

基于虚拟筛选策略发现新型潜在 JAK3 小分子抑制剂

宋志强¹ 王 瑞¹ 秦佳蕊¹ 赵凯惠¹ 钟启迪¹ 朱 皓^{2*}

(¹ 华北理工大学¹ 药学院; ² 公共卫生学院 唐山 063000)

摘 要 利用已知活性的分子采用基于配体的策略构建药效团模型,通过基于类药规则、药效团模型、多种精度的分子对接算法、MM/GBSA 结合能预测以及 ADMET 筛选手段对含约 250 万个分子的数据库进行虚拟筛选。发现 5 种 JAK3 抑制剂的新型骨架,其中 6 个以 1-苯基咪唑烷-2-酮为骨架的分子在与 JAK3 激酶的结合能以及分子的 ADMET 性质评价方面均表现优异,具备高 JAK3 抑制剂潜力,被认为是虚拟筛选的命中分子。

关键词 JAK3 抑制剂 药效团模型 分子对接 虚拟筛选

Discovery of Novel Potential JAK3 Small Molecule Inhibitors Based on Virtual Screening Strategy

Song Zhiqiang¹, Wang Rui¹, Qin Jiarui¹, Zhao Kaihui¹, Zhong Qidi¹, Zhu Hao^{2*}

(¹ College of Pharmacy; ² College of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, 063000)

Abstract The pharmacophore model is constructed by using the known active molecules and the ligand based strategy. The database containing about 2.5 million molecules is virtual screened by means of drug like rules, pharmacophore model, multiple precision molecular docking algorithms, MM/GBSA binding energy prediction and ADMET screening. The novel skeletons of five JAK3 inhibitors were found. Among them, six molecules with 1-phenylimidazolidine-2-one as the skeleton showed excellent performance in binding energy with JAK3 kinase and ADMET property evaluation. They had the potential to be developed as a highly active JAK3 inhibitor, and were considered as hit molecules for virtual screening.

Keywords JAK3 inhibitor, Pharmacophore model, Molecular docking, Virtual filtering

JAK 激酶是一类细胞内的酪氨酸激酶,参与了机体的诸多生理活动,例如调节机体免疫应答活动、参与炎症反应以及与造血功能相关的多种细胞因子和生长因子的信号传导。JAKs 家族具有四个不同的激酶亚型,分别为 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2。在 JAKs 家族中,仅有 JAK3 蛋白主要在免疫系统(造血细胞、淋巴细胞等)内表达,而其他 JAK 蛋白在机体组织和细胞中普遍表达^[1,2]。JAKs 激酶家族参与了机体内的多种生理过程,其中 JAK3 蛋白在细胞因子信号传递中起到至关重要的作用,且 JAK3 蛋白仅在特定的组织中进行表达。因此,若使用 JAK3 抑制剂作为治疗药物,在抑制 JAK3 蛋白活性的同时,并不会

像抑制其他 JAKs 家族成员那样引起过多的非正常生理变化,同时还可以减轻由于抑制 JAK1 蛋白和 JAK2 而造成的机体免疫排斥反应,这使得 JAK3 激酶抑制剂成为治疗肿瘤、自身免疫性疾病的有效手段^[3-6]。

但是目前报道的具有 JAK3 蛋白抑制活性的药物分子在研发上进展缓慢。新型骨架 JAK3 抑制剂可以为特异性作用或者推向临床研究提供更多的可能,因此研究新型骨架 JAK3 抑制剂非常有必要。虚拟筛选(Virtual screening)是发现新化学型生物活性小分子的有效技术之一,目前已经频繁被应用于各类靶点的药物开发工作当中,此前已有 JAK3 共价抑制剂虚拟筛选研究的相关报

* 联系人,朱皓 E-mail: haoyuehong570126@163.com

河北省生物医药联合基金项目(C2020209081)和河北省省属高等学校基本科研业务费(JQN2020016)资助

2022-05-01 收稿,2022-06-01 接受

道^[7]。在本研究中,采用基于配体的虚拟筛选以及基于结构的虚拟筛选串行策略进行了大规模数据库虚拟筛选以发现具有新型化学骨架的潜在 JAK3 抑制剂,虚拟筛选流程见图 1。

