

文章编号 1006-8147(2016)02-0122-04

论 著

# 胆固醇酯转运蛋白抑制剂的分子设计

刘炳旺<sup>1,2</sup>, 马英<sup>1</sup>, 李彬寒<sup>1</sup>, 王润玲<sup>1</sup>

(1.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;2.天津医科大学肿瘤医院分子影像及核医学诊疗科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津 300060)

**摘要** 目的:设计针对胆固醇酯转运蛋白(CETP)的抑制剂,提高其降低血脂水平,为以后相关疾病的治疗提供科学的方法和依据。方法:以现有 torcetrapib 抑制剂为模板,利用 Schrodinger Suite 2009 软件中的“Core Hopping”模块进行修饰,对修饰后的结构用“Core Hopping”模块改造结构;利用 Schrodinger Suite 2009 中的 Glide 模块对 druglike 数据库中 10 万个化合物进行高通量虚拟筛选,得到结构进行修饰。利用 Glide 模块对所建立的化合物库进行虚拟筛选。应用 Qikprop 模块做 ADME(吸收、分布、代谢、排泄)预测来推测这些化合物的成药可能性。结果:对 torcetrapib 结构进行修饰,得到 8 个较好的化合物;通过对 druglike 数据库进行高通量虚拟筛选得到 1 个化合物-ZINC26608950,修饰后得到 6 个化合物。用分子对接方法分析了新抑制剂和 CETP 的相互作用机制,与现有的抑制剂 torcetrapib 相比有更好的结合能力。通过 ADME 预测得出设计出的化合物均符合类药 5 原则。结论:通过两种方法得到 14 个 CETP 抑制剂,分子对接初步证明其可以抑制 CETP,此为 CETP 抑制剂的结构改造及活性测定奠定了基础。

**关键词** 胆固醇酯转运蛋白;抑制剂;药物设计;分子对接

中图分类号 R914.2

文献标志码 A

## Designing novel inhibitors by targeting cholesteryl ester transfer protein

LIU Bing-wang<sup>1,2</sup>, MA Ying<sup>1</sup>, LI Bin-han<sup>1</sup>, WANG Run-ling<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, Tianjin 300070, China; 2. Department of Molecular Imaging and Nuclear Medicine, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China)

**Abstract Objective:** To develop highly active cholesteryl ester transfer protein (CETP) novel inhibitors to facilitate further research. **Methods:** In this study, torcetrapib was modified by means of “core hopping”; the small molecule drug-like database was screened by Glide of Schrodinger Suite 2009 and then was modified. It was further validated by the outcomes of their ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) predictions that the new agonists could have high potential to become drug candidates. **Results:** Eight compounds were discovered to inhibit CETP based on torcetrapib by means of “core hopping”. One CETP inhibitor-ZINC26608950 was discovered by high throughput virtual screening, and 6 compounds were discovered to inhibit CETP based on ZINC26608950. It was observed by docking that these novel inhibitors had more favorable conformation for binding to the receptor than torcetrapib. It was predicted that the values for these novel candidates were all within the reasonable ranges. **Conclusion:** The binding affinity of the designed molecules is theoretically higher than the torcetrapib in CETP. And the new inhibitors may become potential drug hits.

**Key words** cholesteryl ester transfer protein; inhibitors; computer aid design drug; molecular docking

心血管疾病具有“发病率高、致残率高、死亡率高、复发率高、并发症多”的特点<sup>[1-2]</sup>,严重危害到人类健康,已位于人类死亡病因之首,而高血压、冠状动脉粥样硬化是其病因之一。研究治疗冠状动脉粥样硬化药物对预防和治疗心血管疾病有着重要意义<sup>[3]</sup>。研究发现胆固醇酯转运蛋白(CETP)可作为治疗动脉硬化的新靶点,一个基因突变致 CETP 缺乏的家系,高密度脂蛋白(HDL)水平升高,同时冠心病发病率明显下降,并且当抑制 CETP 的活性时,能有效提

作者简介 刘炳旺(1981-),男,硕士在读,研究方向:计算机辅助药物设计;通信作者:王润玲, E-mail: wangrunling@tjmu.edu.cn。

高血浆内 HDL 含量水平<sup>[4-6]</sup>,所以 CETP 抑制剂被认为是冠状动脉粥样硬化(AS)最有治疗潜力的药物之一<sup>[7-12]</sup>。本研究旨在通过两种方法-高通量虚拟筛选和结构修饰的方法设计出新的 CETP 抑制剂。

