

## 基于结构的 HIV-1 蛋白酶抑制剂的虚拟筛选

谷万港<sup>1)</sup>, 张丽<sup>2)</sup>, 张旋<sup>3)</sup>

(1) 遵义医学院基础医学院免疫学教研室, 贵州遵义 563000; 2) 昆明医科大学学报编辑部; 3) 药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 通过新的虚拟筛选工具 PyRx 运行 AutoDock Vina, 对 ZINC 数据库的 2 万个化合物进行虚拟筛选, 发现新的 HIV 蛋白酶抑制剂, 并且对新的抑制剂与 HIV 蛋白酶的结合模型进行探索. **方法** 以 HIV 蛋白酶为靶点, 通过虚拟筛选程序 AutoDock Vina 对 ZINC 数据库的化合物进行虚拟筛选. 与以前研究不同的是, 本研究通过新的虚拟筛选工具 PyRx 运行 AutoDock Vina. HIV 蛋白酶晶体结构 (PDB ID: 4phv) 从 PDB 下载, 通过 AutoDockTools 对结构进行处理. 化合物结构下载自 ZINC 数据库, 通过 PyRx 导入, 处理成 pdbqt 格式. PyRx 运行 AutoDock Vina 以后, 筛选以后的化合物构象导入 AutoDockTools 进行分析, 数据处理用 PyMOL 完成. **结果** 从大约 2 万个化合物库中进行高通量筛选, 得到 1 000 个类药小分子化合物的库. 再从这 1 000 个小分子化合物中筛选针对蛋白酶的抑制剂. 通过对建立的化合物数据库进行 3 轮筛选, 发现 5 个高活性的 HIV 蛋白酶抑制剂. **结论** 5 个新的抑制剂的进一步开发, 将对 HIV 的治疗和基础研究带来帮助. 也对药物虚拟筛选和基于结构的药物开发提供新的信息.

**[关键词]** HIV-1; 蛋白酶; 抑制剂; 虚拟筛选; PyRx

**[中图分类号]** Q789 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 08 - 0019 - 04

## Discovery of Protease Inhibitors of HIV - 1 through Structure Based Virtual Screening

GU Wan - gang<sup>1)</sup>, Zhang Li<sup>2)</sup>, Zhang Xuan<sup>3)</sup>

(1) Dept. of Immunology, Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563000; 2) Editorial Department of Journal of Kunming Medical University; 3) School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** Through new virtual screening tools of PyRx to run AutoDock Vina to virtually screen the 20000 compounds in ZINC database, so as to discover new HIV protease inhibitors, and make a tentative study of the combination model of them with HIV protease. **Methods** The study focused on the targets of HIV protease, the virtual screening program of AutoDock Vina was used to virtually screen the compounds in ZINC database. It was differing from previous studies by using new virtual screening tools of PyRx to run AutoDock Vina. The HIV protease crystal structure (PDB ID: 4phv) was downloaded from PDB and dealt with AutoDock Tools. Compound structure was downloaded from ZINC database and imported with PyRx, processed into format of pdbqt. The post-screen compounds were imported into AutoDockTools, and the data were outputted with PyMOL. **Results** There were 1000 drugs of small molecular compound for high-throughput screening from about 20000 compounds in the library. After screening for 3 times we found five highly active HIV protease inhibitors from the 1000 small molecular compounds. **Conclusion** The further development of the five new HIV protease inhibitors will contribute to the treatment and basic research of HIV, and provide new reference for structure-based virtual screening and discovery of HIV drugs.

