

· 论著 ·

小分子 p53-MDM2 抑制剂先导化合物苜普地尔的研究

罗川¹, 李锦², 张万年², 缪震元² (1. 安徽华润金蟾药业股份有限公司, 安徽 淮北 235000; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

【摘要】 目的 采用老药新用药物设计方法, 探寻 p53-MDM2 蛋白结合小分子抑制剂的先导化合物。方法 通过荧光偏振(FP)法和蛋白印迹试验法, 分别测定化合物的 p53-MDM2 蛋白结合抑制活性和相关蛋白的表达变化, 采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)测试其体外抗肿瘤活性, 并且测定人肝微粒体中代谢产物。结果 发现苜普地尔具有优秀的体外抗肿瘤活性和较强的 p53-MDM2 蛋白结合抑制活性, 能显著降低 MDM2 蛋白的表达, 而且呈剂量依赖性。在人肝微粒体中的代谢产物主要为苯环羟基单氧化代谢产物。结论 苜普地尔可作为 p53-MDM2 蛋白结合小分子抑制剂先导化合物, 用于后续的结构优化设计研究。

【关键词】 老药新用; 药物设计; 苜普地尔; p53-MDM2 蛋白结合抑制剂

【中图分类号】 R914

【文献标志码】 A

【文章编号】 1006-0111(2021)02-0126-04

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.202009031

Discovery of bepridil as a valuable lead compound with potent p53-MDM2 inhibitory activity

LUO Chuan¹, LI Jing², ZHANG Wannian², MIAO Zhenyuan² (1. Anhui Huarun Golden Frog Pharmaceutical Co., Ltd., Huaibei 235000, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To find novel lead compounds as p53-MDM2 inhibitors by drug repurposing strategy. **Methods** The p53-MDM2 inhibitory activities of compounds were determined by FP and western blotting. MTT method was used to determine the in-vitro antitumor activities. The metabolites in human liver microsomes were tested. **Results** Bepridil showed excellent in-vitro anti-tumor activity and strong p53-MDM2 protein binding inhibitory activity, which can significantly reduce the expression of MDM2 protein in a dose-dependent manner. The metabolites in human liver microsomes are mainly benzene ring hydroxyl mono-oxidation metabolites. **Conclusion** Bepridil can be used as a lead compound for p53-MDM2 protein binding small molecule inhibitors for subsequent structural optimization design studies.

【Key words】 new uses of old drugs strategy; drug design; bepridil; p53-MDM2 inhibitor

老药新用是药物设计的重要途径之一, 采用此方法可以获得药物研究所需的先导化合物, 迄今为止已有许多成功的案例, 特别是在新型冠状病毒肺炎治疗药物研究中采用此策略, 获得了很多有价值的药物^[1-3]。阿司匹林从发明至今已有百年的历史, 最初用于解热、镇痛和抗炎。随着医学科学的发展, 在临床上发现阿司匹林的新用途, 能够抑制血小板的聚集, 抑制心脑血管疾病的发生^[4-5]。因此, 从上市药物中寻找新的适应证或将其作为先导物进行结构优化的老药新用设计方法成为药物研究

的有效手段^[6-7]。

1 仪器与试剂

实验所用试剂均为分析纯; 6种药物原料药: 苜普地尔、保泰松、阿洛西林、盐酸氮草斯汀、盐酸多沙普伦、美芬洛酮(南京多点化工有限公司); 还原型辅酶 II (NADPH, 东京化学工业有限公司); 混合人肝微粒体(美国 BD Gentest 公司)。

Biotek Synergy H2 多功能酶标仪、MK-2 全自动酶标仪、戴安公司 Ultimate3000 液相色谱系统(包括三元输液泵、柱温箱、自动进样器和真空脱气机)和 AB 公司 4000Q-Trap 型串联质谱仪, 配有电喷雾电离源, 以及 AB 公司 Analyst (version 1.5.1)、LightSight (version 2.2.1) 数据采集及分析软件。

【基金项目】 国家自然科学基金(81373331)

