

## 复旦大学药学院

### 2014~2015 学年第一学期期末考试试卷

课程名称: 药物设计学 课程代码: PHAR130011  
开课院系: 药学院 考试形式: 开卷/闭卷/课程论文/  
姓 名: 张哲明 学 号: 11307120209 专 业: 药学  
得 分: A

(装订线内不要答题)

#### 结核分枝杆菌 EthR 蛋白拮抗剂的筛选与优化 ——分子碎片药物设计实例

报告选取了分子碎片法药物设计的案例，此概念在该段文字中并未提及，报告对原文的总结和批评基本正确，报告对该方法的总结和评论到位，有自己见解。

# 结核分枝杆菌 EthR 蛋白拮抗剂的筛选与优化

## ——分子碎片药物设计实例

### 一、研究背景

#### 1. 药物作用靶点的发现

结核病是由结核分枝杆菌引起的一种慢性传染病，发病率和死亡率逐年上升，对公众健康造成严重威胁。目前治疗结核病的一线药物有异烟肼、利福平、毗嗪酰胺、乙胺丁醇等，此类药物对大多数患者有效，但极易产生多药耐药性（MDR），多药耐药性是影响抗感染治疗的重要原因。针对多药耐药结核（MDR-TB）则需改变治疗策略，使用二线药物乙硫异烟胺进行治疗。乙硫异烟胺结构如图 1 所示，为治疗 MDR-TB 的前药，被结核分枝杆菌的单加氧酶 EthA 活化后生成药物-NAD 复合物，该复合物可抑制分支菌酸的生成。

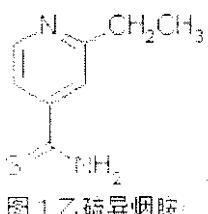


图 1 乙硫异烟胺

但乙硫异烟胺的作用相对一线药物较弱，对结核分枝杆菌的抑制作用仅为异烟肼的十分之一，主要原因因为结核分枝杆菌 TetR 基因转录抑制蛋白 EthR 的存在，导致 EthA 的表达受到抑制，从而降低了乙硫异烟胺的生物活性。Surade 等人通过研究发现，一种 EthR 配体可有效提高乙硫异烟胺活性，此研究结果提示 EthR 可能为二线药物乙硫异烟胺增效剂的作用靶点，通过抑制 EthR 增加乙硫异烟胺的生物转化，从而提高药物活性。

#### 2. 分子碎片药物设计：

分子碎片药物设计是近年发展出的一种新型药物设计方法。这一概念最早由 Jencks 和 Ariens 等人提出，多用于抗菌药设计（如结核分枝杆菌泛酸合酶抑制剂、CYP121 抑制剂等），基本原理大致如下：一个药物分子的生物活性可看作是两个或多个对目标受体具有亲和力的小分子碎片生物活性的叠加，反之，将一个已知药物分子分解成多个小分子碎片，部分小分子碎片可能带有原药物分子部分或全部的生理活性，对这些分子碎片进行筛选和优化即可得到新的先导化合物。相比其它药物设计方法，这种方法可减少人力物力的投入，可在较短时间内筛选出目标化合物。

分子碎片药物设计的基本步骤如下：(1) 发现药物作用靶点；(2) 设计和合成药物的小分子碎片化合物库；(3) 根据靶点筛选小分子碎片；(4) 对筛选出的具有较好生物活性的小分子碎片进行适当组合，得到先导化合物；(5) 对先导化合物进行进一步的筛选和优化。

本文以结核分枝杆菌 EthR 蛋白拮抗剂的筛选与优化为实例，对分子碎片药物设计这一新型方法思路进行阐述，并通过与基于结构的药物设计（SBDD）、基于靶点的药物设计（TBDD）等经典方法进行对比，讨论该方法在药物设计中的优势和不足。

### 二、文献概述

本篇文献的目的在于利用分子碎片药物设计思路，筛选出具有结核分枝杆菌 EthR 蛋白抑制作用的小分子碎片，再采用分子碎片生长、连接及合并等方法，筛选并优化出有 EthR 抑制活性的先导化合物。实验过程中，研究人员主要从化合物与 EthR 蛋白结合构象（采用 X-射线晶体衍射等方法考察）和化合物生物活性（通过测定 50% 抑制浓度 IC<sub>50</sub> 及 50% 最大效应浓度 EC<sub>50</sub> 等进行考察）几方面对小分子碎片和目标化合物进行筛选，设计出与 EthR 结合率高，具有良好生物活性及相关其他性质（如溶解度）的先导化合物。

