

· 数据挖掘 ·

# 传统中药中 H7N9 病毒神经氨酸酶抑制剂的计算机虚拟筛选

史海龙<sup>1,2\*</sup>, 崔亚亚<sup>1</sup>, 李军<sup>1</sup>, 王玉成<sup>1</sup>, 李贤杨<sup>1</sup>, 陈哲<sup>1</sup>, 肖磊<sup>1</sup>

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 西北大学 生命科学学院, 西安 710069)

**[摘要]** 目的:运用计算机虚拟筛选技术从传统中药数据库(TCM database@Taiwan)中快速搜索 H7N9 亚型流感病毒神经氨酸酶(neuraminidase,NA)的中药小分子抑制剂。方法:采用 AutoDock Vina 软件对蛋白质晶体结构数据库 PDB 中 NA 与小分子抑制剂扎那米韦形成的复合物(PDB 代码为 4MWX)三维结构活性部位进行分析,基于传统中药配体库进行分子对接初次筛选。综合运用传统中药系统药理学数据库及分析平台 TCMSP 及 Accelrys 公司开发的 Discovery Studio 2.5 分子模拟软件包内 TOPKAT 模块计算药代动力学参数和毒性预测对分子对接结果进行 2 次筛选。结果:以原配体(扎那米韦)的自由结合能为阈值,筛选出中国传统中药数据库中 3 个类药性良好的化学成分与 NA 亲和力高于上市的抗流感药物扎那米韦的天然小分子化合物,并且确定了它们的中草药来源。结论:该研究结果可促进从传统中药库中提取、设计及实验合成新抗 H7N9 流感病毒药物。

**[关键词]** H7N9 流感病毒;神经氨酸酶;计算机虚拟筛选;中药

**[中图分类号]** R287;R283.6;TP3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0173-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240173

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151028.1108.018.html>

**[网络出版时间]** 2015-10-28 11:08

**Virtual Screening of Potential H7N9 Virus Neuraminidase Inhibitors Based on Traditional Chinese Medicine Database** SHI Hai-long<sup>1,2\*</sup>, CUI Ya-ya<sup>1</sup>, LI Jun<sup>1</sup>, WANG Yu-cheng<sup>1</sup>, LI Xian-yang<sup>1</sup>, CHEN Zhe<sup>1</sup>, XIAO Lei<sup>1</sup> (1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**[Abstract]** **Objective:** To take technology of computer virtual screening for fast searching small molecule inhibitors for H7N9 subtype of influenza virus neuraminidase (NA) from traditional Chinese medicine database@Taiwan (TCM database@Taiwan). **Method:** Based on optimized complex structure of NA bound with specific inhibitor of Zanamivir, computer-aided structure-based virtual screening against TCMD database@taiwan was conducted to determine occurrence of herb-based NA inhibitors in AutoDock Vina software package of Scripps institution. Virtual screening results were further filtered by predictive ADME simulation by traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) and simultaneously filtered by predictive toxic simulation using TOPKAT module from Discovery Studio 2.5 software package. **Result:** Free binding energy of original ligand (Zanamivir) could be used as a threshold, then not only obtained three compounds having a higher binding affinity than Zanamivir, but also they had good drug-likeness. Their sources of traditional Chinese medicine had been determined. **Conclusion:** This study provides an important reference and a theoretical basis for extraction of antiviral compounds from Chinese herbal medicine and design of anti-influenza drugs.

**[Key words]** H7N9 influenza virus; neuraminidase; virtual screening; traditional Chinese medicine

**[收稿日期]** 20150731(010)

**[基金项目]** 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2013JK0779);陕西省教育厅重点实验室科学研究计划项目(13JS033);国家级大学生创新创业训练计划项目(201310716002);陕西省教育科学规划办“十二五”规划项目(SGH1343434)

**[通讯作者]** \* 史海龙,在读博士,讲师,从事计算机辅助药物设计与蛋白质分子模拟研究,E-mail:shihailong2006@sohu.com

H7N9 流感病毒作为一种新型甲型禽流感病毒,2013 年 3 月首次报道人类可作为其宿主,已在感染病毒患者的体内检出<sup>[1-2]</sup>。至今为止,尚未发现该病毒可以在人体内快速增殖,并在人与人之间迅速传播的明显证据<sup>[3]</sup>。但是流行性病学研究发现 H7N9 病毒表面抗原性结构逐渐发生变异,已发生较大抗原性漂变,表明其病毒可逃避宿主方面的免疫压力,较易从禽类传播给人类,促进了病毒毒株的不断进化,可导致严重的呼吸道症状甚至死亡<sup>[4]</sup>。

目前临床上较常用的抗流感病毒药物主要有 Zanamivir (扎那米韦,商品名乐感清)和 Oseltamivir (奥司他韦,商品名达菲),这 2 种药物都是通过占据神经氨酸酶(neuraminidase,NA)活性位点来抑制流感病毒的毒力及传染能力<sup>[5]</sup>。NA 是流感病毒表面的一种糖蛋白,可特异性催化切断成熟病毒粒子表面和细胞表面糖链上的 N-乙酰基神经氨酸,促进成熟的病毒颗粒最终从宿主细胞释放,感染新的宿主细胞,并防止流感病毒发生自凝集。

乐感清虽然售价亲民,但仅有喷雾剂,不能口服,使其应用范围受到了限制;而达菲价格较为昂贵,非普通百姓所能承受,且达菲生产能力有限,一旦发生较大规模的流感病毒爆发,该药物的供给量有限。另外,在一些禽流感疫情中已经发现了达菲耐受的禽流感病毒,在达菲的临床测试中就发现存在一些对达菲耐受的禽流感病毒<sup>[6-7]</sup>。因此,迫切需要寻找新的 NA 抑制剂作为抗流感病毒药物。