**[Key words]** HIV - 1; Protease; Inhibitors; Virtual screening; PyRx

**[作者简介]** 谷万港 (1979~), 男, 山东淄博市人, 博士, 讲师, 主要从事病毒免疫学研究工作.

**[通讯作者]** 张旋. E-mail: [snoopykm@126.com](mailto:snoopykm@126.com)

艾滋病是由人类免疫缺陷病毒感染引起的, 是一种免疫和中枢神经系统退行性疾病<sup>[1,2]</sup>。通过对 HIV 致病机理的大量研究发现, HIV 复制过程中的 3 个酶: 逆转录酶、蛋白酶和整合酶是病毒生活周期的 3 个关键酶<sup>[3-5]</sup>。目前, 治疗艾滋病的鸡尾酒疗法主要是逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的联合疗法<sup>[6-8]</sup>。然而, 在治疗过程中, 由于 HIV 病毒的高变异率, 耐药病毒株不断出现<sup>[9]</sup>。很多患者面临无药可选的尴尬局面。目前尚无有效的 HIV 疫苗问世, 而耐药病毒株对现有药物表现出越来越强的耐药性<sup>[3,10-14]</sup>。因此, 开发新的 HIV 蛋白酶抑制剂具有很紧迫的现实意义。一直以来, 蛋白酶都是抗艾滋药物研发的关键靶点<sup>[15-17]</sup>。

本研究针对报道的晶体结构<sup>[18]</sup>, 以蛋白酶为靶点筛选抑制剂。虚拟筛选技术是今年兴起的新型药物研发技术。近年, 这一新的药物发现技术在蛋白酶抑制剂的研发中也得到了初步的运用。本研究利用新的虚拟筛选工具 PyRx 运行 AutoDock Vina, 对 ZINC 数据库的化合物进行筛选, 发现 5 个新的高活性的 HIV 蛋白酶抑制剂, 并且对抑制剂与蛋白酶之间的结合模式进行了探索。

## 1 材料与方 法

### 1.1 软件与材料

本研究采用 AutoDockTools 1.5.4, Autodock Vina, PyMOL, PyRx 来自 The Scripps Institute。蛋白质晶体结构来自 PDB (Protein Data Bank), 化合物结构来自 ZINC 数据库。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 蛋白酶三维结构的获得和转换** HIV-1 蛋白酶晶体结构 (PDB ID: 4phv) 从 PDB 下载。用 AutoDockTools 进行处理, 去掉多余的分子, 按照 Autodock Vina 的运行要求对分子进行优化, 并且转换成 pdbqt 格式。

**1.2.2 化合物的结构处理** 所有的化合物结构从 ZINC 数据库下载, 用 PyRx 处理和转换成 pdbqt 格式。建立一个处理后的化合物数据库。

**1.2.3 筛选方法的建立和虚拟筛选** 运行 AutoGrid, 根据已经报道的文献设置活性位点。其它条件设为默认。选择 Lamarckian genetic algorithm (LGA) 计算方法, 用 PyRx 运行 Autodock Vina 完成虚拟筛选。

## 2 结 果

### 2.1 蛋白酶晶体结构

HIV-1 蛋白酶的晶体结构 (PDB ID: 4phv) 从蛋白数据库 (PDB) 下载。通过 AutoDockTools 对结构进行分析, 删除水分子, 加电荷、加氢原子, 然后保存为 pdbqt 格式。蛋白酶晶体结构见图 1, 可见蛋白酶含有含 AB 两条链, 共同构成药物结合的口袋。与蛋白酶共结晶的小分子化合物 VAC 以黄色表示。

本晶体结构从 PDB 网站下载。含 AB 两条链, 共同构成药物结合的口袋。与蛋白酶共结晶的小分子化合物 VAC 以黄色表示。蛋白酶的颜色根据不同的元素设置。

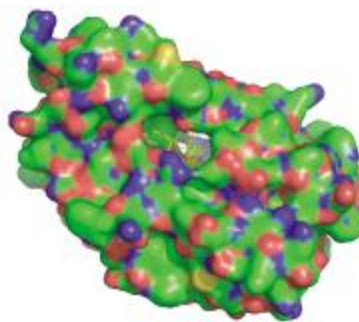


图 1 蛋白酶晶体结构

Fig. 1 The crystal structure of protease

### 2.2 药物结合位点

蛋白酶晶体结构是与小分子抑制剂 VAC 共结晶获得的, VAC 对 HIV 病毒有很好的抑制作用。因此, 本研究针对 VAC 和蛋白酶的结合位点进行筛选, 并且扩大了筛选范围, 不漏掉有活性的化合物, 筛选中心设定在 VAC, Gridbox 设定为 40X40X40。

