

抗癌药物离开绑定位点的方式和时间

毛瑞超

2017-11-15

Background

- 传统的计算机辅助药物设计是基于优化药物靶标结合亲和力的方法。但人们越来越意识到了药效不仅与亲和力有关，还与**药物靶标停留时间**（residence time）有关。
- 虽然实验方法可以直接测定解离时间，但是获得的只是一个数字，不能真正了解药物解离的Detail动态过程：**分子决定因素**以及**解离通路或者障碍**。
- **达沙替尼**（dasatinib）是一种FDA批准的通过阻断c-Src来治疗患有慢性骨髓性白血病和其他相关疾病的患者的药物。
- **C-Src**是一种在细胞信号活动中的一种非受体细胞质酪氨酸激酶，其活性与多种癌症有关，包括结肠癌，肝癌，肺癌和胰腺癌等。

What we do?

本篇文章通过全原子动力学模拟的方法得到了12条运动轨迹，来了解达沙替尼怎样解离，以期能够在设计更长停留时间药物的理论方面给予重要启示。分别从四个方面介绍了研究成果：

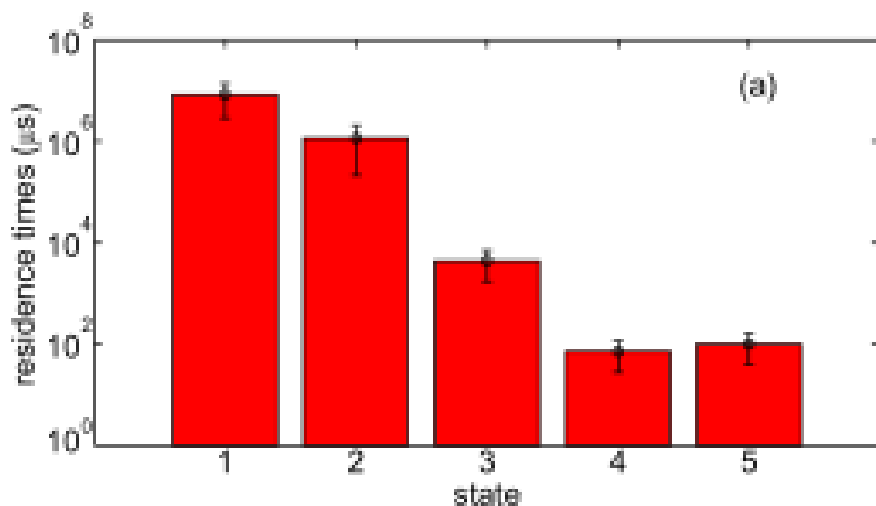
- 1、计算解离速率
- 2、估计自由能面和稳定的中间态产物
- 3、给出了不同稳定中间体的分子特性
- 4、解离过程的限制步骤在哪？

材料和方法：

- ✓ 初始结构来自于PDB 3G5D，采用了OPLS全原子力场和tip4p水模型。系统包含50411个原子，包含有蛋白质，溶剂，电荷补偿抗衡离子等。整个过程温度设置为300K，软件用的是gromacs4.6.7.
- ✓ 使用完全不同的力场和配体电荷参数重复了这项工作的一些计算，以确定结果的鲁棒性。用AMBER全原子力场（TIP4P水模型）验证了结果，使用gaff力场和AM1-BCC生成了配体的电荷参数。

✓ 1、给出了合理的解离速率

- ✓ 增强采样方法能够使系统越过较高的能垒，可以直接得到系统自由能的无偏概率分布。
- ✓ 本实验使用OPLS全原子力场（TIP4P水模型）进行了计算，并且用AMBER全原子力场（TIP4P水模型）验证了结果。一共跑了12条动力学轨迹，在假设 $d > 1.8\text{nm}$ 就算是解离完成的情况下，该轨迹得到的停留时间是 $21 \pm 10\text{s}$ ，这与实验（荧光标记）的观察值 $18-900\text{s}$ 是吻合的。