台湾的传统中药数据库(traditional Chinese medicine database@Taiwan,简称 TCM database@Taiwan)<sup>[8]</sup>中收集了来自于 352 种中药原料的 37 170 个化合物,里面含有大量有文献报道且有生物活性的小分子结构,是世界上最大的非商业中药分子数据库。本研究针对已报道的晶体结构,以 NA 为靶点,使用分子对接技术筛选数据库中神经氨酸酶潜在的抑制剂,发现 3 个新的高活性的 NA 抑制剂,并且对抑制剂与 NA 之间的结合模式进行了探索,有助于以 NA 为靶点从中药中寻找选择性抑制剂提供参考。

## 1 资料与计算方法

蛋白质受体结构预处理程序采用 Accelrys 公司开发的 Discovery Studio 2.5 软件包<sup>[9]</sup>。小分子配体分子结构的绘制及能量优化程序采用 CambridgeSoft 公司开发的综合性科学应用软件包 ChemBioOffice 2008 ultra。分子三维结构显示软件采用 Warren Lyford DeLano 编写的 Pymol-v0.99 软件,受体配体的相互作用的显示采用 CCGI 公司开发的 MOE 2008 软件包。分子对接计算程序采用 Scripps 研究所的 AutoDock Vina 软件<sup>[10]</sup>。所有计算工作均在惠普 HP-Z440 计算工作站上完成。

以蛋白质受体的结构为靶点进行大规模小分子配体化合物对接是计算机虚拟筛选的主要策略之一,具体分为 5 个步骤:①小分子配体库准备。小分子化合物库可以来源于虚拟化合物库、天然产物库、企业提供的化合物库或者商品化的化合物库,要求其具备良好的类药性、类先导性及分子多样性等。②靶点蛋白结构准备。受体结构可以来源于蛋白

质晶体结构数据库(protein data bank,PDB),这些数据文件是通过 X 射线、核磁共振实验得到。如果 PDB 数据库中没有的蛋白晶体结构,就需要依据蛋白一级序列进行同源建模及分子动力学模拟构建。确保对接计算正确、有效的前提是合理的靶点蛋白活性位点的三维结构。③对接计算。对接速度与对接精确度两者之间寻求平衡,虚拟筛选的对接方法绝大多数采用半柔性对接,即只考虑配体的柔性,而靶点设定为刚性或仅局部柔性处理。配体小分子构象生成的算法有多种,如 AutoDock 的遗传算法,Flex X 的生长构建算法, Dock 的空间匹配算法, Glide 的系统搜索算法, LigandFit 的蒙特卡罗算法。④结果评价。正确打分每一个配体和受体的结合优劣,可以从不同指标进行打分,如结合能大小、经验自由能等。需要强调的是,结果评价的正确和有意义的前提是对接计算的合理正确,二者相辅相成。⑤对接后处理。有些化合物尽管对接打分很高,但是由于类药性差或者结构不稳定、具有潜在毒性等原因,不一定能作为候选药物,所以对对接结束后要进行药代动力学及毒性等指标的全面评估。

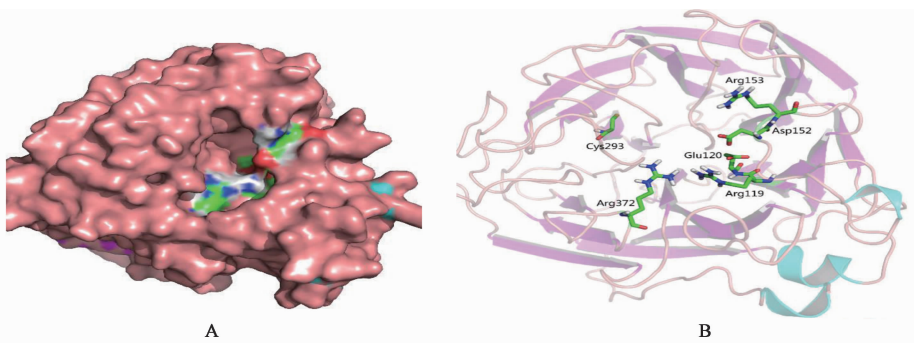
**1.1 TCM database@Taiwan 的处理和配体的准备** 抗呼吸道感染疾病的方剂来源于药源网、找药网、《中国药典》<sup>[11]</sup>和其他参考文献。遴选原则为①药品说明书功效主治含有感冒相关的关键词,诸如“感冒咳嗽”、“咽喉肿痛”、“鼻塞流涕”等。②经国家食品药品管理总局(CFDA)官方网站查询,具有“国药准字 Z……”批准文号。③药品主要成分均来自中草药。搜索得到 33 种较为常用抗呼吸道感染疾病的中药,包括桑叶、丹参、麻黄、金银花、桔梗、青蒿、大黄、板蓝根、甘草、菊花、红景天、五味子、黄芩、薄荷、茜草根、浙贝母、桑白皮、牛蒡子、栀子、芦根、黄连、大青叶、蒲公英、生地黄、柴胡、连翘、半夏、桑叶、丹参、麻黄、白芍、知母和防风。但是上述中药的化学成分复杂,为了筛选出药材中抗病毒的有效小分子化合物,研究其抗病毒机制,在 TCM database@Taiwan 数据库对已有中药进行查询整理,建立一个针对抗呼吸道感染的中药单体数据源,内含有 799 个小分子化合物,作为下一步高通量虚拟筛选的配体库。配体库中每一个小分子化合物需转换文件格式,利用 Autodock Vina 软件的配套工具 MGLTools 1.5.6 处理这些化合物,Gasteiger 电荷,合并非极性氢,由原先的 pdb 文件格式转成 Autodock Vina 程序可识别的 pdbqt 文件格式,作为对接前的初始配体结构。

