

# 三氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-4(5H)-酮衍生物与二肽基肽酶-4结合机理的理论研究

王璇, 杨雪雨, 董珂珂, 朱小蕾

(南京工业大学化工学院, 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 通过分子对接、分子动力学(MD)模拟和结合自由能分析的方法研究了三氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-4(5H)-酮衍生物药物与二肽基肽酶之间的成键机制, 分析和讨论了抑制剂和相邻残基之间的氢键和疏水相互作用. 用 MM-PBSA 方法计算得到的 4 个抑制剂的结合自由能与实验上测得的结果是一致的. 抑制剂与 DPP-4 的关键残基间的范德华相互作用对于体系的结合能有较大的贡献, 并且是区分不同抑制剂生物活性的标志之一.

**[关键词]** 分子动力学模拟, MM-PBSA, 二肽基肽酶, 三氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-4(5H)-酮衍生物抑制剂

**[中图分类号]** O643.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)03-0062-05

## A Study on Binding Mechanism of 3H-imidazo[4,5-c]quinolin-4(5H)-ones to Dipeptidyl Peptidase IV Based on Molecular Dynamics Simulation

Wang Xuan, Yang Xueyu, Dong Keke, Zhu Xiaolei

(State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** We apply molecular docking, molecular dynamics (MD) simulations and binding free energy analysis to investigate and reveal the binding mechanism between four 3H-imidazo[4,5-c]quinolin-4(5H)-ones and DPP-4. The hydrogen bonding and hydrophobic interactions between inhibitors and adjacent residues are analyzed and discussed. The calculated binding free energies using MM-PBSA method are consistent with the experimental data. The van der Waals interaction between key residues of DPP-4 and inhibitors has larger contribution to total energy and can distinguish the binding affinity of four inhibitors.

**Key words:** molecular dynamics simulation, MM-PBSA, DPP-4, 3H-imidazo[4,5-c]quinolin-4(5H)-ones

二肽基肽酶-4(DPP-4), 又被称为 CD26, 是一种丝氨酸蛋白酶, 它能特异性地切掉底物 N 末端倒数第二位的氨基酸残基(脯氨酸或丙氨酸)<sup>[1]</sup>. 在 DPP-4 的酶活性底物中, 胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)对于葡萄糖维持稳态具有非常重要的意义<sup>[2]</sup>. GLP-1 作为一种肠促胰岛素, 通过刺激胰岛细胞分泌胰岛素来降低血糖. 它也可以延缓胃排空, 降低食欲, 减少胰高血糖素分泌以及刺激  $\beta$  细胞增殖, 这些都有利于控制血糖的水平. 然而, DPP-4 会切掉 GLP-1 的 N 末端的二肽, 使得 GLP-1(7-36)酰胺迅速失活<sup>[3]</sup>. 因此, 基于 GLP-1 的作用机制, DPP-4 抑制剂类型的抗糖尿病药物成为代谢研究中的重大突破<sup>[4]</sup>.

Ikuma 等<sup>[5]</sup>旨在找到比维格列汀、沙格列汀、利格列汀已上市的药物抑制活性更强、选择性更好的药物, 他们通过高通量筛选找到了抑制 DPP-4 作用较好的抑制剂——三氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-4(5H)-酮衍生物药物. 然而, 并没有关于这类抑制剂与 DPP-4 成键机制的理论报道, 且它们之间的构效关系也不清楚, 因此我们的研究在理论上就凸显出了重要性.

本文通过分子对接、分子动力学模拟和成键自由能计算等方法研究了三氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-4

收稿日期: 2015-10-29.

基金项目: 国家自然科学基金项目(20706029、20876073、91434109).

通讯联系人: 朱小蕾, 博士, 教授, 研究方向: 分子模拟的研究工作. E-mail: xlzhu@njtech.edu.cn

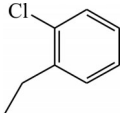
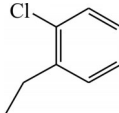
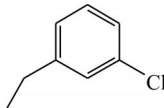
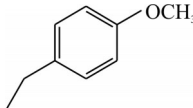
(5H)-酮衍生物药物与 DPP-4 之间的相互作用,这对于今后设计抑制活性更好的新型 DPP-4 抑制剂提供了有价值的思路。

## 1 计算方法

### 1.1 初始结构构建

DPP-4 的 X 射线晶体结构是从 PDB 数据库(PDB 代码:1RWQ,分辨率为 2.20Å)<sup>[6]</sup>中提取的。4 种药物的分子结构通过 3D 图形软件构建,然后通过 Gaussian09 软件<sup>[7]</sup>在 B3LYP/6-31G(d)水平上进行结构优化。4 种抑制剂的结构如表 1 所示。