本篇文献研究过程大致可以分成以下几部分：(1) 已知配体筛选及结合构象的确证；(2) 小分子碎片的发现及确证；(3) 采用分子碎片生长、连接及合并三种策略，优化小分子碎片，

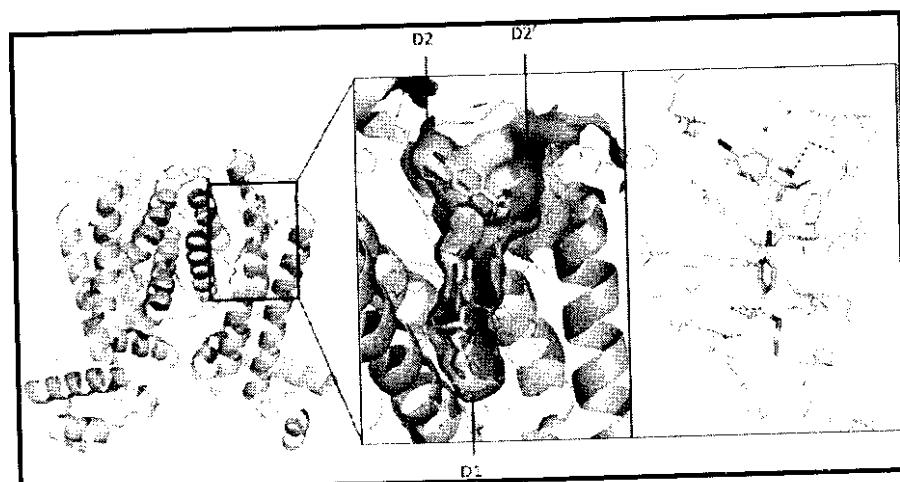


图 3. 化合物 3 (小分子碎片) 与 EthR 蛋白的结合构象

### 3. 小分子碎片的优化

文献以芳基氨基磺胺结构为分子碎片的基本骨架，采用碎片生长、连接及合并三种策略（其中重点研究碎片生长法），对小分子碎片进行优化，使化合物可更好的与 EthR 蛋白结合从而产生抑制作用，具体如下。

#### (1) 分子碎片生长法

以芳基氨基磺胺为骨架，研究人员构建了含有 976 个化合物的虚拟化合物库，并使用 Surflex 2.415 软件，通过考察配体受体结合效率对化合物库进行筛选，得到 75 种可与 EthR 蛋白结合的化合物。然后对所选化合物进行进一步的人工筛选，最终选出 10 个易于与 EthR 蛋白（尤其为 Asn179 侧链）发生氢键结合及疏水作用的化合物（化合物 5-14）。具体筛选过程如图 4 所示。筛选结果表明，侧链为脂肪链的化合物更易与 D1 口袋结合。

