

## 新型法尼基转移酶抑制剂的发现及构效关系分析

张明, 李诗良\*, 朱丽丽, 黄瑾, 赵振江\*, 李洪林

(华东理工大学药学院, 上海市新药设计重点实验室, 上海 200237)

**摘要:** 本文选择法尼基转移酶 (FTase) 作为靶标, 利用计算机辅助药物设计 Schrödinger 软件包中 Glide v4.0 程序进行虚拟筛选, 获得了 13 个结构新颖、具备中等活性法尼基转移酶抑制剂 (FTIs) 苗头化合物。通过分析代表性化合物 **8** ( $IC_{50} = 2.29 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 **18** ( $IC_{50} = 0.41 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与法尼基转移酶的结合模式, 本文发现化合物 **8** 和 **18** 并未和  $\text{Zn}^{2+}$  螯合, 说明抑制剂中极性官能团与  $\text{Zn}^{2+}$  是否螯合并未对酶抑制活性起到决定性作用。通过分析代表性化合物的预测结合模式与构效关系, 本文发现的法尼基转移酶抑制剂 (FTIs) 苗头化合物仍具有改造空间, 为进一步的结构优化并获得高活性和高选择性抑制剂奠定基础。

**关键词:** 法尼基转移酶; 抑制剂; 虚拟筛选; 构效关系分析

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)01-0111-06

## Structure-activity relationship analysis of novel farnesyl transferase inhibitors

ZHANG Ming, LI Shi-liang\*, ZHU Li-li, HUANG Jin, ZHAO Zhen-jiang\*, LI Hong-lin

(Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** Farnesyltransferase (FTase) was selected as a target for virtual screening of inhibitors using the Glide v4.0 program in the Schrödinger software package. We discovered 13 novel structures as farnesyltransferase inhibitors (FTIs) with moderate potency. By analyzing the binding modes of representative compounds **8** ( $IC_{50} = 2.29 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and **18** ( $IC_{50} = 0.41 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) with farnesyltransferase, it was found that compounds **8** and **18** didn't coordinate with  $\text{Zn}^{2+}$ , indicating that the coordination between FTIs with  $\text{Zn}^{2+}$  is not essential for the bioactivity of the inhibitors. The structure-activity relationship was summarized by analyzing the predicted binding modes of representative compounds. It was found that the scaffolds of the discovered FTIs had room for structural optimization, which lay foundation for obtaining highly active and selective FTIs.

**Key words:** farnesyltransferase; inhibitor; virtual screening; structure-activity relationship

Ras 蛋白属于小三磷酸鸟苷酶 (GTPase) 家族, 分布在细胞质膜内表面上, 其在控制细胞生长和增殖分化中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>。从临床研究情况来看, 大约 50% 的结肠 (直肠) 癌和 90% 的胰腺癌存在 Ras 蛋白的突变<sup>[2]</sup>, 其他癌症也存在着不同程度 Ras 蛋白异常

表达<sup>[3]</sup>。Ras 蛋白发挥正常生物效应依赖一系列翻译后修饰, 法尼基转移酶 (farnesyltransferase, FTase) 是翻译修饰过程中关键性催化酶。在法尼基转移酶参与下将胆固醇合成途径中的中间体-法尼基焦磷酸酯 (Farnesyl diphosphate, FPP) 上的法尼基转移到 Ras 蛋白的 CAAX 四肽结构片段 (C 为半胱氨酸, A 为脂肪族氨基酸, X 为丝氨酸或蛋氨酸等) 中的半胱氨酸残基上。Ras 蛋白法尼基化修饰是其成熟的第一步也是最关键的一步。Ras 蛋白在修饰后会形成一个长的可嵌

收稿日期: 2018-09-10; 修回日期: 2018-11-13.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21372078, 81803437).

\*通讯作者 Tel: 86-21-64253962, E-mail: zhjzhao@ecust.edu.cn;

Tel: 86-21-64253962, E-mail: slli403@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0823

入细胞膜的磷脂双分子层脂肪链,完成Ras蛋白在细胞膜上的定位并进行有效的细胞外信号传导<sup>[4]</sup>。因此,针对法尼基转移酶靶点设计抗肿瘤药物已成为治疗由Ras蛋白信号转导异常导致的各种肿瘤的一种重要手段<sup>[5]</sup>。