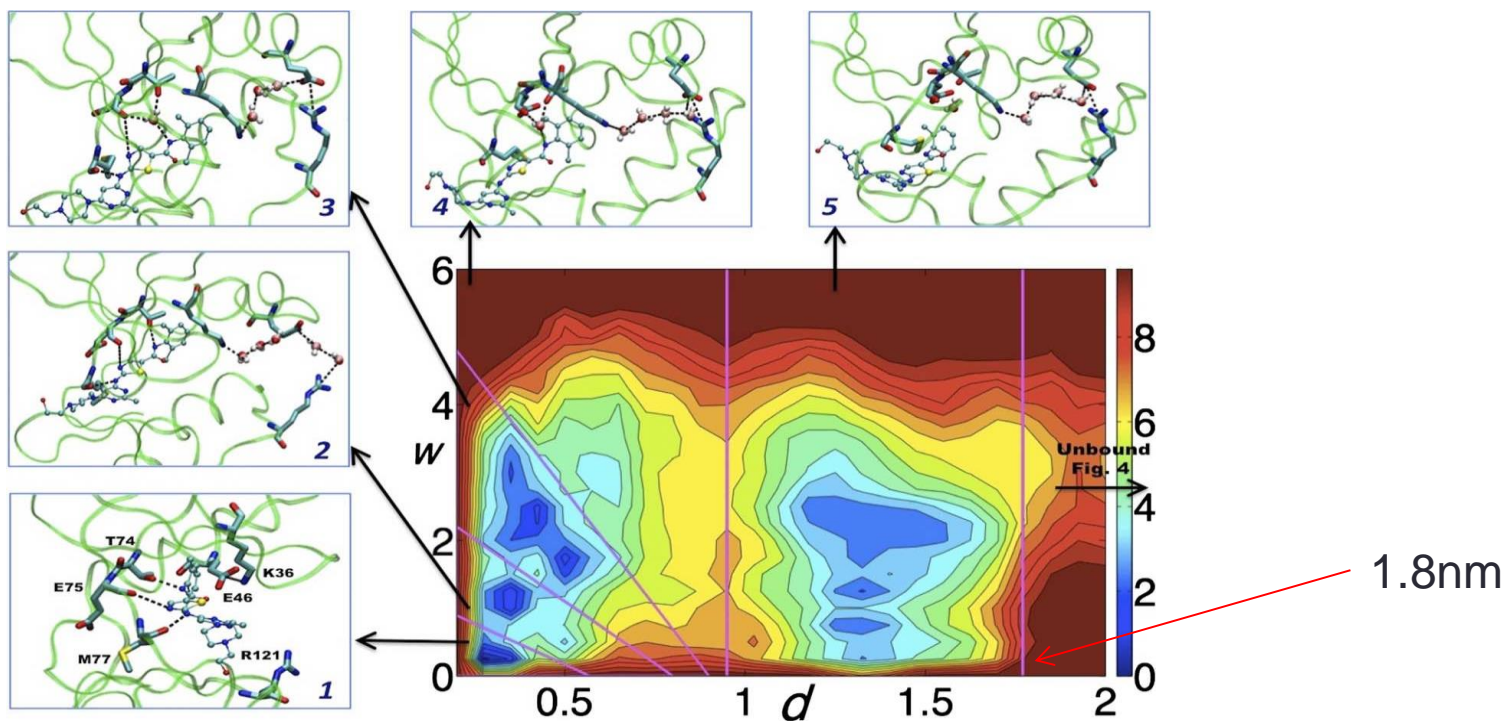


Residence times and *P* values for various states.