**1.2 神经氨酸酶三维结构的选择、优化及活性位点设定** NA 蛋白结构文件来源于蛋白质晶体结构数据库 PDB。遴选原则为①所选靶点晶体结构来源于人源性 H7N9 甲型流感病毒病毒亚型。②晶体结构中氨基酸残基没有突变。③晶体结构分辨率  $< 1.8 \times 10^{-10}$  m。搜索到最适受体蛋白结构 4MWX(PDB 库中 ID 号)为 H7N9 甲型流感病毒神经氨酸酶(H7N9-NA)与乐感清的复合物晶体结构。将复合物晶体结构下载后,在 Discovery Studio 2.5 软件包对蛋白质进行处理,遵循以下原则:①删去配体分子及水分子。②修正非标准的原子名称。③补全不完整的残基。④删除多余的蛋

白质构象。⑤修正氨基酸中原子序号。⑥精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)侧链的质子化(pH 7.0),谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)的非质子化(pH 7.0)。

设定受体对接区域和受体活性氨基酸的对接位点,是基于受体结构的计算机辅助虚拟筛选的关键环节,这些受体活性口袋中氨基酸残基位点的确定,可作为分子对接的中心坐标及边界设定的重要参考数据。对 PDB 数据库进行系统搜

索,寻找已有甲型流感病毒 NA 的晶体结构,接着下载全部其蛋白质序列,采用免费进化分析软件 Mega 6.0<sup>[12]</sup> 软件包进行蛋白质序列同源性比对。文献已报到 NA 的活性口袋的位置,结合 NA 三维结构及序列比对结构,发现位于蛋白活性口袋的氨基酸残基 Arg119, Glu120, Asp152, Arg153, Arg293 和 Arg372 序列保守程度高,可作为新药设计的靶点关键氨基酸残基。见图 1。



A. 活性口袋; B. 活性部位的关键氨基酸

图 1 H7N9 亚型流感病毒神经氨酸酶的空间结构

Fig.1 Spatial structure of H7N9 subtype of influenza virus neuraminidase

**1.3 分子对接的原理及参数确定** 采用 AutoDock Vina 进行半柔性分子对接计算。半柔性对接指只改变小分子配体的构象,而保持受体蛋白的刚性不变,先产生受体结合部位的格点,然后利用拉马克遗传算法<sup>[10]</sup> 同时进行配体结构的优化和配体与受体的对接以寻找最佳的结合模式,最后采用半经验自由能函数来评价,由于优化方法较为复杂,其计算时间较其他分子软件也相对较长,但精度更高。以此理论基础上,AutoDock 在进行大规模配体库与靶点分子对接之前,还需要设置合理的对接参数。因此需要论证 AutoDock Vina 分子对接软件中参数设置的合理性。工作为①从 NA 蛋白晶体复合物 4MWX 中将原配体分子(乐感清)提取出来;②运行 AutoDock Vina 将 NA 受体与原配体重新对接到设定的活性中心(原配体所在空腔);③根据对接后的配体分子与原配体分子的均方根偏差(RMSD)判断对接参数设置的合理性。以  $RMSD \leq 0.2 \text{ nm}$  为成功对接的阈值,设定的对接格点盒子大小  $23 \times 23 \times 23 \text{ nm}^3$ ,为 AutoDock Vina 经过 30 次重复运行,其有效对接数为 16 次,最小 RMSD 仅  $0.095 \text{ nm}$ ,结合能的均值为  $-33.907 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,验证了对接参数的合理性,并通过打分函数计算得到预测受体与原配体的理论结合能力均值,可作为传统中药数据库高通量筛选 NA 抑制剂时结合活性高低的参考。

**1.4 分子对接的可行性验证** 以实验报道的 106 个已知 NA 抑制剂为研究对象<sup>[13-17]</sup>,文献收集整理其化学式及其活性实验数据  $pIC_{50}$  (半数抑制浓度的负对数)。利用 ChemBioOffice 2008 的 ChemDraw 模块将 106 个 NA 抑制剂进行编绘为二维结构式(cdx 格式文件),导入 Chem3D 模块中转换为三维格式。利用 MM2 力场对配体库进行能量优化,并存储为 mol2 格式结构文件。预处理结束后,应用上节已经设定好的参数对抑制剂配体小分子和 NA 受体进行逐个分

子对接。通过 AutoDock Vina 对接软件进行神经氨酸酶与已知阳性抑制剂对接实验,间接反映从中药分子库中利用分子对接策略大规模虚拟筛选 NA 抑制剂的可信性。

**1.5 自动化虚拟筛选** 分子对接过程需要 AutoDock Vina 软件及其配套程序 MGLTools 1.5.6 协作计算。Vina 的对接为半柔性对接,即设定配体是柔性的,受体是刚性的,基于拉马克遗传算法进行能量优化,对每个化合物进行 10 次对接。为了提高计算效率,节约人力成本,本课题组以 AutoDock 官网(<http://autodock.scripps.edu/>)提供虚拟筛选脚本为蓝本,进行改写 Vitural Screening.py 脚本,很大程度实现了自动化。分子对接参数依照上节优化的参数设定,energy evaluation 与 maximum number of generation 分别设定为 250 000 与 20 000,其余参数若非特殊指明,均为默认值。运行脚本 Vitural Screening.py,将 NA 与中药配体库中每一个分子逐一对接。打分函数采用半经验自由能打分函数。完成全部的分子对接后,根据打分函数的评价对中药配体库中所有小分子化合物进行排序,筛选得到打分前 50 个,进行聚类分析及受体配体氢键相互作用分析,选择结合构象相似、聚集程度高且氢键强度大的分子,以此作为候选的人源性 H7N9 甲型流感病毒 NA 抑制剂。