目前,已有大量的文献<sup>[6]</sup>报道FTase抑制剂。FPP类似物FTase抑制剂虽然在体外抑制活性已达到纳摩尔级别,但是由于膜透过性差和类药性差,同时干扰体内其他正常生物合成,该类型FTase抑制剂研究较少;CAAX类FTase抑制剂具有易水解等酶敏感性缺点,同时在细胞内缺乏显著活性,而且早期的肽类抑制剂有疏毒性也限制了临床使用<sup>[7]</sup>;小分子非肽类FTase抑制剂以其良好的活性和生物利用度成为目前研究热点,目前已有5个FTase非肽类抑制剂处于临床的不同研究阶段(图1)。第一个进入临床试验的FTase抑制剂喹啉酮类tipifarnib治疗乳腺癌已经进入临床II期,而针对急性髓性白血病的治疗研究也进入了临床III期;Lonafarnib针对非小细胞肺癌、慢性髓性白血病、早年衰老症候群等疾病都已进入临床II期,包括与紫杉醇和卡铂联合治疗非小细胞肺癌进行临床III期研究<sup>[8]</sup>;BMS-214662同样开展了非特异性实体瘤、急性白血病、骨髓增生异常综合征等临床研究;L-778123、antroquinonol分别针对难治性恶性实体瘤和非小细胞肺癌进行临床研究。随着临床研究的深入,FTase抑制剂对其他疾病的疗效也开始显现出来,最新研究发现FTase抑制剂对人类其他疾病如儿童早衰、肝炎、心血管疾病、神经变性紊乱也表现出一定的效果。但这些抑制剂在临床研究中暴露出来的神经毒性、胃肠道毒性、肝肾毒性等也不容忽视,甚至可能是阻碍抑制剂走向临床的重大阻力<sup>[9]</sup>。迄今为止,尚未有此类抑制剂获得FDA批准上市。

本文基于SPECS数据库以及PDB库中的复合物晶体3E33(乙二胺类FTIs、FTase及FPP的复合物晶体结构)进行虚拟筛选,根据筛选结果挑选21个化合物进行体外生物活性测试,最终发现13个结构新颖具有中等抑制活性的FTase抑制剂,为后续进一步结构优化

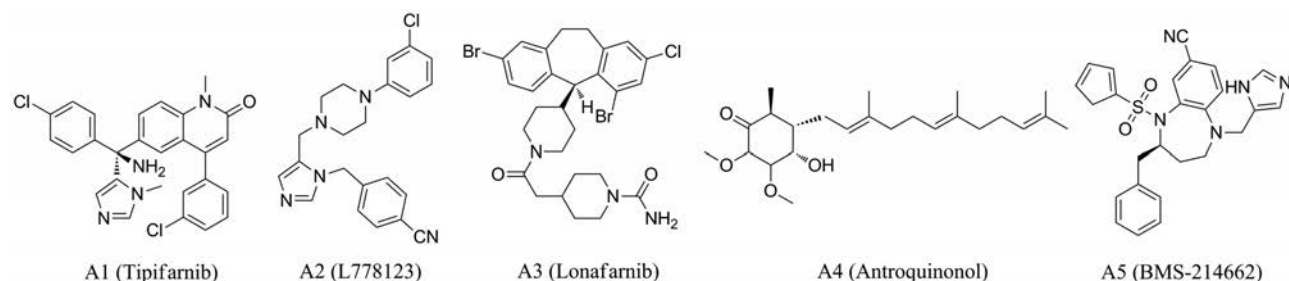


Figure 1 Selected structures of reported FTIs in the clinical stage

从而获得高选择性、高抑制活性抑制剂奠定基础。

## 结果与讨论

### 1 法尼基转移酶的三维结构分析

FTase是由 $\alpha$ 和 $\beta$ 二个亚基组成的一种位于细胞质的异型二聚体金属锌酶, $\alpha$ 和 $\beta$ 二个亚基分子量分别在4 846 kD附近(图2A),且两个亚基的二级结构都为 $\alpha$ 螺旋。 $\alpha$ 亚基在 $Zn^{2+}$ 附近存在氨基酸残基,在 $\beta$ 亚基的上方环绕成半圈的同时与 $\beta$ 亚基共同构成FPP的结合位点, $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的连接处形成了喇叭形状的活性位点,并且在口袋内,由表面亲水性的槽区到 $\beta$ 亚基 $\alpha$ - $\alpha$ 桶状结构的边缘,几乎成直角占据 $\beta$ 亚基结构。活性口袋区域大体分为4个亚口袋(图2B),S1是由与 $Zn^{2+}$ 形成螯合的His362、Asp297和Cys299等氨基酸组成;S2是一个较大的亲水性口袋,由Arg291、Lys164和His248氨基酸构成一个氢键网络;S3是一个较大的疏水性口袋,它由 $\beta$ 亚基的Trp102、Trp106、Trp303和Tyr361等芳香性氨基酸组成;S4也是一个疏水性口袋,它由Arg202、Tyr205和Cys254等氨基酸组成氢键网络<sup>[10]</sup>。FPP的磷酸基团和S2口袋中的残基形成一个氢键作用而其法尼基基团一直伸入S4口袋底端,多肽和产物则集中于S1和S3口袋位点。而大多数抑制剂对多肽或产物产生竞争性抑制是因为会在S1口袋

