

抑制剂RN-486与BTK靶标作用机理的分子动力学研究

何 佳

内蒙古医科大学计算机信息学院, 内蒙古 呼和浩特
Email: hjwy87@163.com

收稿日期: 2021年5月21日; 录用日期: 2021年6月21日; 发布日期: 2021年6月28日

摘 要

布鲁顿式酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase)是近来治疗B细胞恶性肿瘤的明星靶点, 在很多疾病和信号通路中起着关键作用, 现已成为药物的研发热点。搞清楚BTK-抑制剂之前的相互作用及关键作用残基对药物的研发是十分必要的, 本文选择罗氏药业公司开发的BTK抑制剂(研发代号为RN-486), 使用MM/GBSA方法以及正则模式熵来计算靶标与抑制剂的结合自由能, 同时采用基于残基的自由能分解方法评估主要残基对抑制剂结合的贡献。结果发现, RN-486与靶标结合的能量主要以疏水相互作用和静电相互作用为主, 其中, LEU408和VAL416为两个重要的疏水残基, 与RN-486发生范德华相互作用, 而LYS430、TYR476和ASP539三个带电残基与RN-486发生静电相互作用。结合计算数据, 我们找到了抑制剂与靶标的主要结合位点与作用形式, 这为后期继续设计和开发BTK靶标的抑制剂提供根据指向性的理论指导。

关键词

MM/GBSA, BTK, 结合自由能, 热点残基

Insight into Interaction Mechanism of Inhibitor RN-486 to BTK Target by Using Molecular Dynamics Simulation

Jia He

College of Computer and Information, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia
Email: hjwy87@163.com

Received: May 21st, 2021; accepted: Jun. 21st, 2021; published: Jun. 28th, 2021

Abstract

Bruton's tyrosine kinase (BTK) is becoming an increasingly attractive target for drug discovery due to its critical role in multiple pathways and a variety of diseases. Understanding the binding mechanism and key residues in BTK-inhibitor interaction is crucial for effective drug discovery. In this study, a BTK inhibitor developed by Roche (RN-486) was selected. The MM/GBSA method and the normal mode entropy were used to calculate the binding free energy between the target and the inhibitor. Meanwhile, Residue-based free energy decomposition method was used to reveal the contribution of the major residues. The results showed that the binding mainly from hydrophobic interaction and electrostatic interaction. Leu408 and Val416 were two important hydrophobic residues, which had van der Waals interaction with RN-486. The charged residues Lys430, Tyr476 and Asp539 interact with RN-486 electrically. The results indicate that the main binding sites and interaction mechanism between inhibitor and target, which are expected to provide theoretical guidance for the subsequent design and development of inhibitors targeting BTK.

Keywords

MM/GBSA, BTK, The Binding Free Energy, Hot-Spots

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

布鲁顿氏酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase)是近期药物研发的热点,在治疗 B 细胞恶性肿瘤上非常关键,是非受体酪氨酸激酶 TEC 激酶家族的成员之一,几乎在所有的血液细胞中都会发挥其调控作用[1]。

BTK 是 B 细胞抗原受体(BCR)信号通路的重要组成部分,也是与 B 细胞正常生长、成熟紧密关联的重要分子。B 细胞抗原受体(BCR)及其前体(Pre-BCR)可调节与控制 B 细胞的稳态、分化及其功能[2]。BTK 结构包括 5 个区域,从 N 端到 C 端依次为: PH、TH、SH2、SH3、Kinase [3]。2007 年,从 Celera 基因组学的科学家报告的中可知,一些小分子可以通过不可逆地结合到其 ATP 结合域中的 Cys481 残基而使 BTK 失活[4]。首个被批准上市的 BTK 抑制剂 Ibrutinib 就是通过选择性地与 Cys481 位点发生有效且不可逆的结合,阻止 BTK 的磷酸化与活化,从而抑制 BTK 的活性。Ibrutinib 对治疗与 B 细胞恶性增殖相关的恶性肿瘤如慢性淋巴细胞白血病、套细胞淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤等也有较好的疗效[5]。罗氏药业公司开发的小分子抑制剂 RN-486 与 Ibrutinib 不同的是, Ibrutinib 为共价抑制剂,而 RN-486 以非共价形式与 BTK 靶标结合[6]。临床发现 Cys481 的突变后,抑制剂与靶标蛋白的共价键结合变弱,这样会导致药物产生耐药性[7] [8] [9], RN-486 这类的非共价结合的抑制剂可以抵抗这种耐药性,那么它与 BTK 靶标的相互结合作用机制就十分值得探讨了,这也为后续开发和设计 BTK 靶向抑制剂提供更好的理论支持。

