



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110538188 A

(43)申请公布日 2019.12.06

(21)申请号 201910729676.7

(22)申请日 2019.08.08

(71)申请人 云南农业大学

地址 650201 云南省昆明市盘龙区沣源路
452号云南农业大学

(72)发明人 田洋 杨扬 盛军 贺水莲
史崇颖 解静 秦向东

(74)专利代理机构 昆明合盛知识产权代理事务
所(普通合伙) 53210

代理人 牛林涛

(51)Int.Cl.

A61K 31/7048(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

紫云英苷作为CDK2激酶抑制剂的新用途

(57)摘要

本发明公开了紫云英苷作为CDK2激酶抑制剂的用途,本发明通过基于药效团匹配的反向找靶技术进行紫云英苷活性靶点的虚拟筛选,以及计算机模拟分子对接并通过体外CDK2激酶活性抑制试验验证发现了紫云英苷的一个新作用靶点CDK2激酶,紫云英苷对CDK2激酶具有较强的抑制作用, $IC_{50}=14.90\mu M$,其能对深入阐明紫云英苷的生物活性机制,以及为针对相应靶标所适用的疾病类型精准用药或配合用药奠定必要的研究基础。

1. 紫云英苷的新用途,其特征在於,所述紫云英苷用于制备治疗肿瘤的CDK2激酶抑制剂中的用途。
2. 紫云英苷的新用途,其特征在於,紫云英苷作为CDK2激酶抑制剂类抗肿瘤药物的用途。

紫云英苷作为CDK2激酶抑制剂的新用途

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,具体涉及紫云英苷作为CDK2激酶抑制剂的新用途。

背景技术

[0002] 癌症是全人类主要的致死因素之一,严重影响了人们的生命健康和生活质量。中国每年新增约356万癌症患者,预计到2030年,该数字将达到2200万。多数癌症的发生发展与细胞周期调控机制紊乱有关,所以影响或阻断细胞周期是治疗肿瘤的重要方法。而特异性阻断肿瘤细胞的调节细胞周期的关键蛋白靶标,从而抑制肿瘤细胞生长,诱导其凋亡,是目前有效抑制肿瘤的研发热点之一。

[0003] 目前,已发现的调控细胞周期的靶点蛋白有三类:细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent-kinases,CDKs)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent-kinase inhibitor,CKIs)、细胞周期蛋白(cyclins)。其中,CDKs是调控细胞周期的关键蛋白,其异常表达与肿瘤的发生发展密切相关。

[0004] 在CDKs家族13种蛋白中,CDK2是细胞进行有丝分裂时至关重要的激酶。CDK2基因的突变会引起其自身过度活化,在乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌等肿瘤组织中,常有CDK2的异常表达。所以,找到选择性更高、副作用更小的CDK2激酶抑制剂,从而阻止肿瘤细胞的增殖,已经成为一个治疗肿瘤的新方向。

[0005] 国内外已报到了多种不同结构类型的小分子CDK2抑制剂,目前,进入临床研究的CDK2抑制剂均为CDK2的腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate,ATP)结合抑制剂,如目前唯一上市的palbociclib,以及临床II/III期的R-roscovitine、dinaciclib,flavopiridol,AT-7519等,它们对乳腺癌、白血病、淋巴瘤等具有较好的治疗作用。但是有些抑制剂在临床试验时出现了多种副反应而被迫终止试验。总之,发现新类型的CDK2抑制剂对此类药物的后续开发具有重大意义。

[0006] 而天然来源的药物分子或其衍生物,是一个较安全可靠的药物发现来源。从药食同源植物中发掘对身体有益且具有显著生理活性的次生代谢物具有重要的应用价值。紫云英苷是一种天然存在的黄酮类化合物,广泛存在于菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.)和旋花科(Convolvulaceae)的很多种植物中,由约60个属和1650种。目前发现紫云英苷具有抗炎、抗氧化、抗病毒、镇痛、抗菌、抗过敏和抗肝毒等作用,紫云英苷所能调节和影响的功能蛋白靶标研究也较广泛。但目前尚未有报道紫云英苷作为CDK2激酶抑制剂方面的用途。