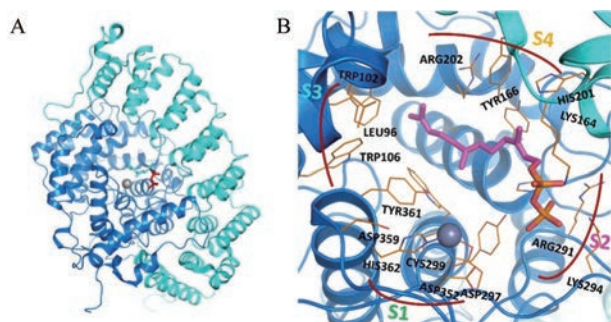


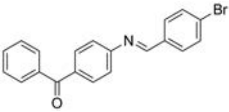
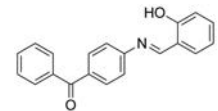
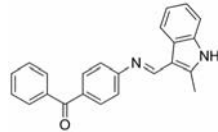
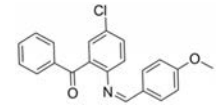
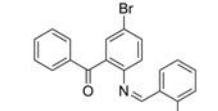
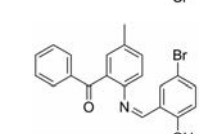
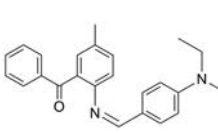
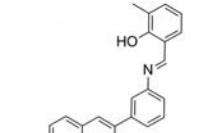
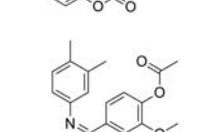
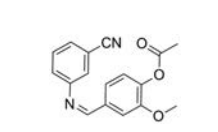
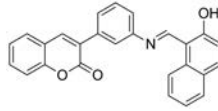
Figure 2 (A) Crystal structure of FTase, the  $\alpha$ -subunit is cyan, the  $\beta$ -subunit is blue. (B) The FTase active sites are indicated by blue and cyan cartoons, and the S1-S4 sub-pocket positions are indicated by deep red curves

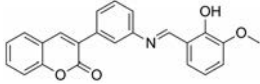
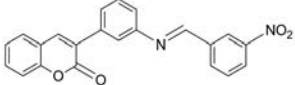
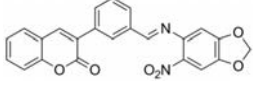
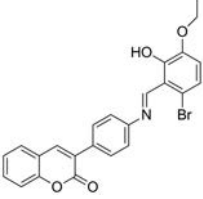
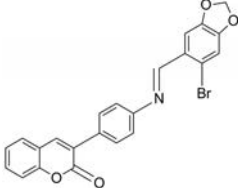
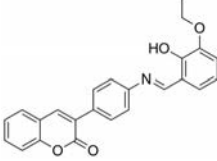
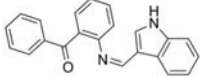
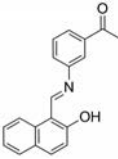
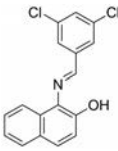
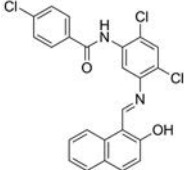
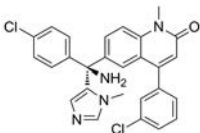
形成氢键相互作用或与  $Zn^{2+}$  形成螯合作用, 亦或在 S3 口袋形成疏水的相互作用<sup>[11]</sup>。最后, 产物经由活性口袋延伸至  $\beta$  亚基边缘的一个较浅的凹槽状区域获得释放。

## 2 虚拟筛选结果及化合物结合模式分析

本文通过基于 FTase 受体虚拟筛选得到的 21 个化合物, 同时进行 FTase 活性抑制测试, 得到了相应的  $IC_{50}$  数据。如表 1 所示。