### 2.3 虚拟筛选结果

首轮筛选从大约 2 万个化合物库 (ZINC 数据库) 中进行高通量筛选, 得到 1 000 个类药小分子化合物的库。再从这 1 000 个小分子化合物中筛选针对蛋白酶的抑制剂。通过对建立的化合物数据库进行 3 轮筛选, 筛选出活性最高的 5 个化合物, 化学结构见图 2, 对这 5 个化合物做进一步分析。

在虚拟筛选中活性最高的 5 个化合物, 结构及 ZINC 数据库编号见图 2。

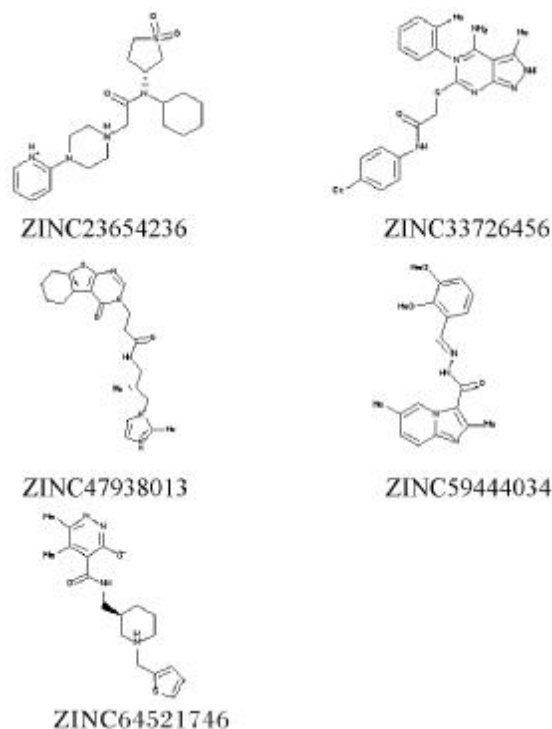


图 2 活性最高的 5 个化合物的化学结构

Fig. 2 The chemical structure of 5 compounds with highest activity

#### 2.4 抑制剂与蛋白酶的相互作用模型

用 PyMol 对得到的 5 个小分子抑制剂与蛋白酶的结合模式进行 3D 建模, 结果见图 3. 分析结果, 得到抑制剂跟蛋白酶之间的结合情况, 发现 5 个小分子抑制剂与蛋白酶结合主要是氢键结合力和疏水相互作用. 结果表明这 5 个化合物可作为蛋白酶的小分子抑制剂.

小分子化合物以杆状结构表示, 不同的元素用不同的颜色. CXCR4 显示高级结构, 蛋白表面用灰色表示. 参与小分子相互作用的氨基酸显示在蛋白表面里面, 并且标注氨基酸编号. 红色虚线表示氢键, 数字表示长度.

### 3 讨论

HIV 复制依赖于 3 个主要的酶即逆转录酶、蛋白酶和整合酶. 这 3 个酶一直是抗 HIV 药物研究的热点. 鉴于蛋白酶作为关键药物靶点的广阔前景, 蛋白酶抑制剂的研究引起了广泛关注<sup>[19-22]</sup>.

本研究针对蛋白酶靶点, 利用新的虚拟筛选工具 PyRx 运行 AutoDock Vina, 对 ZINC 数据库的化合物进行筛选, 发现 5 个新的高活性的 HIV 蛋白酶抑制剂. 这些化合物为新的蛋白酶抑制剂的研发