State	Residence time	p-value
Full unbinding	20.7 ± 9.7 sec	0.14
1	8.4 ± 5.5 sec	0.17
2	1.2 ± 0.9 sec	0.13
3	4.4 ± 2.7 msec	0.23
4	70.9 ± 43.6 μsec	0.16
5	99.5 ± 60.6 μsec	0.45

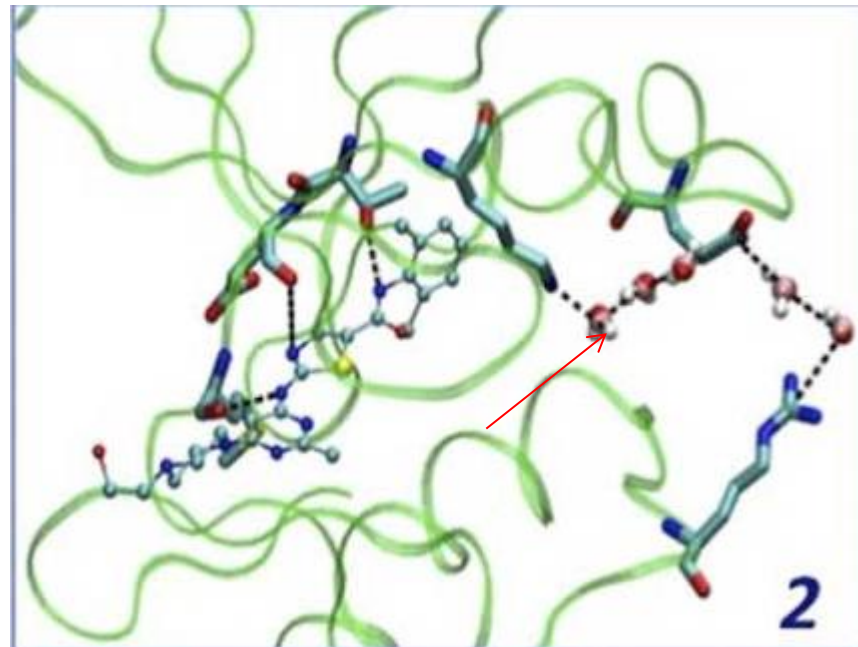
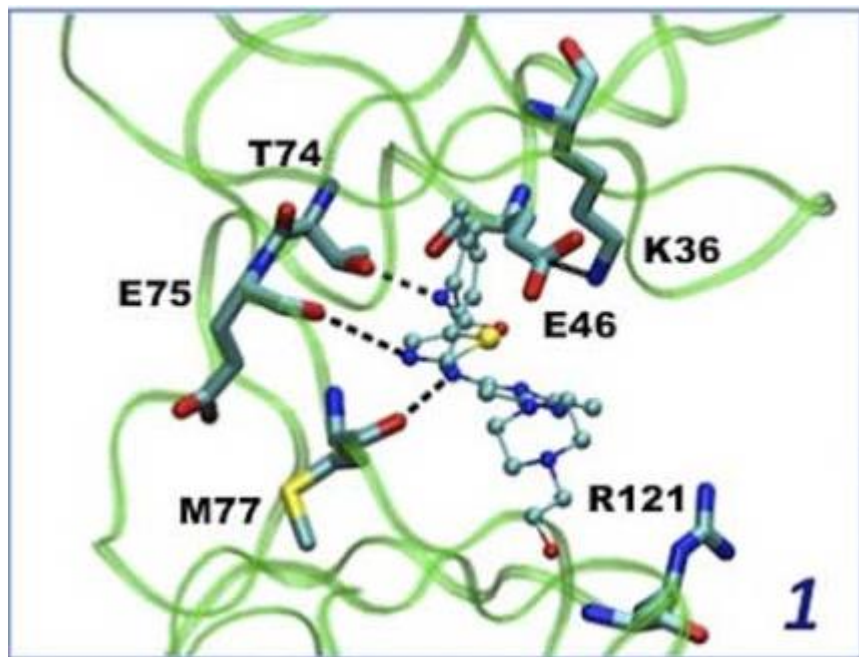
不同状态的停留时间及其标准差

