

结构生物信息学在肽体药物分子设计中的应用

杨胜利

乐山师范学院化学与生命科学系, 四川乐山, 614004

摘要: 肽是人体七大营养素之一, 具有抑制细胞变性、增强免疫力, 激活细胞、清除自由基, 修复变性细胞、促新陈代谢, 维持细胞正常活动四大功效。本研究概述了肽类药物分子设计的相关概述, 进而设计出了一种基于结构生物信息学的纳米肽类药物, 以为药物实现长时间血液循环、靶向性爆发释放、提升试剂装载率、降低毒副作用提供可行性借鉴。

关键词: 结构生物信息学; 肽体药物; 分子; 设计

肽是人体七大营养素之一, 具有抑制细胞变性、增强免疫力, 激活细胞、清除自由基, 修复变性细胞、促新陈代谢, 维持细胞正常活动四大功效。肽体药物的制备之于人类具有重要的科研价值。从结构生物信息学的相关理论来看, 肽体药物涵盖白蛋白、蛋白肽、羊胎素、干细胞、胰岛素、催产素、胸腺肽等多种物质, 在疾病防控和治疗领域发挥了显著的功效^[1]。

1 肽体药物概述

在过去的数十年间, 肿瘤学治疗领域中诞生了以分子靶向药物的病因治疗机制革新和替代了非特异性化疗药物的治疗策略。以肽类药物为例, 通过药物制备环节分子设计, 整体上实现了肿瘤微环境改善、阻断了肿瘤细胞或肿瘤特异性细胞表达, 同时以高分子作用机制阻断肿瘤细胞恶性增殖、转移, 促使其凋亡的尝试, 一度成为结构生物信息学研究背景领域的关键性议题, 并在现实实践中发挥了突出作用。肽类药物分子设计主要通过智能超分子光动力纳米技术作用, 在金属配位能力设计、装载效率、稳定性测试、血液循环时间、临床试验治疗疗效上发挥了特异性作用^[2-3]。

通讯作者: 杨胜利, 乐山师范学院化学与生命科学系。

Copyright © Sanderman Publishing House

This work is licensed under a Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

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



2 设计细则

2.1 设计背景

2018年5月,多家研究机构合作报道了Schlafen(SLFN)蛋白家族被发现20年以来的第一个晶体结构,证实SLFN是一个新型的核酸内切酶家族,通过破坏蛋白翻译机器调控真核生物的翻译进程,能够有效控制HIV病毒的复制和包装^[1]。肽类药物分子设计正是基于小分子化合物与蛋白靶标的对接上,并在结果排序中得到充分验证。自1980年以后,首个对接分子软件信息系统DOCK的运用,直接程度上在方法、虚拟筛选策略上达到了药物制备的设计需求^[4]。

故此,肽类药物的分子设计产物借助配位和多种弱的协同机制,整体上促进了药物的长效性、稳定性、靶向爆发式释放的形成;再者,还在制备方法上,以其便捷性、可操作性、高装载率和包封率,实现了药物的应用效果;三者,以结构生物信息学为基础的材料来源,更具生物相容性、药物多组分配位及其自组装制备成效及其应用前景极为广阔。

2.2 设计对接点位

基于结构生物信息学的肽类药物制备中,主要通过了解蛋白结合位点、提升对接效率为准确性的前提。具体包括应用计算方法预测指定口袋来确定蛋白-小分子复合物晶体结构中小分子的位点准确性。小分子三维构象的采样和小分子在结合位点的构象、打分等之于小分子势能表面极小值点(低能)的构象,均可借助开源软件(RDKit, Frog2, Confab)等软件性能俩达到商业软件的媲美效果。

2.3 设计模式选择

肽类药物分析设计结合模式为口袋结合模式,并成为分子对接的关键点。主要手段为,依靠小分子和蛋白的药效团(pharmacophore)距离矩阵(配体)确定构象(映射口袋);大的化合物库筛选主要通过他来实现。模型构筑环节,还通过毒品片段小分子渐进式建模方法,稳定性生长配体分子^[5]。设计方法还包括应用蒙特卡洛模拟和遗传算法等随机采样方法实现集成对接。亲和性上,主要通过经验打分函数估算CTL表位肽来实现。CTL对肿瘤特异性杀伤表现在对毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的杀伤作用上,并针对其活动物质发挥出了关键性作用。