**Table 1** Structures and biological data of the 21 compounds. <sup>a</sup> $IC_{50}$  values were determined from the results of at least three independent tests and attempts to determine  $IC_{50}$  values were made if the inhibition rate at  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  was larger than 50%. <sup>b</sup>NA: No activity

Compd.	Structure	Inhibition rate/%	$IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1a}$
1		45.20	NA <sup>b</sup>
2		42.87	NA
3		59.87	$2.47 \pm 0.36$
4		80.50	$1.59 \pm 0.22$
5		79.48	$1.48 \pm 0.18$
6		70.24	$2.83 \pm 0.21$
7		70.19	$1.63 \pm 0.13$
8		91.29	$2.29 \pm 0.85$
9		67.97	$0.69 \pm 0.14$
10		12.02	NA
11		104.37	$1.13 \pm 0.04$

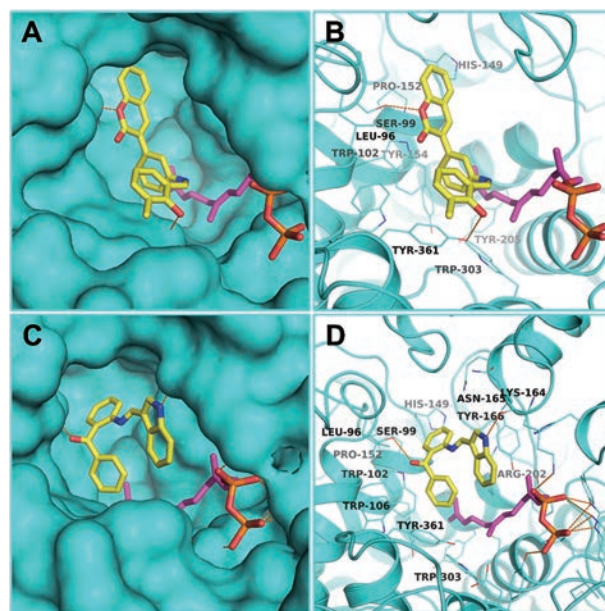
				Continued
Compd.	Structure	Inhibition rate/%	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1a</sup>	
12		Insoluble	NA	
13		65.93	2.72 ± 0.01	
14		Insoluble	NA	
15		Insoluble	NA	
16		Insoluble	NA	
17		Insoluble	NA	
18		78.07	0.41 ± 0.18	
19		81.48	1.65 ± 0.29	
20		69.10	2.31 ± 0.43	
21		98.71	1.18 ± 0.08	
Tipifarnib		100.00	0.003 0 ± 0.000 2	

根据其结构的相似性, 可以将21个化合物分为两类: 以化合物**8** ( $IC_{50} = 2.29 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 为代表含有香豆素结构的化合物以及化合物**18** ( $IC_{50} = 0.41 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 为代表的含有二苯酮结构的化合物。化合物**8**主要占据的是S1和S3亚口袋(图3A、B), 其苯并吡喃环中的氧原子能与S3口袋中的Ser99形成氢键相互作用; 香豆素结构中的苯环与Trp102、Pro152和Tyr154形成范德华作用, 与香豆素连接的苯环能与Trp102形成 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用; 化合物中苯酚上的羟基能与S1口袋中Try361形成氢键相互作用; 化合物**14**~**16**未表现出抑制活性, 与化合物在活性测试中溶解性差有关。

化合物**18**是筛选出来抑制活性最好的化合物, 它主要占据的是S3和S4口袋(图3C、D), 化合物**18**的二苯酮的羰基氧原子能与S3口袋中的Ser99氢键, 二苯酮中与氮原子相连的苯环能与Pro152、His149、Arg202和Gln116等氨基酸残基形成的小空腔形成有利的范德华相互作用。在该苯环中氮原子对位取代小的疏水基团, 也有利于维持化合物抑制活性, 例如化合物**4**的氯原子, 化合物**5**的溴原子, 化合物**6**的甲基。但由于空间不能容纳较大的取代基团邻位取代苯环, 故化合物**10**表现出大幅降低的FTase抑制率。此外, 苯并吡咯环上的氮原子能与S4口袋中的Lys164骨架羰基氧原子形成氢键相互作用, 在该部位引入极性基团有利于化合物活性的维持, 如化合物**7**中的二乙胺基能与S4亚口袋的Asn165和Lys164产生极性相互作用。以上分析可知, 化合物**8**和**18**虽然对FTase具有较高的抑制活性, 但并未和 $\text{Zn}^{2+}$ 螯合, 这说明抑制剂中极性官能团与金属离子是否螯合对本文发现FTase抑制剂并未起到决定性作用。