2、估计表面自由能和稳定的中间产物



达沙替尼从c-Src激酶解离过程中的5个中间态，以及与 d 和 w 变化有关的自由能面（ d 代表了药物与配体之间的距离， w 代表了结合口袋的溶剂化状态。）

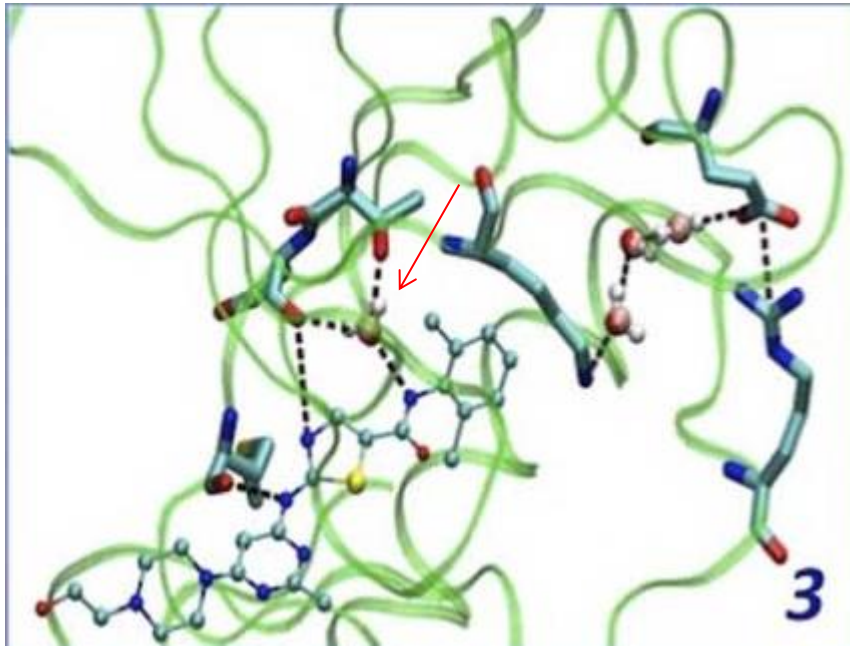