**1.6 运用构象分析、药代动力学预测及毒性预测进行二次筛选** 采用传统中药系统药理学数据库及分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)<sup>[18]</sup> 对前 50 个候选 NA 抑制剂进行药代动力学参数预测。TCMSP 是一个全新的以系统药理学为基础的中药药物研究平台及数据库,已被 SCI 刊物引用 26 次,固定用户有 1 800 多人,囊括了所有 2010 年版《中药药典》中收录的全部中药药材的组分数据,包括 13 144 个分子及 29 384 个化合物。该数据库包含了每个化合物不同

来源的 12 个关键的 ADME/T 性质、类药性等,以用于活性化合物的筛选。通过该数据库,研究者可方便、准确地找到某一味药的各类性质,并将其用于中药机制的深入研究、新药开发或中医药基础理论的科学解释。每个分子具体的参数信息、筛选标准和计算方法均可以从 TCMSp 数据库网站上得到 ([http://sm.nwsuaf.edu.cn/lsp/load\\_intro.php?Id=29](http://sm.nwsuaf.edu.cn/lsp/load_intro.php?Id=29))。因篇幅有限,只针对一些主要参数的算法作简要说明。

①生物口服利用度(oral bioavailability, OB)是药物 ADME 特性中最重要的药代动力学参数之一,它表示一个口服药剂剂量能够产生药效的百分数。OB 预测模型是该课题组自主建立一套可预测口服利用度的数学模型 OBioabiavl 1.1 和一个 OB 整合预测系统(IntegOB)<sup>[19]</sup>。②类药性(drug-likeness, DL)评估模块使用了 Tanimoto 参数<sup>[20]</sup>,见公式。

$$T(x, y) = xy / (|x|^2 + |y|^2 - xy)$$

式中  $x$  是基于 DRAGON 软件 ([http://www.taletе.mi.it/products/DRAGON\\_description.htm](http://www.taletе.mi.it/products/DRAGON_description.htm)) 计算分子描述符,  $y$  是 DrugBank 数据库 (<http://www.drugbank.ca/>) 中所有药物的平均描述符。类药性  $>0.18$  的化合物被认为是具有较高的类药

表 1 ADME/T 参数建议筛选标准

Table 1 Screening criteria suggested by ADME/T parameters

参数	筛选标准	参数	筛选标准
口服生物利用度	$\geq 30\%$	类药性	$\geq 0.18$
血脑屏障通透性	$\leq -0.3$ (非穿透性) $-0.3 \sim 0.3$ (中等穿透性) $\geq 0.3$ (高穿透性)	潜在毒性	$0 \sim 0.3$ (低概率) $0.3 \sim 0.7$ (中等概率) $0.7 \sim 1.0$ (高概率)
拓扑分子极性表面积	$\leq 6 \times 10^{-19} \text{ m}^2$ (可穿透细胞膜)	可旋转键数	$\leq 10$ 个
相对分子质量	180 ~ 500 Da	肠道吸收率	视情况而定

1.7 受体与配体复合物相互作用的图像演示 NA 与候选活性抑制剂的分子对接结果采用分子图形开源软件 Pymol-v0.99 分子软件处理作图。用 Pymol 对结合自由能最低且符合药代动力学的 2 个配体受体复合物进行 3D 建模,土贝母皂苷甲以棍棒模式(stick style)表示结构,不同元素用不同颜色。靶点蛋白以卡通模式(cartoon style)模式显示高级结构。参与小分子相互作用的氨基酸显示在蛋白表面内部,并且标注氨基酸编号,红色虚线表示氢键。运用 MOE 2008 软件演示受体配体复合物间的氢键作用及疏水作用的示意图。

## 2 结果分析

2.1 分子对接的可行性验证 利用 AutoDock Vina 分子对接软件进行 106 个已知 NA 抑制剂与 NA 蛋白受体进行逐一分子对接计算,发现实验活性值( $\text{pIC}_{50}, X$ )与 AutoDock 计算的对接打分值(binding energy,  $\Delta G, Y$ )之间具有显著的相关性( $Y = -1.221 2X - 3.535 9, R^2 = 0.823 1, SD = 0.309 2$ ),见图 2。此实验数据验证了本文选择 AutoDock Vina 软件包中分子对接算法及其打分函数的可行性,为下阶段基于传统中药配体库进行大规模计算机虚拟筛选工作的可靠性提供

性。阈值确定为 0.18 是因为 DrugBank 数据中的药物平均类药性为 0.18。③血脑屏障通透性(blood-brain barrier, BBB)预测模型是该课题组对先前开发的、基于 190 个结构各异的不同家族的化合物数据的内部 BBB 模型<sup>[21]</sup>做了改进,使用偏最小二乘判别分析法建立了新的血脑屏障模型。其中,当化合物  $\text{BBB} < -0.3$  时认为该分子不能穿透血脑屏障(即  $\text{BBB}^-$ ),而 BBB 处于  $[-0.3, +0.3]$  区间则被认为具有一定的渗透性( $\text{BBB}^\pm$ ), $\text{BBB} > 0.3$  被认为具有较强渗透性( $\text{BBB}^+$ )。

前 50 个候选 NA 抑制剂的毒性预测,采用 Discovery Studio 2.5 软件包中的专利化 TOPKAT 模块,通过化合物的二维结构信息构建高质量的 QSTR(定量结构-毒性关系)模型<sup>[9]</sup>,以此对各类有机化合物的诸如急性毒性、慢性毒性、诱变性、再生性等性质进行预测,同时还可以考虑化合物对环境毒性的影响,大大节省了实验的时间和投入。综上所述,50 个候选小分子化合物的 ADME/T 参数分别采用 TCMSp 分析平台预测药代动力学参数,并基于 TOPKAT 模块预测毒性参数(toxicity potential, TP),得到的打分值依据表 1 标准进行二次筛选。

了理论依据。

2.2 虚拟筛选分析 选取分子对接结果中打分前 50 个小分子化合物进行分子对接结合构象、药代动力学参数及毒性预测全面分析,以乐感清作为阳性对照,参考其对接结合构象、药代动力学参数及毒理学参数,最终得到了 3 个潜在的神经氨酸酶小分子抑制剂,预测参数见表 2,3。这 3 个候选分子可能成为有效的抑制神经氨酸酶,并同时符合类药分子的药代动力学参数及低毒性质。