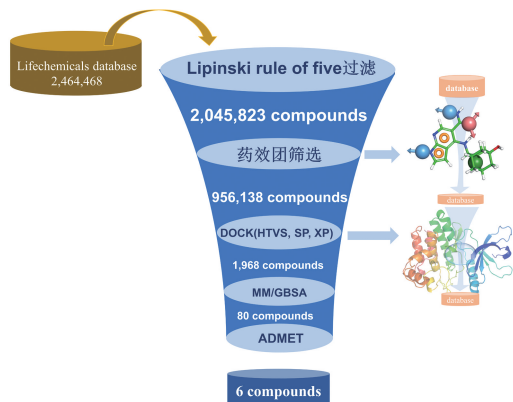


图 1 虚拟筛选流程

Fig. 1 virtual screening process

1 材料与方法

1.1 小分子数据库及蛋白准备

对 LifeChemicals 数据库中的 2464468 个化学小分子进行虚拟筛选。该数据库拥有庞大的分子数量,并且这些覆盖了大部分化学空间,这一优势有利于寻找新骨架分子。所有分子在对接之前进行 3D 结构转换工作,该过程在 Schrödinger 2021-4 软件包中的 LigPrep 模块下完成,主要包含对所有分子在 OPLS4 力场下进行能量最小化,使用 Epik 方法对所有分子进行正确的质子化预测处理,去除分子库中可能存在的盐离子等操作。清洗处理完毕的分子用于后续的性质计算。

从 PDB 数据库中检索到的 JAK3 与抑制剂 Peficitinib 结合的共晶结构(PDB ID 为 6AAK)^[8]作为计算使用的晶体结构,Peficitinib 亲和力和测量范围为 0.43 ~ 18 nmol/L,该共晶结构分辨率为 2.67 Å。将 Maestro13.0 软件包中的 Protein Preparation Wizard 模块用于该蛋白的准备工作,包括杂基添加键序和电荷、去除所有水分子、给蛋白体系添加氢原子并进行氢原子取向优化、在 pH = 7.2 的生理环境下对氨基酸进行质子化处理以及对整个结构在 OPLS4 力场下进行的能量最小化。

1.2 类药性过滤

药物性质计算采用 Schrödinger 2021-4 软件中的 Qikprop 模块完成,主要计算 Lipinski 五倍率

法则(Lipinski rule of five)中所描述的化合物的氢键受体、化合物的氢键供体、化合物的分子量、化合物的脂水分配系数的对数值、化合物中可旋转键的数量。基于生成的各个属性,采用 Lipinski 五倍率法则对 LifeChemicals 化合物数据库进行过滤,通过该规则的分子用于后续的药效团筛选。

1.3 药效团筛选

药效团模型使用文献[9~11]中所报道的 33 个化合物进行构建,这些化合物的骨架与日本上市的 JAK3 抑制剂 Peficitinib 骨架相同,侧链基团具有多样性,并且结合模式类似,因此用于建模的分子具有代表性。本研究中以其中 25 个 JAK3 激酶活性数值在 20nmol/L 以下的分子作为活性数据集;7 个活性数值大于 1000nmol/L 的分子作为非活性数据集。空间构象均选用 MCS Docking Ligand Alignment 模块工作后的活性构象。药效团构建工作使用 Phase 模块完成。随后使用 Phase 模块中的 Phase Ligand Screening 方法用于完成虚拟筛选中的基于药效团模型筛选过程。该过程的输入分子为上述经过类药规则过滤的分子库。筛选时,设置每个分子生成 50 种不同的空间构象用于与药效团模型进行匹配,要求输出分子必须匹配至少 4 个任意的空间药效团特征。所有输出的分子用于后续基于结构的虚拟筛选。

1.4 验证性分子对接

在本研究中采用分子对接预测目标分子与 JAK3 蛋白的结合模式。Schrödinger2021-4 软件包中的 Glide 软件用于该分子对接工作。Peficitinib 通过 Maestro 13.0 手动构建,靶点蛋白的晶体结构从 PDB 数据库中下载获得(PDB ID: 6AAK)^[8]。

