

2-吡啶酮类 VEGF 受体 2 抑制剂的分子对接和三维定量构效关系

3D-quantitative structure-activity relationship and molecular docking studies on 2-indolinones as VEGF receptor 2 inhibitors

陈 军, 吕加国, 张万年, 宋云龙, 郑灿辉, 李耀武, 盛春泉, 朱 驹*, 周有骏*

(第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究 VEGFR2 抑制剂与靶酶的作用机制, 为设计新型抑制剂建立理论模型。 **方法:** 应用 AutoDock3.05 对接 2-吡啶酮类抑制剂到靶酶的活性腔, 然后以抑制剂的对接构象为基础, 在 Sybyl6.9 中建立抑制剂的比较分子力场分析法 (comparative of molecular field analysis, CoMFA) 和比较分子相似性指数分析法 (comparative of molecular similarity index analysis, CoMSIA) 三维定量构效关系模型。 **结果:** 对接构象与文献报道结果一致, 三维定量构效关系统计指标 Q^2 均大于 0.5。 **结论:** 所得结果具有较好的可靠性, 对于设计新型化合物具有指导意义。

[关键词] 血管内皮生长因子受体 2; 2-吡啶酮类; 分子对接; 量化构效关系

[中图分类号] R 979.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0733-04

VEGF 受体 2 亦称含激酶插入域的受体 (kinase domain-containing receptor, KDR), 属于受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 超家族^[1]。目前, 靶向 KDR 的抑制剂已成为新兴的抗肿瘤研究热点。

2-吡啶酮类化合物是 SUGEN 公司开发的一类 KDR 抑制剂, 其中 SU5416 率先进入临床试验。然而, 由于其理化性质和生物利用度等方面的不足而在 III 期临床时终止了试验。随后, 一批经由合理设计和优化的第二代抑制剂正逐渐在临床试验中表现出令人满意的结果^[2]。为了获得更理想的抑制剂, 需要基于 KDR 活性位点的结构以及 KDR 与配体结合的机制进行合理设计。为此, 有必要深入研究抑制剂与 KDR 的相互作用机制。

2-吡啶酮类 KDR 抑制剂的三维定量构效关系至今未见报道, 本文利用分子对接方法来模拟 KDR 与其抑制剂的结合方式, 并对抑制剂进行三维定量构效关系分析, 然后详细探讨它们的相互作用机制。

1 材料和方法

所有工作均在 SGI 的 Origin300 服务器上完成, 所用软件为 Sybyl6.9 和 AutoDock3.05^[3]。所用参数除特别指明外都是默认参数。所选取化合物来自文献^[4-6]报道的 2-吡啶酮类 KDR 抑制剂 (表 1)。

1.1 分子对接

1.1.1 受体的准备 KDR 激酶域晶体结构取自 Brookhaven 蛋白晶体结构数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/>), PDB 号 1YWN^[7]。在 Sybyl6.9 中删去水分子和配体分子, 为受体添加极性氢并加载 KOLLMAN UNI 电荷。然后优化所添加的氢原子; 固定所有重原子, 用最陡下降法, 能量收敛到 10 kcal/(mol·Å), 最大迭代次数 10^6 , 进行分子力学优化, 使用 Kollman United 力场, 使用当前电荷。然后用共轭梯度法, 能量收敛到 0.1 kcal/(mol·Å)。然后为缺失侧链的 11

个残基添加侧链并优化。方法为先优化这 11 个残基侧链的氢原子, 再优化这 11 个残基侧链的全部原子, 优化策略同上。所得结构用 AutoDockTools 转换成 pdbqs 文件, 设定网格大小和网格参数, 用 AutoGrid 模块计算每个网格点与探针原子的作用能。

1.1.2 配体的准备 所有分子在 Sybyl6.9 中构建, 并用分子力学进行能量优化。参数选择为: Tripos 力场, Gasteiger-Huckel 电荷, 能量收敛到 0.01 kcal/(mol·Å), 最大迭代次数 10^6 。然后, 所有分子用 AutoTors 转换成 pdbq 文件。