2.3 神经氨酸酶与候选抑制剂的结合模式预测 乐感清与神经氨酸酶蛋白受体形成 9 个氢键,形成 1 个氢键相互作用的氨基酸残基是 Arg119, Arg153, 色氨酸(Trp)180, Lys194 和 Arg372,形成了 2 个氢键相互作用的氨基酸残基是 Arg152 和 Glu278,见图 2。

参考乐感清与 NA 的结合模式,从 50 个打分值靠前的配体小分子,进一步筛选得到 3 个候选抑制剂,它们表面结构特征均含有较多的易于形成氢键的氧原子团,更倾向与 NA 受体蛋白的关键氨基酸形成氢键相互作用。并且与乐感清的结构具有一定的相似性,不同程度地与受体蛋白神经氨酸酶活性位点 Arg119, Arg152, Arg153, Trp180, Glu278, Lys294

表 2 候选小分子抑制剂的分子对接预测

Table 2 Molecule docking prediction of potential small molecule inhibitors

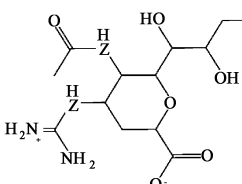
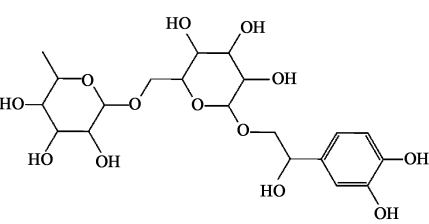
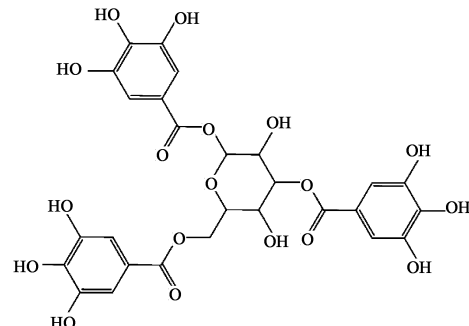
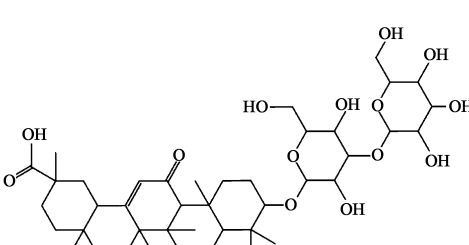
化合物	中草药来源	结合能 /kJ·mol <sup>-1</sup>	氢键数 /个	相互作用的基团	化学结构式
乐感清		-35.162	9	Arg119 (1), Arg152 (2), Arg153 (1), Trp180 (1), Glu278 (2), Lys294 (1), Arg372 (1)	
连翘酯苷 D (TCM3129)	连翘	-37.674	11	Arg372 (1), Tyr406 (1), Gly349 (1), Asn296 (2), Lys294 (1), Asn223 (1), Gly246 (1), Glu279 (1), Glu229 (1), Asp152 (1)	
β-葡萄糖 (TCM8541)	大黄	-40.186	11	Asn223 (1), Gly246 (1), Arg226 (1), Arg153 (1), Trp180 (2), Arg372 (1), Arg119 (1), Lys294 (2), Asn296 (1)	
乌拉尔甘草皂苷 B (TCM8747)	甘草	-41.441	9	Ala370 (1), Arg372 (1), Arg153 (1), Trp180 (1), Glu229 (1), Asp152 (1), Glu120 (1), Lys294 (1), Glu278 (1)	

表 3 候选小分子抑制剂的药代动力学参数及毒性预测

Table 3 Pharmacokinetic parameters and toxicity prediction of potential small molecule inhibitors

化合物	相对分子质量/Da	脂水分配系数	氢键供体数 /个	氢键受体数 /个	口服生物利用度 /%	人类肠道吸收率	血脑屏障通透性	类药性	拓扑分子极性表面积/m <sup>2</sup>	可旋转键数 /个	潜在毒性
乐感清	233	-5.17	7	8	-	-	-	-	-	7	0.49
TCM3129	479	-5.43	9	13	52.6	-2.40	-3.03	0.67	2.199 × 10 <sup>-19</sup>	9	0.41
TCM8541	437	-4.21	11	18	30.1	-2.00	-3.29	0.54	3.166 × 10 <sup>-19</sup>	10	0.52
TCM8747	523	-5.42	8	16	79.2	-2.60	-3.17	0.31	2.604 × 10 <sup>-19</sup>	11	0.42

注:乐感清为西药,无法从传统中药系统药理学数据库及分析平台 TCMSP 中获取药代动力学参数。

和 Arg372 中 3~5 个氨基酸残基形成氢键,其中 TCM3129 还与受体的 Tyr406, 甘氨酸 (Gly) 349, 天冬酰胺 (Asn) 296, Asn223, Gly246, Glu279 和 Glu229 形成氢键;TCM8541 与 Asn223, Gly246, Arg226 和 Asn296 形成氢键;TCM8747 与丙氨酸 (Ala) 370, Glu229, Glu120 形成氢键。基于配体受体结

合模式的分析,可以推断候选抑制剂不仅与关键氨基酸残基 Lys294, Arg372 发生共同作用,而且与除此之外的 7~9 个氨基酸残基发生氢键相互作用。因而这 3 个候选抑制剂与神经氨酸酶蛋白受体的结合较乐感清更稳定,结合能更低,见图 3~5。