### 3 小结

本文基于FTase进行虚拟筛选, 得到21个化合物, 体外酶活性测试发现13个化合物具有FTase抑制活性。结合化合物**8**和**18**的潜在结合模式, 对这些抑制剂的初步构效关系分析发现, 抑制剂主要占据S3亚口袋并与口袋中的芳香性氨基酸发生芳香性相互作用, 其极性基团与Ser99、Lys164等形成氢键相互作用, 但未与 $\text{Zn}^{2+}$ 发生螯合。由此可以推测出FTase抑制剂与S3口袋相互作用, 与其他位点氢键作用和范德华作用决定了抑制剂活性, 抑制剂中极性官能团与 $\text{Zn}^{2+}$ 是否螯合对发现的该类抑制剂并未起到决定性作用。因此, 通过虚拟筛选不仅提供了具有结构新颖和有中等活性的苗头化合物结构, 并通过构效关系分析为进一步苗头化合物结构优化从而发现高选择性、高活性抑制剂奠定基础。



**Figure 3** Predicted binding modes of representative compounds. The active inhibitor is colored yellow and the FPP is in purple. A: Compound **8** occupies the S1 and S3 pockets; B: Predicted binding mode of compound **8**; C: Compound **18** occupies the S3 and S4 pockets; D: Predicted binding mode of compound **18**

## 实验部分

### 1 蛋白质及配体准备

从PDB库中下载FTase及其抑制剂和底物的复合物晶体结构(3E33)<sup>[2]</sup>。首先利用Schrödinger软件将所有的水分子去除, 接着利用“Protein Preparation Workflow”, 对受体模型加氢加电荷, 并对蛋白结构进行优化, 所有氢原子采用OPLS\_2005力场优化, 收敛RMSD小于0.30 Å。优化后, 采用“Receptor Grid Generation”模块生成对接格点, 格点定义为以晶体结构中原有配体ED7为中心, 半径大小为14 Å范围内的氨基酸结构区域。蛋白结构中原子电荷小于0.25的非极性原子, 范德华半径缩放因子定义为1.00。

实验对包含20多万个小分子的SPECS数据库(2010年3月版)进行处理, 将所有无机原子的分子去除。剩余分子在Schrödinger软件包的LigPrep程序中准备, 用OPLS\_2005力场生成三维结构, 分配电荷。配体生成的环境pH设为 $7.0 \pm 2.0$ , 二维构象转化为三维构象时保留手性信息, 同时设定每个小分子最多保留8个低能构象和32个立体构象。

### 2 分子对接

虚拟筛选采用Schrödinger软件包中Glide v4.0程序进行分子对接。在虚拟筛选之前通过将共结晶配体ED7重新对接到3E33晶体结构的底物结合位点来验证对接模型和对接方法的可行性和可靠性。结果显

示, ED7 排名第三的对接结合构象与其共结晶构象有着最小均方根偏差 (RMSD), 值为 0.96 Å (图 S1), 证明了本研究中使用的筛选模型和方法的可靠性。

SPECS 数据库中的小分子首先采用标准精度模式 (standard precision, SP), 获得合理的对接构象后, 根据 G-score 打分保留筛选结果排名前 1 000 个分子。随后剩余分子采用高精度模式 (extra precision, XP), 剔除假阳性分子, 保留 G-score 打分前 100 个配体。然后对这 100 个化合物进行聚类, 并根据它们与 FTase 的结合模式, 最终挑出 21 个化合物进行购买和活性测试 (图 4)。

