会增加,false和true分别代表非抑制和抑制。肝毒性:肝脏容易受药物毒性的影响,这会影响肝脏转移和排除毒物的能力,true和false分别表示没有肝毒性和有肝毒性。人类肠道吸收性:肠道吸收性被分为4个等级0-3,分别表示:易吸收;中等程度吸收;不易吸收;极难吸收。通过数据我们可以得知4f和compound1-compound9溶解度、血脑屏障通透性相似,无细胞色素P450 2D6抑制性和肝毒性。在人类肠道吸收性方面我们设计的化合物要优于已知化合物4f。通过ADMET预测也进一步表明我们设计的化合物具有成药的可能性,同时优于已知化合物。

参考文献:

- [1] 魏周科,李丽灵,魏佳.癌症治疗观探讨[J].辽宁中医杂志,2014,41(7):1377
- [2] 肖建英,刘超,孙小涵.蛋白激酶A对CDC25B蛋白S149与S321位点磷酸化的修饰抑制小鼠1-细胞期受精卵有丝分裂[J].生理学报,2012,64(1):33
- [3] 余月华,王琴,郑红英,等. CDC25B在大肠癌中的表达及意义[J].宁夏医学杂志,2013,3(11):1022
- [4] 陈彩萍,陆翔,邬万新,等. CDC25B在乳腺癌中的表达及其临床意义[J].肿瘤学杂志,2011,17(9):692
- [5] 黄颖鹏,闫竞一,刘纳新,等. CDC25B和CyclinB在胃癌中的表达及临床意义[J].温州医学院学报,2010,40(4):346
- [6] 于秀月,孔垂泽,张哲,等. CDC25B在肾癌细胞中的作用[J].现代肿瘤医学,2014,22(8):1782
- [7] 沈佳汇,陈立,杨天训,等. 细胞分裂周期蛋白CDC25B抑制剂研究进展[J].中国新药杂志,2014,23(24):2881
- [8] 宋宇宁,康东伟,张庆柱,等. CDC25磷酸酶抑制剂研究进展(2008~2014年)[J].中国药物化学杂志,2015,25(1):54
- [9] Li Y, Yu Y, Jin K, et al. Synthesis and biological evaluation of novel thiazole amides as potent Cdc25B and PTP1B inhibitors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(17):4125

(2017-01-19 收稿)