

· 综述 ·

全新药物设计与常用软件及其在抗癌药物设计中的应用

殷 丽, 陈临溪 (南华大学药物药理研究所, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] 计算机辅助药物设计已普遍应用于药物研发过程, 大大加快了药物开发的速度。特别是全新药物设计方法可以用于识别作用于特异性靶点的全新配体结构。全新药物设计常用软件有 LUDI, LigBuilder, LeapFrog, SPROUT 和 SYNOPSIS 等, 常用方法有片段连接、片段生长、侧链替换和骨架跃迁等。全新药物设计方法在一些抗癌化合物, 如纺锤体驱动蛋白抑制剂、血管内皮生长因子抑制剂、亲环蛋白 A 抑制剂和 BRAF 抑制剂等的发现方面, 已经发挥了重要作用。综述全新药物设计方法与常用软件, 并举例讨论其在新型抗癌药物领域中的应用。

[关键词] 全新药物设计; 抗癌药; LUDI; LigBuilder; LeapFrog

[中图分类号] R914.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)01-0009-08

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.01.003

Applications of the common software and methods of *de novo* drug design in the antitumor drug design

YIN Li, CHEN Linxi (Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hunan Hengyang 421001, China)

[Abstract] Computer aided drug design had become part of the drug discovery process, greatly improved the speed of drug development compared with traditional drug finding methods. In particular, the *de novo* drug design method could be used to identify ligands with novel structure for a special target. Through computer simulation, researchers could find new ideas about how to change a compound to improve the drug properties or how to assemble some fragments to generate candidates which be drug-like, synthetically accessible and high affinity for a target. The common software of *de novo* design included LUDI, MCSS, LigBuilder, SPROUT, SYNOPSIS, BREED, LeapFrog and RACHEL, etc. The methods were fragments link and grow, side chain replacement, parent molecule evolve, template, scaffold hopping and so on. Discovery and development of cancer drugs had been revolutionized over the last decade. *De novo* drug design methods had already played a significant role in the discovery of some anticancer compounds such as kinesin spindle protein inhibitors, vascular endothelial growth factor inhibitors, cyclophilin A inhibitors, cell division cycle protein CDC25 inhibitors and BRAF inhibitors. The common software and methods of *de novo* drug design were summarized in this review and their applications in antitumor drug design were discussed.

[Key words] *de novo* drug design; antitumor drug; LUDI; LigBuilder; LeapFrog

传统新药的主要发现途径是基于大量化合物在各种活性测定模型下通过广泛筛选获得, 需要耗费大量人力、物力, 盲目性大且命中率低, 在抗癌药物研究领域也不例外。新的抗癌药物主要有两大来源: 新类型化合物的发掘和现有抗癌药物的结构修饰和改造。虽然已研制出许多新型抗癌药物, 但癌症的高致死率需要更多有效治疗癌症的新药问世^[1]。随着近 10 年来计算机辅助药物设计 (computer aided drug design, CADD) 研究的实质性进展,

其研究成果已成为药物研发过程的常用方法之一, 具有比实验筛选更高效、更便捷的优势, 大大加快了药物设计和研发的速度^[2]。因此, 应利用 CADD 在基础研究中筛选高效、安全的候选化合物, 并在先导化合物优化过程中改进化合物特性。全新药物设计 (*de novo* drug design) 是一种特殊的 CADD 方法^[3,4], 本文对全新药物设计的常用软件与方法及其在抗癌药物设计中的应用做一综述。

1 全新药物设计方法

1.1 概述 全新药物设计可以描述为通过基于片段设计概念设计潜在的靶点生物学活性化合物, 主要原则是以生物学靶点的结构信息为指导, 将小分子片段置于蛋白结合位点上, 构建符合靶点空间需要的小分子化学结构^[5]。从本质上说, 有以下几个

[基金项目] 国家自然科学基金(81270420); 教育部留学归国人员科研启动基金(20091590); 湖南省高校创新平台开放基金(10K051); 湖南省自然科学基金省市联合(衡阳)基金重点项目(12JJ8013); 湖南省十二五重点学科资助。

[作者简介] 殷 丽, 女, 硕士研究生。Tel: 18684738315, E-mail: 657568572@qq.com.

[通讯作者] 陈临溪。Tel: (0734)8282614, E-mail: chenlinxi@tom.com.

问题可以编入全新药物设计程序:如何模拟有效的搜索空间、如何收集候选化合物以及如何评估这些化合物的潜在生物学性质。这个过程的主要优势在于它可以利用靶点结构广泛的三维空间,探索到可能尚不存在的全新化合物。

需要注意的是,全新药物设计面临大量化学组合的问题,大量不同类型的片段或原子具有多种相互连接的方式^[6],而且每个结构还存在很多变化的空间构象,因此需要执行有效的优化算法在蛋白位点空间里对合适的候选化合物进行取向。在理论上产生的化合物不仅要有对靶点的高亲和性,而且还有类药性、合成可行性及合适的药物吸收、分配、代谢、排泄和毒性(absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity, ADMET)等性质。许多最近发展的软件都试图使用特殊的打分方法解决这些问题。全新药物设计研究方法的选择同样受到靶点空间结构有效性的限制,靶标分子的三维结构除了可通过X射线衍射和NMR提供数据外,同源蛋白建模也能预测其结构模型^[7]。通过已有实验数据或软件搜索确定相互作用位点,减少在片段生长连接时软件的结构探索空间。