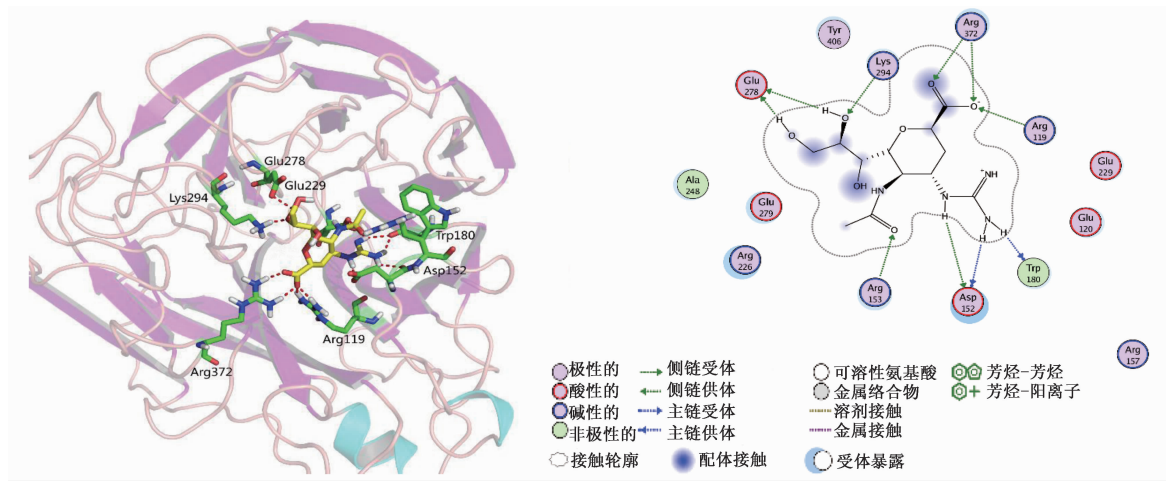


图 2 NA 与乐感清的对接模式 (左), 相互作用 (右)

Fig. 2 Docking mode (left) and interaction (right) between NA and Zanamivir

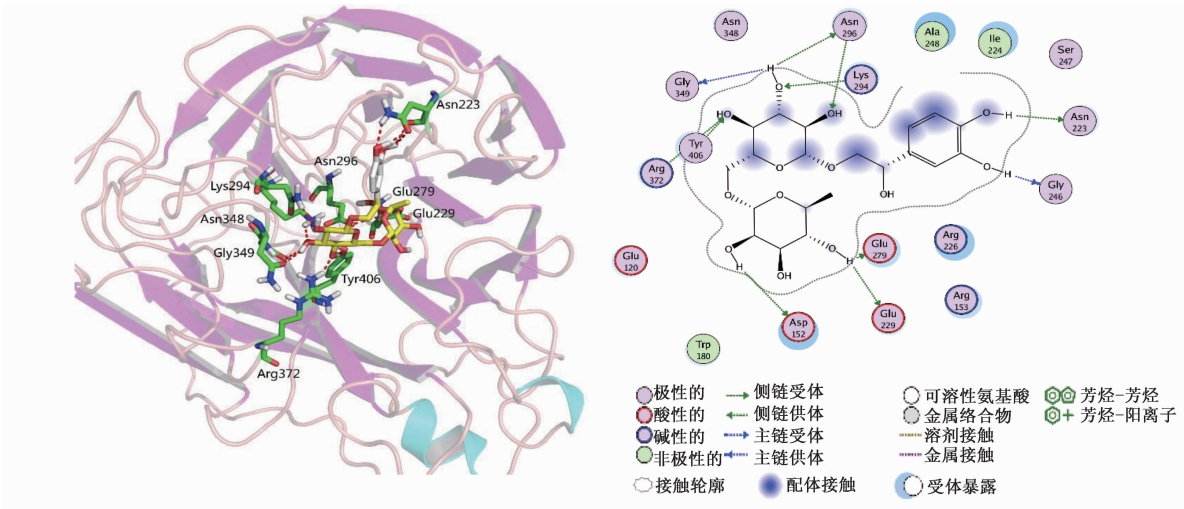


图 3 NA 与 TCM3129 的对接模式 (左), 相互作用 (右)

Fig. 3 Docking mode (left) and interaction (right) between NA and TCM3129

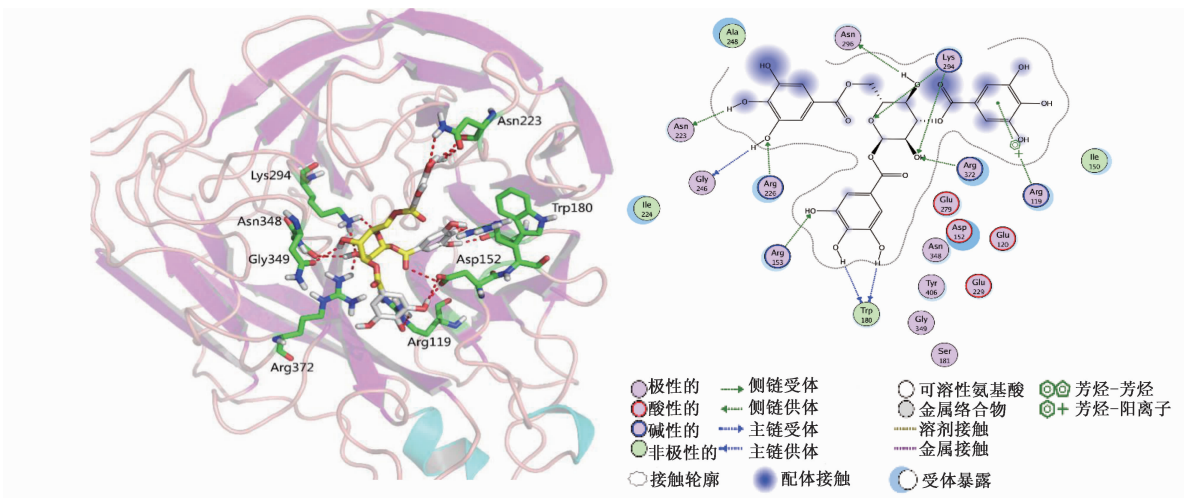


图 4 NA 与 TCM8541 的对接模式 (左), 相互作用 (右)