【作者简介】 罗川, 高级工程师, 研究方向: 肿瘤药物研究与开发, Tel: 0561-3152858, Email: luoch51@126.com

【通信作者】 缪震元, 副教授, 研究方向: 药物化学, Tel: 021-81871241, Email: miaozhenyuan@hotmail.com

2 实验方法

2.1 p53-MDM2 蛋白结合抑制活性测试^[8]

将荧光肽 (PMDM-F, Anaspec) 用缓冲溶液 (100 mmol/L 磷酸钾、0.02% 叠氮化钠、100 μg/ml 牛丙种球蛋白, 用蒸馏水定容至 500 ml, pH 7.5) 稀释至 10 nmol/L, 加入到梯度稀释的 MDM2 癌基因蛋白中, 30°C 避光孵育 30 min。荧光各向异性值用 Biotek Synergy H2 多功能酶标仪读取, 蛋白结合常数根据荧光各向异性值用 Mathematica 9 软件拟合得到。

将购买的 6 个药物溶于二甲基亚砜 (DMSO), 缓冲液稀释至所需要浓度 (最终缓冲液中含有 1% DMSO)。然后将 20 μl 化合物加入到 60 μl 含有 10 nmol/L PMDM-F 肽和 100 nmol/L MDM2 蛋白的溶液中, 30°C 避光孵育 1 h。荧光各向异性值用 Biotek Synergy H2 多功能酶标仪读取, 蛋白结合常数根据荧光各向异性值用 Mathematica 9 软件拟合得到。

2.2 蛋白印迹试验^[9]

将人肺腺癌上皮细胞 (A549) 培养, 待细胞生长至 70%~80% 时, 加药处理。药物处理不同时间后, 用 0.25% 胰酶消化, 离心收集细胞, 再用胞浆蛋白核蛋白裂解液 4°C 裂解, 提取胞浆蛋白及核蛋白。采用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白转移到固相支持膜 (PVDF 膜) 上, 封闭液室温封闭 1~2 h, 用等渗缓冲盐溶液 (tris-buffered saline tween-20, TBST) 洗膜 5 min, 洗 3 次。采用 TBST 稀释抗体, 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜 5 min, 洗 3 次。然后用 TBST 稀释 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 5 min, 洗 3 次。暗室内采用 ECL 显色, X 线片曝光成像。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参照, 分析成像光片灰度值, 并以对照组为基准进行量化。

2.3 体外抗肿瘤活性测试^[10]

样品配制: 用 DMSO 溶解后, 加入磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 配成 1000 μg/ml 的溶液或均匀的混悬液, 然后用含 DMSO 的 PBS 稀释。

MTT 比色法: 96 孔板每孔加入浓度为 (5~6)×10⁴ 个/ml 的细胞悬液 100 μl, 置 37°C, 5% CO₂ 培养箱内。24 h 后, 加入样品液, 10 μl/孔, 设双复孔, 37°C、5% CO₂ 作用 72 h。每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl, 作用 4 h 后加入溶解液, 100 μl/孔, 置培养箱内, 溶解后用 MK-2 全自动酶标仪测定 570 nm 处 A 值, 计算 IC 值。

$IC(\%) = [(空白对照孔 A 值 - 给药孔 A 值) / 空白对照孔 A 值] \times 100\%$

根据不同浓度的 IC 值, 进行线性回归, 计算出抑制肿瘤细胞生长 50% 的药物浓度, 即 IC₅₀。

2.4 体外代谢研究^[11]

每个孵育体系总体积为 200 μl, 介质为 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4), 包括终浓度为 1 mg/ml 的肝微粒体蛋白、50 μmol/L 的苄普地尔和 2 mmol/L 的还原型辅酶 II (NADPH), 用 37°C 水浴进行孵育, 60 min 后加入同体积冰冷乙腈终止反应。被终止反应的肝微粒体孵育样品, 离心 5 min (13 000 r/min), 取出全部上清液置于 10 ml 试管中, 于 40°C 空气流下吹干, 残留物以 100 μl 乙腈/水 (10: 90, V/V) 复溶, 取 10 μl 进行 HPLC/Q-Trap MS 分析。色谱条件为色谱柱为 Kromasil® C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm), Agilent C₁₈ 保护柱 (12.5 mm×2.1 mm, 5 μm)。流动相: 乙腈 (A)-10 mmol/L 甲酸铵水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 10% A; 10~15 min, 90% A; 15.1~18 min, 10% A; 流速为 0.3 ml/min; 柱温为室温; 进样量为 10 μl。质谱条件为电喷雾离子化源 (ESI), 正离子检测。雾化温度为 500°C, 电喷雾电压为 5 200 V, 气帘气流速 20 L/min, 雾化气 50 L/min, 辅助气流速 50 L/min。扫描方式为 MRM/MIM 簇发 EPI。