1.1.3 设定对接参数 采用 Lamarckian 遗传算法, 并用 Solis and Wets 局部搜寻算法进行能量优化。修改 Lamarckian 算法的 3 个参数 maximum number of energy evaluations, maximum number of generations 和 docking runs 分别为 1 500 000, 370 000 和 50^[8]。

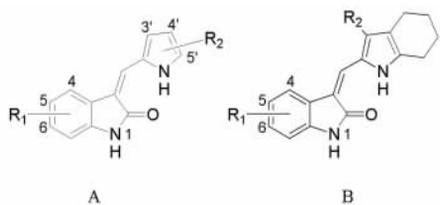
1.2 三维定量构效关系 药效构象我们采取分子对接得到的与受体的结合构象 (图 1), 在 Sybyl6.9 中, 网格可以随机生成或自定义。随机生成的网格点往往不能很有效地探测到分子周围三维空间场与生物活性变化最相关的信息。因此我们采用自行编写的分子旋转和网格平移程序探测整个场空间, 以交叉验证系数 Q^2 为标准选择结果最好的网格, 用该网格导出 3D-QSAR 模型。搜寻算法为: 以 36° 为步长, 分别沿 x、y、z 轴旋转 1 周, 共旋转 1 000 步。每旋转一步即随机生成一网格, 用交叉验证导出 Q^2 值, 根据 Q^2 值选择分子的空间取向。然后进行网格平移, 先生成一个网格点间距为 2 Å 的网格, 然后以 0.2 Å 为步长, 分别沿 x、y、z 轴移动 2 Å 距离, 共平移 1 000 次。每次均计算 Q^2 值, 以 Q^2 值最大的网格用非交叉验证偏最小二乘法导出 CoMFA (comparative of

[作者简介] 陈 军, 博士生。

* Corresponding authors. E-mail: zhuju@smmu.edu.cn; zhouyoujun2006@yahoo.com.cn

molecular field analysis)和 CoMSIA(comparative of molecular similarity index analysis)模型。