在对接之前,使用与上述准备小分子数据库同样的方法准备 Peficitinib 分子,然后使用上述准备好的对接盒子、以 SP 精度的算法进行分子对接工作。最后,对接输出的最低能构象(最佳对接构象)与活性构象进行 RMSD 计算以及叠合分析。本研究使用 PyMOL 2.5^[12]配合 plip 2.1.7 软件^[13]进行 3D 相互作用力分析。

1.5 基于结构的虚拟筛选

对接盒子文件通过 Schrödinger 2021-4 软件中受体格点准备模块生成,上述准备好的共晶结构中的小分子质心被选作为活性口袋的中心。在准备对接格点文件时,选择铰链上的 Glu903:O、Leu905:O、Leu905:H 作为氢键的供体或受体,以

此作为氢键限制条件,以便高效识别活性分子。在上述条件的基础下最后计算生成体积为 $20 \times 20 \times 20 \text{ \AA}^3$ 的对接盒子文件。基于结构的虚拟筛选工作使用 Schrödinger 2021-4 软件中的 VSW (Virtual Screening Workflow) 模块完成。在对接过程中要求化合物输出的对接构象必须满足和受体蛋白 (JAK3 蛋白) 铰链区的 Glu903: O、Leu905: O、Leu905: H 三个氢键供体或受体中的至少两个形成氢键。

由于虚拟筛选所用的数据库中含有大量的小分子结构,采用串行策略可以在提高计算效率的同时筛选出符合条件的分子。而并行筛选需要耗费大量的计算资源,在筛选效率上要低于串行策略,因此利用三种不同精度的算法进行串行筛选。

对接采用 Glide 三种精确度的算法: HTVS (高通量虚拟筛选)、SP、XP, 三种算法在精度上逐步提升。本过程三种算法都采用,对接过程类似,逐渐提高精度提取打分前 10% 的化合物进入下一轮对接,最后 XP 算法设置每个对接输出 3 个构象用于 MM/GBSA 计算。

1.6 ADMET 性质计算

使用 Schrodinger 2021-4 中的 Qikprop 模型预测了包括犬肾细胞细胞通透率 (MDCK)、血脑屏障通透性 (BBB)、人类口服吸收率 (Human oral absorption) 以及人肠道吸收百分比 (%HIA) 等多种药理学相关参数。此外还使用 PreADMET 在线服务预测了 CaCo2 (肠血屏障通透性)、CYP3A4 底物、CYP2C19 抑制剂、CYP2C9 抑制剂、CYP3A4 抑制剂等性质。通过对这些性质的综合分析,将满足 HERG 小于 -4、口服吸收率大于 70%、BBB 小于 1、MDCK 大于 4、CaCo2 大于 4、%HIA 大于 90% 等条件的分子确定为虚拟筛选最终命中的化合物。

2 结果与讨论

2.1 药效团模型验证结果

如图 2(A) 所示, ADDHRR_1 药效团模型主要由两个氢键供体、一个氢键受体、两个芳环以及一个疏水中心构成。将目前已于日本上市的 JAK3 抑制剂 Peficitinib 拟合至该药效团模型中 (图 2(B)), 可见 Peficitinib 与药效团匹配度非常高, 除了该分子上的羟基没有被药效团包裹, 其余的氢键供体或受体, 芳环以及疏水中心都与药效团模型高度拟合。

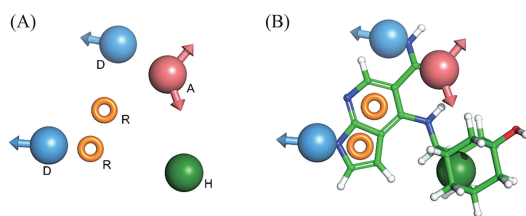


图 2 (A) 药效团模型 ADDHRR_1; (B) Peficitinib 与药效团模型的叠合图

Fig. 2 (A) Pharmacophore model ADDHRR_1; (B) Superposition diagram of peficitinib and pharmacophore model

ADDHRR_1 药效团模型可以与活性数据集内 25 个活性分子中的 22 个相匹配, 表明这个模型具备较高的富集率。从软件的评分角度而言, 该模型的生存得分为 6.263, 位点得分为 0.815, 表明该模型质量较高, 可用于大规模的虚拟筛选工作。