1.2 设计方法 基于受体结构的药物设计(structure-based drug design)主要使用两种方法:①连接技术:将来自数据库的小片段(如胺、羧酸、单环和碳氢化合物)置于靶点不同的活性位点,连接这些小片段形成最终的单个化合物^[8];②生长技术:将单一的小片段置于靶点活性位点,片段按照满足受体结合位点需要生长,产生一系列与靶点特异性结合的化合物。可以通过从外向内和从内向外两种方法放置片段。从外向内法的片段最初置于结合位点边缘,再向内生长,如Caveat和SPROUT软件即是使用的这种方法;从内向外法的片段则先随机放入结合位点,再向外生长,如LUDI软件。

在全新药物设计方法中,对起始分子片段的定位和活性位点的分析是设计能否成功的重要环节。GRID软件计算网络格点上各种探针分子与受体活性位点的相互作用功能,找出各种探针分子的最佳作用区域。MCSS用基团探针代替简单的原子探针,在位点内置入大量功能团进行能量优化和比较结合能,确定最佳结合区,并给出空间取向。HINT软件在上述研究的基础上,加入计算疏水场分布。

全新药物设计分为以下步骤:①最初的起始单元,可以是一个结构片段或原子,也可以是多个起始单元,放置在生物学靶点想要研究的活性口袋中。起始单元的选择对化合物如何生成有显著影响。②然后将原子或片段加到起始单元上,通过软件打分

函数评估得到的结构,看结果是接受还是拒绝。如果接受,新生成的结构将在下一轮循环里作为新的起始单元;如果拒绝,循环将会从之前的起始单元重新开始。③经过多轮循环后,当最后得到的分子达到研究人员定义的某一性质特征值时,循环将结束。此时得到的化合物即为所需结构,也可做进一步的结构修饰及优化。

全新药物设计建立化合物时的常用策略:①将片段连续加到新生的起始单元上,直到满足与受体蛋白所需对接模式。②将几个活性片段置于受体蛋白的对接位点,然后选择合适的桥片段进行连接,尽量减少配体与受体结合的空间阻碍,增加化合物的类药性和合成可行性。③在原有已知的有效化合物骨架上,通过R基团替换,以侧链来修饰骨架,改善化合物性质。④对已知的母体化合物,若其骨架化学性质或与受体对接模式不是很好,可以使用其他骨架进行替换或进行骨架跃迁,以改变骨架位置。⑤根据遗传算法改造化合物,将化合物的片段转变、增加或删除,突变原子或键级;⑥模版方法,首先生成碳氢化合物,然后以适当化合价的杂原子进行取代。需要强调的是,在一个全新药物程序里,往往采用以上两种或多种策略,结合使用。

2 全新药物设计常用软件

2.1 LUDI软件 LUDI是早期计算机辅助全新药物设计使用的软件,是应用最为广泛的全新药物设计方法之一^[9]。LUDI的第一步是在受体结合位点周围产生作用位点,主要考虑氢键供体、氢键受体、疏水脂肪作用位点及疏水芳香作用位点。第二步是将分子片段库中的分子片段与两个或几个作用位点进行匹配,之后进一步检查此片段与靶点分子及其他分子片段间有无原子碰撞和静电作用。接下来,将对接在靶点结合位点处的分子片段连接起来(此过程也可用于对结合在靶点活性位点中的配体分子进行扩充修饰),分子片段上的氢原子作为连接位置被其他片段所代替。连接方式可采用单重连接、双重连接或三重连接。最后,对产生的化合物进行评估,包括氢键相互作用得分、疏水相互作用得分、结合自由能得分等。LUDI提供了两套片段库:一个是含有约1 000个分子片段的标准库,分子片段的原子数一般在5~30之间,用于筛选起始片段;另一个是含有约1 100个分子的连接片段库,用于分子片段的连接和对已知底物的扩展。对大多数的柔性分子,LUDI通过旋转某些单键从而产生多个构象,对位点进行匹配。

2.2 LigBuilder软件 2000年首次报道全新药物

设计程序 LigBuilder^[10]。LigBuilder 1.0 在进行配体构建时,用户可以选择生长或连接策略,基于遗传算法使用有机片段库迭代构建化合物。对产生的化合物通过 SCORE 2.0^[11] 经验评分函数对蛋白-配体亲和力进行打分,并使用一系列化学规则评估其生物利用度。为了增加软件全新药物设计的实用性和成功率,2011 年开发了新版本 LigBuilder 2.0^[12]。在保留旧版本优点的同时,具有 3 个显著的改进:①引进合成可行性分析模块,通过植入化学反应数据库和逆合成分析器,分析设计化合物的合成可行性,并给出合理的合成路径。②新发展的受体蛋白空穴探测程序,用于精确检测靶点结合口袋的位置及形状,分析药物的可进入性,并在检测到的空穴里设计配体防止其过度生长。③使用 ADMET 辅助分析,选择类药性和特殊性片段来构建配体。