表 1 所选用的 2-吡啶酮类化合物的结构及其 IC₅₀、pIC₅₀ 以及 pIC₅₀ 的预测值



化合物	结构	R1	R2			IC ₅₀	pIC ₅₀	pIC ₅₀ 的预测值	
			5'	3'	4'			CoMFA	CoMSIA
1	A	H	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	H	0.02	1.70	1.64	1.71
2	A	4-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	H	0.20	0.70	0.89	0.64
3	A	5-Br	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	H	0.35	0.46	0.56	0.45
4	A	6-(3-OCH ₃ phenyl)	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	H	28.30	-1.45	-1.45	-1.38
5	A	6-(3-OC ₂ H ₅ phenyl)	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	H	1.00	0.00	0.27	0.13
6	A	H	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	H	2.14	-0.33	-0.16	-0.37
7	A	5-COOH	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	H	0.24	0.62	0.72	0.66
8	A	5-SO ₂ NH ₂	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	H	0.92	0.04	0.04	0.10
9	A	6-OCH ₃	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	H	1.35	-0.13	-0.13	-0.20
10	A	6-phenyl	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	H	0.30	0.52	0.55	0.47
11	A	6-(3-OCH ₃ phenyl)	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	H	0.09	1.05	1.00	1.23
12	A	6-(2-OCH ₃ phenyl)	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	H	1.47	-0.17	0.03	-0.15
13	A	6-(4-OCH ₃ phenyl)	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	H	0.45	0.35	0.54	0.39
14	A	H	-CH ₃	H	-CH ₃	0.70	0.15	0.17	0.08
15	A	H	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	2.43	-0.39	-0.33	-0.27
16	A	5-Br	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	1.73	-0.24	-0.35	-0.12
17	A	5-COOH	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	0.07	1.15	1.64	1.03
18	A	5-SO ₂ NH ₂	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	1.26	-0.10	-0.22	-0.23
19	A	6-OCH ₃	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	8.29	-0.92	-0.78	-0.81
20	A	6-phenyl	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	0.14	0.85	0.77	1.07
21	A	6-(3-OCH ₃ phenyl)	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	0.30	0.52	0.39	0.31
22	A	6-(2-OCH ₃ phenyl)	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	4.37	-0.64	-0.42	-0.55
23	A	6-(4-OCH ₃ phenyl)	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	0.52	0.28	0.17	0.22
24	B	H	H	H	-CH ₃	0.48	0.32	0.32	0.48
25	B	5-Br	H	H	-CH ₃	0.07	1.15	0.92	0.87
26	B	5-SO ₂ NH ₂	H	H	-CH ₃	0.03	1.52	1.44	1.33
27	B	5-COOH	H	H	-CH ₃	0.02	1.70	1.88	1.56
28	B	6-OCH ₃	H	H	-CH ₃	12.10	-1.08	-0.77	-0.92
29	B	6-(2-OCH ₃ phenyl)	H	H	-CH ₃	20.00	-1.30	-1.22	-1.01
30	B	H	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	-CH ₃	0.09	1.05	1.03	1.17
31	B	5-Br	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	-CH ₃	0.03	1.52	1.60	1.43
32	B	5-SO ₂ NH ₂	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	-CH ₃	0.60	0.22	0.22	0.35
33	B	5-COOH	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	-CH ₃	0.004	2.40	2.05	2.61
34	B	6-OCH ₃	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	-CH ₃	0.38	0.42	0.38	0.66
35	B	6-phenyl	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	-CH ₃	0.05	1.30	1.17	1.29
36	B	6-(3-OCH ₃ phenyl)	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	-CH ₃	0.07	1.15	1.08	1.17
37	B	6-(2-OCH ₃ phenyl)	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	-CH ₃	0.06	1.22	1.21	1.04
38	B	6-(4-OCH ₃ phenyl)	-CH ₂ CH ₂ COOH	-CH ₃	-CH ₃	0.03	1.52	1.48	1.48

pIC₅₀ = -lg(IC₅₀)

2 结果

对接结果的选取主要依据结合自由能的大小,同时参考相同构象出现的次数以及构象的合理性。对接结果中,所有抑制剂 2-吡啶酮环的 1 位 N-H 和 KDR 绞链区 Glu917 的 C=O 形成分子间氢键,2-吡啶酮环的 2 位羰基氧与 Cys919 的 N-H 形成分子间氢键,而吡咯环上的 N-H 还可以和 Cys919 的 C=O 形成一个氢键。5 位或 6 位上的疏水性取代基与 Val899, Phe1047, Leu889, Val916, Val914 的疏水性侧链以及 Lys868 的侧链的疏水部分组成的一个大的疏水腔发生疏水相互作用。另外由 Leu840 和 Phe918 的侧链组成的一个小的疏水通道也可与配体 3 位上的疏水基团发生疏水相互作用提高亲和力。除此以外,3' 位上有丙酸基团的还可以与绞链区的 Asn923 形成两个氢键。这些结果与 SU5402 (化合物 1) 和 FGFR1 的复合物的晶体结构^[9]是一致的。抑酶活性最强的化合物 33 除了上述作用以外,其 5 位上的甲酸的氧可以跟活化环(A 环)起始端保守的 DFG 基序的 Asp1046 的主链上的 N-H 形成氢键(图 2),进一步增强与酶的结合力。



图 1 对接后 2-吡啶酮类分子的构象叠合图

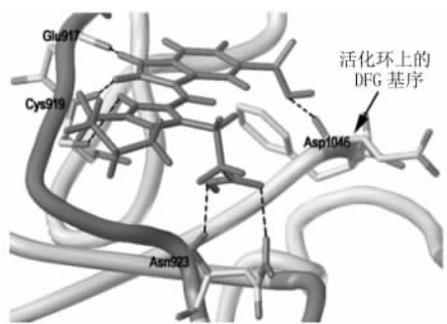


图 2 化合物 33 与 KDR 活性腔的结合图

抑制剂的 CoMFA 和 CoMSIA 的统计学指标如表 2 所示,交叉验证系数 Q^2 均大于 0.5。通常地, $Q^2 > 0.5$ 即说明该模型具有好的预测能力。