分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟和结合自由能计算是现阶段研究抑制剂与靶标蛋白结合作用机制的主要工具,本文采用基于经验方程的 MM/PB (GB) SA [10] [11]方法以及基于残基的自由能分解方法来计算 RN-486 与 BTK 靶标的结合自由能,图 1 展示了小分子抑制剂的平面分子结构以及与 BTK 靶标的复合体结构。同时,希望此项工作能够为接下来设计非共价抑制剂提供有价值的结合位点信息和理论指导。

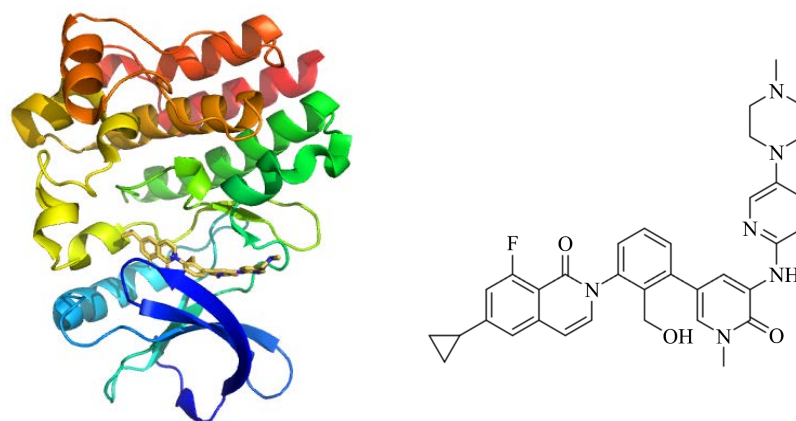


Figure 1. RN-486 with BTK complex structure chart and plane structure of RN-486
图 1. RN-486 与 BTK 的复合物结构图以及 RN-486 平面分子结构图

2. 理论和方法

2.1. 分子动力学模拟

在蛋白质库(PDB)中获取复合物晶体结构, PDBID 为 5P9G [12]作为做分子动力学模拟的初始构象, 本文使用的是 AMBER 力场进行分子动力学模拟, 蛋白质和水分子力场参数由 ff14SB 产生, 小分子抑制剂的力场参数由 gaff 力场生成, 小分子的电荷处理以及参数生成都使用 Amber Tools 中 Antechamber 程序, 并利用 Tleap 模块对复合物模型进行处理。复合体被溶解在显性的 TIP3P 水盒子中, 水盒子边缘与复合体最近原子的距离设定为 12 Å。在进行分子动力学模拟之前先约束溶质重原子, 优化氢原子和水, 在约束溶质主链原子, 优化侧链和水, 最后对体系进行整体优化、升温 and 一段时间的模拟平衡。体系在 NVT 系综中从 0 K 缓慢升温到 300 K, 用时 1 ns; 随后在 NPT 系综中进行平衡模拟, 用时 2 ns, 模拟温度为 300 K, 压强为 101 kPa; 最后再在 NPT 系综中进行 10 ns 的分子动力学模拟, 时间步长为 2.0 fs, 每 100 fs 保存一帧。在分子动力学模拟过程中采用 SHAKE [13]算法控制含氢化学键的伸缩, PME [14]方法计算长程静电相互作用, 非键相互作用的截断值为 10 Å。

2.2. 结合自由能的计算

MM/GBSA (分子力学广义玻尔兹曼比表面积)方法, 是端点自由能方法的一种, 以分子动力学模拟采样和连续介质模型方法为基础去计算两个分子间的结合自由能[15]。结合自由能焓和熵贡献的计算分别由 AMBER16 中的 perl 脚本 mm_pbsa.pl 和 nmode 模块完成, GB 模型的“igb”设置为 2, 从最后 2 ns 中的轨迹中均匀的取 100 帧用于 MM/GBSA 的计算。计算过程中去掉构象中的水分子和离子, 采用下面的公式计算小分子抑制剂和靶标蛋白的结合自由能:

$$\Delta G = \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdw} + \Delta G_{pol} + \Delta G_{nonpol} - T\Delta S \quad (1)$$

式中, ΔE_{ele} 和 ΔE_{vdw} 分别表示气相中小分子抑制剂与靶标蛋白的静电相互作用和范德华作用, 第三项 ΔG_{pol} 表示极性溶解自由能对结合自由能的贡献, 第四项 ΔG_{nonpol} 表示非极性溶剂对结合自由能的贡献, 最后一项 $-T\Delta S$ 表示熵变对结合自由能的贡献, 由传统热力学计算中的正则模式算出。第四项 ΔG_{nonpol} 非极性项由溶剂可及表面积(SASA)得到, 有公式:

$$\Delta G_{nonpolar} = \gamma\Delta SASA + \beta \quad (2)$$

式中, γ 和 β 是常数, $\gamma = 0.00542 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA})$, $\beta = 0.92 \text{ kcal/mol}$ 。

