

Computer Aided Design of New PHD Inhibitors for Oral Anti-Anemia Drug Molecules

Hanyue Yang*, Shubo Dong, Xuemin Chen

Jiangsu Deyuan Pharmacy Co., Ltd., Lianyungang Jiangsu
Email: *yanghanyue01@163.com

Received: May 5th, 2017; accepted: May 21st, 2017; published: May 24th, 2017

Abstract

A series of small molecule compound structures oral administration anti-anemia drugs were designed based on target protein. Small molecule drug designed in this project is targeted at renal and cancer related anemia. Anemia treatment field, especially diabetic anemia, is a very promising market. As a new kind of anemia inhibitor, HIF-PHD inhibitors could obtain a larger market share from erythropoietic drugs for injection, especially pre-dialysis patients with chronic kidney diseases. More importantly, this kind of drugs could be used as a new, effective replacement therapy for those patients that could not be treated by the existing erythropoietic drugs for that the drugs are invalid for them, or cannot be used for them for some other reasons, or too expensive for them to afford to. So, the potential drugs with better therapeutic effects, less adverse effects, and oral administration developed on the basis of structural characteristic of known active compound and its mechanism of action with target proteins, are doomed to hold a place in the field of anemia treatment. By combining theoretical calculation and practical test together via computer aided drug design, with the computer's simulation, calculation and estimation on the relationship between drugs and biological receptor molecules, this project starts from designing and optimizing the leading compounds of proline hydroxylase inhibitors, then carrying out *In Vitro* experiments to verify the theoretical activity, which is of great application value for discovering greater potential active agents. Result: A series of compounds with indole as the parent nucleus structure were designed and some molecular compounds were theoretically confirmed by molecular docking as potential reactive compounds. Conclusion: It has laid a theoretical foundation for the development of new oral anti-anemia drugs.

Keywords

Anemia, Prolyl Hydroxylase Domain Enzyme Inhibitor, Drug Design, Indole

*通讯作者。

新型PHD抑制剂类口服抗贫血药物分子的计算机辅助设计

杨汉跃, 董淑波, 陈学民

江苏德源药业股份有限公司, 江苏 连云港

Email: yanghanyue01@163.com

收稿日期: 2017年5月5日; 录用日期: 2017年5月21日; 发布日期: 2017年5月24日

摘要

目的: 以目标靶蛋白为研究对象设计一系列可口服的抗贫血类化学药物分子结构。方法: 本文针对肾性和肿瘤相关性贫血设计口服小分子治疗药物。贫血, 特别是糖尿病性贫血治疗领域是一个非常有前景的市场。HIF-PHD抑制剂作为新型治疗贫血药物, 可从注射用促红细胞生成药物, 尤其是透析前慢性肾病患者中获取较大的市场份额。更重要的是, 由于这类药物可作为对现有促红细胞生成药物治疗无效或因故不能使用、或因价格太贵而未使用人群的一种新的、有效的替代治疗选择, 故也显著拓展贫血治疗市场规模的潜力。通过对已知有活性的化合物的结构特性以及与靶蛋白的作用机制为基础进行研究, 设计合成出治疗效果更好的、副作用更小的潜在治疗贫血的口服药物, 在贫血治疗领域必将占有一席之地。采用计算机辅助药物设计将理论计算和实际试验相结合, 通过计算机的模拟、计算和预算药物与受体生物大分子之间的关系, 设计和优化脯氨酸羟化酶抑制剂类先导化合物。采用体外模拟试验进行理论验证, 以期对发现新的具有更大的潜在活性药物提供较大的应用价值。结果: 设计出一系列以咪唑为母核结构的化合物分子, 通过分子对接从理论上证实其中一些分子化合物为潜在的活性化合物。结论: 为新型口服抗贫血化学药物的开发奠定了一定的理论基础。