除了不使用初始结构全新产生先导化合物外, LigBuilder 同样可以作为先导化合物或骨架结构优化的工具。用户可以选择保留先导物的关键片段,去掉不想要的片段部分,之后使用生长或连接策略进行优化。

2.3 LeapFrog 软件 作为 SYBYL 软件中的一个模块, LeapFrog 同样是应用最为广泛的全新药物设计方法之一^[13], 用于小分子片段的生长连接、先导化合物的优化及配体分子的评价。LeapFrog 可以采用两种设计起点:一是受体结构的活性位点;二是采用比较分子场分析 (comparative molecular field analysis, CoMFA) 方法计算得到的等势面图^[14]。得到的化合物采用半经验的自由能算法,用来评估配体分子和活性口袋间的结合能力。

在以受体结构作为起点时, LeapFrog 定义了 3 种位点:氢键给体、受体位点和疏水位点。LeapFrog 还提供了多种操作方式,包括用于起始片段的选择与放置的 New 和 Complement 模块,用于分子片段的扩展及现有分子片段连接的 Join、Fuse 和 Bridge 模块,用于配体分子构象和空间位置优化的 Fly 和 Twist 模块等。当受体结构未知时,三维定量构效关系 (3D-quantitative structure activity relationship, 3D-QSAR) 可以建立分子三维结构与其活性间关系的模型。根据 CoMFA, 作用于一个受体的相似化合物的生物活性取决于每个化合物周围分子场的差别原理,采用多种探针原子和基团在药物分子表面建立一个虚拟的受体环境,虚拟受体和药物分子间相互作用的差别反映了药物分子活性的差别。LeapFrog 使用 CoMFA 方法建立 3D-QSAR 模型^[15], 使用一系列药物类似物产生训练集和测试集,获得假定的空穴来产生结合位点,进而得到受体和配体间可能的

相互作用信息。

2.4 骨架跃迁 (scaffold hopping) 骨架跃迁的概念最早在 1999 年由 Schneider^[16] 提出,作为一项识别骨架结构显著不同、但功能相同的化合物技术。骨架跃迁的目的是从已知活性的化合物或天然产物出发,通过改变它们的核心结构,得到具有相似活性的新结构类型的化合物^[17]。基于现有药物和活性化合物的骨架片段和构建的骨架片段数据库,通过 2D 或 3D 结构相似性搜索实现骨架跃迁。骨架跃迁与其他方法最大的不同在于,它起始于一个已知并存在的化学核心,构效关系或药效团模型^[18]。核心替换在先导化合物优化中有其独特的作用,可以清楚地看出分子核心骨架存在的问题。CAVEAT 程序最先被应用到骨架跃迁上,为后续的骨架跃迁方法提供了基础^[19]。

按照对母体化合物的改变程度,骨架跃迁可以分为 4 种类型:①1°跃迁:杂环骨架与靶蛋白相互作用,为改变其亲和力,在杂环骨架中更换 C、N、O 和 S 原子,并保持用户自定义的杂环骨架外端片段不变的限制。为了合成的可行性和化学稳定性,通常使用自然产物和市售药物作为骨架库模版。常用软件有 MORPH^[20] 和 Recore^[21]。②2°跃迁:大多数类药性分子至少有一个环系统,因此可以执行环的开放和闭合。分子内氢键通常可以提供环的闭合位置,通过环的闭合将分子锁定成活性结构,减少分子柔性及结合自由能,但也可能会潜在影响到溶解性能和 ADME 性质,而环的开放可以加强分子的类药性。③3°跃迁:以非肽部分置换骨架的肽部分。由于生物活性内源肽的低代谢稳定性和低生物利用度,因此可以将这些肽研发成临床可用的药物,以活性肽作为模版,设计小分子来模仿这些肽的结构特征,使其与蛋白有相似的相互作用。基于肽的药物设计主要原则是减少肽的特征,加强对蛋白水解的抵抗力,并保持分子识别的关键化学特征。二级结构如 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角经常发现在肽和蛋白的相互作用中,在设计分子时要模仿这些二级结构,在分子骨架位置保持螺旋和转角的一致, β -折叠模拟时要保持骨架的氢键作用。Recore 和 CAVEAT 软件可用于设计合适的骨架代替肽部分。④4°跃迁:基于形状的骨架跃迁所产生新的化学型分子与模版显著不同。

2.5 其他软件 PROUT^[22] 软件混合了碳氢化合物模版方法与片段连接方法,加入了共价相互作用,并且考虑了全新药物设计所得化合物的合成可行性。SYNOPSIS^[23] 软件应用商业上可获取的药物构架化合物,通过应用已建立的化学反应规则,进行化合物

生长。SYNOPSIS 软件的应用还需要 3 个要素:一个已存在分子的数据库、一组化学反应和一个合适的函数。该软件不仅增加了化合物的合成可行性,而且直接提供了化合物的合成路径。BREED^[24] 软件采用结构重组思想,设计新颖的化合物结构。BREED 软件的基本原则是使用两个或多个已知的配体结合到相同的靶点,再从每一个结构中重组片段,产生新的杂种化合物,并允许与之后产生的杂种化合物进行再组建。BOMB 软件则通过类药性骨架和侧链构架化合物,根据遗传算法对分子进行改造。