3、不同中间体的分子特性：



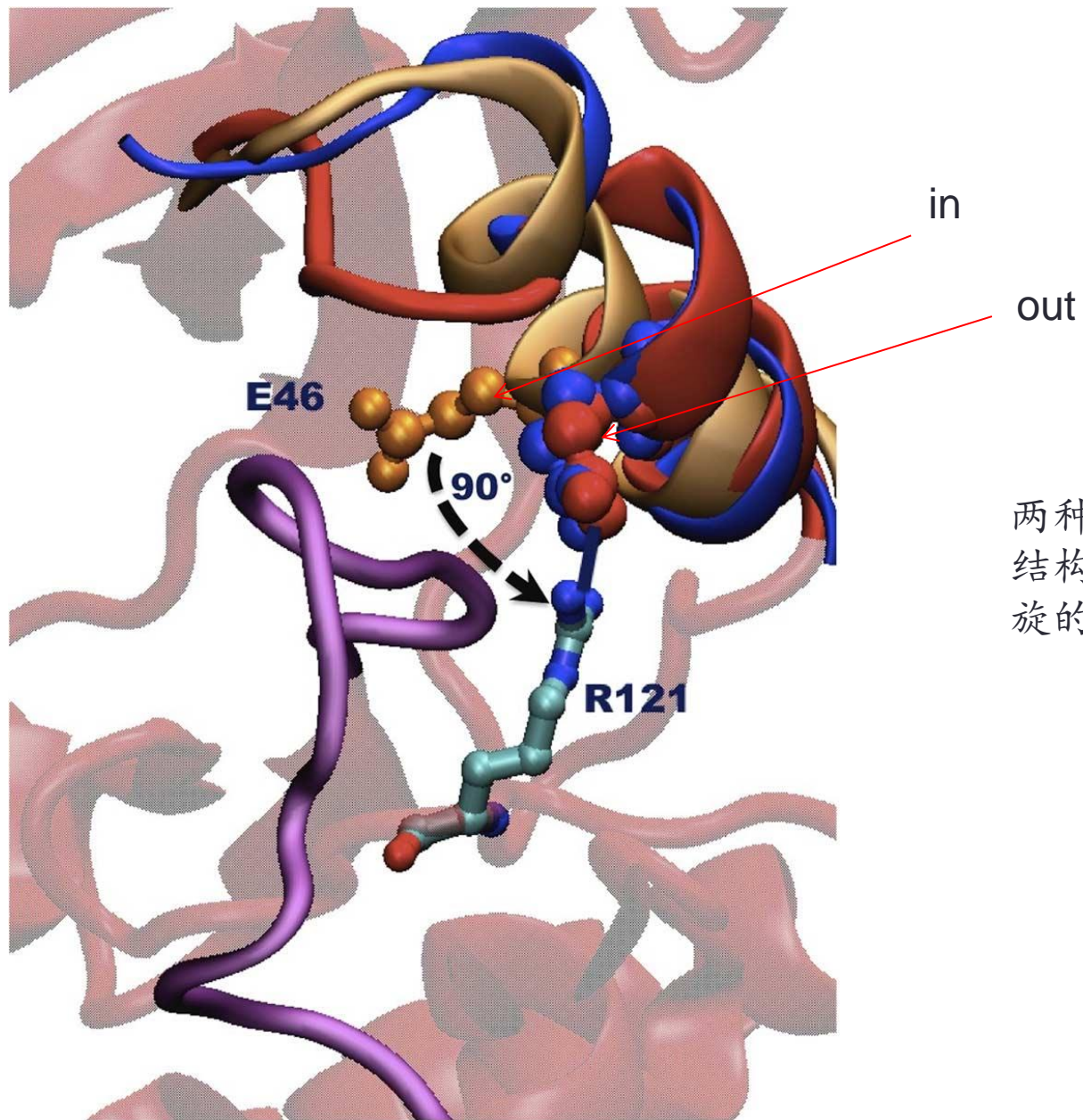
x-Ray-结合状态，停留时间是8s。可以看到药物与受体之间的相互作用主要是靠配体和蛋白质残基Thr74, Glu75, 和Met77之间形成的氢键。Lys36和Glu46之间形成了盐桥。