关键词

贫血, 脯氨酸羟化酶抑制剂, 药物设计, 咪唑

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

贫血是慢性肾脏病(CKD)和肿瘤最常见的并发症, 也是导致 CKD 和心血管并发症的发病率及死亡率增加的重要危险因素, 显著影响患者生活质量[1] [2] [3]。至今, 贫血治疗市场目前几乎全被促红细胞生成药物(rhEPO)垄断[4] [5] [6]。尽管这类药物目前在市场上成为治疗贫血领域不可替代的药物, 但其依然存在许多不足之处[7]。如可能会使患者的死亡几率增加、产品价格昂贵、并且 rhEPO 采用注射给药, 增加患者的痛苦等。所以, 一种新的治疗方法, 即经稳定缺氧诱导因子(HIF)刺激 EPO 的生成来治疗贫血正成为该领域的研究热点[8] [9] [10] [11]。

脯氨酸羟化酶(PHD)抑制剂作为治疗贫血的一种新抑制剂, 尽管具有明显的治疗优势和商业价值, 但此类药物研究时间尚短, 尚未积累各药物与靶点结合的特异性以及由此带来的副作用, 应该进一步研究清楚 PHD、HIF 以及 PHD 抑制剂之间各自的结构和相互作用方式, 从而针对某一特定疾病或特定效应研发更为特异的抑制作用, 为未来将 PHD 抑制剂用于临床疾病的治疗开辟新的道路[12] [13] [14] [15], 本文以已知的先导化合物的生物活性为基础, 进行药物分子与 PHD 间构效关系的分析, 对药物分子的结构进行修饰和改造, 以期得到比先导化合物更为优秀的化合物, 可以在化合物的生物活性、生物利用度、靶点选择性、毒性副作用等方面有所提高。

2. 材料与方法

2.1. 材料

分子对接使用 Autodock4.2 软件; 小分子构建、结构优化、图形展示及数据分析均在 Sybyl7.3 中完成。

2.2. 方法

本文采用计算机辅助药物设计将理论计算和实际试验相结合, 以 PDBID 3HQU 为研究对象, 通过计算机的模拟、计算和预算药物与受体生物大分子之间的关系, 采用包括前药设计、电子等排替换以及手性研究等方法, 设计和优化脯氨酸羟化酶抑制剂类先导化合物。进而采用体外的分子对接模拟试验进行理论验证。本文采用 autodock4.2 软件, 对设计的 10 个化合物与蛋白质(PDBID:3HQU)进行分子对接和相关的计算。其中由共晶的小分子位于蛋白质中心一个口袋中, 初步判断为药物的活性区域, 设计分子对接盒子大小为 90*90*90, 中心位置是(-39.984, 23.627, -5.102), 其余参数均为软件默认值。

2.3. 统计学方法

配体柔性对接的设置选项中限制原子或键的浮动, 利用预配置进行精确对接。打分函数选择分子力场函数 GOLDScore, 根据得分(fitness score)高低确定配体小分子的抑制活性高低。

3. 结果与讨论

3.1. 构型关系研究

我们以 PDBID 3HQU 为研究对象, 通过分析处理测试(APBS)计算发现, PHD 活性口袋属于亲水性口袋, 口袋允许药物分子的亲水基团进入, Fe^{2+} 位于活性口袋的中上部(接近开口位置), Fe(II) 分别与 His374, Asp315, His313 三个氨基酸残基的 N 原子形成配位键, 键长为 2.2angstrom。3HQU 的作用类似与 beta-葡萄糖苷酶(beta-glucosidase), 蛋白质的中间存在一个活性的空腔, 活性口袋狭长, 仅适合直链型的药物基团伸入, 位阻过大不能进入。且活性口袋两侧蛋白质表面有凹槽, 见图 1。