## 1 材料与方法

**1.1 材料 软件及数据库** 在 DELL T5500 工作站上进行操作,涉及的软件为 Schrodinger 2009,模块包括 ligPrep, QikProp, Combiglide, Glide。在 ChemBioOffice2010 上进行绘图,片段分子来自已有碎片库。受体来自 PDBbank 数据库。

## 1.2 方法

**1.2.1 受体结构的准备** 蛋白结构预处理由 Schrodinger Suite 2009 软件中的 Protein preparation wizard 模块完成。首先对 CETP 蛋白质结构(PDB ID:4EWS)<sup>[13]</sup>进行修正,包括修正化学键,加氢,处理金属离子,修正 N 端和 C 端的残基结构错误,除去蛋白质晶体结构中的水分子和杂原子,只保留蛋白质分子与原始配体。再对蛋白质氢键进行优化,优化参数为 Sample water orientations, 优化力场选择 OPLS 2005<sup>[14]</sup>,以 RMSD 0.5 Å 为收敛标准。

**1.2.2 盒子的产生** 以原始配体小分子 torcetrapib 为中心,大小选择为 11Å 生成对接盒子文件。为确保盒子文件能够适合模拟体系,对盒子文件进行验证。本实验通过将小分子 torcetrapib 对接到 CETP (4EWS)的配体结合区,再重新与晶体结构中的配体构象叠合比对来验证对接方法和盒子文件的选择是否合理。

**1.2.3 配体准备** 对分子进行配体优化处理,此步在 LigPre 模块中完成。小分子优化的力场为 OPLS\_2005,产生 pH 值 7.0±2.0 下的离子化状态,去盐,产生各种可能的互变异构体。

**1.2.4 分子对接** 应用 Glide<sup>[15]</sup>模块进行分子对接。以原始配体小分子为盒子中心,大小为 11×11×11Å 自动生成对接盒子文件。虚拟筛选中对接精度为 HTVS(高通量筛选)。对接精度为 SP(标准精度),采用柔性对接,柔性对接时要求考虑各种环的柔性情况,要求对接函数在打分时对非平面型的酰胺键构象进行扣分,其它参数为默认值。

**1.2.5 结构修饰** “Core Hopping”模块具有片段替换和分子刚性对接两大功能,可以发现全新的拓扑结构骨架和活性分子。在“Core Hopping”过程中,第一步是定义模板化合物,在 Define Combinations step 中定义需要替换的片段。第二步将定义好的受体盒子导入 Receptor grid file 中。第三步导入分子片段,分子片段来自于实验室已有片段数据库和软件中自带的片段数据库。小分子片段会自动连接到母核上生成新的化合物数据库,得到的化合物数据库与受体进行刚性对接。依据对接得分进行下一步筛选,得分的绝对值越大,配体与受体的亲和力越强,结合力越好。

**1.2.6 ADME 预测** QikProp 模块可以预测化合物,可以对整个分子的 3D 结构预测,预测性质包括:辛醇/水和水/气体的 log Ps, log S, log BB; 整个 CNS 活性;Caco-2 和 MDCK 细胞渗透性;血清白蛋白结合活性 log Khsa;HERG 的 K 离子通道阻断性

log IC<sub>50</sub>。本实验对 logPo/w、PSA、logS 和 PMDCK 进行了预测。

## 2 结果

**2.1 对接方法验证** 对接后的结构与晶体中配体原始构象的均方根偏差(RMSD)值为 0.8 Å。说明盒子文件能够适用模拟体系。图 1 为 CETP 与 torcetrapib 的结合模式图。

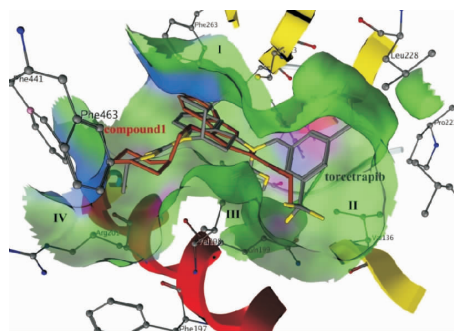


图1 CETP 与 compound1、torcetrapib 的结合模式图

Fig 1 The conformation obtained by docking torcetrapib and compound1 to CETP

## 2.2 CETP 抑制剂

**2.2.1 对 torcetrapib 结构进行修饰** 本实验选取 torcetrapib 作为结构修饰的母核。具体修饰过程如图 2 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 2 个优选片段 A1、A2。然后,对 B 片段进行替换以期找到疏水作用更强的片段,找出 4 个优选片段 B1、B2、B3、B4。这样就产生了 2×4=8 个化合物。根据这个分子修饰的原则,表 1 中列出了修饰后的 8 个 torcetrapib 的类似物分子,包括 torcetrapib 本身在内的对接结果。

