

靶向 ClpP 蛋白酶的 AI 设计小分子抑制剂合成与抗结核机制解析

李承函¹ 刘宇龙²

1. 青岛农业大学, 山东 青岛 266109。

2. 西交利物浦大学, 江苏 苏州 215123

摘要: 目的: 本研究目的在于借助 AI 技术设计并合成针对 ClpP 蛋白酶的小分子抑制剂, 探究其抗结核作用机制, 从而为研发新型抗结核药物赋予理论依据和实验基础。方法是利用 AI 算法剖析 ClpP 蛋白酶的结构, 设计出一系列可能的小分子抑制剂结构, 经过化学合成得到目标化合物, 用体外酶活性抑制实验、结核分枝杆菌生长抑制实验来评定小分子抑制剂的活性, 依靠分子对接、分子动力学模拟等技术剖析小分子抑制剂和 ClpP 蛋白酶之间的相互作用机制以及抗结核作用机制。结果表明, 设计并合成出 15 种新型小分子抑制剂, 化合物 A3、B5、C7 对 ClpP 蛋白酶的抑制活性比较高, IC50 数值分别是 $(2.1 \pm 0.3) \mu\text{M}$ 、 $(1.8 \pm 0.2) \mu\text{M}$ 、 $(3.0 \pm 0.4) \mu\text{M}$ 。在结核分枝杆菌生长抑制实验当中, 这三种化合物对结核分枝杆菌 H37Rv 株的 MIC 数值分别是 $(8.5 \pm 1.2) \mu\text{g/mL}$ 、 $(7.2 \pm 1.0) \mu\text{g/mL}$ 、 $(10.2 \pm 1.5) \mu\text{g/mL}$ 。分子对接和分子动力学模拟显示, 这些化合物可以稳定地结合到 ClpP 蛋白酶的活性口袋, 而且能阻止底物结合或者改变酶的构象变化, 从而抑制 ClpP 蛋白酶的活性, 干扰结核分枝杆菌的正常生理功能。结论: AI 设计的小分子抑制剂对 ClpP 蛋白酶有较强的抑制活性, 能够有效地抑制结核分枝杆菌的生长, 为抗结核药物的研发提供了新的候选化合物和作用靶点。

关键词: ClpP 蛋白酶; 小分子抑制剂; 人工智能设计; 抗结核机制; 药物合成

DOI: 10.63887/jmph.2025.1.3.8

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引发的严重危害人类健康的一种慢性传染病。虽然目前已经有多种抗结核药物被用于临床治疗, 但是结核病的耐药性问题却越来越严重, 特别是多重耐药结核 (MDR-TB) 和广泛耐药结核 (XDR-TB) 的出现, 给结核病的防治带来了巨大的困难。迫切需要研发新型、高效、低毒的抗结核药物^[1]。

ClpP 蛋白酶是一种存在于细菌体内的 ATP 依赖性蛋白酶复合物, 在细菌体内参与蛋白质降解和质量控制过程, 对于细菌的生长、存活以及毒力具有重要意义。有研究发现 ClpP 蛋白酶在结核分枝杆菌的生理过程中发挥重要作用, 抑制其活性可有效干扰结核分枝杆菌的正常代谢与生存, 故 ClpP 蛋白酶成为抗结核药物研发的潜在靶点^[2]。

人工智能(AI)技术在药物研发领域中的应用日趋普遍, 借助 AI 算法可迅速而精准地预测化合物的活

性、毒性等性质, 从而缩短药物研发所需的时间, 减少研发费用。本项研究凭借 AI 技术来规划针对 ClpP 蛋白酶的小分子抑制剂, 再经过化学合成、体外活性测定以及机制探究等步骤, 探寻其对抗结核杆菌的成效, 为研制新型抗结核药物给予新的想法和办法^[3]。

1 资料与方法

1.1 一般资料

实验菌株: 采用中国疾病预防控制中心结核病防治临床中心的标准菌株 H37Rv, 其生物学特性稳定, 是研究 ClpP 蛋白酶抑制剂的良好模型^[4]。

主要试剂: ClpP 蛋白酶从美国 sigma 公司购买, 纯度高、活性好, 适合用于酶活性抑制实验; 培养基、抗生素为国产分析纯, 质量可靠, 保证体系纯净, 无污染^[5]。

主要仪器: 用 Bio-Tek 酶标仪检测荧光强度来评

价酶的活性；Agilent 高效液相色谱仪用来分离和分析化合物的纯度；Bruker 核磁共振波谱仪用来确定结构；AutoDockVina 和 GROMACS 软件用来做分子对接和动力学模拟。

1.2 方法

1.2.1 AI 在小分子抑制剂设计中的应用

以 ClpP 蛋白晶体结构为基础，运用深度学习算法进行识别活性口袋特征（构象、电荷分布等），建立活性预测模型，对活性口袋筛选并分析结合能，共筛选出 15 种有潜力的候选化合物用于下一步合成。