在 CoMFA 模型中,静电场的贡献略大于立体场的贡献,可以认为电性相互作用立体场对活性的贡献大体相当。在 CoMSIA 模型中,力场被进一步细分,疏水场和静电场的贡献几乎相当,氢键受体比氢键供体对活性的贡献要大得多,可以认为抑制剂中的疏水基团和电性基团同样重要,而氢键

受体比氢键供体重要。CoMFA 和 CoMSIA 对活性的预测值和实验值的传统相关系数 r^2 分别为 0.974 和 0.978,说明模型有较好的预测能力。

表 2 2-吡啶酮类化合物的 3D-QSAR 的统计指标

指标	CoMFA	CoMSIA
交叉验证系数 Q^2	0.561	0.541
最佳组分数	6	6
传统相关系数 r^2	0.974	0.978
标准误	0.159	0.125
F	190.976	125.365
立体场贡献(%)	42.5	14.6
静电场贡献(%)	57.5	30.3
疏水场贡献(%)	—	31.9
氢键受体贡献(%)	—	17.1
氢键供体贡献(%)	—	6

观察 CoMFA 等势图(图 3)可得出如下结论:在 3-吡咯亚甲基取代 2-吡啶酮的侧链吡咯环的 3' 和 5' 位引入立体大基团对活性有利(等势图的绿色区域)。其 5' 位上电正性基团取代对活性有利(蓝色区域)。特别要指出的是报道的化合物中很少在 5' 位有较大的取代基,根据所得模型我们可以尝试在该处引进大取代基以得到活性更优的化合物。

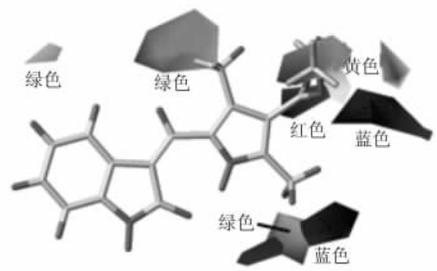


图 3 CoMFA 模型力场贡献等势图

绿色区域表示此处有立体大基团对活性有利;黄色则表示立体大基团对活性不利;红色区域表示此处有电负性基团对活性有利;蓝色区域则表示电正性基团对活性有利

CoMSIA 等势图(图 4)中,图 4A 表示配体氢键受体对活性的贡献。在 2-吡啶酮的侧链吡咯环的 1' 位上氢键受体对活性有利(紫红色区域)。图 4B 显示的是配体氢键供体对活性的贡献。从图中可看出 2-吡啶酮环的 N1 上的氢作为氢键供体对活性有利,而在吡咯 3' 位上不宜有氢键供体(紫色区域)。图 4C 表示疏水场对活性的影响。图中吡咯环的 3', 4' 位附近有一广泛的黄色区域,提示该位置引入疏水性基团对活性有利。

3 讨论

目前已报道的 KDR 抑制剂与 KDR 的对接工作都是基于同源模建的 KDR 结构。我们采用了 Miyazaki 等^[7]报道的 VEGFR2 与抑制剂的复合物的晶体结构作为受体的结合构

象,采用 AutoDock3.05 分子对接程序对已报道的 38 个 2-吡啶酮类抑制剂进行了分子对接计算。我们的结论不仅与已报道的抑制剂作用方式一致^[10],还进一步认为,KDR 活化环起始端的保守 DFG 基序上的 Asp1046 可与 2-吡啶酮类 5 位上的羧基形成氢键,该氢键不仅可以增强配体与受体的亲和力,并有可能对限制活化环的构象起到一定的作用,因此该氢键的形成对于提高抑制剂的活性是有利的。

通过分子对接研究,我们还确定了受体活性腔的关键功能残基,讨论了配体与 KDR 的亲和力与抑酶活性的关系。KDR 绞链区的 Glu917 的 C=O 和 Cys919 的 N-H 作为氢键受体和供体,对于配体的结合非常重要,提示我们设计新的