3. 结果和讨论

3.1. 体系的稳定性与自由能计算

为了评估复合物体系动力学过程的稳定性以及结合自由能取样是否合理，我们以初始构象作为参考对象，计算了 BTK 蛋白主链的均方根偏差(root-mean-square displacement, RMSD)，并绘制了 RMSD 随时间变化的图像(图 2)。如图 2 所示，经过 10 ns 的 MD 模拟，体系的 RMSD 最终稳定在 RMSD 的值波动范围在 1.2 Å 左右，方差和标准差分别为 0.0138 和 0.1175，说明所有体系都处于相对平衡的状态，因此我们认为对这段轨迹采样计算蛋白配体结合自由能是合理的。

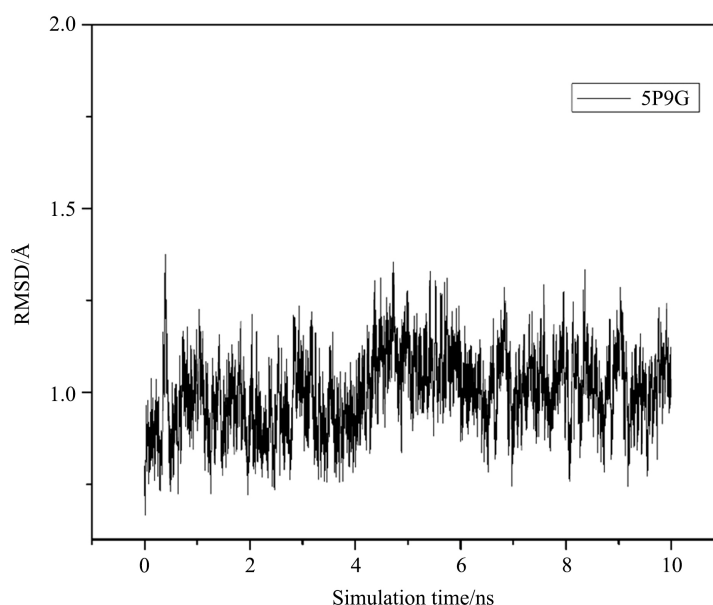


Figure 2. Molecular dynamics simulation of the root mean square deviation of 5P9G main chain atoms

图 2. 分子动力学模拟 5P9G 主链原子的均方根偏差

3.2. 计算结果与分析

我们从最后 2 ns 中的轨迹中均匀的取 100 帧用于 MM/GBSA 的结合自由能计算，如表 1 所示，结合自由能包含 5 个部分，静电相互作用(ΔE_{ele})、范德华相互作用(ΔE_{vdw})、极性溶剂自由能(ΔG_{pol})、非极性溶剂自由能(ΔG_{nonpol})和熵变对结合自由能的贡献($-T\Delta S$)。其中，范德华相互作用、静电相互作用和非极性溶剂自由能都为负值，有利于小分子抑制剂和 BTK 靶标的结合，而极性溶剂自由能和熵变为正值，即不利于小分子抑制剂与靶标的结合。而气相的静电作用和液相的极性溶剂作用总体看来不利于结合自由能的增加，范德华相互作用比起非极性溶剂自由能又大得多，因此，范德华相互作用在小分子抑制剂与靶标的结合中起着更重要的作用。

Table 1. Binding Free Energy of RN-486 and BTK Target Calculated by MM/GBSA Method (in Kcal/mol)

表 1. MM/GBSA 方法计算的 RN-486 与 BTK 靶标的结合自由能(单位 kcal/mol)

Complex	ΔE_{ele}	ΔE_{vdw}	ΔG_{pol}	ΔG_{nonpol}	$-T\Delta S$	ΔG
5P9G	-60.26	-62.78	73.52	-7.96	20.62	-36.85