分子对接研究表明, 配体结构(HIF PHD 抑制剂药物)可以划分 3 个部分, 其中 Domain1 区域是羧酸或者其他亲水的基团, 使之能够插入 PHD 蛋白质的亲水活性口袋, 其分子中的羧酸基团可以与 PHD2 上的 Arg383A 形成盐桥作用, 羧酸基团上的羰基可以与 PHD2 上的 Tyr329A 形成氢键作用。PHD 蛋白类似与 beta 葡萄糖苷酶, 都是属于水解蛋白(位于蛋白质中央有一个亲水的活性空腔, 在口袋内发生水解、羟化反应)。这个是药物进入空腔发挥活性的一个重要条件; 其二, Domain2 部分要有 N, O 等带孤对电子对的配位原子与之金属离子形成配位的五元环(或六元环)螯合物, 进一步增强药物的活性; 第三, Domain3 考虑接上一些苯环和其他的疏水基团, 主要是考虑在活性口袋周围存在一些疏水的凹槽, 一般蛋白质的周围是水包围着的, 如果 Domain3 基团通过疏水作用和芳环重叠的作用与蛋白质结合, 会增强药物和蛋白质的总体亲和力, 从而抑制 PHD 的生理活动, 见图 2。

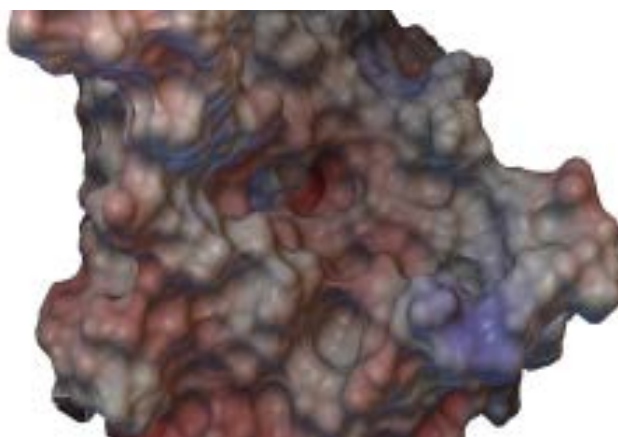


Figure 1. Spatial configuration of PHD (PDBID: 3HQU)
图 1. PHD 空间构型图(PDBID:3HQU)

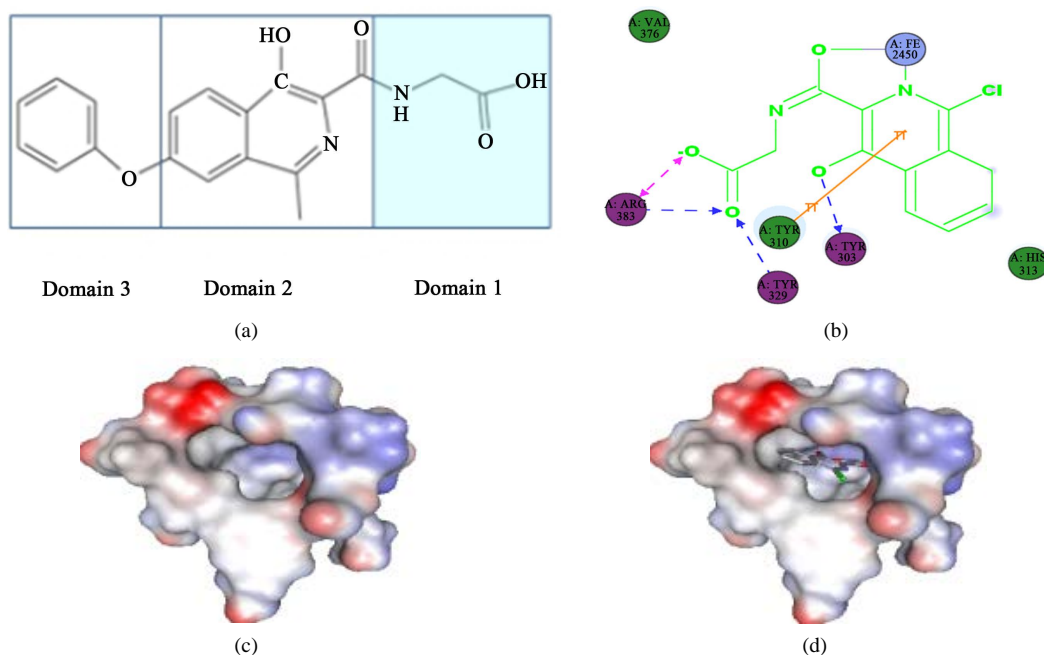


Figure 2. The interaction graphs of receptor and ligand. (a) Structure of FG-2216; (b) The interaction graph of FG-2216 and 3HQU; (c) Spatial configuration of 3HQU; (d) Spatial configuration of FG-2216 and 3HQU.