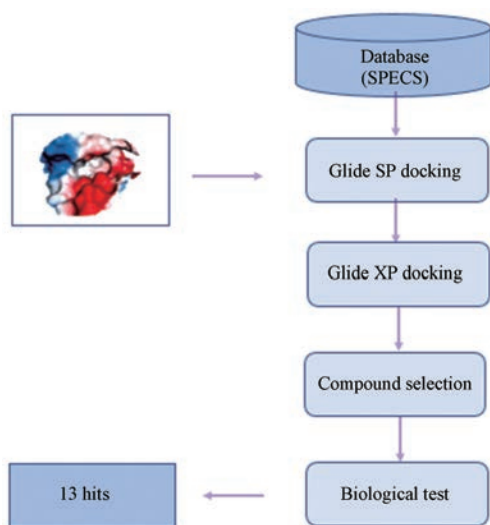


Figure 4 Virtual screening flow chart for FTase inhibitors

### 3 药理测试

酶活性测试首先将底物 *N*-dansyl-GCVLS 用 DMSO 溶成  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, FPP 用缓冲液 ( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris,  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{ZnCl}_2$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT, 0.02% 吡喃葡萄糖苷, pH 7.5), 稀释成  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, FTase 酶稀释成  $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液<sup>[13]</sup>。随后化合物用 DMSO 溶解并稀释至  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 按照 0.2% 浓度加化合物, 以  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  进行初筛。最后, 该实验将 Tipifarnib 作为阳性对照。

根据表 2 的反应体系, 利用 BioTek-Synergy2 酶标仪进行酶活测试实验。反应总体系为  $100 \text{ } \mu\text{L}$ , 首先将 assay buffer 加入到 96 孔板中, 随后加入酶和不同浓度的化合物孵育 10 min, 再加入 *N*-dansyl-GCVLS, 最后加入 FPP 起始反应。反应开始之后, 在激发波长

Table 2 Screening system of compounds *in vitro* enzyme assays

Assay buffer	<i>N</i> -dansyl-GCVLS ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Com ( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	FTase	FPP ( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
88.6 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$

340 nm、发射波长 486 nm 处每隔 30 s 检测一次荧光值的变化<sup>[14]</sup>, 整个检测过程为 8 min。IC<sub>50</sub> 值要求至少 3 次独立测试, 取平均值。

### References

- [1] Khosravifar R, Clark GJ, Abe K, et al. Ras (Cxxx) and Rab (Cc/Cxc) prenylation signal sequences are unique and functionally distinct [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 24363-24368.
- [2] Midgley RS, Kerr DJ. Ras as a target in cancer therapy [J]. *Crit Rev Oncol/Hematol*, 2002, 44: 109-120.
- [3] Henry HK Jr, Wasicak J, Tasker AS, et al. Discovery of a series of cyclohexylethylamine-containing protein farnesyltransferase inhibitors exhibiting potent cellular activity [J]. *J Med Chem*, 1999, 42: 4844-4852.
- [4] Dunten P, Kammlott U, Crowther R, et al. Protein farnesyltransferase: structure and implications for substrate binding [J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 7907-7912.
- [5] Williams TM, Ciccarone TM, Mactough SC, et al. 2-Substituted piperazines as constrained amino acids. application to the synthesis of potent, non carboxylic acid inhibitors of farnesyltransferase [J]. *J Med Chem*, 1996, 39: 1345-1348.
- [6] Brunner TB, Hahn SM, Gupta AK, et al. Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 5656-5658.
- [7] Graham SL, Desolms SJ, Giuliani EA, et al. Pseudopeptide inhibitors of Ras farnesyl-protein transferase [J]. *J Med Chem*, 1994, 37: 725-732.
- [8] Wang J, Yao X, Huang J. New tricks for human farnesyltransferase inhibitor: cancer and beyond [J]. *Med Chem Commun*, 2017, 8: 841-854.
- [9] Caponigro F, Casale M, Bryce J. Farnesyl transferase inhibitors in clinical development [J]. *Expert Opin Invest Drugs*, 2003, 12: 943-954.
- [10] Fletcher S, Cummings CG, Rivas K, et al. Potent, plasmodium-selective farnesyltransferase inhibitors that arrest the growth of malaria parasites: structure-activity relationships of ethylenediamine-analogue scaffolds and homology model validation [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 5176-5197.
- [11] Long SB, Casey PJ, Beese LS. Reaction path of protein farnesyltransferase at atomic resolution [J]. *Nature*, 2002, 419: 645-650.
- [12] Hast MA, Fletcher S, Cummings CG, et al. Structural basis for binding and selectivity of antimalarial and anticancer ethylenediamine inhibitors to protein farnesyltransferase [J]. *Chem Biol*, 2009, 16: 181-192.
- [13] Degraw AJ, Keiser MJ, Ochocki JD, et al. Prediction and evaluation of protein farnesyltransferase inhibition by commercial drugs [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 2464-2471.
- [14] Wlodarczyk N, Le BRD, Gilleron P, et al. Potent farnesyltransferase inhibitors with 1,4-diazepane scaffolds as novel destabilizing microtubule agents in hormone-resistant prostate cancer [J]. *J Med Chem*, 2011, 54: 1178-1190.