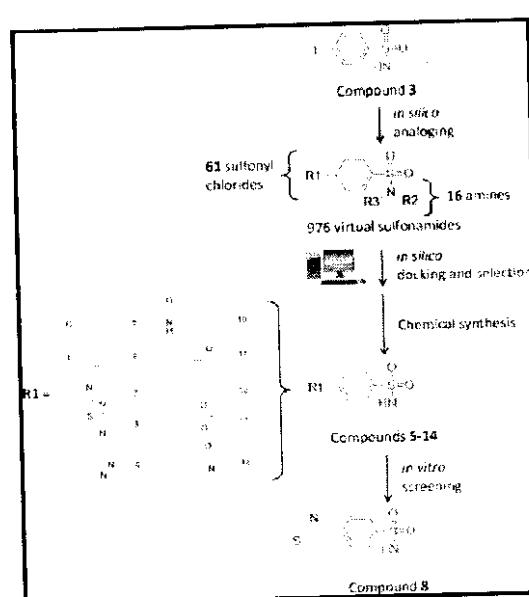


图 4. 分子碎片生长法化合物库的筛选

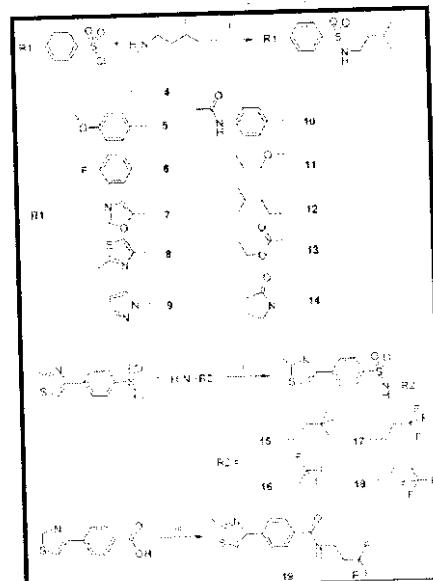


图 5. 化合物 5-19 的合成

研究人员采用结核分枝杆菌感染的巨噬细胞作为体外模型，分别给予  $0.1 \mu\text{g/mL}$  的乙硫异烟胺（相当于  $1/10 \text{ MIC}$ ）及等量各化合物，考察化合物提高乙硫异烟胺药效的能力（用  $\text{EC}_{50}$  作为参数进行评价）。结果表明，几种化合物本身对巨噬细胞无毒，给药后结核分枝杆菌的耐药性部分上升，部分下降，其中化合物 8 对乙硫异烟胺的增效作用最强 ( $\text{EC}_{50}=5.7 \mu\text{M}$ )，且与 EthR 蛋白可较好结合，其结合构象如图 6 所示，化合物氨基磺酰基团与 EthR

得到先导化合物。下文将对研究过程做出具体阐述。

### 1. 配体筛选及结合构象确证

从前人研究中，研究人员筛选出两个典型化合物（化合物 1、2），这两个化合物均可以氢键结合于 EthR 蛋白的同一结构域内，并且化合物 2 可同时结合在 176 位天冬酰胺（Asn176）侧链上。两个化合物与 EthR 蛋白结合构象分别如图 2.A, B 所示。

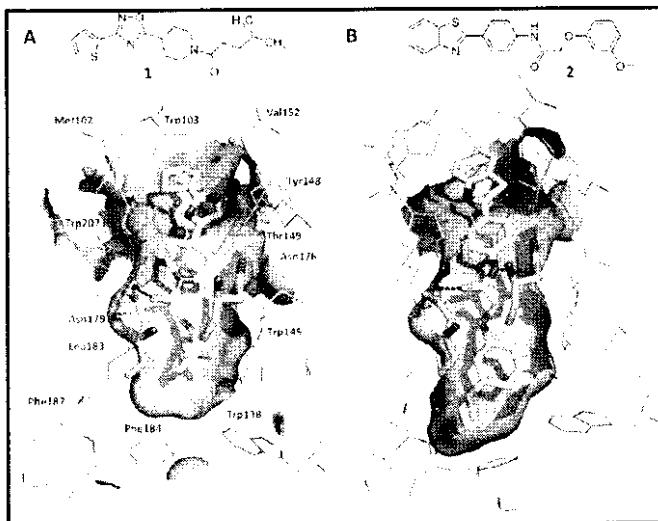


图 2. 化合物 1、2 与 EthR 蛋白结合构象

根据已知配体在 EthR 蛋白结合口袋内的结合位点及结合方式，得到有活性的小分子碎片，再利用碎片生长、连接或合并等多种策略，即可得到有潜在活性的化合物。

### 2. 小分子碎片的发现和确证

在研究过程中，研究人员发现了小分子化合物 3（结构见表 1），化合物 3 有较好的物理化学性质及生物活性，可看作 EthR 蛋白抑制剂的一个小分子碎片，但活性较弱 ( $IC_{50}$  为  $160 \mu M$ )，需进一步优化。文中对化合物 3 与 EthR 蛋白的结合进行再一次确证并细化（见图 3），以便后期针对结合口袋构象对小分子碎片进行优化。

结果表明，两个小分子碎片以 Y 形结合于 EthR 蛋白的三个结合口袋（D1, D2, D2'）内。D1 口袋为已知结合位点，所有 EthR 配体均可结合。该位点以 110 位苯丙氨酸（Phe110）、114 位苯丙氨酸（Phe114）、142 位甲硫氨酸（Met142）、107 位异亮氨酸（Ile107）和 207 位色氨酸（Trp207）序列为骨架，口袋底部为 138 位色氨酸（Trp138）和 184 位苯丙氨酸（Phe184）。小分子碎片结合于口袋底部 Trp138 和 Phe184 之间，且小分子碎片的氨基磺酰侧链与 Asn179 以氢键结合。D2 口袋以 Met012、Trp103、152 位缬氨酸（Val152）和 Trp148 为骨架，通过氢键与小分子碎片的氨基磺酰基团相连，同时氨基磺酰基团上的氮原子还与 90 位亮氨酸（Leu90）和 Asn93 相互作用。D2' 口袋由 94 位脯氨酸（Pro94）、105 位苏氨酸（Thr105）、95 位丙氨酸（Ala95）及 Leu90 构成。