Fig. 4 Docking mode (left) and interaction (right) between NA and TCM8541

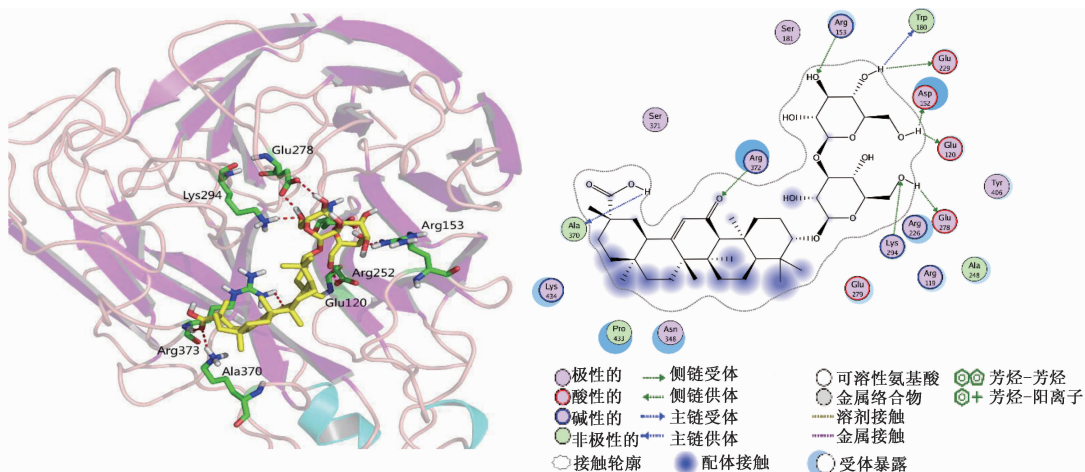


图 5 NA 与 TCM8747 的对接模式 (左), 相互作用 (右)

Fig. 5 Docking mode (left) and interaction (right) between NA and TCM8747

综上所述,通过呼吸道感染的中医药经方进行发掘整理,锁定 30 种治疗流感病毒的常见中药,建立含有 799 个小分子化合物的配体库,以人源性 H7N9 甲型流感病毒神经氨酸酶为靶点,利用 Autodock Vina 分子对接软件进行蛋白靶点与药物小分子配体对接,以初次筛选的小分子化合物与靶点蛋白的自由结合能做排序,综合运用 TCMSp 分析平台及 Discovery Studio 2.5 软件包内 TOPKAT 模块预测候选化合物药代动力学及毒性参数预测,以此对分子对接结果进行二次筛选,成功建立一套完善的高通量虚拟筛选流程,最终从传统中药数据库中筛选出 3 个候选抑制剂。分子对接的结果显示受体神经氨酸酶与 3 个候选抑制剂均可发生相互作用,其中氢键相互作用占较大权重,因而较容易直接进入受体的口袋形成空间位阻效应,导致宿主体内受体蛋白与唾液酸无法正常结合。

### 3 讨论

创制新型药物的一个重要源泉是传统中药中天然活性化合物的多样性,我国资源丰富、种类多样的中药决定了其天然产物的多样性。由于天然产物结构的独特性和新颖性,在此基础上寻找有效的先导化合物成为药物研发的重要途径,如吗啡、麻黄碱、紫杉醇、青蒿素等药物均来源于天然产物。由于中药中天然化学成分冗杂,作用靶点十分复杂,分离纯化技术有限,即便将各天然产物提纯并进行相关药理学测试,其成本昂贵、效率低下,且只能进行极其有限的活性筛选。计算机辅助药物设计作为一种全新的药物研发手段,基于原子、分子层面探究小分子化合物与靶点的相互作用,拓展了崭新的药物研发策略。目前中药化学成分数据库可以向科学家针对特定中药或复方提供完整正确的有关化学成分信息,在此基础上组建天然产物组合配体库,从有效靶点为突破口,利用计算机高通量虚拟筛选候选先导化合物,为进一步活性验证试验提供较为可靠的数据,避免后期实验的盲目性,提高命中率,更重要的是缩短药物研发周期,降低药物研发成分。

蛋白的相互识别、相互作用。药物小分子与相应受体之间存在着互补性,包括形状的适配、电性的互补和力场的契合等,均可引发分子识别。基于受体三维结构设计新型药物的理论基础就是分子识别,其中分子对接计算就是这种理论的具体应用。分子对接常用策略是搜选配体在受体的定位,正确有效的药物小分子定位是启发药理活性的根源。首先药物小分子与靶点蛋白活性中心相互形状匹配识别,然后用受体-配体复合物分子内原子距离配对的方法模拟配体与受体的相互作用,最后基于打分函数评价结合有效性,给予药理活性实验提供候选化合物。故分子对接成为了计算机辅助药物设计的研究热点,在新药的研发中分子对接技术已得到广泛应用,并且取得了一些可喜佳绩<sup>[22-23]</sup>。

有效性、安全性及药代动力学 3 项指标的全面评估是一个成功药物研发的关键。以往的计算机虚拟药物筛选局限于分子对接方法的应用,仅仅预测受体与配体之间的相互作用,较少关注甚至缺失药物分子体内代谢过程的预测。药物的 ADME/T 参数预测大体涵盖了候选药物进入体内代谢性质的系统评估,即吸收 (absorption, A), 分布 (distribution, B), 代谢 (metabolism, M), 排泄 (excretion, E) 等方面,加之毒性 (toxicity, T)。在药物研发过程中,不但要评估配体与受体之间的相互作用,而且需要评估候选药物分子的药代动力学参数 (ADME), T 和类药性、化学稳定性、合成难易性等性质,这些工作对于提高计算机虚拟筛选策略的命中率至关重要。如果仅仅重视候选药物分子有很强的靶点受体亲和性,却忽略了目标化合物体内代谢、毒理学、生物利用度中测试中表现不佳的状况,在这方面案例发生在很多大型研究机构和跨国制药公司<sup>[24-25]</sup>,说明配体设计不等同于药物设计,对候选化合物的前期的 ADME/T 性质进行预测及综合评价,新药研发策略从先期串行流程向并行流程转变,ADME/T 研究显得越来越重要。