3 全新药物设计在抗癌药物研发中的应用

全新药物设计在某些抗癌药物的发现上已显现其重要作用,本文选择一些使用全新药物设计软件而发现具代表性潜在抗癌药物的案例进行综述。

3.1 使用 LUDI 软件设计抗癌药物

3.1.1 设计纺锤体驱动蛋白抑制剂 纺锤体驱

动蛋白(kinesin spindle protein, KSP)在增殖细胞中高表达,在有丝分裂纺锤体的形成和分离过程中具有重要作用。KSP 抑制剂能导致有丝分裂停止,且不会产生神经毒性,是一类有潜力的抗癌药物^[25]。Cheng 等^[26]使用 LUDI 软件设计了新的 KSP 抑制剂。他们将 KSP 与其第一个识别的抑制剂 monastrol 的 3D 复合结构(PDB:1Q0B)载入 insight II 软件的图形模拟程序,使用剑桥数据库,通过 Accelry 的 LUDI 程序,筛选出可以与 KSP 结合口袋残基相互作用的小分子片段。选择 20 个得分较高的片段做进行生长连接,并将得到的化合物做进一步设计。经过几轮循环,对获得最高得分的化合物依据合成可行性进行修饰。由于体外测试的活性低,因而改进了分子核心以提高溶解性。最终新设计的一系列分子被识别为有效的 KSP 抑制剂,在小鼠体内实验结果显示具有潜在治疗作用(图 1)。

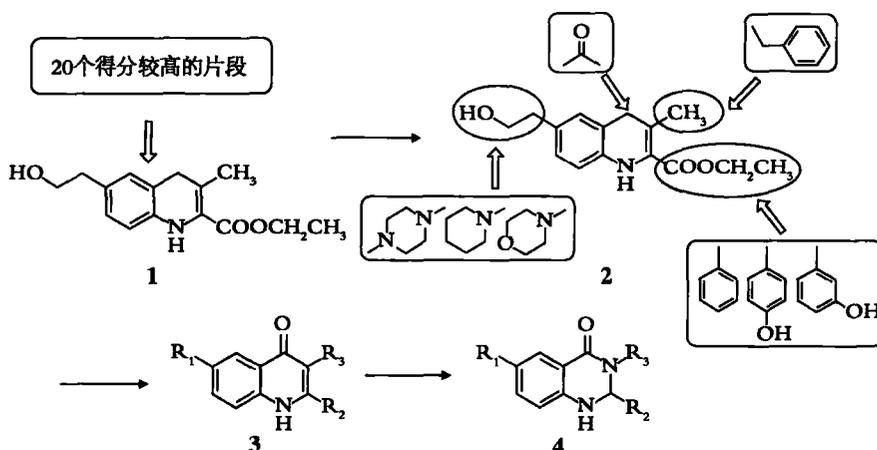


图 1 使用 LUDI 软件设计 KSP 抑制剂

3.1.2 设计血管内皮生长因子受体抑制剂 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为一种重要的血管形成因子,乃是血管肿瘤发生的关键因素,如果抑制 VEGF 就可以抑制肿瘤的生长。因此,VEGF 受体被认为是抗癌药物作用的靶点^[27]。Masaharu 等^[28]通过应用 LUDI 软件,基于 VEGF 受体与配体的复合物晶体结构(PDB:1Y6A),识别结合口袋相互作用位点,预测到 4 个重要残基:Leu840、Arg842、Cys919 和 Asn1032。从而将结合口袋分为 3 个部分,从片段库分别筛选出适合这 3 个部分的片段,连接片段后基于合成可能性,对得到的化合物再进行修饰,以获得候选分子。然后,设计并合成了一系列衍生物,经酶联免疫吸附法测定(enzyme linked im-

munosorbent assay, ELISA) 活性,其中最有效化合物抑制活性为 0.57 μmol/L(图 2)。

3.2 使用 LigBuilder 软件设计抗癌药物

3.2.1 设计细胞分裂周期蛋白 CDC25 磷酸酶抑制剂 CDC25 磷酸酶是调节正常细胞分裂和细胞应对 DNA 损伤的重要调控因子,CDC25 磷酸酶在许多肿瘤中呈过度表达^[29],表明特异性的 CDC25 磷酸酶抑制剂可能成为癌症治疗药物。Hwangseo 等^[30]使用 LigBuilder 程序,设计一系列具有微摩尔(μmol/L)级活性的新 CDC25 抑制剂。通过虚拟筛选识别的两个抑制剂骨架,用于全新药物设计的起始结构,使用 POCKET 模块分析活性位点关键作用残基。之后,探索这两个核心骨架上的不同取代位置,固定核心结构,通过变换不同取代基来优化结合