3 结果

3.1 p53-MDM2 蛋白相互作用抑制活性

课题组在针对 p53-MDM2 靶标进行虚拟筛选过程中, 发现 Wayne 等已运用计算机构象筛选法对 ZINC 数据库中 3 244 个 FDA 已批准上市药物进行了筛选, 鉴别出与 p53-MDM2 抑制剂 Nutlin-3a 结构不同, 但具有类似形状电荷分布的化合物^[12]。然后, 通过 Autodock 软件与 MDM2 蛋白进行分子对接, 根据结合能获得打分函数排名前 15 的化合物, 但未用分子药理学实验证实其作用靶标。因此, 课题组购买了可售的 6 个药物 (图 1)。对这 6 个药物进行蛋白结合抑制活性实验, 以 Nutlin-3 为阳性对照药, 结果见表 1。

从表 1 中可以看出, 6 个药物中美芬诺酮、盐酸氮葶斯汀、苄普地尔和保泰松 4 个药物体现出一定的 p53-MDM2 蛋白结合抑制活性, 其余 2 个药物无活性。其中, 钙离子拮抗剂苄普地尔的 K_i 值达到 0.456 μmol/L, 显示出优异的 p53-MDM2 蛋白结合抑制活性。

为验证苄普地尔是否能抑制 p53-MDM2 蛋白

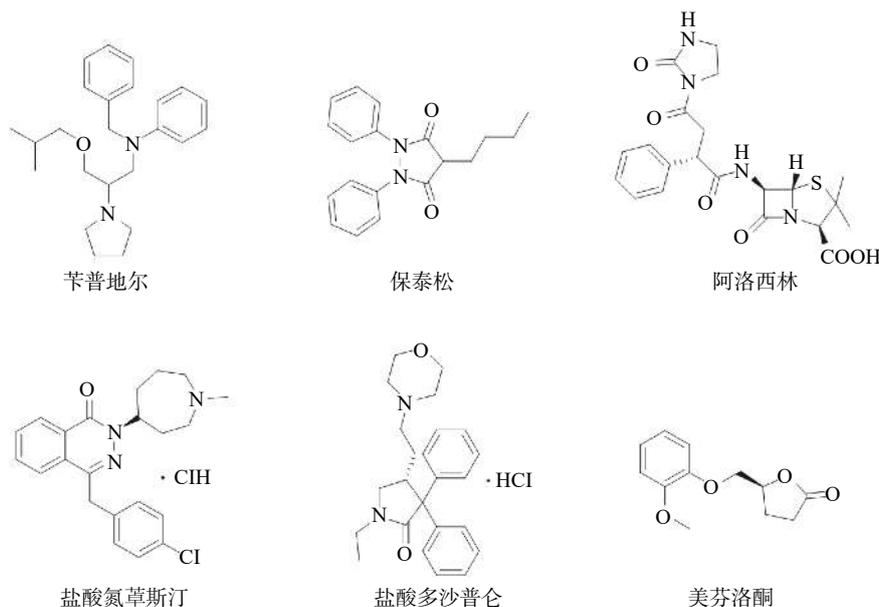


图1 6个市售药物的化学结构

表1 蛋白结合抑制活性和体外抗肿瘤活性测试结果

化合物	K_i ($\mu\text{mol/L}$)	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)			
		U-2OS (wt-p53)	Saos-2 (p53 null)	A549 (wt-p53)	NCI-H1299 (p53 null)
Nutlin-3	0.093	12.2	8.38	2.18	1.97
美芬诺酮	5.79	>100	>100	8.43	>100
盐酸氮草斯汀	216.3	6.38	3.80	1.54	4.32
苜普地尔	0.456	2.58	1.56	1.04	1.39
保泰松	155.5	71.31	>100	91.45	>100
阿洛西林	NA	>100	>100	>100	>100
盐酸多沙普仑	NA	>100	>100	60.68	>100