另外，前人研究表明，化合物与 Asn179 的氢键结合与 106 位甘氨酸（Gly106）附近位点占位可抑制 EthR 蛋白活性。

由于 D1 口袋为所有配体均可结合的位点，且含有抑制性位点 Asn179，本文献主要以小分子碎片的芳基氨基磺酰为骨架，重点针对 D1 口袋进行优化，同时设计出的分子应兼具与 D2 和 D2' 口袋相互作用的性质，从而达到提高化合物与 EthR 蛋白结合率的目的。

General Information	
Compound Name:	Compound 3
Chemical Formula:	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S
Molecular Weight:	352.44
Purity:	95%
Dissolution:	1 mg/mL in DMSO
Stability:	Stable at room temperature
Storage:	-20°C避光保存

表 1. 化合物 3 及性质

蛋白的 Asn179 以氢键连接，苯环与 Trp20 和 Phe110 相嵌合，噻唑环与 Trp103、Tyr148、Val 152 和 Leu87 相嵌合，分子中的甲基与 Met102 相互作用，且可占据 D2' 口袋。

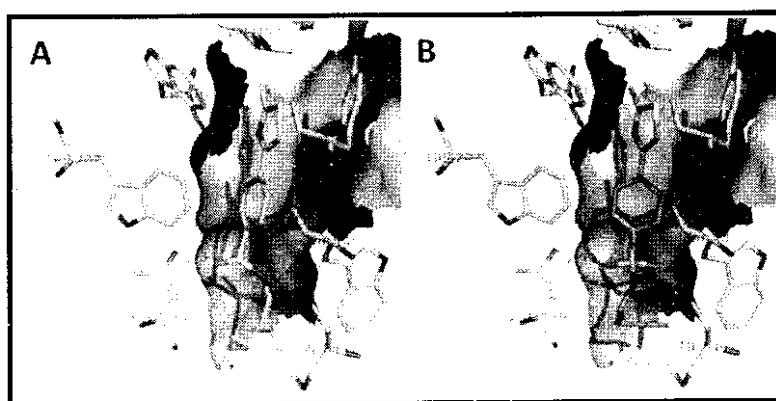


图 6. 化合物 8 与 EthR 蛋白的结合构象

在化合物 8 的基础上对化合物进行第二步优化，保留了分子中 2-甲基噻唑基团，为使化合物与 EthR 底部的 D1' 口袋更好的结合，将化合物 8 的异戊基侧链以 3,3-二甲基丁基侧链或三氟代烷基侧链取代，合成化合物 15-18（结构及合成过程如图 5 所示）。叔丁基取代后阻碍了化合物与 D1' 口袋结合，导致化合物活性降低（如化合物 15 的  $EC_{50}>20 \mu M$ ），而三氟代烷基取代后则显著提高了化合物与受体的亲和力及活性（如化合物 17 活性约为化合物 8 的 9 倍， $EC_{50}$  为  $0.29 \mu M$ ），但过长或过短的三氟代烷基取代后活性均较差。除此以外，三氟代烷基取代后提高了化合物的溶解度，较好的溶解度可使分子更易穿透含有病原体的巨噬细胞。

化合物 17 为筛选出的性质最优的目标化合物，对其进行第三步结构优化，以酰胺基团取代原来的磺酰胺基团，所得化合物（19）活性增加（ $EC_{50}$  为  $0.08 \mu M$ ），可能是由于酰胺的氢原子与 EthR 的 Asn176 侧链氧原子间产生了新的氢键，导致化合物 19 与 EthR 蛋白结合效率提高，同时化合物 19 也表现出较好的溶解性。

## （2）分子碎片连接及合并

研究过程中，研究人员对小分子进行进一步的连接及合并。采用合并策略将化合物 19 与化合物 3 的构象进行重叠设计出化合物 2 作为分子碎片合并后生成的化合物；同时采用分子碎片连接策略合成了化合物 21。两个化合物合成过程见图 7。