发明内容

[0007] 针对以上的问题,本发明的目的是寻找一种安全新型的CDK2激酶抑制剂,为CDK2激酶抑制剂类抗肿瘤药物提供新的选择。

[0008] 实现本发明的技术特征是:

[0009] 紫云英苷作为CDK2激酶抑制剂方面的新用途。

[0010] 紫云英苷作为CDK2激酶抑制剂类抗肿瘤药物的用途,所述药物包括紫云英苷及一

种或两种以上的辅料。

[0011] 本发明的有益效果为：

[0012] 本发明发现了紫云英苷的一个新靶标，即对CDK2激酶具有显著的抑制活性，通过抑制CDK2激酶的活性可进而阻止肿瘤细胞的增殖，有望达到治疗癌症的目的，紫云英苷价格低廉、来源广泛，资源丰富，可以作为新的CDK2激酶抑制剂为开发新的治疗肿瘤的药物提供了新的选择，对深入了解紫云英苷的抑制CDK2激酶的生物活性机制，以及为针对相应靶标所适用的肿瘤类型精准用药或配合用药奠定必要的研究基础。

附图说明

[0013] 图1为紫云英苷的分子特征图及其进行pharmmapper药效团匹配筛选后与CDK2激酶药效团的匹配情况，其中，(a)为紫云英苷分子及分子特征；(b)紫云英苷及药效团模型匹配图；

[0014] 图2：(a)为紫云英苷与CDK2 (1DM2) 激酶的空间对接模拟3D图，(b)为(a)图放大情况，可见相互作用位点，(c)为紫云英苷与CDK2 (1DM2) 激酶的空间对接模拟2D图；

[0015] 图3为不同浓度紫云英苷对CDK2激酶的抑制情况。

具体实施方式

[0016] 以下结合实施例对本发明做进一步详细说明。

[0017] 实施例1紫云英苷靶标筛选

[0018] 方法：Pharmmapper是一个广泛被使用的药效团匹配与潜在识别靶标平台，根据药物靶点特征应用许多算法来寻找所最佳匹配的基因和蛋白质。Pharmmapper本质上也是对小分子和特异靶点受体之间的相互作用进行分析。PharmMapper有超过7000个受体基础的药效团模型，来自TargetBank, DrugBank, BindingDB和PDPTD这几个蛋白靶标数据库。

[0019] 通过pharmmapper药物靶标虚拟筛选服务端，提交紫云英苷分子结构，根据其结构特征，选择对2241种人体相关靶标蛋白的药效团进行匹配打分和误差分析，并将结果按照z'-score值排名。

[0020] 结果：排名前五的作用蛋白中，见表1，紫云英苷的特征匹配值为7，匹配分数值为4.154，以及z'-score为3.29839，在2241种靶标蛋白中排名最高。其中z'-score是从分子的匹配分数和预先计算的数据库分数矩阵生成的分数，越高的z'-score值也表明该靶标蛋白更可能是紫云英苷的最佳作用蛋白。

[0021] 表1. 紫云英苷在Pharmmapper中匹配能力最高的5个靶标蛋白数据

[0022]

排名	PDB ID	靶标名称	匹配特征数	匹配值	Z'-score
1	1DM2	Cell division protein kinase 2	7	4.154	3.29839
2	1MFU	Alpha-amylase 1	4	3.886	3.16082
3	1RFG	Purine nucleoside phosphorylase	6	3.908	3.15871
4	1V84	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 1	6	3.934	3.13356
5	1YXU	Pim-1	4	3.604	2.79309

[0023] 图1为紫云英苷的分子特征图,及其进行pharmmapper药效团匹配筛选后与CDK2激酶药效团的匹配情况,其匹配特征数为7,包括1个亲脂基团、1个正电荷基团、2个氢键供体基团和3个氢键受体基团。