自由能,识别可以加强抑制活性的取代基。应用 GROW 模块的遗传算法,生成这两个抑制剂骨架的衍生物。对每一个骨架产生 10 000 个衍生物,对最

高分的 500 个分子,检查其商业可获性,测定其对 CDC25 的抑制活性,最后得到一系列具有微摩尔级抑制活性的化合物(图 3)。

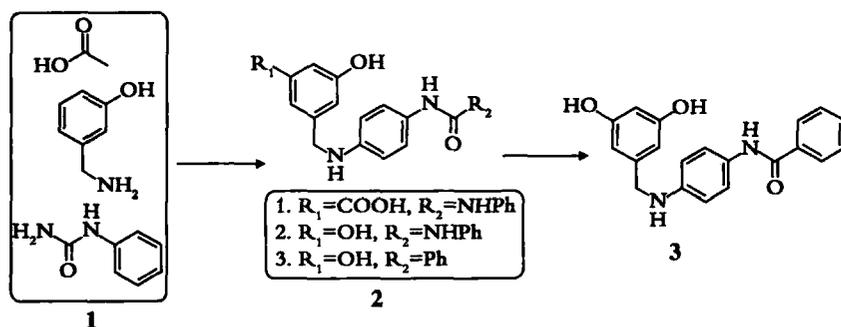


图 2 使用 LUDI 软件设计 VEGF 抑制剂

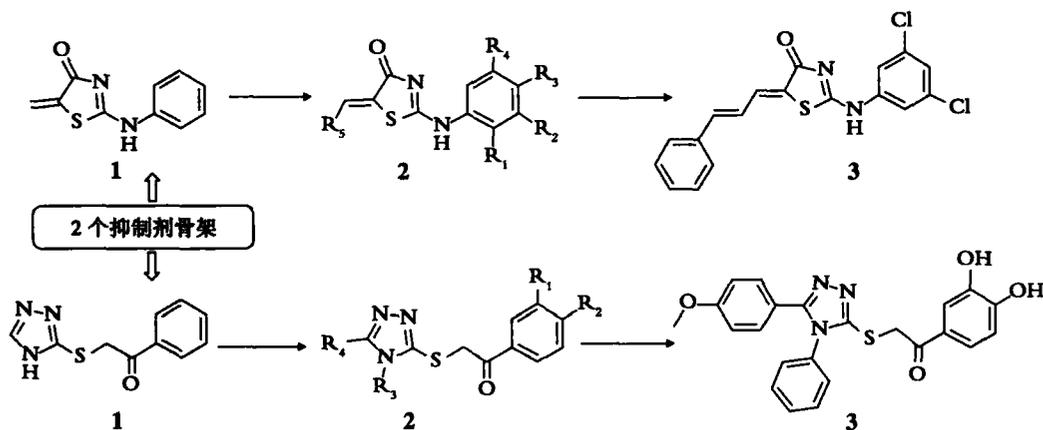


图 3 使用 LigBuilder 软件设计 CDC25 抑制剂

3.2.2 设计亲环蛋白 A 抑制剂 亲环蛋白 A (cyclophilin A, CypA) 是免疫抑制药环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 的一个胞内结合蛋白,具有肽基-脯酰胺异构酶 (peptidyl-prolyl isomerase, PPIase) 活性,在多种生物学进程中扮演重要角色^[31]。最近有报道称, CypA 在癌症尤其是实体肿瘤中过表达,表明 CypA 在肿瘤发生和肿瘤细胞凋亡中起重要作用^[32]。当前已知的亲环蛋白抑制剂主要为天然产物或肽类似物,通常分子结构复杂、药理学参数不理想,因此寻找有效的新型小分子抑制剂显得十分重要。Ni 等^[33]使用全新药物设计方法发现了高活性的小分子 CypA 抑制剂。基于以前的抑制剂研究识别出的一些骨架结构,设计酰胺基作为中间位置的起始骨架片段,找到其与蛋白的作用模式,并与两端的片段进行连接。使用 LigBuilder 程序,从产生的大量化合物中识别高效能的化合物,进一步对该化合物的构效关系进行研究,产生的 2 个化合物是现有报道中活性最高的抑制剂(图 4)。

3.3 使用 LeapFrog 软件设计抗癌药物芳香化酶抑制剂 大约 1/3 的乳腺癌患者体内都能检出雌激素受体阳性 (estrogen receptor-positive, ER⁺), 细胞内含有显著数量的雌激素受体,而芳香化酶基因 (cytochrome P450 aromatase, CYP19) 对雌激素的生物合成非常重要,因此芳香化酶抑制剂 (aromatase inhibitors, AIs) 可以用于治疗激素依赖型的乳腺癌^[34]。由于现在使用的 AIs 抑制芳香酶的活性遍及全身,为了减少长期使用 AIs 产生的副作用,需要使用芳香酶的组织特异性抑制剂。Gueto 等^[35]使用 CoMFA 与 LeapFrog 软件相结合的方法设计新的氨基磺酸类似物 AIs。由于化合物在乳腺癌细胞中确切的分子靶点未知,不能使用基于结构的方法,根据氨基磺酸类似物对 SK-BR-3 乳腺癌细胞的体外活性抑制数据^[36],选择 55 个分子用于产生 QSAR 模型,分子随机分成训练集和测试集。通过 SYBYL 软件的 CoMFA 分析,得到抑制剂的 3D-QSAR 模型。使用 LeapFrog 软件并利用 CoMFA 等势轮廓产生假定的