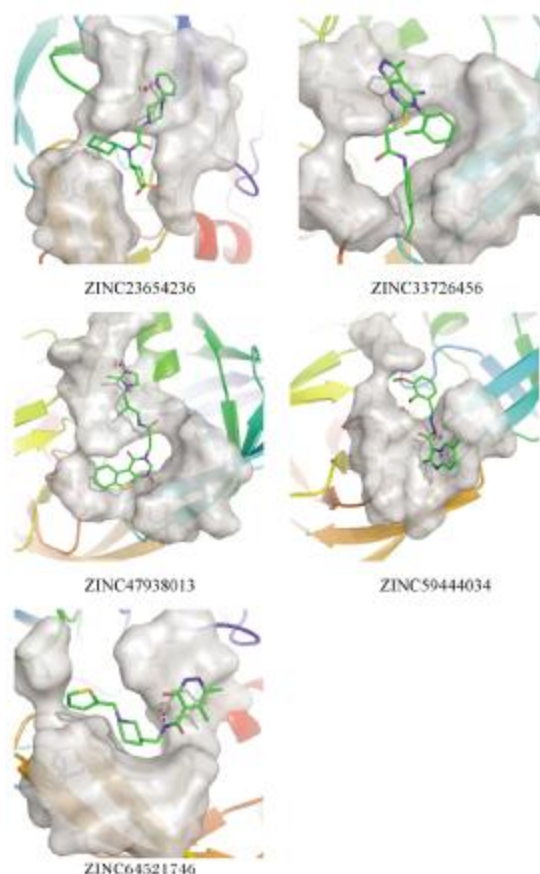


图 3 抑制剂与蛋白酶的相互作用模型

Fig. 3 The modes of the interaction between the inhibitors and protease

提供了有用的结构信息, 并且本研究对 PyRx, AutoDock Vina 等软件在 HIV 药物发现中的配合使用进行了尝试, 这对于抗 AIDS 的新药开发具有积极的意义. 作为一种新的虚拟筛选工具, PyRx 的开发为虚拟筛选带来了新的变革. PyRx 使虚拟筛选变的更简单. 良好的操作界面使虚拟筛选步骤更简洁. 跟之前多个软件转换操作相比, PyRx 实现了多软件的顺利整合. 这使得虚拟筛选变的更高效. 跟之前的虚拟筛选方法相比, PyRx 可以在更短的时间内更高效的筛选更多的化合物. 这就使药物被发现的几率大大增加. 本研究是应用 PyRx 进行蛋白酶抑制剂虚拟筛选的新报道, 笔者对新的筛选工具 PyRx 在蛋白酶筛选方面进行了尝试. 这对于蛋白酶抑制剂的研究是新的启发. 随着虚拟筛选新工具 PyRx 等的不断进步, 必定会大大提高蛋白酶抑制剂的研发速度.