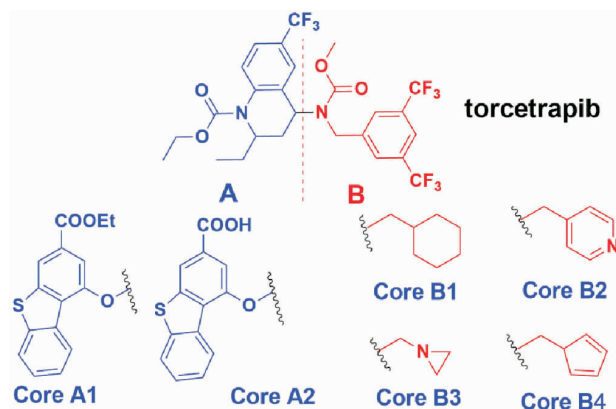


图2 以 torcetrapib 为母核的结构修饰流程图

Fig 2 A flowchart to show the agonists design process of torcetrapib

**2.2.2 高通量虚拟筛选** 对 druglike<sup>[16]</sup>数据库中 10 000 个化合物进行筛选,选出能与受体 CETP 的 4 个结合口袋结合的化合物最后得到 1 个化合物

ZINC26608950。此化合物能结合到第 2,3,4 口袋。由此,选 ZINC26608950 作为进一步修改的候选化合物。ZINC26608950 的缺点是没有向 CETP 受体的第一结合空腔延伸,没能与 CETP 受体结合区形成较好的匹配,所以可以尝试设计出能够占据 CETP 受体 4 个结合区的高效抑制剂。对此结构应用“Core Hopping”进行结构改造得出 6 个较好的结构,见表 1。具体修饰过程如图 3 所示:在环上添加分子片段以提高与受体的疏水区的匹配性,找出 6 个优选片段 R1、R2、R3、R4、R5 和 R6。对接结果显示:分子结构与 CETP 具有较好的匹配性。图 4 为 torcetrapib、comp-vs#1 与 CETP 结合模式图。