表 1 DPP-4 的三氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-4(5H)-酮衍生物抑制剂结构及实验上的生物活性  
Table 1 Structure and bioactivity of 3H-imidazo[4,5-c]quinolin-4(5H)-ones inhibitors to DPP-4

抑制剂	R	X	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	抑制剂	R	X	IC <sub>50</sub>
B1		7-CO <sub>2</sub> H	1.6	B2		—	103
B3		—	110	B4		—	6 900

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> 为半抑制浓度,单位为 nmol/L。

### 1.2 分子对接

我们在 AUTODOCK4.0 软件<sup>[8]</sup>中进行了药物与蛋白质分子对接的过程。在对接前,需要将极性氢原子添加到 DPP-4,同时科尔曼全原子电荷被添加到 DPP-4 的部分原子上。对接计算中,药物分子的键设置为可自由旋转,而 DPP-4 为刚性。格点盒子的大小设定为 60 Å×60 Å×60 Å,间隔为 0.375 Å。我们总共进行 200 次独立的对接计算,对接的结果根据均方根偏离标准 2.0 Å 进行归类成簇。最后选择最佳的复合物用于之后的模拟过程。

### 1.3 分子动力学模拟

我们采用 AMBER10.0 软件<sup>[9]</sup>对每个体系进行分子动力学模拟。蛋白质和配体分别采用 AMBERFF03 和 GAFF 力场。每个复合物体系都浸入到 1 个被截断的八面体溶剂盒子中,所选择的水分子类型为 TIP3P<sup>[10]</sup>。之后需加入抗衡离子(Na<sup>+</sup>)使体系电荷成中性。在模拟之前,为了达到收敛标准,每一体系的能量优化都分别经过了最速下降法和共轭梯度法。随后进行受限制的动力学模拟,将每个体系逐步从 0K 升温到 300K。最后,在 NPT 系综下对每个体系进行 20 ns 的分子动力学模拟。在整个 MD 模拟过程中,采用 PME 方法来处理长程静电相互作用<sup>[10]</sup>,而涉及氢原子的键长则用 SHAKE<sup>[11]</sup>算法进行固定。轨迹坐标每 1 ps 保存 1 次用于进行下面的结合自由能计算和残基分解分析。

### 1.4 结合自由能计算

我们采用了 MM-PBSA 方法<sup>[12]</sup>来计算药物与 DPP-4 之间的结合自由能及自由能分解。对每个体系,我们从整个模拟过程的最后 10 ns 轨迹中选取 200 个构象进行分析。结合自由能  $\Delta G_{\text{bind}}$  的计算方法描述如下<sup>[13,14]</sup>:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G(\text{complex}) - [\Delta G(\text{protein}) + \Delta G(\text{ligand})], \quad (1)$$

$$\Delta G_{\text{bind}} = [\Delta E_{\text{gas}}] + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S, \quad (2)$$

$$\Delta E_{\text{gas}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdw}}, \quad (3)$$

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{nonpolar}}, \quad (4)$$

$$\Delta G_{\text{nonpolar}} = \gamma(\text{SASA}) + \beta. \quad (5)$$

其中  $\Delta G$  (complex),  $\Delta G$  (protein), 和  $\Delta G$  (ligand) 分别代表复合物、蛋白质及配体的自由能. 气态能  $\Delta E_{\text{gas}}$  包括静电能 ( $\Delta E_{\text{ele}}$ ) 和范德华能 ( $\Delta E_{\text{vdw}}$ ). 溶剂化自由能  $\Delta G_{\text{sol}}$  可以进一步分解为极性部分 ( $\Delta G_{\text{polar}}$ ) 和非极性部分 ( $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ ).

## 2 结果与讨论

4 种三氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-4(5H)-酮衍生物抑制剂分别对接到 DPP-4 中, 抑制剂分子都位于蛋白质的 S1 结合口袋和蛋白酶 N 端区域. 尽管 4 种抑制剂的几何结构有差异, 但它们的结合模式大致相同, 与 DPP-4 对接时都位于由 Glu205、Glu206、Arg356、Phe357、Tyr547、Tyr631、Tyr662、Tyr666 和 Arg669 所形成的疏水口袋中.

### 2.1 在 MD 模拟中体系的稳定性

为了考察模拟体系的稳定性, 我们分析了结合态以及游离态 DPP-4 上骨架 C $\alpha$  原子的均方根偏差 (RMSD). 结果表明所有体系的 RMSD 值在约 10 ns 之后都到达了平稳, 其值在 1.8 Å 附近波动. 这表明这几种复合物经过 10 ns 的分子动力学模拟已达到平衡.