2.4 设计实现

以人含缬酪肽蛋白(VCp)ELISA kit为例,整体上以实验研究设计出了以结构生物信息学为基础的肽类药物分子的设计实现^[6]。

浓度: 1mg/ml

稀释方法:

a. 实验前,将冻干粉抗体用无菌蒸馏水稀释(或PBS稀释),将稀释后的抗体分装5-10

支 (20ulx5 支或 10ulx10 支), 放入-20°C保存, 使用环节即用即拿, 避免反复冻溶。

b. 实验前, 可将冻干粉抗体用无菌蒸馏水稀释 50ul (或 PBS 稀释 50ul) 成原液:再加 50% 甘油, 放入-20°C保存, 视研究需要进行。

c. 预试验梯度选择 1: 100、200、400, 选择最佳稀释比例, 工作液选用抗体稀释液。

3 基于结构生物信息学的肽体药物分子设计实现

肽体药物分子的筛查作为新药研发的关键, 直接关系到是否符合结构生物信息学项目的生死。具体应用设计实现流程为:

3.1 确认肽体药物分子设计靶点

肽体药物制备工作的起点即确认靶点, 并成为相关工作如期进展的有序保障。基于结构生物学的肽体药物旨在疾病治疗, 并融合基因序列晶体结构、基因组学和蛋白质组学等关键信息。应用化合物库供应平台如陶素生化对已知肽体药物分子通路和靶点作为数据库筛查对象, 由用户确认后, 应用激酶库、GPCR 库等工具对小分子靶点活性和功能进行初筛。

科学家以此为对象, 发现肽类蛋白中的一个/几个蛋白对生物现象发生的直接刺激, 进而对期间感兴趣的蛋白加以提炼。

例如: 含缬酪肽蛋白(valosin-containing protein, VCP)即 p97, 是一种广泛存在的膜结合糖蛋白, 在细胞活性中有着广泛的功能, 其总的特点是作为类似分子伴侣的作用在内质网相关的蛋白降解及细胞周期调控中起重要作用。如图 1 所示:

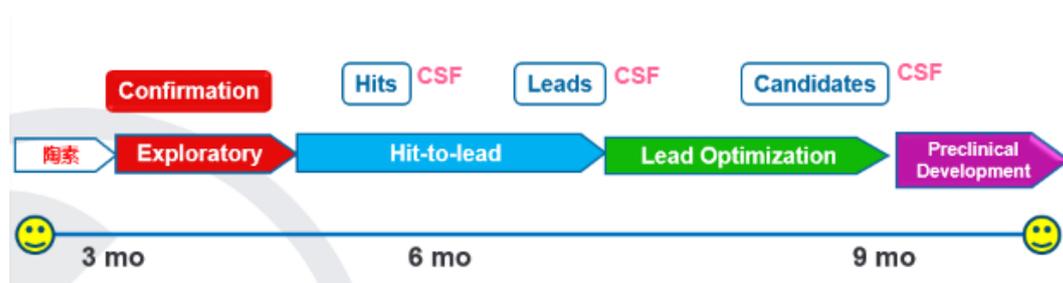


图 1 含缬酪肽蛋白结构筛查

3.2 小分子肽类化合物的发现和获得

小分子肽即超低分子量寡肽, 系统构成包括 2~4 个氨基酸高活性肽, 以洗化用品面膜生产中小分子肽类面膜为例, 补水保湿效果显著高于玻尿酸。从概念来讲, 小分子肽作为氨基酸和蛋白质间的生物物质, 具有分子量小、蛋白质片段的效果。以氨基酸组合物>10 的肽类化合物即为多肽, 2-9 个氨基酸组合物为寡肽, 2-4 个氨基酸组成的为小分子肽。其最初发现, 主要作用表现为蛋白质吸收分解后以氨基酸和小肽出现; 与食品中的异体蛋白肽融合, 重组分解为新的氨基酸和小肽来共同构筑人体蛋白质; 基于结构生物信息学研究的肽类蛋白具有极高的氨基酸利用率并直接参与细胞的新陈代谢, 逐渐以细胞生长、发育、生理功能发挥和