如表 2 所示, 通过基于残基的自由能分解方法, 将结合自由能大于 1 kcal/mol 的残基列出, 共有 11 个热点残基对结合自由能贡献较大, 将它们从大到小进行排列。LYS430 在与 rn486 结合时自由能最大, 可以看出发挥主要作用的是范德瓦尔斯作用。如图 3 所示, 赖氨酸 LYS430 提供了含有氢原子的基团, 与 rn486 结构中的电负性原子 F 产生了较强的氢键相互作用。除此之外, LYS430 与 rn486 也产生了 π -烷基相互作用, 在作用部位, 二者的距离分别为 3.3 Å 和 5.2 Å。极性的 LYS430、TYR476、ASP539 与 rn486 相互作用所得溶剂能中的极化作用能对结合自由能有更多贡献, 非极性的 MET471、LEU408、VAL416 与 rn486 相互作用所得的极化作用能与非极性能的大小则没有那么明显的差别。以典型的非极性氨基酸亮氨酸 LEU408 为例, 如图 4 所示, 它与 rn486 形成了两个较强的 π -烷基相互作用, 在作用部位, 二者之间距离分别为 3.9 Å 和 4.8 Å。

Table 2. Interactions of RN-486 with key residuals in BTK target (in kcal/mol)

表 2. RN-486 与 BTK 靶标中主要残基的相互作用(单位 kcal/mol)

Residues	ΔE_{ele}	ΔE_{vdw}	ΔG_{pol}	ΔG_{nonpol}	ΔG
LYS430	-0.47	-12.4	9.73	-0.16	-3.30
MET471	-1.13	-2.73	0.89	-0.05	-3.01
TYR476	-1.84	-3.85	2.87	-0.08	-2.89
ASP539	-1.31	-6.12	5.16	-0.21	-2.48
LEU408	-2.82	-0.89	1.69	-0.42	-2.44
VAL416	-2.10	-0.48	0.65	-0.20	-2.13
LEU528	-1.75	-0.36	0.41	-0.25	-1.95
GLN412	-1.60	-0.46	0.61	-0.22	-1.68
GLY480	-1.29	-0.42	0.45	-0.20	-1.47
ASN479	-1.19	-0.78	0.95	-0.11	-1.12
ALA478	-1.06	-1.07	1.20	-0.10	-1.03

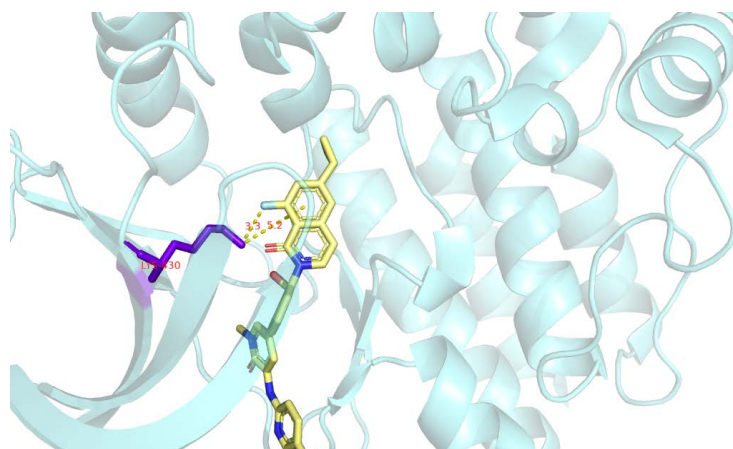


Figure 3. The hydrogen bond and π -alkyl interaction of Lys430 with RN-486

图 3. LYS430 与 RN-486 的氢键与 π -烷基相互作用

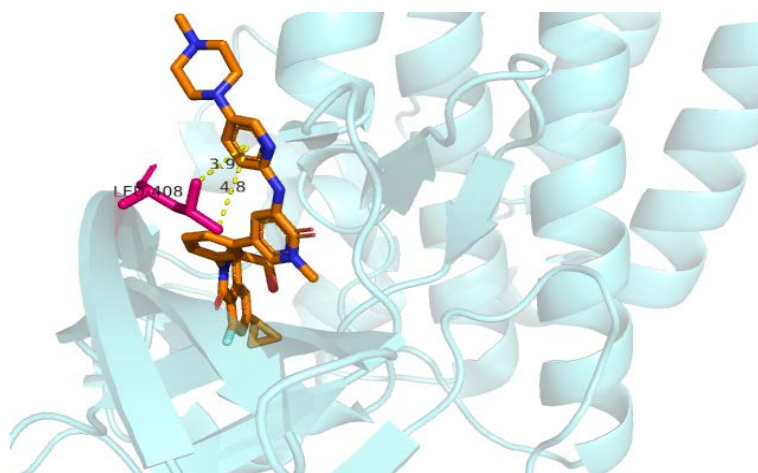


Figure 4. The hydrophobic interaction of Lys430 with RN-486
图 4. LEU408 与 RN-486 的疏水相互作用