### 2.2 DPP-4 与抑制剂的结合机制

本文采用了 MM/PBSA 方法计算了复合物的结合自由能, 结果如表 2 所示. 由表 2 可看出, 计算得到的 DPP-4/B1~DPP-4/B4 的结合自由能分别是 -26.37 kcal/mol、-21.37 kcal/mol、-20.03 kcal/mol、-11.41 kcal/mol, 表明生物活性的顺序是 B1>B2>B3>B4, 此结果与实验上的 IC50 值的顺序相一致.

表 2 通过 MM-PBSA 方法计算得到的 4 种复合物的结合自由能

能量项	DPP-4/B1	DPP-4/B2	DPP-4/B3	DPP-4/B4
$\Delta E_{\text{ele}}$	-30.94	-13.88	-0.79	-10.94
$\Delta E_{\text{vdw}}$	-46.52	-31.17	-36.70	-24.47
$\Delta E_{\text{gas}}$	-77.45	-45.05	-37.49	-35.41
$\Delta G_{\text{pol}}$	57.39	28.21	22.49	27.86
$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	-6.31	-4.52	-5.03	-3.85
$\Delta G_{\text{sol}}$	51.08	23.69	17.46	24.00
$\Delta G_{\text{bind}}$	-26.37	-21.37	-20.03	-11.41
IC50	1.6	103	110	6 900

此外, 为了清楚辨别每个残基对于总结合自由能的贡献, 我们用 MM-PBSA 方法对每个残基的作用能进行了分解, 进而更好地了解抑制剂上不同的取代基及结合模式对于结合的影响. DPP-4 与 4 种抑制剂的相互作用光谱图如图 1 所示. 从图 1 中可以看出: DPP-4 与抑制剂相互作用的关键残基为 DPP-4/B1 (Y547、Y631、Y662、Y666、R669)、DPP-4/B2 (S209、F357)、DPP-4/B3 (R357、Y537、S552、Y631) 和 DPP-4/B4 (F357).

为了进一步了解哪一种能量项有利于 DPP-4 与抑制剂的结合作用, 单独比较表 2 中的每一能量组分 ( $\Delta E_{\text{ele}}$ ,  $\Delta E_{\text{vdw}}$ ,  $\Delta G_{\text{pol}}$ ,  $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ ) 是有必要的. 从表中可以得出范德华作用对总的结合自由能贡献最大, 且是决定这 4 种抑制剂与 DPP-4 结合能力强弱的主要因素. 尽管气相静电能对结合是有利的, 但它不能完全抵消极性溶剂能产生的不利作用. 此外, 非极性溶剂能对于结合也有些许贡献.

由于范德华相互作用在复合物结合中起主要作用, 我们将范德华作用能进行了残基的分解分析, 结果如图 2 所示. 从表 2 中不难看出 DPP-4/B1 的范德华作用能为 -46.52 kcal/mol, 远大于 DPP-4 分别与

B2、B3 和 B4 之间的范德华作用能(-31.17 kcal/mol、-36.70 kcal/mol、-24.47 kcal/mol),这就决定了药物 B1 的生物活性较之 B2、B3 和 B4 更强. 如图 2, DPP-4/B1 的关键残基数量比其他复合物要多,因此它比其他复合物有着更强的范德华相互作用能,这与表 2 中的结果也是一致的. 图中显示出 B1 与 DPP-4 的关键残基尤其是 Y547 的相互作用对结合能贡献最大. 对 DPP-4/B2 和 DPP-4/B4 复合物来说, F357 也起着重要作用. 这说明, F357 和 Y547 对于区分 4 种抑制剂的生物活性起重要作用.