图 2. 药物分子与靶蛋白相互作用图。(a)为 FG-2216 分子结构；(b)为 FG-2216 受体与靶蛋白 3HQU 相互作用图；(c)为 3HQU 蛋白空间构型图；(d)为 FG-2216 与 3HQU 相互作用空间构型图

基于总结的三个区域的作用，由于 Domain1 的区域已经受到专利保护了，只有舍弃这个区域，应为活性的口袋是一个整体，如果同时具备和金属离子配位和疏水作用，也可以起到和蛋白质结合抑制蛋白质活性的作用。有文献研究报道也有舍弃 Domain1 区域的。Domain1 是和口袋形成氢键或者说是盐桥效应。另外一种思路是，忽略 Domain1 的专利保护，将 Domain1 区域的结构作为一个单独分子与设计的分子混合使用。金属离子的配位，要达到形成 5, 6 元环螯合物最稳定，N, O 配位原子之间最好是刚性的结构，相隔 2, 3 个原子。

PHD 蛋白质的活性口袋是单开口的亲水空腔，如果能结合金属离子配位和疏水作用，增强药物和蛋白质的结合力，也能够通过药物塞住这个活性空腔，阻断其生理作用。

此外，我们以“PHD2”作为关键字在 RCSB 的 cambridge protein database 搜索，可以查询到 40 个相关蛋白质结构，经过筛选确定 17 个蛋白质，见表 1。对上述 17 个蛋白质的 APBS 计算发现，活性口袋以及周围的亲水、疏水等特性类似。通过软件对每组的蛋白质进行对齐发现，3HQU 与 3HQR 差异性最大，结构分析发现 3HQR 蛋白以 Mn 为口袋的金属离子时，活性口袋开口变狭小。与此同时，在 NCBI 上查询 PUBCHEM COMPOUND 数据库，查询到 19 个 PHD 相关的配体文件，结合在一起研究不同配体和不同蛋白质的作用。结构分析发现：金属离子相同的蛋白质，空间结构类似，包括蛋白质的形状，口袋的形状、亲水性等，但是 Fe、Mn 离子的口袋开口较 Ni 离子的为大，因此考虑 Domain1、Domain2 两个区域的基团不能太大，甚至如果是苯环或者有支链位阻比较大的均不能顺利插入活性口袋中，从而不能产生活性。

3.2. 分子设计及分子对接

基于分子结构骨架跃迁和电子等排原理设计，以吡啶类化合物为母核结构设计了一系列具体的小分子化合物结构，并进行分子对接研究，结果见图 3。

从已知的药物分子与 3HQU 蛋白结合的结果可知，受体蛋白中的活性部位在 FE2450 周围，而此次设计的分子中，其对接后的结果大部分符合设计的要求，准确对接在 3HQU 蛋白质分子的活性部位上。从上述分子进行对接的结果来看，与蛋白质分子受体结合后的能量最低的是 Ligand 6，分子构象最低结合能为-14.67 kcal/mol。与配体作用的氨基酸有 ILE256、ILE327、ASP254、TYR303、TYR310、HIS374、HIS313、ASP315、MET299。其中疏水的氨基酸有 ILE256、ILE327、MET299；亲水氨基酸有 TYR303、TYR310；带正电性的氨基酸有 HIS374、HIS315；带负电性的氨基酸有 ASP315、ASP254 等。疏水的氨基酸和带负电性的氨基酸主要分布在配体分子的尾部即吡啶环附近，亲水的氨基酸主要与分子中部的氢原子形成氢键，增加结合度。带有正电性的氨基酸 HIS374 和 HIS315 与配体分子羧基形成共价键，将配体分子牢牢锁住，这也是配体分子与蛋白质受体紧密结合的重要原因(图 4)。