分裂增殖为特性。在人类吸收利用上，数量不同的氨基酸排列组合共同构筑了形态万千、功效不一的医用治疗药物，并以纳米技术为出发点的抗肿瘤药物在临床实践中发挥着越来越显著的临床效应。

针对特定靶标或作用环节的活性化合物，在主途径发现、随机筛选方案，基于肽类药物小分子设计的受体或配体结构和机制，药物研发环节往往采用虚拟筛选方式获得 hit。

在获得途径上，主要基于纳米靶蛋白三维结构虚拟筛选、结合位点特征性质、药物与小分子化合物间的共生作用，以打分函数对蛋白和小分子化合物进行综合评价，预测得分、后续生物活性检测。再者，受配体的虚拟筛选环节对小分子的利用，整体上在化合物形状相似性或药效团模型中以实验的形式得出最终研究成果。具体如图 2 所示：

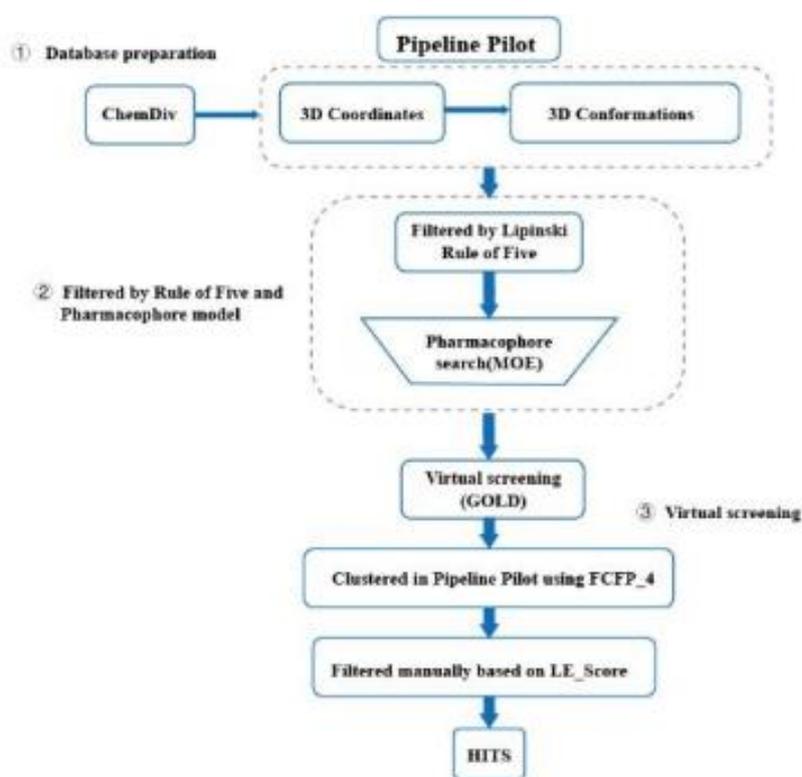


图 2 纳米钛靶蛋白三维结构筛查

3.3 分子结构筛选

基于分子结构的筛选和使用基于配体的方式进行筛选为化合物母核结构筛选中的最佳方案，并在分子化合物多样性、纯度、产品新颖度、类药性、候选药物获得上具有重要的临床价值。临床实验的申请审批环节，还涉及 CFDA 审批药品临床试验批件、药检报告要符合规范、研究者手册、药物临床研究机构、研究人员、新药临床试验方案、可操作的标准操作规程（简称 SOP）。

3.4 临床实验与上市审批复核

一期实验阶段，要综合评价药物安全性和剂量，需健康志愿者为新药实验人员，即通过

早期人体试验, 衡量药物耐受程度、药代动力学结构、确定治疗试验; 临床 II 期试验用药剂量要综合考虑肽类药物的药效或毒性与其所达到的浓度(如血液中的浓度); 临床 III 期临床试验研究设计和给药剂量方案, 主要以随机盲法对照临床试验。如在临床分子库中通过高通量筛选和高内涵筛选对已知肽类药物分子及其化合物进行集合; 批准进入临床一期、二期、三期; 配备详尽的化合物结构、靶点信息、IC₅₀ 值、活性描述等; 以 NMR 和 HPLC 技术满足高纯度药物制备要求。