2.2 对接方法验证结果

从图 3 中可以看出, 三种算法获得的对接构象都结合在活性构象所在的位置, 其中 SP、XP 几乎完全和活性构象叠合, RMSD 分别为 0.1530 和 0.1395 Å (见表 1), 对接打分为别 -9.888、-10.092 kcal·mol⁻¹, 意味着 SP 以及 XP 算法可以非常准确地搜索到 JAK3 抑制剂的正确构象, 因

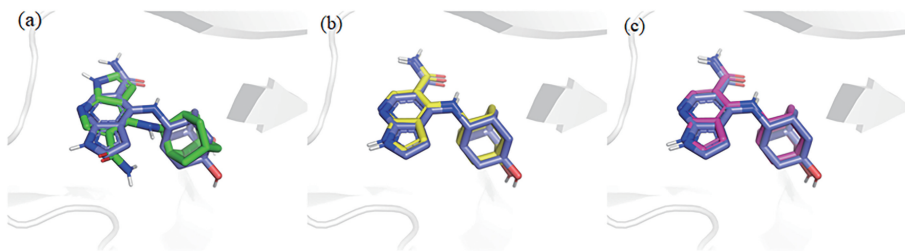


图 3 (A) HTVS、(B) SP、(C) XP 算法的构象叠合图

Fig. 3 Conformational superposition graph of algorithm (A) HTVS, (B) SP, (C) XP

表 1 HTVS、SP 和 XP 的对接分数及 RMSD 值

Tab.1 Docking score and RMSD value of HTVS, SP and XP

对接算法	对接分数/ $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	RMSD/ $\text{\AA}$
HTVS	-9.189	1.5379
SP	-9.888	0.153
XP	-10.092	0.1395

此 SP、XP 都被选用于基于结构的虚拟筛选。

在 HTVS 算法的构象叠合中,虽然母核有些颠倒,但是分子处于正确的位置,功能性基团基本和活性分子叠合,并且 RMSD 在 $2\text{\AA}$ 以内,对接打分为 $-9.189\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明这种算法可取。考虑到虚拟筛选分子库较大,而 HTVS 筛选迅速,精度也尚可。因此将 HTVS 算法应用于基于结构的虚拟筛选第一步,在 SP、XP 算法筛选之前。

此前报道的大多数 JAK3 抑制剂为 ATP 竞争性抑制剂。如图 4(A) 所示,参考分子 Peficitinib 结合在 JAK3 蛋白的 ATP 口袋当中。蛋白的铰链区是比较保守的 loop 区域,铰链上的骨架酰胺键往往作为氢键供体或受体与活性分子的母核结构形成氢键作用^[14,15]。并且从 Peficitinib 与 JAK3 的共晶结构中发现^[8],Peficitinib 与铰链上的 Tyr904、Leu905、Glu903 的酰胺键形成三个氢键作用(图 4(B))。这三个氢键对分子产生 JAK3 激酶活性非常重要,故在后续基于结构的虚拟筛选(分子对接)过程中对输出的构象进行条件限定,要求待筛选分子必须与 JAK3 蛋白形成上述三个氢键中的任意两个或以上的氢键作用才能被筛选出来。

2.3 基于配体及基于结构的虚拟筛选

基于上述结果,将基于配体(药效团)的虚拟筛选以及基于结构(分子对接)的虚拟筛选策略串行使用。在 2464468 个化合物中,有 2045823 个化合物符合 Lipinski 的特性,并表现出令人满意的类药性,表明这些分子可能具有良好的生物膜吸收或渗透性。采用 ADDHRR_1 药效团模型对类药性五规则过滤之后的 2045823 个分子进行筛选,要求匹配 6 个药效团特征中任意 4 个或 4 个以上的分子为符合要求的潜力分子,最终基于药效团筛选获得 956138 个分子。

在进行基于结构的虚拟筛选时,首先基于 HTVS 算法将 956138 个分子分别对接到 JAK3 蛋白的 ATP 口袋当中,成功对接且符合氢键形成条件的分子共计 196840 个。在此保留对接打前