通过分子对接得出的结果可知配体分子含有一个羧基可以增加与受体蛋白 3HQU 的结合度。1 号配体和 4 号配体对接的结果我们猜测与羧基相连的 C 上连上带有吸电子基团的羰基能增强羧基水解，从而使羧基与 HIS374 和 HIS313 结合的共价键更牢固(图 5)。

4. 结论

本文以已知的先导化合物的生物活性为基础，进行构效关系的分析，对药物分子的结构进行修饰和改造，避开已有的化合物专利保护，以期得到比先导化合物更为优秀的化合物，可以在化合物的生物活性、生物利用度、靶点选择性、毒性副作用等方面有所提高。本文设计的小分子药物主要是针对肾性和肿瘤相关性贫血。长期垄断该市场的药物几乎都是生物药 EPO，且均是通过注射给药，而 FibroGen 的

Table 1. The alignment results of 17 PHD2 protein's spatial structure

表 1. 17 个 PHD2 蛋白空间结构对齐结果

PDBID	ALIGNED (SIMPLICITY)	PDBID	ALIGNED (SIMPLICITY)
2G19 (Fe), 2G1M (Fe)	0.249	2Y33 (Zn), 2Y34 (Fe)	0.193
3HQU (Fe), 3HQR (Mn)	0.499	3OUH (Fe), 3OUI (Fe), 3OUJ(Fe)	0.318 0.361
4BQW (Mn), 4BQX (Mn), 4BQY (Fe)	0.163 0.140	4JZR (Ni), 4KBZ (Fe), 4UWD (Fe)	0.335 0.239
2HBT (Fe), 2HBU (Fe)	0.120	-	-