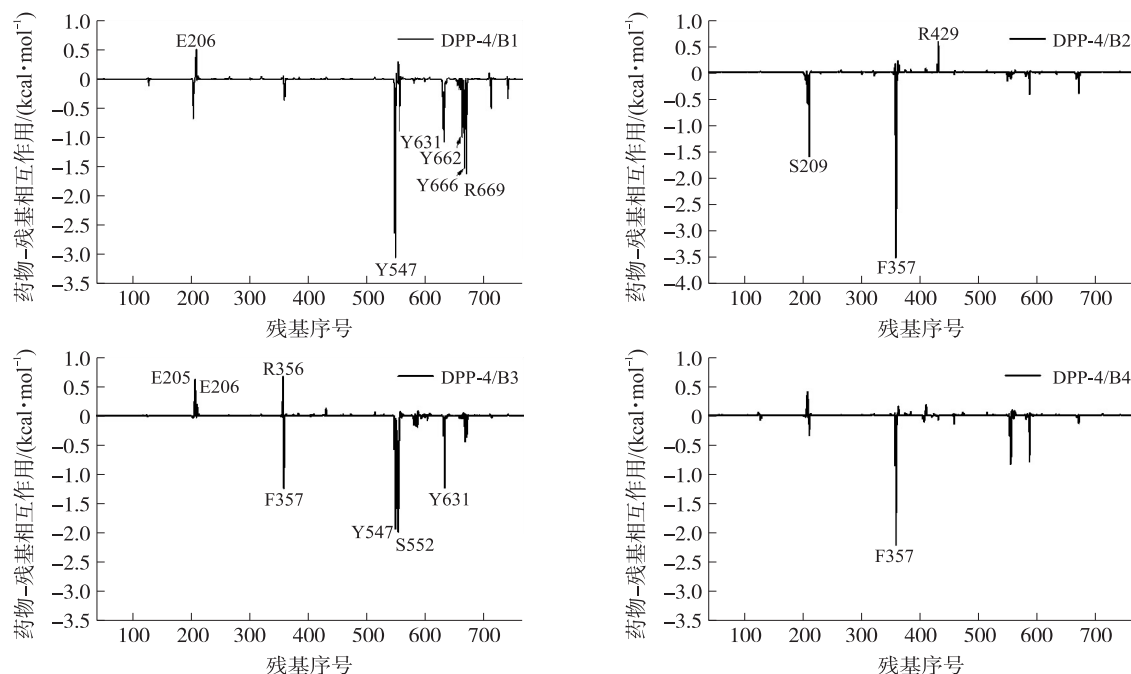


图 1 DPP-4抑制剂复合物中抑制剂-残基之间的相互作用谱图

Fig.1 Interaction spectra of inhibitor-residue pair in the protein-inhibitor complexes

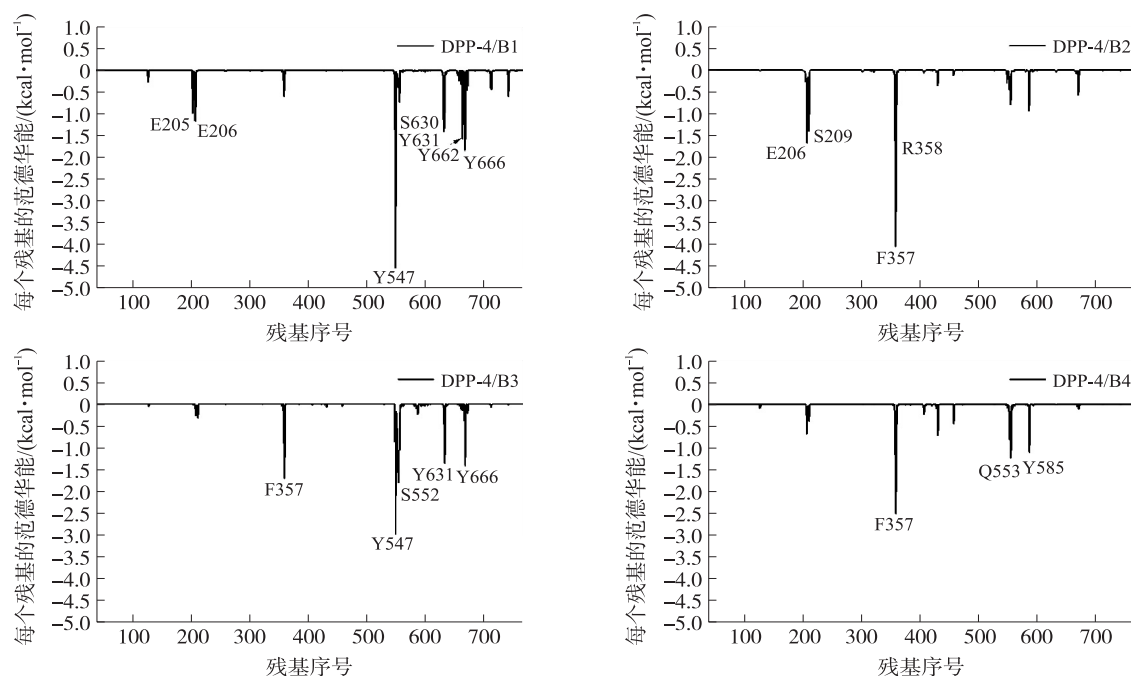


图 2 DPP-4、抑制剂复合物中抑制剂-残基的范德华作用谱图

Fig.2 Van der Waals interaction energy spectra of inhibitor-residue pair in DPP-4/inhibitor complexes

静电相互作用也影响着抑制剂的结合能力. 我们对模拟过程中形成的氢键进行了分析. 对于 B1, 其与周围的残基之间形成了两条稳定的氢键, 一条形成于 B1 的 O15 原子与残基 S630 的羟基氧之间, 另一条形成于 B1 的 O56 原子与残基 Q553 的 N 原子之间. B2 与残基 S209 的羟基氧形成了一条氢键, 而 B3

和 B4 与残基之间并没有氢键的形成. 因此 B1 抑制剂的静电相互作用能远强于 B2, B3 和 B4, 这与表 2 的结果是吻合的.