[0024] 实施例2评价紫云英苷的药物-蛋白结合能力

[0025] 方法:SwissDock是一个广泛应用的可以通过提交靶点蛋白和分子结构,进而预测计算其结合能量,评价药物-蛋白结合能力的药物筛选平台。通过SwissDock服务端,分别提交紫云英苷与pharmmapper中可能结合的排名前五的靶标蛋白结构。

[0026] 结果:经过分子对接和结合能计算,其中,1DM2 (CDK2激酶)的结合能为-8.42kcal/mol,在五个蛋白中结合能值最低,表明其结合能最强,见表2。

[0027] 结论:本实验再次确证了CDK2激酶与紫云英苷的结合能力,验证了虚拟筛选结果;

[0028] 表2.SwissDock对紫云英苷排名前5匹配靶标蛋白的结合能预测值

[0029]

PDB ID	1DM2	1MFU	1RFG	1V84	1YXU
Estimated binding energy ΔG (kcal/mol)	-8.42	-7.78	-7.39	-7.29	-7.99

[0030] 实施例3阐释紫云英苷药物分子对靶标蛋白的结合机制

[0031] 方法:Discovery Studio TM(简称DS),是全球知名的基于Windows系统,在统一的工作界面下,集成了所有药物设计与生物大分子计算方法与模拟工具的软件平台。DS软件可以更精确的进行药物-蛋白分子对接模拟,并对其结合位点,结合键类型、间距进行分析评价,深入阐释药物分子对靶标蛋白的结合机制。通过在DS软件中,将处理好的紫云英苷和1DM2 (CDK2激酶)结构进行CDOCKER模块的分子对接,参数设置按照常规数值进行设置,结果如图2所示。

[0032] 结果:图2中,紫云英苷能够结合到CDK2激酶的ATP结合活性口袋中,该结合位点也是目前公认的CDK2激酶抑制剂所结合的位点,结合区域(Site Sphere)为26.3798, 32.3505,27.1413,15.3。并且,紫云英苷能与CDK2激酶活性位点的各个关键氨基酸残基形成多种相互作用力,包括紫云英苷糖基侧链中H33、H35和H36分别与蛋白的LEU83、HIS84和

ASP86氨基酸残基形成的两个氢键(键长分别为2.94 Å、2.83Å和2.23Å);紫云英苷的芳环部分能与蛋白的LYS89和GLU8残基分别形成2个 π -阴离子和2个 π -阳离子相互作用力(键长分别为3.51Å、3.74Å、4.46Å和4.81Å)。上述相互作用表明紫云英苷能够与CDK2激酶形成较强的结合力。

[0033] 实施例4体外CDK2激酶活性抑制测定

[0034] 方法:建立P-CDK2纯化蛋白并体外激活,纯度>95%。CDK2是Ser/Thr蛋白激酶,在底物磷酸化中需要消耗ATP,同时产生等量的ADP。故选择ADP-GloTMMax检测试剂盒,此试剂盒基于发光法定量检测反应中产生的ADP,从而检测ATP激酶活性。反应在384孔板中进行,反应总体积是5 μ L,包含小分子化合物1 μ L(DMSO含量5%)、蛋白复合物(2 μ L,78nmol/L)、ATP(0.75 μ L,75 μ mol/L)、拟底物多肽HHASPRK(1.25 μ L,250 μ mol/L)。将上述反应物混匀,室温条件下反应10min,加入5 μ L ADP-GloTM试剂终止反应,室温孵育55min以消耗反应体系中剩余的ATP,然后加10 μ L ADP-GloTMMax检测试剂室温孵育1h,将ADP转化成ATP并偶联上荧光信号,用酶标仪检测荧光信号值。本实验同时增设2个对照,不加紫云英苷和酶的空白对照以及不加紫云英苷的阳性对照。根据荧光信号差值与空白信号值的比值计算抑制率,用Graphpad prism6拟合IC₅₀曲线并计算IC₅₀值,结果如图3所示。