空穴,获得的空穴用于产生位点,得到的新化合物具有比原始化合物更好的活性(图5)。

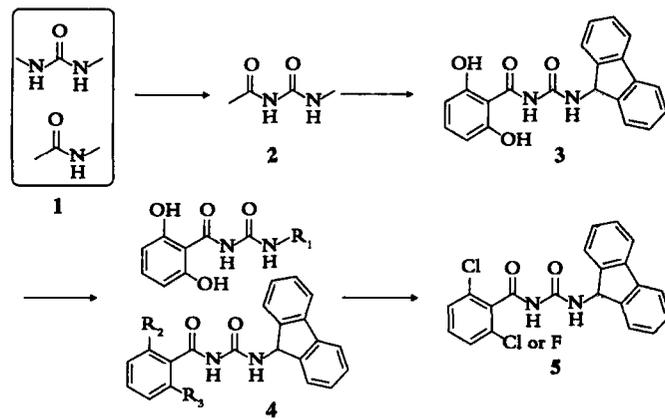


图4 使用 LigBuilder 软件设计 CypA 抑制剂

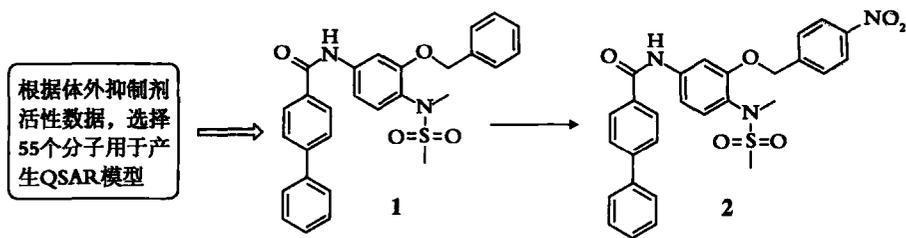


图5 使用 LeapFrog 软件设计芳香胺抑制剂

3.4 使用骨架跃迁设计抗癌药物 B-raf 抑制剂
RAS-RAF-MEK-ERK 信号转导通路在肿瘤生物学中发挥着重要作用。B-raf 是一种癌基因,它编码一种苏氨酸特异性激酶。B-raf 的 V600E 突变可以诱导激酶的活化,增加细胞增殖和细胞存活,许多肿瘤中都存在 B-raf 的突变。因此,B-raf 抑制剂可以用于治疗与 RAS 通路相关的人类癌症^[37]。Ariamala

等^[38]采用骨架跃迁方法识别了新的 B-raf 抑制剂先导物,将原始高通量筛选 (high throughput screening, HTS) 发现的抑制剂的骨架作为起始母体结构,并保留原始抑制剂的药效基团部分,对骨架的芳香环进行替换并做了活性评估,发现了值得进一步探索的、新的先导化合物(图6)。

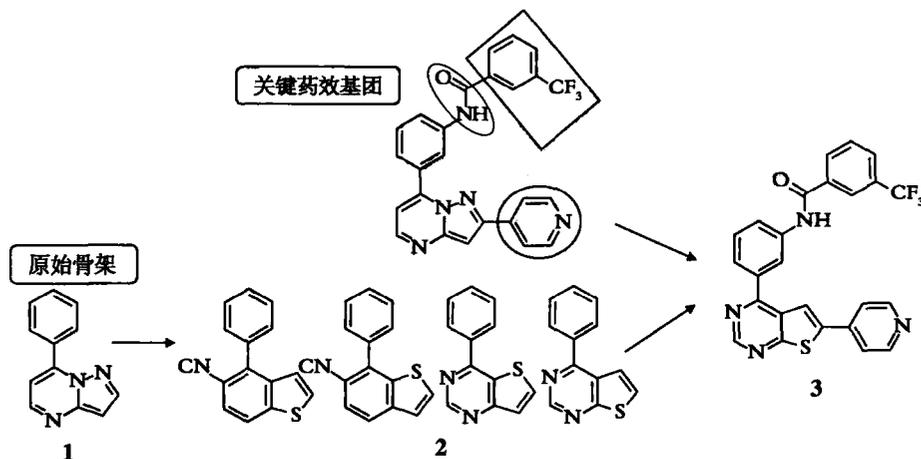


图6 使用骨架跃迁设计 B-raf 抑制剂

4 结语

迄今,分子模拟方法已经成为药物发现和先导物优化过程的基本组成部分,随着计算机性能和药物设计软件准确性的不断提高,CADD 已可有效加速新的生物活性分子的产生和优化。全新药物设计因能带来新的研究思路和方案,而成功应用于抗癌药物领域。但全新药物设计方法仍存在靶点 3D 结构准确性的限制和大量化学结构组合构象的问题,并且在类药性和合成性方面还有待提高,这需要软件功能和算法得到更好的完善。但毫无疑问的是,随着新的癌症生物靶点的不断识别和结构的确认,抗癌新药将被陆续发现。本文中提到的全新药物设计方法与常用软件的广泛应用和发展,将发挥越来越重要的作用。