### 3 结论

本文通过分子动力学模拟、结合自由能分析和能量分解分析探究了 4 种三氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-4(5H)-酮衍生物抑制剂与 DPP-4 相互作用的机制, 并区分出了抑制剂的生物活性. 计算得到的 DPP-4/抑制剂复合物的结合自由能与实验测得的 4 种抑制剂的 IC<sub>50</sub> 值在顺序上是一致的. 结果表明药物与残基 S630 和 Q553 之间形成的稳定氢键对于抑制剂与 DPP-4 的结合是有利的. 范德华作用能, 特别是抑制剂与关键残基 F357 和 Y547 之间的范德华相互作用能在结合自由能中起主要贡献, 且在区分 4 种抑制剂的生物活性中起重要作用. 我们的工作为实验工作者设计新型的 DPP-4 抑制剂提供了理论指导.

### [参考文献]

- [1] BUSEK P, MALIK R, SEDO A. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer[J]. International journal of biochemistry & cell biology, 2004, 36(3): 408-421.
- [2] DRUCKER D J. Minireview: the glucagon-like peptides[J]. Endocrinology, 2001, 142(2): 521-527.
- [3] MAGNIN D R, ROBL J A, SULSKY R B, et al. Synthesis of novel potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors with enhanced chemical stability: interplay between the N-terminal amino acid alkyl side chain and the cyclopropyl group of alpha-aminoacyl-L-cis-4,5-methanoprolinenitrile-based inhibitors[J]. J Med Chem, 2004, 47(10): 2 587-2 598.
- [4] AHRÉN B. Use of DPP-4 inhibitors in type 2 diabetes: focus on sitagliptin[J]. Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy, 2010, 3: 31-41.
- [5] IKUMA Y, HOCHIGAI H, KIMURA H, et al. Discovery of 3H-imidazo 4,5-c quinolin-4(5H)-ones as potent and selective dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitors[J]. Bioorg Med Chem, 2012, 20(19): 5 864-5 883.
- [6] PETERS J U, WEBER S, KRITTER S, et al. Aminomethylpyrimidines as novel DPP-IV inhibitors: A 10(5)-fold activity increase by optimization of aromatic substituents[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14(6): 1 491-1 493.
- [7] FRISCH M J, TRUCKS G W, SCHLEGEL H B, et al. Gaussian09 Revision A.02[M]. Wallingford: Gaussian Inc, 2009.
- [8] MORRIS G M, GOODSELL D S, HALLIDAY R S, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function[J]. J Comput Chem, 1998, 19(14): 1 639-1 662.
- [9] CASE D A, CHEATHAM T A, SIMMERLING C L, et al. AMBER 10[M]. San Francisco: University of California, 2008.
- [10] JORGENSEN W L, CHANDRASEKHAR J, MADURA J D, et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water[J]. J Chem Phys, 1983, 79(2): 926-935.
- [11] RYCKAERT J P, CICCOTTI G, BERENDSEN H J C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes[J]. J Comput Phys, 1977, 23(3): 327-341.
- [12] SRINIVASAN J, CHEATHAM T E, CIEPLAK P, et al. Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate-DNA helices[J]. J Am Chem Soc, 1998, 120(37): 9 401-9 409.
- [13] SAIZ-URRA L, CABRERA M A, FROEYEN M. Exploring the conformational changes of the ATP binding site of gyrase B from Escherichia coli complexed with different established inhibitors by using molecular dynamics simulation protein-ligand interactions in the light of the alanine scanning and free energy decomposition methods[J]. J Mol Graph Model, 2011, 29(5): 726-739.
- [14] EL-BARGHOUTHI M I, JAIME C, AL-SAKHEN N A, et al. Molecular dynamics simulations and MM-PBSA calculations of the cyclodextrin inclusion complexes with 1-alkanols, para-substituted phenols and substituted imidazoles[J]. J Mol Struct Theochem, 2008, 853(1/2/3): 45-52.

[责任编辑: 顾晓天]