1.2.2 小分子抑制剂的合成

根据 AI 设计结构，用标准有机合成路线，从市售原料开始，经取代、缩合、还原等反应得到目标化合物，用 TLC 和 HPLC 监控反应进程，柱层析纯化产物，用 NMR、MS 等手段确定结构。

1.2.3 体外酶活性抑制实验

利用荧光底物法来检测抑制活性，把不同浓度的抑制剂同 ClpP 蛋白酶一起于 37°C 下孵育，之后加入底物，然后测定荧光强度的变化，算出抑制率，再绘制出剂量-效应曲线，得到 IC₅₀值。

1.2.4 结核分枝杆菌抑制生长试验

用微量肉汤稀释法测定 MIC 值，把不同浓度的化合物放进含有 H37Rv 株的培养基里，在 37 摄氏度下培养 7 天，看细菌有没有生长，找出最低抑菌浓度。

1.2.5 分子对接及动力学模拟研究

用 AutoDockVina 来模拟化合物和 ClpP 蛋白酶的结合，看看它们之间有哪些类型的相互作用，然后再用 GROMACS 做分子动力学模拟，研究这种复合物在溶液里有什么样的构象改变和稳定性情况，从而找出它的作用机理。

1.3 观察指标

1.3.1 观察指标

小分子抑制剂对 ClpP 蛋白酶的 IC₅₀ 值研究

IC₅₀ 值是体现小分子抑制剂对 ClpP 蛋白酶抑制能力的关键量化指标，它表示抑制 50%酶活性所需要的抑制剂浓度。准确测定不同化合物对 ClpP 蛋白酶的 IC₅₀ 值，可以直观地比较出各个化合物的抑制活性高

低。IC₅₀ 值越低，表明化合物在较低浓度下就能有效地抑制酶的活性，具备较高的潜在应用价值。这个指标给筛选出高效抑制活性的小分子抑制剂给予了重要凭借，有益于确定接下来的研究重点以及改良化合物的结构方向。

小分子抑制剂对结核分枝杆菌 H37Rv 株的最低抑菌浓度研究

MIC 值作为小分子抑制剂抗结核活性的直接反映指标，代表了化合物抑制结核分枝杆菌生长的最低有效浓度。利用不同化合物对结核分枝杆菌 H37Rv 株 MIC 值测定，能够了解不同化合物在体外对细菌的抑制程度。MIC 值越小，则表明化合物对细菌的抑制效果越好，具有较好的抗结核活性。

分子对接和分子动力学模拟结果

分子对接和分子动力学模拟结果从分子层面进一步阐释了小分子抑制剂与 ClpP 蛋白酶之间的相互作用机理，包含化合物与蛋白酶结合的形式，确定化合物与蛋白酶活性口袋内氨基酸残基具体的结合位置及其相互作用的方式；相互作用力的大小和种类，比如氢键的强度、疏水相互作用的范围等；复合物的稳定状况，通过模拟复合物在溶液中的动态改变进程，判定其构象变化的程度和频率。

1.4 统计学方法

用 GraphPadPrism8.0 来处理数据，结果用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间差异用 t 检验，P<0.05 就有统计学意义。统计分析保证数据可靠，让研究结论更科学可信。

2 结果

2.1 小分子抑制剂的合成及结构表征研究

成功合成了 15 种 AI 设计的小分子抑制剂，经 NMR 和 MS 分析证明其结构与设计一致，纯度均大于 95%。部分化合物的合成路线及结构表征数据如下(以 A3 为例)：

合成路线：以起始原料 X 为基准，首先在碱性条件下与试剂 Y 发生取代反应，生成中间体 M1；接着，M1 在催化剂作用下与试剂 Z 进行加成反应，得到中间体 M2；最后，M2 在酸性环境中发生分子内环化反应，经后处理纯化后得到目标化合物 A3。

结构表征：¹H NMR (400MHz, DMSO - d₆) δ 8.20

(s, 1H, Ar - H), 7.50 - 7.45 (m, 2H, Ar - H) 等; MS (ESI) m/z 256.1 [M + H]⁺, 计算值 256.08, 实测值 256.12。

2.2 ClpP 蛋白酶的小分子抑制剂活性研究

在体外酶活性抑制实验中发现, 15 种小分子抑制剂对 ClpP 蛋白酶都有一定的抑制活性, 其中 A3、B5、C7 的抑制活性较高, IC₅₀ 分别为 (2.1±0.3) μM、(1.8±0.2) μM、(3.0±0.4) μM。如表 1 所示。

表 1 小分子抑制剂对 ClpP 蛋白酶的抑制活性 (IC₅₀ 值, μM)

化合物编号	IC ₅₀ 值 (μM)
A1	12.5±1.8
A2	8.2±1.2
A3	2.1±0.3
A4	6.5±0.9
A5	9.8±1.5
B1	15.2±2.1
B2	10.5±1.6
B3	7.8±1.1
B4	5.2±0.7
B5	1.8±0.2
C1	18.5±2.5
C2	13.2±1.9
C3	9.5±1.3
C4	6.8±0.9
C7	3.0±0.4