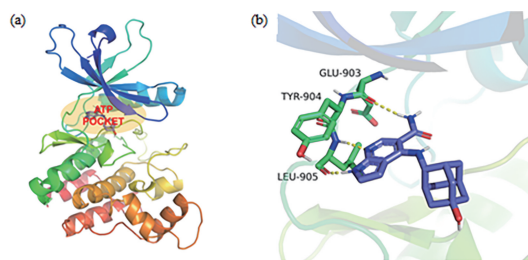
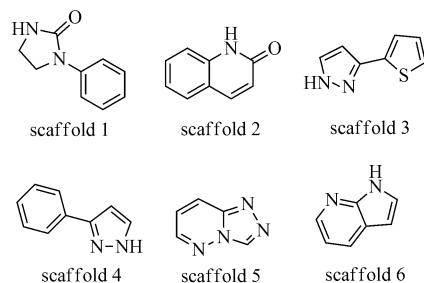


图 4 (A) JAK3 蛋白活性口袋;(B) 重要氢键作用

Fig.4 (A) JAK3 protein active pocket;(B) Important hydrogen bonding

10% 的分子,进一步使用 SP 算法对接且保留对接打分排名前 10% 的分子,获取 1968 个分子。考虑到之前分析的 XP 算法对分子的搜索能力最强,对接构象与活性构象的 RMSD 值为 $0.1395\text{\AA}$ 。为了进一步筛选采用 MM/GBSA 计算这些分子高精度结合能,采用 XP 算法进行高精度对接,并选取了打分排名前 10% 的分子构象用于 MM/GBSA 计算。MM/GBSA 结合能计算完成后,通过对结合能数值进行排名以及手动挑选从 196 个分子筛选出 80 个高潜力化合物。

经筛选所得到的分子在药效团匹配度、结合模式以及结合能方面均表现优异。通过分析这些化合物的化学骨架结构,可以获得如图式 1 所示的 6 个化合物骨架,除骨架 6 外均未有相关文献报道,为新型 JAK3 小分子抑制剂骨架。

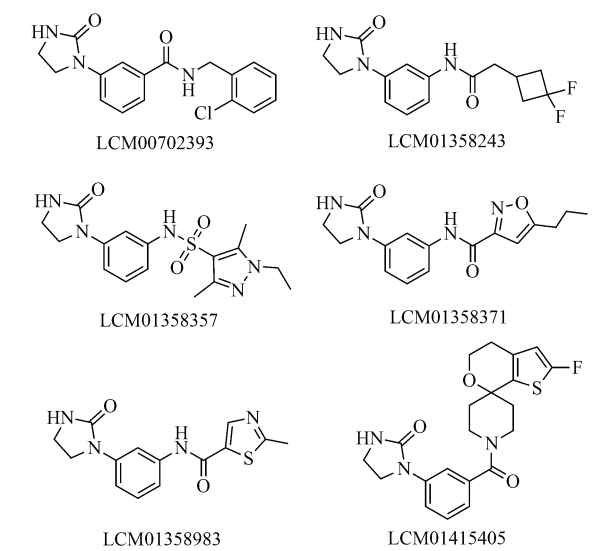


图式 1 虚拟筛选所得的 6 个化学骨架结构

Scheme 1 Six chemical skeleton structures obtained by virtual screening

2.4 ADMET 分析

上述筛选工作获得的 80 个高潜力化合物中,数据库编号 LCM00702393、LCM01358243、LCM01358357、LCM01358371、LCM01358983、LCM01415405 的化合物具备优秀的 ADMET(药物的吸收、分配、代谢、排泄和毒性)性质,其各项 ADMET 指标均表现出色,被视为虚拟筛选的命中分子,其化学结构见图式 2。



图式 2 虚拟筛选最终命中的 6 个化学骨架结构
Scheme 2 Six chemical skeleton structures finally obtained by virtual screening

3 结论

本研究选择了化学空间覆盖范围较为广泛的 LifeChemicals 数据库。为了最终获取的分子具有更好的成药性以及可改造空间,在虚拟筛选的开始阶段将数据库进行类药性过滤,而后才进行基于药效团筛选和基于结构的虚拟筛选。在经过计算机筛选以及人工筛选过滤后,确定了 80 个潜在苗头化合物。这些分子具备良好的理化性质,可以通过 JAK3 抑制剂药效团模型,并且还能和 JAK3 蛋白以高亲和力相互结合。在筛选出的 80 个潜在苗头化合物中,共发现了 6 种骨架结构,其中有 5 种骨架是未见报道的。大多数通过筛选的分子均具有良好的

ADMET 性质,其中代表性分子为 LCM00702393、LCM01358243、LCM01358357、LCM01358371、LCM01358983、LCM01415405,为后续 JAK3 抑制剂的开发与结构优化提供了重要的参考价值。

参 考 文 献

[1] 黄昊哲, 张吉星, 刘佳, 等. 药学进展, 2019, 43(1): 42~50.