4 研究综述

以新型抗糖尿病分子设计为例, 内涵含有尿嘧啶结构单元的二肽衍生物; 主要原料来源——尿嘧啶、多聚甲醛和半胱氨酸; 经两步反应获得关键中间体 S-胸腺嘧啶-L-半胱氨酸(IM-2), 再经氨基保护、羧基酯化和氨基酸偶联, 顺利合成了 16 个二肽衍生物。结果表明, 该分子的 α -葡萄糖苷酶抑制活性变化趋势与 PPRE 激动活性、DPP-4 抑制活性变化趋势相反^[7]。通过分析抑制剂胱氨酸结(inhibitor cystine knot, ICK) 多肽和环形胱氨酸结(cyclic cystine knot, CCK) 多肽两类主要 CK 毒素的氨基酸序列、拓扑结构、排列组合、人工合成以及空间折叠等特征, 阐述了其在药物设计与分子工程中的应用前景^[8]。利用多肽自组装超分子体系实现药物对肿瘤微环境的响应释放和高效递送, 并对其通过调控微环境中的血管、成纤维细胞和胞外基质等组分, 构建表/界面性质可控的纳米药物系统, 发展基于肿瘤微环境调控与联合治疗的肿瘤综合治疗方案^[9]。提高光敏剂的肿瘤选择性, 尤其是其肿瘤靶向输送的手段和方法, 构筑新型纳米粒、脂质体、聚合物胶束、仿生型纳米系统等新式药物^[10]。

5 结束语

上文总结了基于结构生物信息学视域的肽体药物分子结构设计, 并在研究领域发挥了突出的作用和功效。基于上述实验的优点, 该肽类药物的制备具有广泛的应用前景。尽管如此, 该药物的设计实现, 仍旧需要进一步调整, 以在动物实验中加以印证, 方便尽早应用于临床。

参考文献

- [1]邱留洋. 肽体药物分子设计的结构生物信息学研究[D]. 四川:电子科技大学, 2017.
- [2]谭博文, 周毅洁, 黄婷婷等. 靶向基质金属蛋白酶 14 类血红素结构域特异活性位点的确定及反义肽虚拟筛选[J]. 生物技术通讯 2014 25 (5) 605-610, 615.
- [3]Zhong, Wenying, He, Suyun, Wu, Can, et al. In situ hydrogelation of bicalutamide-peptide conjugates at prostate tissue for smart drug release based on pH and enzymatic activity [J]. *Nanoscale* 2019 11 (11) 5030-5037.
- [4]陈学思, 景遐斌, 田华雨等. 生物医用可降解高分子材料的结构与性能调控[Z]. 中国科学院长春应用化学研究所, 2016.
- [5]Zou, Qianli, Yuan, Chengqian, Xing, Ruirui, et al. Smart Peptide-Based Supramolecular Photodynamic Metallo-Nanodrugs Designed by Multicomponent Coordination Self-Assembly [J]. *Journal of the*

- American Chemical Society 2018 140 (34) 10794-10802.
- [6]Muhammad Kalim. PD-L1 单链抗体的筛选、抗体偶联药物的制备以及抗肿瘤活性的研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2017.
- [7]唐雪梅, 范莉, 张泽朝等. 含尿嘧啶结构单元二肽衍生物的设计、合成及生物活性研究[J].有机化学 2019 39 (5) 1460-1468.
- [8] Maciel, I. S., Azevedo, V. M., Pereira, T. C., et al. The spinal inhibition of N-type voltage-gated calcium channels selectively prevents scratching behavior in mice [J]. *Neuroscience: An International Journal under the Editorial Direction of IBRO*, 2014, 794-805.
- [9]李晨, 祁迎秋, 王亚洲等. 基于靶向调控肿瘤微环境的多肽纳米药物系统研究进展[J]. 功能高分子学报 2019 32 (5) 567-581.
- [10]Memic, Adnan, Habibi, Neda, Kamaly, Nazila, et al. Self-assembled peptide-based nanostructures: Smart nanomaterials toward targeted drug delivery [J]. *Nano Today* 2016 11 (1) 41-60.