结合,采用免疫印迹试验测定相关蛋白的表达变化,结果如图2。从图中可以看出,苜普地尔对p53蛋白表达作用相对较小,并且随着苜普地尔浓度上升到10 $\mu\text{mol/L}$,反而出现下降。但苜普地尔能显著降低MDM2蛋白的表达,而且呈剂量依赖

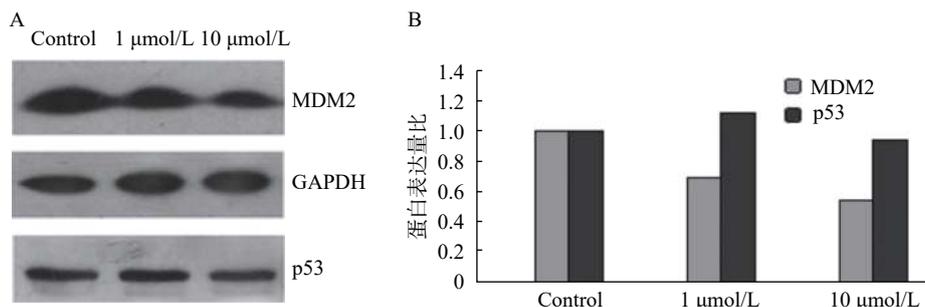
关系,初步说明苜普地尔能明显抑制p53-MDM2蛋白结合。

3.2 体外抗肿瘤活性研究

课题组选择骨肉瘤(U-2OS、Saos-2)和肺癌(A549、NCI-H1299)2组细胞株进行了6个药物的体外抗肿瘤活性测试(表1)。从表1中可以看出,苜普地尔对4种细胞株均具有优秀的抗肿瘤活性,其 IC_{50} 值均低于3 $\mu\text{mol/L}$,优于阳性对照药Nutlin-3。而美芬诺酮尽管具有中等的p53-MDM2蛋白结合抑制活性($K_i=5.79 \mu\text{mol/L}$),但除对A549具有较好的抗肿瘤活性,其余细胞株均未显示出活性。令人意外的是盐酸氮草斯汀尽管具有较弱的p53-MDM2蛋白结合抑制活性,但对4种肿瘤细胞株也显示出较好的活性。

3.3 苜普地尔的体外代谢研究

课题组进一步对苜普地尔开展了人肝微粒体中代谢产物研究,结果见表2、图3和图4。发现在经人肝微粒体孵化的样品中除原形药物(M0, m/z

图2 苜普地尔对A549细胞中MDM2及p53蛋白表达的调节作用($\mu\text{mol/L}$)

A. 蛋白印迹实验图; B. 灰度分析图

表2 苜普地尔在肝微粒体孵化体系中的代谢产物信息

编号	代谢途径	质荷比	分子式	保留时间(<i>t</i> /min)
M0	原形	367	C ₂₄ H ₃₄ N ₂ O	11.6
M1	氧化	383	C ₂₄ H ₃₄ N ₂ O ₂	9.8