【参考文献】

- [1] Hoelder S, Clarke PA, Workman P. Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities[J]. *Mol Oncol*, 2012, 6 (2): 155-176.
- [2] Kalyanamoorthy S, Phoebe Chen Y-P. Structure-based drug design to augment hit discovery[J]. *Drug Discov Today*; 2011, 16 (17-18): 831-839.
- [3] Kutchukian PS, Shakhnovich EI. *De novo* design: balancing novelty and confined chemical space[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2010, 5(8), 789-812.
- [4] Park H, Jeong Y, Hong S. Structure-based *de novo* design and biochemical evaluation of novel BRAF kinase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(2):1027-1030.
- [5] Schneider G, Fechner U. Computer-based *de novo* design of drug-like molecules[J]. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4 (8): 694-663.
- [6] Lipinski, C, Hopkins A. Navigating chemical space for biology and medicine[J]. *Nature*, 2004, 432(7019): 855-861.
- [7] Platania CB, Salomone S, Leggio GM, et al. Homology modeling of dopamine d(2) and d(3) receptors: molecular dynamics refinement and docking evaluation[J]. *PLoS One*, 2012, 7 (9): 44316.
- [8] Keseru GM, Makara GM. Hit discovery and hit-to-lead approaches[J]. *Drug Discov Today*, 2006, 11(15-16), 741-748.
- [9] Bohm HJ. The computer program LUDI: a new method for *de novo* design of enzyme inhibitors[J]. *J Comput Aided Mol Des*, 1992, 6 (1): 61-78.
- [10] Wang RX, Gao Y, Lai LH. LigBuilder: a multi-purpose program for structure-based drug design[J]. *J Mol Model*, 2000, 6 (7-8): 498-516.
- [11] Wang RX, Liu L, Lai LH, et al. SCORE: A new empirical method for estimating the binding affinity of a protein - ligand complex[J]. *J Mol Model*, 1998, 4 (12): 370-394.
- [12] Yuan, YX, Pei JF, Lai LH. LigBuilder 2: a practical *de novo* drug design approach [J]. *J Chem Inform Model*, 2011, 51 (5): 1083-1091.
- [13] Cramer RD. Design and preliminary results of LeapFrog, a second generation *de novo* drug discovery tool[J]. *J Mol Graphics*, 1993, 11(4): 271-272.
- [14] Ambure PS, Gangwal RP, Sanganwar AT. 3D-QSAR and molecular docking analysis of biphenyl amide derivatives as p38 α mitogen-activated protein kinase inhibitors[J]. *Mol Divers*, 2012, 16 (2): 377 - 388.
- [15] Makhija MT, Kasliwal RT, Kulkarni VM, et al. *De novo* design and synthesis of HIV-1 integrase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(9): 2317-2333.
- [16] Schinerider G, Neidhart W, Giller T, et al. Scaffold-Hopping by topological search: a contribution to virtual screening[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *Angew Chem Int Ed Engl*, 1999, 38(19): 2894-2896.
- [17] Schneider G. *De novo* design- hopping against hope[EB/OL]. *Drug Discovery Today: Technologies*. (2012-06-20)[2013-01-02].
- [18] Wolber G. 3D pharmacophore elucidation and virtual screening [J]. *Drug Discov Today*, 2010, 7(4): 203-204.
- [19] Lauri G, Bartlett PA. CAVEAT: a program to facilitate the design of organic molecules[J]. *J Comput Aided Mol Des*, 1994, 8(1):51-66.
- [20] Beno BR, Langley DR. MORPH: a new tool for ligand design [J]. *J Chem Inform Model*, 2010, 50(6): 1159-1164.
- [21] Maass P, Schulz - Gasch T, Stahl M, et al. Recore: a fast and versatile method for scaffold hopping based on small molecule crystal structure conformations[J]. *J Chem Inform Model*, 2007, 47(2): 390-399.
- [22] Gillet VJ, Newell W, Mata P, et al. SPROUT: recent developments in the *de novo* design of molecules [J]. *J Chem Inform Comput Sci*, 1994, 34: 207-217.
- [23] Vinkers HM, de Jonge MR, Daeyaert FF, et al. SYNOPSIS: SYNthesize and optimize system in silico [J]. *J Med Chem*, 2003, 46: 2765-2773.
- [24] Pierce AC, Rao G, Bemis GW, et al. BREED generating novel inhibitors through hybridization of known ligands. Application to CDK2, p38 and HIV protease [J]. *J Med Chem*, 2004, 47: 2768-2775.
- [25] Marra E, Palombo F, Ciliberto G, et al. Intratumoral electro-transfer of small interfering RNA against kinesin spindle protein (KSP) slows down tumor progression[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(1),58-64.
- [26] Jiang, C, Yang L, Wu WT, et al. *De novo* design, synthesis and biological evaluation of 1,4-dihydroquinolin-4-ones and 1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-4-ones as potent kinesin spindle protein (KSP) inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19 (18): 5612-5627.
- [27] Kim LA, D'Amore PA. A brief history of anti-VEGF for the treatment of ocular angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(2): 376-379.
- [28] Uno M, Ban HS, Nabeyama W, et al. *De novo* design and synthesis of N-benzylanilines as new candidates for VEGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *Org Biomol Chem*, 2008, 6 (6): 979-981.