状态2，停留时间是1s。最明显的特征是Lys36-Glu46盐桥的直接相互作用被破坏，转为被水介导。

不同中间体的分子特性：

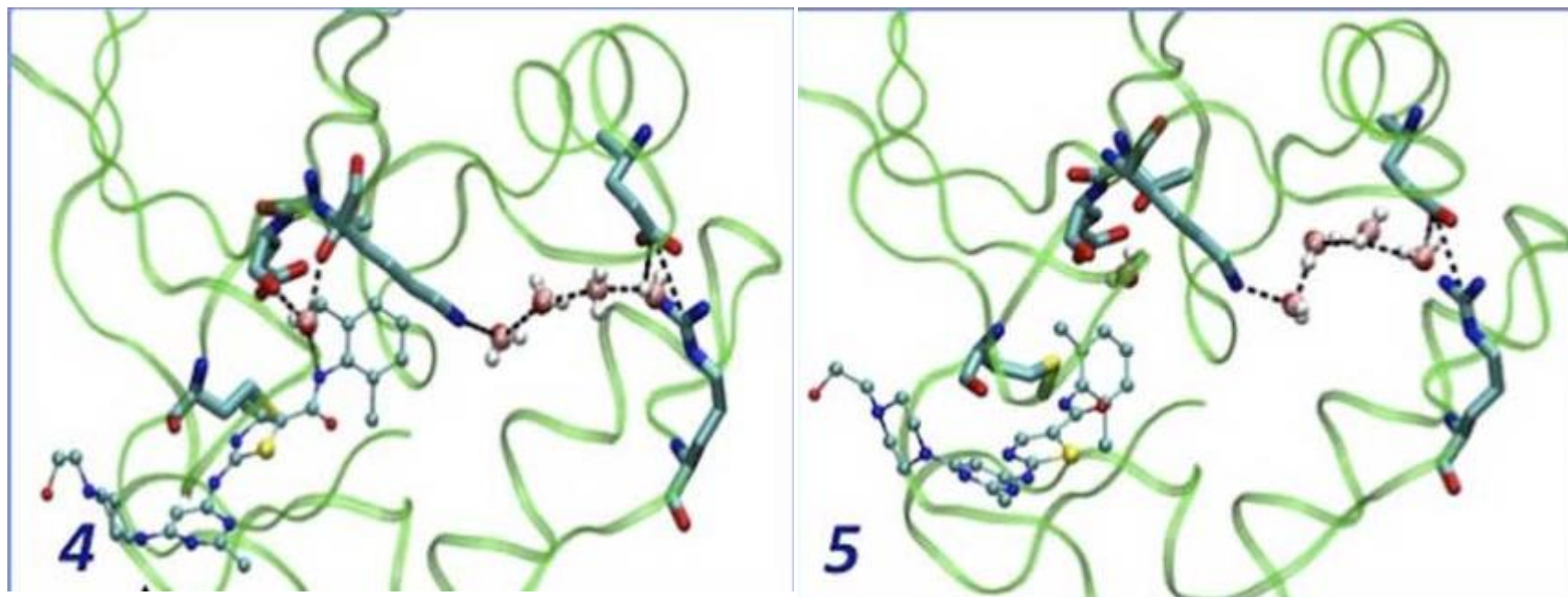


状态3：停留时间为4ms。由于 α C螺旋的旋转，为水分子进一步进入结合口袋形成了一定的空间。可以看到其中一个水分子打破了T47与小分子之间形成的氢键。

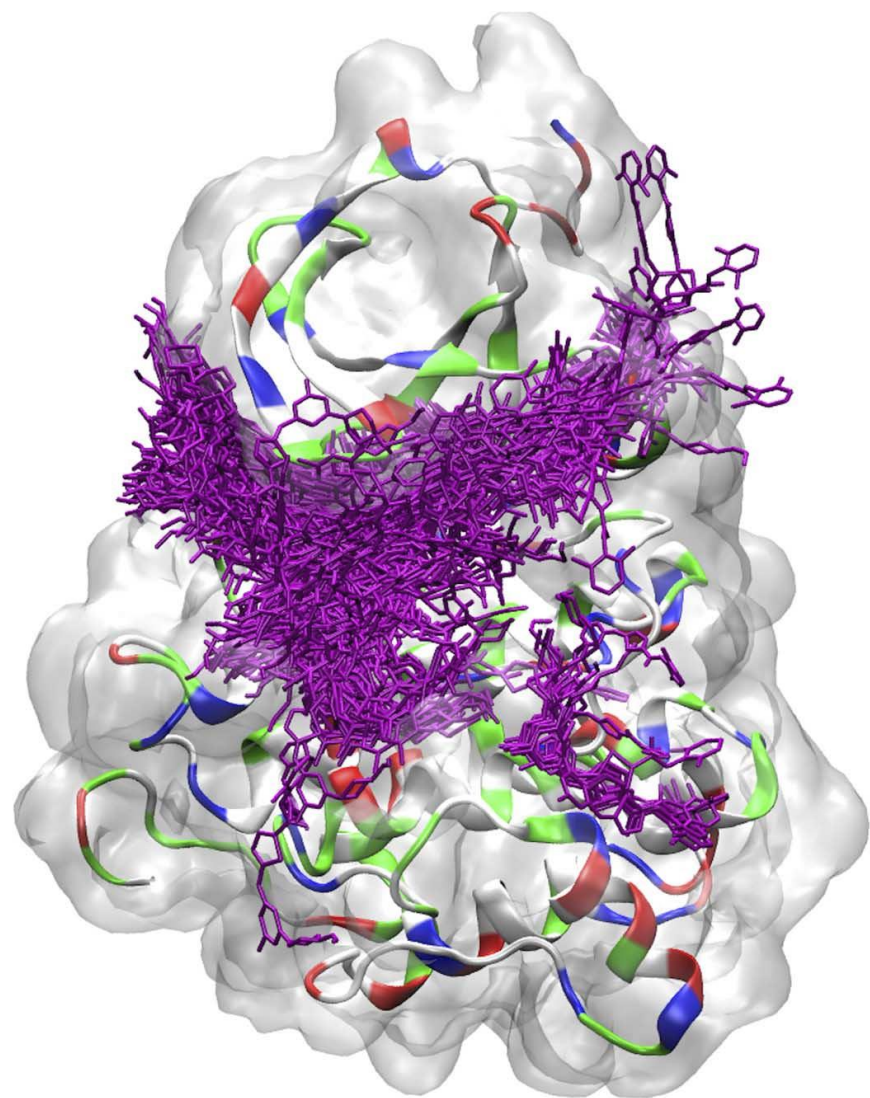


两种不同c-Src蛋白结构的叠合， α C螺旋的旋转。

不同中间体的分子特性：



状态4和5的停留时间分别为70和100us。展示了在水分子的不断入侵下，配体受体之间的相互作用逐渐被破坏。



在状态5结束之后，药物要么扩散在溶剂中，要么通过互联区域在蛋白质表面移动。

研究中没有详细描述表面扩散的时间尺度，但从动力学运行过程可以初步估计，扩散的时间尺度要比在结合口袋中的停留时间短几个数量级。

● 4、解离过程的限制步骤

- 第一个限速步骤是结合口袋初始的水合作用，这个过程药物分子本身是稳定的。伴随了Glu-Lys盐桥的破坏，形成一个分子开关，控制着解离的起始。当盐桥扭曲，就标志着会有大量的水分子进入结合口袋。