[2] 赵九洲, 姜晓旭, 李宏伟, 等. 癌变·畸变·突变, 2020, 32(5): 402~404.

[3] Stark G, Darnell Jr J D. Immunity, 2012, 36(4): 503~514.

[4] Levy D E, Darnell J E. Nat. Rev. Mol. Cell Bio., 2002, 3(9): 651~662.

[5] Danese S, Grisham M B, Hodge J, et al. Am. J. Physiol-Gastr. L., 2016, 310(3): 155~162.

[6] O'shea J J, Schwartz D M, Villarino A V, et al. Annu. Rev. Med., 2015, 66: 311~328.

[7] 郁倩倩, 蒋颖敏, 许磊, 等. 化学通报, 2021, 84(10): 1102~1107.

[8] Hamaguchi H, Amano Y, Moritomo A, et al. Bioorg. Med. Chem., 2018, 26(18): 4971~4983.

[9] Nakajima Y, Tojo T, Morita M, et al. Chem. Pharm. Bull., 2015, 63(5): 341~353.

[10] Park E, Lee S J, Moon H, et al. J. Med. Chem., 2021, 64(2): 958~979.

[11] Hamaguchi H, Amano Y, Moritomo A, et al. Biorg. Med. Chem., 2018, 26(18): 4971~4983.

[12] Adasme M F, Linnemann K L, Bolz S N, et al. Nucl. Acids Res., 2021, 49(W1): W530~W534.

[13] Chen H, Ma J, Li W, et al. Mol. Cell, 2007, 27(5): 717~730.

[14] Xing L, Klug-Mcleod J, Rai B, et al. Biorg. Med. Chem., 2015, 23(19): 6520~6527.

[15] Irwin J J, Tang K G, Young J, et al. J. Chem. Inf. Model., 2020, 60(12): 6065~6073.

[22] Wang J, Jiang X, Liu X, et al. Chem. Eng. J., 2018, 344: 86~94.

[23] Wang C, Zhang M, Cheng F, et al. Biosci. Biotech. Biochem., 2015, 79(1): 164~170.

[24] Zhuang H, Han H, Xu P, et al. Biochem. Eng. J., 2015, 99: 44~47.

[25] Tuo B, Yan J, Fan B, et al. Bioresource Technol., 2012, 107: 55~60.

[26] Wang P Y, Chen H, Wang Y, et al. J. Chem. Technol. Biotech., 2020, 95(8): 2171~2179.

[27] Zhang X, Zhang L, Wu M, et al. J. Chem. Technol. Biotech., 2020, 95(7): 2017~2026.

[28] 洪涛, 何晓蕾, 张毅. 给水排水, 2021, 47(6): 86~91.

[29] 李婷, 张玉秀, 祖德彪, 等. 工业水处理, 2021, 41(10): 96~103.

[30] Xu H, Sun W, Yan N, et al. Environ. Sci. Pollut. Res., 2017, 24(32): 25082~25091.

(上接第 122 页)

[14] 王浩, 刘东方, 张丽, 等. 工业水处理, 2016, 36(5): 71~75.

[15] Wen H, Xiong K, Yang H, et al. J. Environ. Chem. Eng., 2022, 10(3): 107377.

[16] Zhao L, Fu G, Wu J, et al. Bioresource Technol., 2021, 335: 125236.

[17] Ahmadi M, Jorfi S, Kujlu R, et al. J. Environ. Manag., 2017, 191: 198~208.

[18] Jiang Y, Shang Y, Yang K, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2015, 100(4): 1883~1890.

[19] 周旭华, 刘鹏程, 王伟, 等. 环境污染与防治, 2021, 43(10): 1269~1273.

[20] Wu X, Wu X, Li J, et al. Msphere, 2020, 5(2): e00246-20.

[21] Zhu G, Xing F, Tao J, et al. J. Environ. Manag., 2021, 285: 112119.