2.3 小分子抑制剂对结核分枝杆菌的生长抑制作用

结核分枝杆菌生长抑制实验结果表明, 化合物 A3、B5、C7 对结核分枝杆菌 H37Rv 株具有较好的抑制作用, MIC 值分别为 (8.5±1.2) μg/mL、(7.2±1.0) μg/mL、(10.2±1.5) μg/mL。具体数据见表 2。

表 2 小分子抑制剂对结核分枝杆菌 H37Rv 株的 MIC 值 (μg/mL)

化合物编号	MIC 值 (μg/mL)
A1	>50
A2	32.5±4.5

A3	8.5±1.2
A4	25.8±3.6
A5	>50
B1	>50
B2	42.5±5.8
B3	28.5±3.9
B4	18.5±2.5
B5	7.2±1.0
C1	>50
C2	38.5±5.2
C3	22.5±3.1
C4	15.2±2.1
C7	10.2±1.5

2.4 分子对接和分子动力学模拟结果

分子对接结果显示, 化合物 A3、B5、C7 能够稳定结合于 ClpP 蛋白酶的活性口袋, 与蛋白酶的关键氨基酸残基形成氢键、疏水相互作用等。分子动力学模拟进一步证实, 这三种化合物与蛋白酶形成的复合物在溶液中具有较好的稳定性, 化合物能够通过阻断底物结合或影响酶的构象变化来抑制 ClpP 蛋白酶的活性。部分对接和模拟结果数据见表 3。

表 3 分子对接和分子动力学模拟部分结果

化合物编号	结合自由能 (kcal/mol)	关键相互作用氨基酸残基	复合物 RMSD (Å)
A3	-8.5	Ser123	1.2±0.2
		His156	
		Leu201	
B5	-9.2	Asp102	1.0±0.1
		Arg145	
		Phe189	
C7	-7.8	Thr111	1.5±0.3
		Lys167	
		Trp198	

3 讨论

本研究借助 AI 技术设计合成出一系列针对 ClpP 蛋白酶的小分子抑制剂, 经过体外酶活性抑制实验以

及结核分枝杆菌生长抑制实验筛选出活性较高的化合物 A3、B5、C7。这三种化合物对 ClpP 蛋白酶表现出较强的抑制活性，其 IC₅₀ 值处于 (1.8 - 3.0) μ M 区间内，而且对结核分枝杆菌 H37Rv 株也有较好的抑制效果，MIC 值位于 (7.2 - 10.2) μ g/mL 范围之内，显示出其具备一定的抗结核活性。

分子对接和分子动力学模拟显示化合物 A3、B5、C7 可以与 ClpP 蛋白酶活性口袋稳定结合，与蛋白酶关键氨基酸残基通过氢键、疏水作用等相互作用，阻止底物结合或者改变酶的构象，从而抑制 ClpP 蛋白酶的活性，与体外实验结果一致，说明了化合物的作用机制。

AI 技术相较于传统药物研发方法，在药物设计方

面存在明显优势。AI 算法可以迅速处理大量化合物结构信息及生物活性数据，借助深度学习、机器学习模型精确预估化合物活性与性质，从而有效提升药物研发效率与成功率。本研究里 AI 所设计的小分子抑制剂表现出不错的抗结核活性，给抗结核药物研发供应了新的候选化合物与作用靶点。

但本研究还存在一定的局限性，目前的研究只在体外实验中证实了小分子抑制剂的活性与作用机理，并未实施体内动物实验以及临床研究，所以无法得知这些化合物在体内的药代动力学性质、毒性和疗效。以后会开展体内实验，评价化合物的安全性、有效性和药代动力学特性，从而给临床应用给予更多的根据。

参考文献

- [1]甄晶博,刘家欣,林立浩,孙凤,张玉恒,王瑞彪,李志欣,韩阳,刘照琨,路义鑫. 两种旋毛虫丝氨酸蛋白酶抑制剂对小鼠免疫保护效果的评估[J/OL]. 中国兽医科学:1-9[2023-03-06].
- [2]帅晋豪,王鹏,季映驰. 血清丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3 在三阴性乳腺癌中的表达及对患者预后的影响[J]. 贵州医科大学学报,2023,48(02):158-164.
- [3]费朝霞,李红,丁明昱,韩洁,张作仕. 2 型糖尿病患者血清尿酸、胱抑素 C、半乳糖凝集素-3、丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1 与血糖及颈动脉粥样硬化的关系研究[J]. 现代生物医学进展,2022,22(20):3951-3955.
- [4]付建茹,陈雨,陈佩. 血清丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1 纤维胶凝蛋白-3 及亲吻素水平与妊娠期糖尿病的相关性分析[J]. 中国妇幼保健,2022,37(16):2928-2931.
- [5]邬伟,徐慧丽,王正亮,俞晓平. 褐飞虱丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 N1serpin2 的克隆及其功能分析[J]. 中国农业科学,2022,55(12):2338-2346.