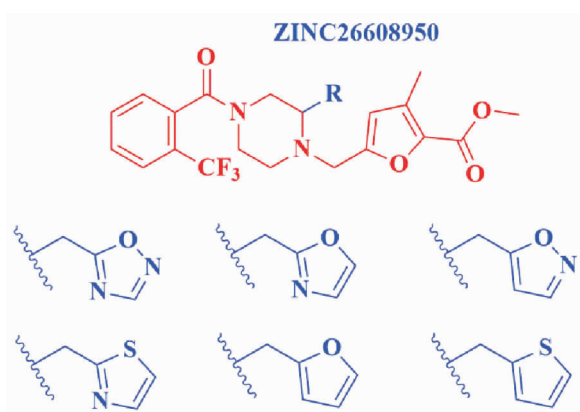


图 3 对 ZINC26608950 的结构修饰流程图

Fig 3 A flowchart to show the agonists design process of ZINC26608950

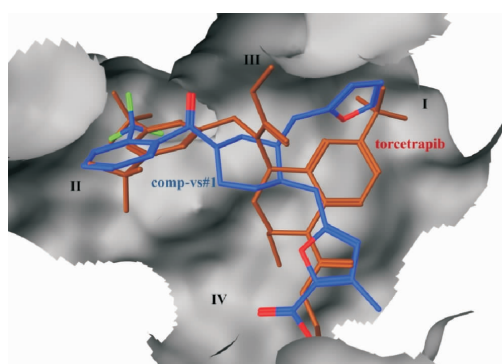


图 4 Torcetrapib、comp-vs#1 与 CETP 结合模式图

Fig 4 The conformation obtained by docking torcetrapib and comp-vs#1 to CETP

2.3 ADME 预测结果 应用 Schrodinger2009 软件包中的 QikProp 模块对与药效相关的 5 个性质进行预测。结果如表 1 所示。新设计的化合物的 logPo/w、PSA、logS、PMDCK 均在合理的范围内。

表 1 ADME 预测和对接得分

Tab 1 Physicochemical descriptors calculated by QP and docking score

化合物	PSA <sup>a</sup>	logPo/w <sup>b</sup>	logS <sup>c</sup>	PMDCK <sup>d</sup>	对接得分
torcetrapib	59.963	8.395	-10.803	1000.049	-7.689
comp#1	50.375	5.397	-6.581	1607.494	-8.397
comp#2	50.561	5.227	-6.088	1601.354	-8.105
comp#3	51.092	4.542	-5.444	1607.543	-7.280
comp#4	50.789	5.099	-6.156	1607.501	-7.874
comp#5	65.348	4.548	-5.303	1370.050	-7.727
comp#6	65.530	4.389	-4.806	1360.295	-7.134
comp#7	66.065	3.719	-4.226	1370.046	-6.624
comp#8	65.761	4.260	-4.899	1307.049	-7.577
comp-vs#1	166.40	4.36	-5.481	1195.380	-8.012
comp-vs#2	126.10	4.64	-4.863	1189.350	-8.126
comp-vs#3	132.71	3.16	-4.874	1190.290	-8.236
comp-vs#4	166.32	4.35	-5.668	1179.230	-8.632
comp-vs#5	198.62	5.24	-4.651	1178.690	-8.624
comp-vs#6	134.74	4.82	-5.353	1183.670	-8.391

各参数的参考范围 a:7.0~200.0;b:-2.0~6.5;c:-6.5~0.5;d:<25 差, >500 优

### 3 讨论

3.1 CETP 受体抑制剂的设计 靶点的选择对化合物的设计起到至关重要的作用。CETP 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 2.6Å<sup>[17]</sup>。

Torcetrapib<sup>[18]</sup>是由美国辉瑞公司研发的第一个 CETP 抑制剂,也是第一个进行大规模终点事件评价临床试验的 CETP 抑制剂。torcetrapib 使收缩压升高约 5 mmHg,同时升高血钠、碳酸氢盐及醛固酮水平。似乎这些脱靶效应导致了死亡率的增加,后续研究显示这些不良作用与 CETP 抑制机制无关,即其他 CETP 抑制剂不一定有这样的作用。CETP 抑制剂 torcetrapib 具有高脂溶性(cLogP=8.395),极低水溶性,这就使化合物产生了脱靶现象。torcetrapib 有两点不符合成药五规则:分子质量超过 500 和高脂溶性。所以在设计化合物的时候要避免此现象产生。现今,一个成功用作口服药物的化合物必须具有足够的水溶性,以及和其临床药效相关的通透性。准确的 ADME 预测对进一步合成起到指导作用。本实验设计的化合物 logPo/w、PSA、logS、PMDCK 均在合理的范围内。尽管 logPo/w 越高,结合能力越强,但不能过度地增强 logPo/w 水平,这样会导致药物在体内分布较差。这些化合物的创新性在于不仅均符合成药五规则还能与 CETP 有很好的相互作用,在理论上这些化合物的结合能力超过