4. 结论

本文通过分子动力学模拟及结合自由能计算的方法研究了 RN-486 与 BTK 靶标的相互作用机制，计算得到结合自由能为 36.85 kcal/mol，其中，范德华相互作用能和静电相互作用的数值最大，由此可知 BTK 与 rn486 相互作用的过程中，范德华相互作用和静电力相互作用占有主导地位。通过残基自由能分解的方法得到 LYS430、MET471、TYR476 和 ASP539 更易与 rn486 发生静电相互作用，LEU408 和 VAL416 则更易与 rn486 发生范德华相互作用。明确 rn486 与热点残基占主导地位的相互作用后，可以此为依据修饰 rn486 结构，使其更易于与对应的热点残基相互作用，最大程度地释放结合自由能。

基金项目

内蒙古医科大学青年创新基金(YKD2018QNCX002)。

参考文献

- [1] Hendriks, R.W., Yuvaraj, S. and Kil, L.P. (2014) Targeting Bruton's Tyrosine Kinase in B Cell Malignancies. *Nature Reviews Cancer*, **14**, 219-232. <https://doi.org/10.1038/nrc3702>
- [2] Rickert, R.C. (2013) New Insights into Pre-BCR and BCR Signalling with Relevance to B Cell Malignancies. *Nature Reviews Immunology*, **13**, 578-591. <https://doi.org/10.1038/nri3487>
- [3] Kawakami, Y., Kitaura, J., Hata, D., et al. (1999) Function of Bruton's Tyrosine Kinase in Mast and B Cells. *Journal of Leukocyte Biology*, **65**, 286-290. <https://doi.org/10.1002/jlb.65.3.286>
- [4] Spaargaren, M., de Rooij, M.F., Kater, A.P., et al. (2015) BTK Inhibitors in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Glimpse to the Future. *Oncogene*, **34**, 2426-2436. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.181>
- [5] Wang, Y., Zhang, L.L., Champlin, R.E., et al. (2015) Targeting Bruton's Tyrosine Kinase with Ibrutinib in B-Cell Malignancies. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **97**, 455-468. <https://doi.org/10.1002/cpt.85>
- [6] Michael, B.J., Mcfarland, J.M., Paavilainen, V.O., Angelina, B., Danny, T., Phan, V.T., Sergei, R., David, F., Jin, S. and Vaishali, P. (2015) Prolonged and Tunable Residence Time Using Reversible Covalent Kinase Inhibitors. *Nature Chemical Biology*, **11**, 525-531. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1817>
- [7] Jain, M., Chatterjee, A., Mohapatra, J., Bandhyopadhyay, D., Ghoshdostidar, K., Bhatnagar, U., Patel, H., Bahekar, R., Ramanathan, V. and Patel, P. (2015) 326 A novel Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor with Anticancer and Anti Inflammatory Activities. *European Journal of Cancer*, **51**, S63. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(16\)30191-5](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(16)30191-5)
- [8] Molina-Cerrillo, J., Alonso-Gordoa, T., Gajate, P. and Grande, E. (2017) Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) as a Promising Target in Solid Tumors. *Cancer Treatment Reviews*, **58**, 41. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.06.001>
- [9] De, C.S., Kurian, J., Dufresne, C., Mittermaier, A.K. and Moitessier, N. (2017) Covalent in Hibitors Design and Dis-

- covery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **138**, 96-114. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.019>
- [10] Kollman, P.A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D.A. and Cheatham, T.E. (2000) Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Accounts of Chemical Research*, **33**, 889-897. <https://doi.org/10.1021/ar000033j>
- [11] Brown, S.P. and Muchmore, S.W. (2006) High-Throughput Calculation of Protein-Ligand Binding Affinities: Modification and Adaptation of the MM-PBSA Protocol to Enterprise Grid Computing. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **46**, 999-1005. <https://doi.org/10.1021/ci050488t>
- [12] Bender, A.T. (2017) Ability of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors to Sequester Y551 and Prevent Phosphorylation Determines Potency for Inhibition of Fc Receptor but not B-Cell Receptor Signaling. *Molecular Pharmacology*, **91**, 208-219. <https://doi.org/10.1124/mol.116.107037>
- [13] Ryckaert, J.P., Ciccotti, G. and Berendsen, H.J.C. (1977) Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *Journal of Computational Physics*, **23**, 327-341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)
- [14] Darden, T., York, D. and Pedersen, L. (1993) Particle Mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems. *The Journal of Chemical Physics*, **98**, 10089-10092. <https://doi.org/10.1063/1.464397>
- [15] 侯廷军, 李有勇. MM/PBSA 和 MM/GBSA 对蛋白-配体自由能计算精度的评估研究[C]//中国化学会. 中国化学会第 28 届学术年会第 14 分会场摘要集. 成都: 四川大学出版社, 2012: 01-05.