[0035] 结果:经6个浓度的紫云英苷对CDK2激酶抑制实验后,计算得到其IC₅₀=14.90 μ M,显著抑制CDK2激酶活性。且随紫云英苷浓度增加,抑制CDK2激酶的活性随之增强,呈现出明显的剂量依赖性,如图3所示,紫云英苷浓度越低,抑制率约低,紫云英苷浓度增加到32 μ mol/L时抑制率高达84%。

[0036] 综上所述,紫云英苷对CDK2激酶有显著的抑制活性,且抑制CDK2激酶的活性呈现出明显的剂量依赖性,具有开发利用价值,有望成为新型靶向CDK2激酶的抗癌药物。

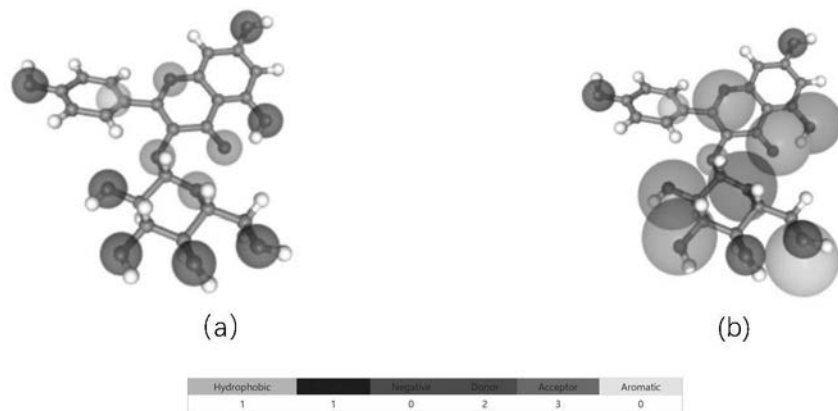


图1

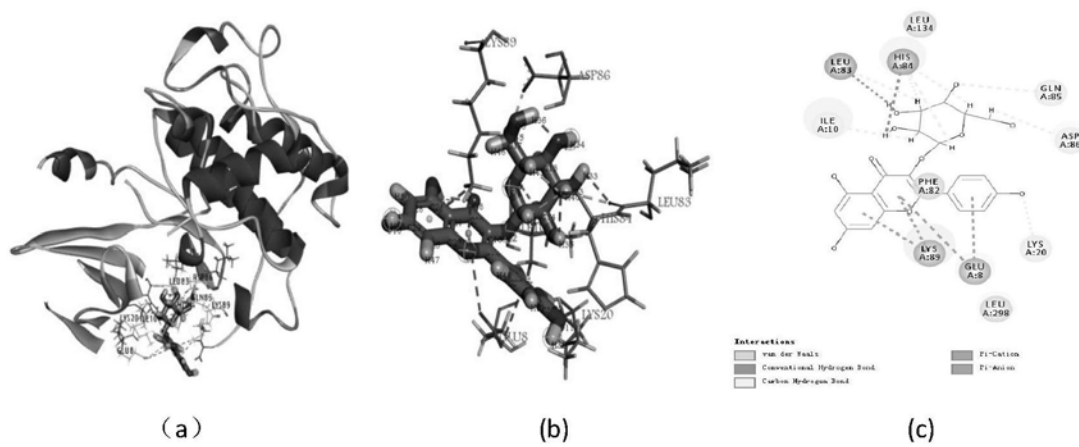


图2

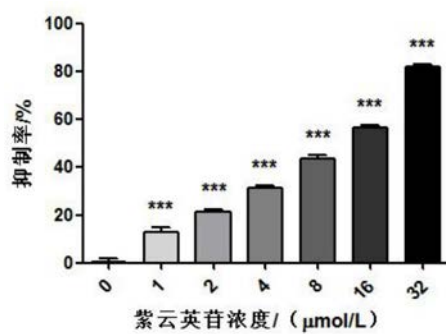


图3