torcetrapib。

分子对接初步证明其可以抑制 CETP, 具有理论活性, 表明基于 CETP 治疗冠状动脉粥样硬化具有一定可行性, 为治疗冠状动脉粥样硬化的先导化合物的结构改造及活性测定奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Zhang L, Yan F, Zhang S, et al. Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein [J]. Nat Chem Biol, 2012, 8(4): 342
- [2] Bishop B M. Systematic review of CETP inhibitors for increasing high-density lipoprotein cholesterol: where do these agents stand in the approval process [J] Am J Ther, 2015,22(2): 147
- [3] Chapman M J, Wilfried L G, Guerin M, et al. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors [J]. Eur Heart J, 2010, 31(2): 149
- [4] Barter P J, Brewer H B, Chapman M J, et al. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(2): 160
- [5] Ding Y Y, Zhang W, Zhang M Q, et al. Functional and association studies of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in a Wannan Black pig model[J]. Anim Genet, 2015,46(6): 702
- [6] Morton R E, Izem L. Modification of CETP function by changing its substrate preference: a new paradigm for CETP drug design[J]. J Lipid Res, 2015, 56(3): 612
- [7] 杨征, 邱敏. 丹参酮 IIA 的心血管作用及机制研究进 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(4): 372
- [8] Collins H L, Drazul-Schrader D, Sulpizio A, et al. L-Carnitine intake and high trimethylamine N-oxide plasma levels correlate with low aortic lesions in ApoE transgenic mice expressing CETP[J]. Atherosclerosis, 2015, 244: 29
- [9] Miyosawa K, Watanabe Y, Murakami K, et al. New CETP inhibitor K-312 reduces PCSK9 expression: a potential effect on LDL cholesterol metabolism[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015, 309(2): 177
- [10] Jeenduang N, Porntadavity S, Nuinoon M, et al. Studies of the CETP TaqIB and ApoE polymorphisms in southern thai subjects with the metabolic syndrome[J]. Biochem Genet, 2015, 53 (7/8): 184
- [11] Hitchcock E, Patankar J V, Tyson C, et al. A novel microdeletion affecting the CETP gene raises HDL-associated cholesterol levels [J]. Clin Genet, 2015,1
- [12] Greene D J, Izem L, Morton R E. Defective triglyceride biosynthesis in CETP-deficient SW872 cells[J]. J Lipid Res, 2015, 56(9): 1669
- [13] Liu S P, Mistry A, Jennifer M, et al. Crystal structures of cholesteryl ester transfer protein in complex with inhibitors[J]. J Biol chem, 2015, 287(44): 37321
- [14] Oostenbrink C, Soares T A, Vander Vegt N F, et al. Validation of the 53A6 GROMOS force field [J]. Eur Biophys J, 2005,34(4): 273
- [15] Halgren T A, Murphy R B, Friesner R A, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening [J]. J Med Chem, 2004, 47(7): 1750
- [16] Irwin J J, Shoichet B K. ZINC—a free database of commercially available compounds for virtual screening[J]. J Chem Inf Model, 2005, 45(1):177
- [17] 洪渊. 基质金属蛋白酶及其抑制剂的分子对接研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 2007
- [18] Morehouse L A, Sugarman E D, Bourassa P A, et al. Inhibition of CETP activity by torcetrapib reduces susceptibility to diet-induced atherosclerosis in NZW rabbits[J]. J Lipid Res, 2007,48(6):1263

(2015-10-09 收稿)

+++++

(上接第 121 页)

- [4] 罗定强, 赵翔宇, 王军宪. 小丛红景天化学成分研究[J]. 中药材, 2005, 28(2): 98
- [5] Lee M W, Lee Y A, Park H M, et al. Antioxidative phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor[J]. Arch Pharm Res, 2000, 23(5):455
- [6] Nakamura S, Li X Z, Matsuda H, et al. Chemical structures of acyclic alcohol glycosides from the roots of *Rhodiola crenulata*[J]. Chem Pharm Bull, 2008, 56(4):536
- [7] Yurdanur A, Daneel F, Ehab A, et al. Lotaustralin from *Rhodiola rosea* roots[J]. Fitoterapia, 2004,75(6): 612
- [8] Sigurskjold B W, Haunstrup I, Bock K. Hydrolysis of substrate analogues catalysed by beta-D-glucosidase from *Aspergillus niger*. Part III. Alkyl and aryl beta-D-glucopyranosides[J]. Acta Chem Scand, 1992, 46(10): 451
- [9] 陈纪军, 陈金素, 陈润英, 等. 德钦红景天的化学成分[J]. 云南植物研究, 1999, 21(4): 525
- [10] Liu B M, Chen R G, Cai Q L. Preliminary study on the chemical constituents of *Glochidion ericarpum* Champ[J]. Guangxi J Tradit Chin Med, 2000, 23(40): 52
- [11] 舒希凯. 芍药花抗氧化活性成分的分离与鉴定[D]. 山东: 山东师范大学, 2013.
- [12] Ding H Y, Lin H C, Teng C M, et al. Phytochemical and pharmacological studies on Chinese Paeonia Species[J]. J Agric Food Chem, 2000, 47 (2):381
- [13] 张忠立, 左月明, 罗光明, 等. 梔子化学成分研究[J]. 中药材, 2013, 36(3): 401
- [14] Xiao H, Parkin K. Isolation and identification of phase II enzyme-inducing agents from Nonpolar Extracts of Green Onion (*Allium spp.*)[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(22): 8417
- [15] Bai N S, He K, Roller M, et al. Flavonolignans and other constituents from *Lepidium meyenii* with activities in anti-inflammation and human cancer cell lines[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(9): 2458
- [16] Hussein S A, Hashem A N, Selim M A, et al. Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*[J]. Phytochemistry, 2003, 64(4): 883

(2015-09-15 收稿)