#### [参考文献]

[1] LOUBOUTIN J P, REYES B A, AGRAWAL L, et al. HIV-

- 1 gp120-induced neuroinflammation: relationship to neuron loss and protection by rSV40-delivered antioxidant enzymes [J]. *Exp Neurol*, 2009, 221 (1): 231 – 245.
- [2] ORSINI M, DE FREITAS M R, SILVA J G, et al. Motor neuron disease and acquired axonal neuropathy association in HIV infection: case report and update [J]. *Curr HIV Res*, 2012, 10 (8): 694 – 699.
- [3] AITKEN S C, KLIPHUIS A, WALLIS C L, et al. Development and evaluation of an assay for HIV-1 protease and reverse transcriptase drug resistance genotyping of all major group-M subtypes [J]. *J Clin Virol*, 2012, 54 (1): 21 – 25.
- [4] HAUBRICH R H, RIDDLER S A, RIBAUDO H, et al. Initial viral decay to assess the relative antiretroviral potency of protease inhibitor-sparing, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-sparing, and nucleoside reverse transcriptase inhibitor-sparing regimens for first-line therapy of HIV infection [J]. *AIDS*, 2011, 25 (18): 2 269 – 2 278.
- [5] HENDERSON G J, LEE S K, IRLBECK D M, et al. Interplay between single resistance-associated mutations in the HIV-1 protease and viral infectivity, protease activity, and inhibitor sensitivity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 56 (2): 623 – 633.
- [6] BARRAGAN P, PODZAMCZER D. Lopinavir/ritonavir: a protease inhibitor for HIV-1 treatment [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2008, 9 (13): 2 363 – 2 375.
- [7] BIERMAN W F, VAN AGTMAEL M A, NIJHUIS M, et al. HIV monotherapy with ritonavir-boosted protease inhibitors: a systematic review [J]. *AIDS*, 2009, 23 (3): 279 – 291.
- [8] BLASS S C, ELLINGER S, VOGEL M, et al. Overweight HIV patients with abdominal fat distribution treated with protease inhibitors are at high risk for abnormalities in glucose metabolism – a reason for glycemic control [J]. *Eur J Med Res*, 2008, 13 (5): 209 – 214.
- [9] ALENCAR C S, NISHIYA A S, FERREIRA S, et al. Evaluation of primary resistance to HIV entry inhibitors among Brazilian patients failing reverse transcriptase/protease inhibitors treatment reveal high prevalence of maraviroc resistance-related mutations [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2010, 26 (12): 1 267 – 1 271.
- [10] ALBRECHT M, MUKHERJEE A L, TIERNEY C, et al. A randomized clinical trial evaluating therapeutic drug monitoring (TDM) for protease inhibitor-based regimens in antiretroviral-experienced HIV-infected individuals: week 48 results of the A5146 study [J]. *HIV Clin Trials*, 2011, 12 (4): 201 – 214.
- [11] GARCIA-ARRIAZA J, ARNAEZ P, JIMENEZ J L, et al. Vector replication and expression of HIV-1 antigens by the HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B is not affected by HIV-1 protease inhibitors [J]. *Virus Res*, 2012, 167 (2): 391 – 396.
- [12] HALLENGARD D, HALLER B K, PETERSSON S, et al. Increased expression and immunogenicity of HIV-1 protease following inactivation of the enzymatic activity [J]. *Vaccine*, 2010, 29 (4): 839 – 848.
- [13] LUO M, CAPINA R, DANIUK C, et al. Immunogenicity of sequences around HIV-1 protease cleavage sites: Potential targets and population coverage analysis for a HIV vaccine targeting protease cleavage sites [J]. *Vaccine*, 2013, 31 (29): 3 000 – 3 008.
- [14] WRIGHT J K, BRUMME Z L, CARLSON J M, et al. Gag-protease-mediated replication capacity in HIV-1 subtype C chronic infection: associations with HLA type and clinical parameters [J]. *J Virol*, 2010, 84 (20): 10 820 – 10 831.
- [15] ALFONSO Y, MONZOTE L. HIV Protease Inhibitors: Effect on the Opportunistic Protozoan Parasites [J]. *Open Med Chem J*, 2011, 5: 40 – 50.
- [16] ALI A, BANDARANAYAKE R M, CAI Y, et al. Molecular Basis for Drug Resistance in HIV-1 Protease [J]. *Viruses*, 2011, 2 (11): 2 509 – 2 535.
- [17] ALVIZO O, MITTAL S, MAYO S L, et al. Structural, kinetic, and thermodynamic studies of specificity designed HIV-1 protease [J]. *Protein Sci*, 2012, 21 (7): 1 029 – 1 041.
- [18] BONE R, VACCA J P, ANDERSON P S, et al. X-Ray Crystal Structure of the HIV Protease Complex with L-700,417, an Inhibitor with Pseudo C2 Symmetry [J]. *J Am Chem Soc*, 1991, 113: 9 382 – 9 384.
- [19] ANNAERT P, YE Z W, STIEGER B, et al. Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1 [J]. *Xenobiotica*, 2010, 40 (3): 163 – 176.
- [20] ANUURAD E, BREMER A, BERGLUND L. HIV protease inhibitors and obesity [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2010, 17 (5): 478 – 485.
- [21] BERGINC K, TRDAN T, TRONTELJ J, et al. HIV protease inhibitors: garlic supplements and first-pass intestinal metabolism impact on the therapeutic efficacy [J]. *Biofarm Drug Dispos*, 2010, 31 (8-9): 495 – 505.
- [22] BERTUCCI C, PISTOLOZZI M, FELIX G, et al. HSA binding of HIV protease inhibitors: a high-performance affinity chromatography study [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32 (10): 1 625 – 1 631.

(2013-04-18 收稿)