- 第二个限速步骤是，由于水分子都进入到结合口袋，打破了药物分子其与激酶残基的相互作用并使其离开它。当药物小分子离开后，之前进入的水分子也离开结合口袋，Glu-Lys盐桥重新形成，与X-RAY中的形态一样。然后药物穿过有吸引力的表面位点的区域，在溶剂中或蛋白质表面扩散。

● 本篇文章的药理学意义

1、该工作完全显示了解离过程中何时何地发生水合，以及它起到的作用。可以知道水分子不是旁观者，而是非常重要的参与者，水合作用是第一个也是必须经历的缓慢的过程。所以可以通过控制水分子进入结合口袋来增加停留时间。

2、解释了进化上保守的Lys-Glu盐桥作为分子开关解绑的作用。给我们的启示是：设计靶向某些特定c-Src激酶构象的具有更长停留时间的药物是困难的。同时告诉我们可以通过某种方法阻止 α C螺旋的旋转来延长停留时间。

结论/创新点:用全原子模拟的方法得到12条解离轨迹,证明了达沙替尼与靶蛋白的解离过程经历了多种稳定中间态,由分子开关控制水分子的进出来控制解离过程。

启发:加入将 α C螺旋突变,限制 α C螺旋的运动,但是不干扰达沙替尼与蛋白之间的氢键,可能会对Koff产生一定的影响,增加R-T residence time

改进:尽管已经达到了几秒钟的停留时间,但在实际应用中仍然缺少理想的时间尺度。可以通过增加计算能力,改进力场,以及更加可靠的增强采样方法的发展来加速计算,扩大计算量。

谢谢