入 5.54 g 微粉硅胶, 0.30 g 硬脂酸镁, 再分别加入 10.26 g 不同种类的填充剂(淀粉, 预胶化淀粉, 糊精), 使总量为 90 g。测定所得混合料的休止角, 同时将部分混合料进行胶囊填充, 规格为 0.45 g, 测定其装量差异。实验结果见表 7, 结果表明预胶化淀粉在休止角和胶囊的装量差异方面要明显好于淀粉和糊精。故采用预胶化淀粉作为本品的填充剂。

表 7 原花青素磷脂复合物填充剂选择试验

填充剂	休止角(°)	装量差异(%)
淀粉	43.6	±4.8
预胶化淀粉	39.2	±2.9
糊精	44.5	±5.7

2.6.4 润滑剂的确定 胶囊填充设备为活塞杆挤压式填充机, 按加入原花青素磷脂复合物 7.5% 的微粉硅胶、0.4% 硬脂酸镁与预胶化淀粉处方进行中试填充时, 发现有少量的胶囊出现挤压划破囊壳的情况。因此, 适当加大了硬脂酸镁的用量, 达到原花青素磷脂复合物量的 0.6%, 可顺利进行填充, 以适应大批量生产。

3 讨论

本研究制备了葡萄籽原花青素磷脂复合物, 并考察了原花青素 B₂ 的水中饱和溶解度的测定、正辛醇中饱和溶解度的测定、油水分配系数的测定, 表明葡萄籽原花青素制成磷脂复合物有望提高体内吸收率。在成型工艺中, 对原花青素磷脂复合物的相对临界湿度、流动性及黏性等进行考察, 并考察了制备

原花青素磷脂复合物胶囊剂的辅料, 为葡萄籽原花青素的制剂技术升级奠定基础。

【参考文献】

- [1] 周坦洋, 罗芙蓉, 白彬. 葡萄籽原花青素生物药理活性的研究进展[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012, 46(1): 94-96.
- [2] 王忠合, 朱俊晨, 陈惠音. 葡萄籽原花青素提取物的保健功能与应用[J]. 食品科技, 2006, 4: 135-139.
- [3] 孙传范. 原花青素的研究进展[J]. 食品与机械, 2010, 26(4): 146-152.
- [4] 马中春. 葡萄籽原花青素的安全性毒理学评价及抗突变作用研究[D]. 吉林大学, 2005.
- [5] 孙芸, 徐宝才, 谷文英. 葡萄籽原花青素抗氧化作用的研究[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(6): 129-134.
- [6] 彭亮, 傅伟忠, 姚思宇, 等. 葡萄籽粉对自然衰老大鼠的抗氧化作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 10: 2376-2378.
- [7] 王亚东, 李立, 王海玉, 等. 葡萄籽提取物和大豆磷脂混合制剂对老龄大鼠的抗氧化作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 9: 1887-1888.
- [8] 王喜泉, 孙树坤, 夏剑秋, 等. 大豆卵磷脂的功能特性及营养保健作用[J]. 大豆通报, 1999, 3: 27-28.
- [9] 蔡珺. 简述卵磷脂功能特性及其应用[J]. 黑龙江科技信息, 2011, 11: 19-20.
- [10] 李立. 大豆磷脂的药用价值[J]. 中国中医药杂志, 1994, 9: 570-572.
- [11] 莫凤奎, 朱澄云, 黄松鹤, 等. 维生素 E 和维生素 C 对大豆磷脂脂质体的抗氧化作用[J]. 中国药物化学杂志, 1997, 2: 46-49.
- [12] 荆海兰. 大豆磷脂的抗衰老作用[J]. 现代中西医结合杂志, 1998, 7(12): 2003.

[收稿日期] 2013-08-08 [修回日期] 2013-09-29

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 15 页)

- [29] Albert H, Santos S, Battaqlia E, et al. Differential expression of CDC25 phosphatases splice variants in human breast cancer cells [J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(10): 1707-1714.
- [30] Park H, Bahn YJ, Ryu SE. Structure-based *de novo* design and biochemical evaluation of novel Cdc25 phosphatase inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(15): 4330-4334.
- [31] Zhou DJ, Mei Q, Li JT, et al. Cyclophilin A and viral infections [J]. Bioch Biophys Res Comm, 2012, 424(4): 647-650.
- [32] Choi KJ, Piao YJ, Lim MJ, et al. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia-and cisplatin-induced cell death [J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3654-3662.
- [33] Ni SS, Yuan YX, Huang J, et al. Discovering potent small molecule inhibitors of cyclophilin A using *de novo* drug design approach [J]. J Med Chem, 2009, 52(17): 5295-5298.
- [34] Wong C, Chen S. The development, application and limitations of breast cancer cell lines to study tamoxifen and aromataes inhib-

itor resistance [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012, 131(3-5): 83-92.

- [35] Gueto C, Torres J, Vivas-Reyes R. CoMFA, LeapFrog and blind docking studies on sulfonanilide derivatives acting as selective aromataes expression regulators [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44(9): 3445-3451.
- [36] Su B, Diaz-Cruz ES, Landini S, et al. Novel sulfonanilide analogues suppress aromataes expression and activity in breast cancer cells independent of COX-2 inhibitor [J]. J Med Chem, 2006, 49(4): 1413-1419.
- [37] Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the B-raf gene in human cancer [J]. Nature, 2002, 417(6892): 949-954.
- [38] Gopalsamy A, Shi M, Hu Y, et al. B-raf kinase inhibitors: hit enrichment through scaffold hopping [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(8): 2431-2434.

[收稿日期] 2013-02-21 [修回日期] 2013-09-06

[本文编辑] 李睿旻