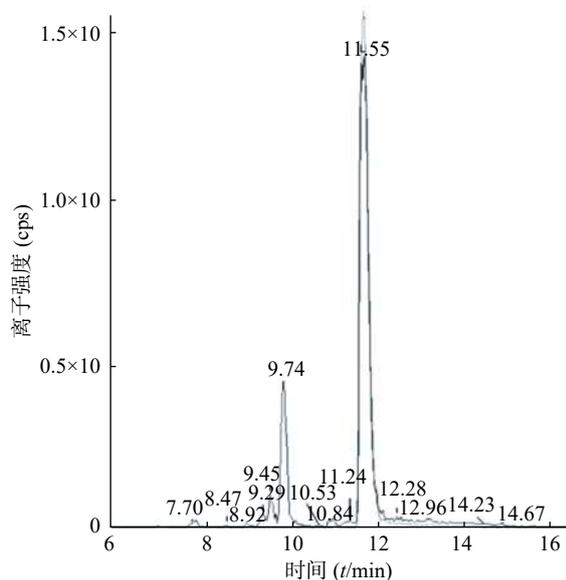


图3 苜普地尔在肝微粒体孵化体系中代谢产物的色谱图

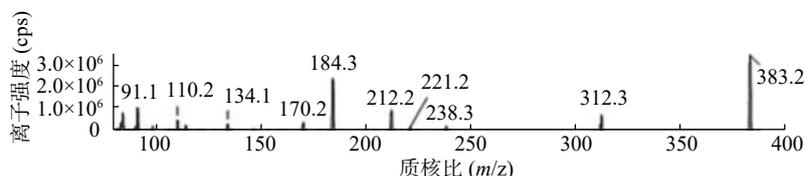


图4 代谢产物M1的MS/MS质谱图

367)外,在保留时间为9.8 min处检测到1个色谱峰,命名为M1,其*m/z*为383。推测其分子式组成为C₂₄H₃₄N₂O₂,比原形增加1个O,可能为单氧化代谢产物。在MS/MS扫描质谱图中,由M1获得的主要碎片离子为*m/z* 312、212、184(图4),其中*m/z* 312、212比原形的主要碎片离子*m/z* 296、196,相对分子质量增加16,而碎片184与原形的相同,且未见相对分子质量少18的碎片,推测其为苯环羟基化代谢产物。

4 结论

基于老药新用的药物设计思想,课题组验证发现钙离子拮抗剂苜普地尔具有优秀的抗肿瘤活性和较强的p53-MDM2蛋白结合抑制活性。进一步通过免疫印迹试验发现,苜普地尔能显著降低MDM2蛋白的表达,而且呈剂量依赖。体外代谢研究发现,苜普地尔在人肝微粒体中的代谢产物主要是苯环羟基化单氧化代谢产物。研究表明,苜普地尔可作为p53-MDM2蛋白结合小分子抑制剂先导化合物,用于后续的结构优化设计研究。

【参考文献】

- PARSONS C G. CNS repurposing-potential new uses for old drugs: Examples of screens for Alzheimer's disease, Parkinson's disease and spasticity[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 147: 4-10.
- LIU Y X, WU W, LIANG Y J, et al. New uses for old drugs: the tale of artemisinin derivatives in the elimination of schistosomiasis japonica in China[J]. *Molecules*, 2014, 19(9): 15058.
- CHEN V C, CHAN H L, HSU T C, et al. New use for old drugs: The protective effect of atypical antipsychotics on hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(10): 2428-2439.
- YEOMANS N D. Aspirin: old drug, new uses and challenges[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(3): 426-431.
- PATRONO C. Aspirin: new cardiovascular uses for an old drug[J]. *Am J Med*, 2001, 110(1A): 62S-65S.
- YANG B W, SHI J L. Developing new cancer nanomedicines by repurposing old drugs[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(49): 21829-21838.
- NELSON B S, KREMER D M, LYSSIIOTIS C A. New tricks for an old drug[J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(11): 990-991.
- 赵方振,庄春林,郭子照,等. 1H-吡咯-2(5H)-酮类化合物的合成及生物活性[J]. *药实践杂志*, 2012, 30(6): 430-432, 456.
- LI J, WU Y L, GUO Z Z, et al. Discovery of 1-arylpyrrolidone derivatives as potent p53-MDM2 inhibitors based on molecule fusing strategy[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(12): 2648-2650.
- MIAO Z Y, ZHU L J, DONG G Q, et al. A new strategy to improve the metabolic stability of lactone: discovery of (20S, 21S)-21-fluorocamptothecins as novel, hydrolytically stable topoisomerase I inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(20): 7902-7910.
- ZHUANG C L, MIAO Z Y, ZHU L J, et al. Discovery, synthesis, and biological evaluation of orally active pyrrolidone derivatives as novel inhibitors of p53-MDM2 protein-protein interaction[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(22): 9630-9642.
- WARNER W A, SANCHEZ R, DAWOODIAN A, et al. Identification of FDA-approved drugs that computationally bind to MDM2[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2012, 80(4): 631-637.

【收稿日期】 2020-09-15 【修回日期】 2021-03-07
【本文编辑】 陈盛新