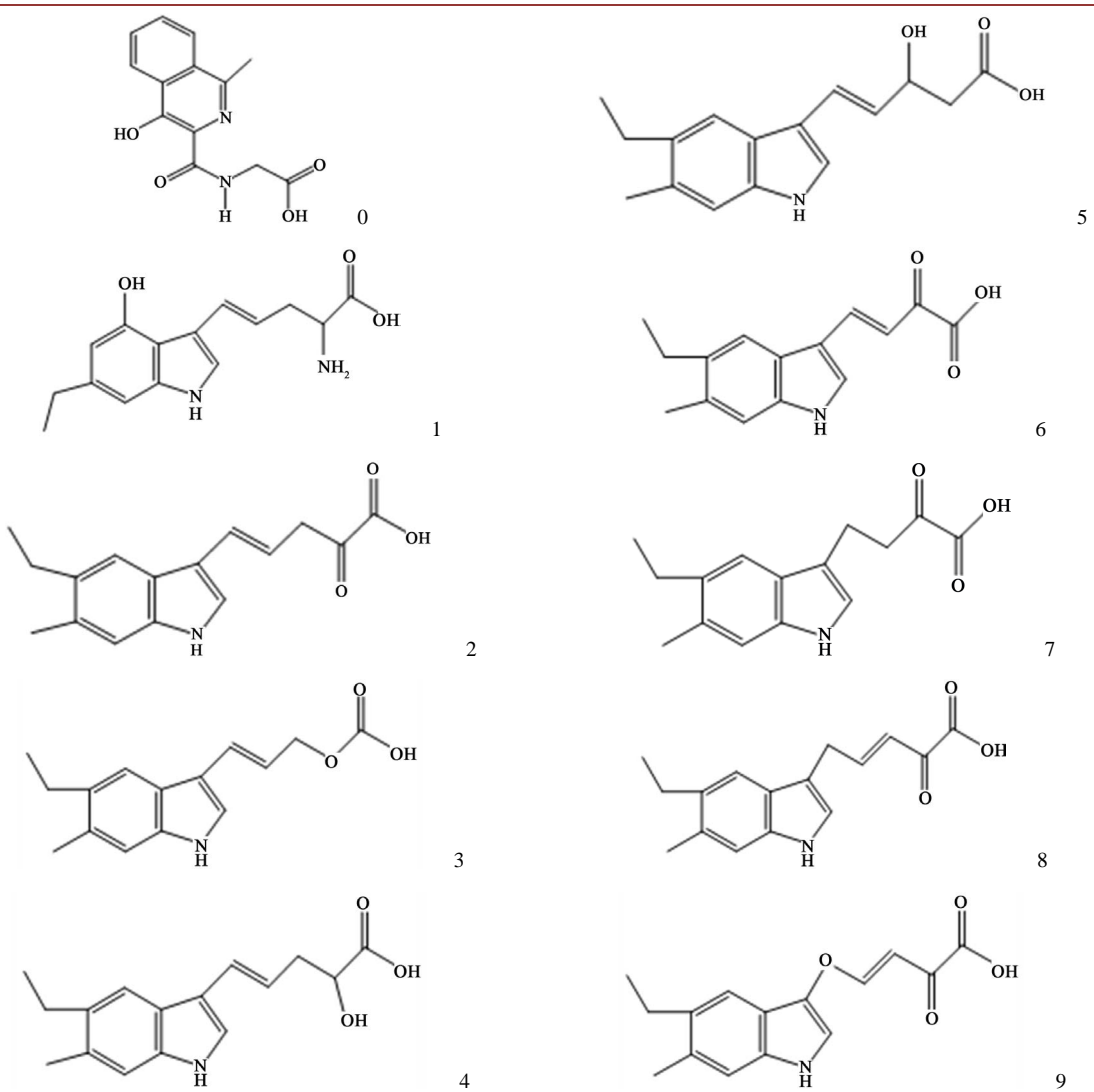


Figure 3. Structural design of small molecule compounds based on ligand structure

图 3. 基于配体结构的小分子化合物结构设计

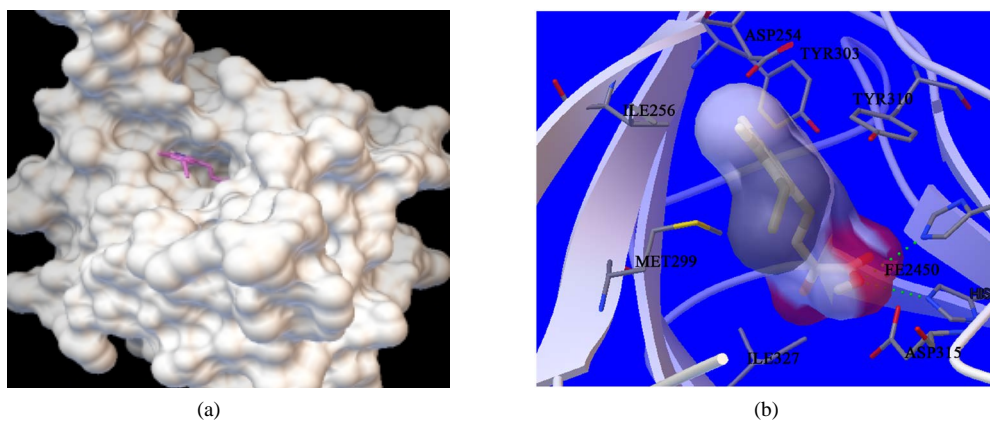


Figure 4. Docking small molecules with target protein (3HQU)

图 4. 设计的药物分子与 3HQU 蛋白质的对接图

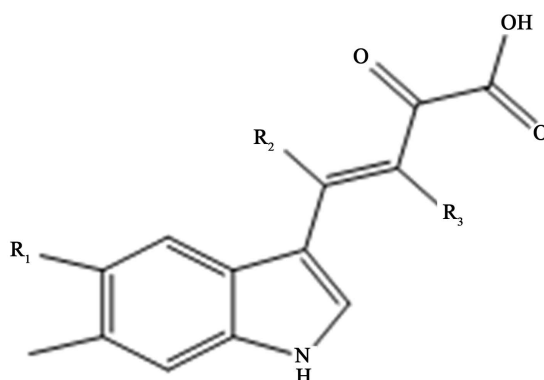


Figure 5. The designed formula of indole compounds. Note: R1 can be alkyl or other hydrophobic group; R2 and R3 can be alkyl groups with a benzene ring or other conjugated ring, also can be other groups that can produce intermolecular forces with TYR301, TYR310