本文采用分子对接和 ADME/T 预测相结合的方法,从 TCM database@Taiwan 中快速筛选出了 3 个与人源性 H7N9 甲型流感病毒神经氨酸酶相互作用强并且类药性良好的化

合物,为从我国丰富的中药材资源中提取、设计及合成新的神经氨酸酶抑制剂研发提供宝贵数据,并有助于揭示小分子抑制剂与 NA 的作用机制。

[参考文献]

[ 1 ] Alcorn T. As H7N9 spreads in China, experts watch and wait [ J ]. Lancet, 2013, 381 ( 9875 ) : 1347.

[ 2 ] 张宝,黄克勇,郭劲松,等. H7N9 病毒的来源和重组模式 [ J ]. 南方医科大学学报, 2013, 33 ( 7 ) : 1017-1021.

[ 3 ] Horby P. H7N9 is a virus worth worrying about [ J ]. Nature, 2013, 496 ( 7446 ) : 399.

[ 4 ] No authors listed. From SARS to H7N9: will history repeat itself? [ J ]. Lancet, 2013, 381 ( 9875 ) : 1333.

[ 5 ] Gubareva L V, Penn C R, Webster R G. Inhibition of replication of avian influenza viruses by the neuraminidase inhibitor 4-guanidino-2, 4-dideoxy-2, 3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid [ J ]. Virology, 1995, 212 ( 2 ) : 323-330.

[ 6 ] Colman P M, Varghese J N, Laver W G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase [ J ]. Nature, 1983, 303 ( 5912 ) : 41-44.

[ 7 ] McKimm-Breschkin J L. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors—a review [ J ]. Antivir Res, 2000, 47 ( 1 ) : 1-17.

[ 8 ] Sanderson K. Databases aim to bridge the East-West divide of drug discovery [ J ]. Nat Med, 2011, doi: 10.1038/nm1211-1531a.

[ 9 ] Accelrys Software Inc, Discovery Studio Modeling Environment. Release 2.5 [ EB/OL ]. [ 2015-05-02 ]. <http://accelrys.com/about/legal/>.

[ 10 ] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [ J ]. J Comput Chem, 2010, 31 ( 2 ) : 455-461.

[ 11 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [ S ]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1354-1355.

[ 12 ] Tamura K, Stecher G, Kumar S, et al. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [ J ]. Mol Biol Evol, 2013, 30 ( 12 ) : 2725-2729.

[ 13 ] Zheng M, Yu K, Liu H, et al. QSAR analyses on avian influenza virus neuraminidase inhibitors using CoMFA, CoMSIA and HQSAR [ J ]. J Comput Aided Mol Des,

2006, 20 ( 9 ) : 549-566.

[ 14 ] Lommer B S, Ali S M, Bajpai N B, et al. A benzoic acid inhibitor induces a novel conformational change in the active site of influenza B virus neuraminidase [ J ]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004, 60 ( 6 ) : 1017-1023.

[ 15 ] Wu H, Lew W, Mendel D B, et al. A new series of C3-aza carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors: synthesis and inhibitory activity [ J ]. Bioorg Med Chem Lett, 1988, 8 ( 23 ) : 3321-3324.

[ 16 ] Cui Y, Jiao Z D, Gong J X, et al. Development of new stere diverse diaminocyclitols as inhibitors of influenza virus neuraminidase [ J ]. Org Lett, 2010, 12 ( 1 ) : 4-7.

[ 17 ] Guo C T, Sun X L, Kanie O, et al. An *O*-glycoside of sialic acid derivative that inhibits both hemagglutinin and sialidase activities of influenza viruses [ J ]. Glycobiology, 2002, 12 ( 3 ) : 183-190.

[ 18 ] Ru J L, Li P, Wang J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [ J ]. J Cheminform, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.

[ 19 ] Xu X, Zhang W, Huang C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [ J ]. Int J Mol Sci, 2012, 13 ( 6 ) : 6964-6982.

[ 20 ] Yamanishi Y, Kotera M, Kanehisa M, et al. Drug-target interaction prediction from chemical, genomic and pharmacological data in an integrated framework [ J ]. Bioinformatics, 2010, 26 ( 12 ) : 1246-1254.

[ 21 ] 李兰婷,李燕,王永华,等. 基于分子参数的血脑屏障通透性预测模型 [ J ]. 中国药物化学杂志, 2007, 17 ( 4 ) : 221-228.

[ 22 ] Cozza G, Bonvini P, Zorzi Z, et al. Identification of ellagic acid as potent inhibitor of protein kinase CK2: A successful example of a virtual screening application [ J ]. J Med Chem, 2006, 49 ( 8 ) : 2363-2366.

[ 23 ] Zhao L Q, Brinton R D. Structure-based virtual screening for plant-based ER $\beta$ -selective ligands as potential preventative therapy against age-related neurodegenerative diseases [ J ]. J Med Chem, 2005, 48 ( 10 ) : 3463-3466.

[ 24 ] Oprea T L. Virtual screening in lead discovery: A viewpoint [ J ]. Molecules, 2002, doi: 10.3390/70100051.

[ 25 ] Schneider G. Virtual screening: an endless staircase [ J ]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9 ( 4 ) : 273-276.

[责任编辑 刘德文]