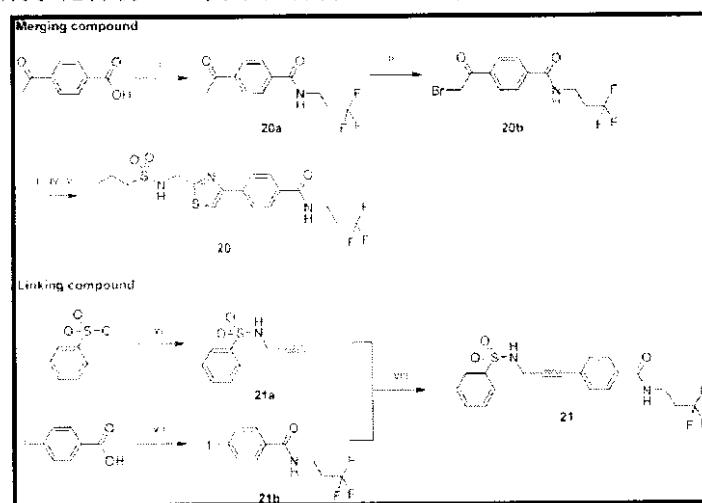


图 7. 化合物 20、21 合成过程

两个化合物均可与口袋底部 Asn176 及 Asn179 以氢键结合，且化合物的氨基磺酰结构可与 Tyr148 的羟基以氢键结合，此外化合物 20 与 Met102 之间还产生了相互作用力，表明

两个化合物可与 EthR 蛋白较好结合。但活性考察结果表明，与化合物 19 相比，化合物 20、21 活性和溶解度均较差，难以作为先导化合物进一步考察。

通过以上实验，研究人员得出如下结论：采用分子碎片药物设计思路，通过分子碎片生长得到的化合物 19 为筛选出的最优化合物，与分子碎片连接及合并方法得出的化合物相比具有更好的生物活性，可进一步考察化合物 19 的体内活性。

### 三、心得体会

#### 1. FBDD 与传统药物设计方法的异同与优势

本篇文献采用的是近年发展出的新型方法——分子碎片药物设计（FBDD），该方法多用于抗菌药的设计，且目前已成功应用于抗结核分枝杆菌的药物发现与筛选。FBDD 主要具有如下优势。

由于 FBDD 的研究主要基于小分子碎片，从小分子、低分子量分子（分子量 $<300\text{g/mol}$ ）起步，因此通过 FBDD 得到的先导化合物多具有较好的物理化学性质（如溶解性等），使这些小分子碎片更易穿透含有病原体的巨噬细胞，甚至可以穿过细菌的细胞壁，物理化学性质上的优势可在一定程度上弥补小分子碎片对靶点亲和力的不足，且低亲和力的缺陷可在后期进行优化和改进。

与传统合理药物设计方法，如基于靶点的药物设计（TBDD）对比，FBDD 与已知配体结构进行药物设计类似，均以已知配体作为模板。不同的是，TBDD 需要以配体结构反推受体结构，而这一步在 FBDD 中则不必要。在 FBDD 中，将配体分解为若干小分子，从中筛选出具有生物活性的小分子碎片即可，不需对受体结构与结合方式进行全面了解，例如文献实例中研究人员 D2、D2' 口袋与药物的结合方式并未进行全面考察，依然可以筛选并优化出先导化合物，相对避免了计算机模拟受体结构时易产生的错误及不确定因素。

与基于结构的药物设计（SBDD）相比，文献实例所用方法与 SBDD 中分子碎片生长法思路相同，但相对于活性分子碎片发现及目标化合物的筛选等方面，FBDD 结合高通量筛选，相对可减少较多人力物力的投入，在某种程度上可看作是 SBDD 方法的优化。

#### 2. 药物设计过程中的取舍

在合理药物设计的过程中，难以兼顾目标化合物的全部性质，如化合物的物理化学性质及与受体的亲和力等。以文献中由小分子碎片合并及连接产生的化合物 20、21 为例，将化合物 19 与化合物 3 拼合后，增加了产物分子与受体之间的相互作用从而提高了分子的受体亲和力，但疏水原子的增加导致了溶解度的降低，在一定程度上影响了分子透膜作用于病原体的过程，从而影响了药效。由此可见，化合物的理化性质和受体亲和力等其它性质无法在药物设计过程中兼顾，一味的提高分子的某种性质可能会导致其它性质的下降，因此在药物设计过程中，应以整体药效为目标，寻求最优设计方法（如实例中化合物 19）。