图 5. 设计出的吲哚类化合物结构式。注：R1 可以是烷基或其他疏水性基团；R2 和 R3 可以是带苯环或其他共轭环的烷基，也可以是其他能和 TYR301、TYR310 产生分子间作用力的基团

HIF-PH 抑制剂均是小分子制剂，通过口服给药，与 EPO 相比，它有可能给病人带来更大的便利，而且价格也便宜得多。在早期临床试验中，该类药物显示出了良好的治疗效果，所以该治疗领域会有很好的市场前景。

参考文献 (References)

- [1] 袁群生, 郑法雷. 慢性肾脏病患者贫血治疗中的几个关键问题[J]. 北京医学, 2009, 31(3): 182-184.
- [2] 叶长青, 郑兴. 住院慢性心衰患者贫血患病率与心功能的关系及血红蛋白浓度对其住院死亡率的影响[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(9): 977-980.
- [3] 李睿, 于观贞, 王喜, 等. 肿瘤相关贫血, 肿瘤病理状况与胃癌患者生存预后的相关性研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13(8): 704-708.
- [4] 李宇阳, 孙晶, 刘正娟. 促红细胞生成素在胎儿期及新生儿期的非造血作用[J]. 中国妇幼保健, 2006, 21(11): 1586-1588.
- [5] 王晓光, 刘丽波, 张季. 不同剂量 EPO 对老年化疗肿瘤相关性贫血患者的疗效和血栓形成可能性研究[J]. 中国实用医药, 2016, 11(20): 177-179.
- [6] 邓永鸿. FDA 批准了 Amgen 公司的 EPO [J]. 生物技术通报, 1990(2): 30-31.
- [7] 孙衍伟, 安永恒. rhEPO 治疗恶性肿瘤贫血的现状及其争议[J]. 中国临床实用医学, 2007, 1(7): 76-78.
- [8] 马培奇. 贫血治疗药物研究进展[J]. 上海医药, 2009, 30(7): 329-330.
- [9] 段睿, 胡章学. 肾性贫血治疗的新进展: 低氧诱导因子[J]. 临床肾脏病杂志, 2016, 16(5): 313-316.
- [10] 张馨文, 刘雯玥, 肖桂芝, 等. 低氧诱导因子脯氨酰羟化酶抑制剂 roxadustat [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(4): 551-556.
- [11] 刘明, 李国亮, 杨宝学. 缺氧诱导因子研究进展[J]. 中华现代临床医学杂志, 2012, 10(6): 4-5.
- [12] 罗娟. 血液系统/造血器官及免疫药物: 11073 Asteeias 获得治疗贫血化合物的权利[J]. 国外药讯, 2006(11): 32-33.
- [13] Rabinowitz, M.H., Barrett, T.D., Rosen, M.D., et al. (2010) Inhibitors of HIF Prolyl Hydroxylases. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **45**, 123-139.
- [14] Ellinghaus, P., Heisler, I., Unterschemmann, K.A., et al. (2013) BAY 87-2243, a Highly Potent and Selective Inhibitor of Hypoxia-Induced Gene Activation has Antitumor Activities by Inhibition of Mitochondrial Complex I. *Cancer Medicine*, **2**, 611-624.
- [15] Pergola, P.E., Spinowitz, B., Haase, V.H., et al. (2015) FO015AKB-6548, a Novel Hypoxia-Inducible Factor Prolyl-Hydroxylase Inhibitor (HIF-PHI) for the Treatment of Anemia in Patients with Chronic Kidney Disease Not on Dialysis (ND-CKD). *Nephrology Dialysis Transplantation*, **30**, 511-525.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：hjmce@hanspub.org