结构时也应考虑到这 2 个氢键。Val899、Phe1047、Leu889、Val916、Val914 的疏水性侧链以及 Lys868 的侧链的疏水部分组成的一个大的疏水腔对于抑制剂结合的亲和力和选择性也非常重要。抑制剂上大的疏水基团如取代苯基或萘环等与该疏水腔发生疏水性相互作用。另外由 Leu840 和 Phe918 的侧链组成的一个小的疏水通道也可与配体作用提高亲和力,由绞链区的 Asn923 和催化环的 Arg1032 组成一个亲水性腔,可与抑制剂上的极性基团如吡啶基形成一个氢键,起到增强作用力和稳固抑制剂的作用。KDR 活性腔里的这些功能性区域的性质和空间分布的确定,对于指导抑制剂的设计有非常重要的意义。

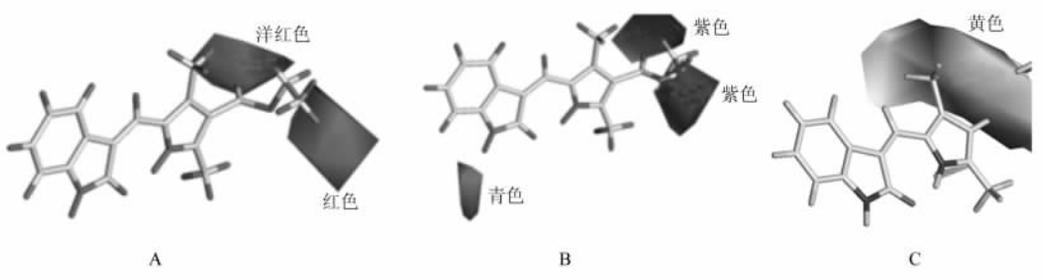


图 4 CoMSIA 模型力场贡献等势图

A: 氢键受体场贡献等势图,洋红色区域表示配体在此处有氢键受体对活性是有利的,红色区域则表示氢键受体对活性不利;B: 氢键供体场贡献等势图,青色区域表示配体在此处有氢键供体对活性是有利的,紫色区域表示配体在此处有氢键供体对活性是不利的;C: 疏水场贡献等势图,黄色区域表示配体在此处有疏水性基团对活性是有利的

我们对 2-吡啶酮类抑制剂进行了 3D-QSAR 研究,得到了预测力好($Q^2 > 0.5$)的 CoMFA 和 CoMSIA 模型,并定性的探讨了与 KDR 结合好的基团在 KDR 活性腔中的空间分布,为全新 KDR 抑制剂的设计提供了理论基础。

[参考文献]

[1] Olsson A, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signaling-in control of vascular function[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006,7:359-371.
 [2] Manley P W, Bold G, Bruggen J, et al. Advances in the structural biology, design and clinical development of VEGF-R kinase inhibitors for the treatment of angiogenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2004,1697:17-27.
 [3] Morris G M, Goodsell D S, Halliday R S, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function[J]. J Comput Chem, 1998, 19: 1639-1662.
 [4] Sun L, Tran N, Tang F, et al. Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones: a novel class of tyrosine kinase inhibitors that exhibit selectivity toward particular receptor tyrosine kinases[J]. J Med Chem, 1998, 41:2588-2603.
 [5] Sun L, Tran N, Liang C, et al. Design, synthesis, and evaluations of substituted 3-[(3- or 4-carboxyethylpyrrol-2-yl) methylide-

nyl]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF, and PDGF receptor tyrosine kinases[J]. J Med Chem, 1999, 42:5120-5130.
 [6] Sun L, Tran N, Liang C, et al. Identification of substituted 3-[(4, 5, 6, 7-tetrahydro-1H-indol-2-yl) methylene]-1, 3-dihydroindol-2-ones as growth factor receptor inhibitors for VEGF-R2 (Flk-1/KDR), FGF-R1, and PDGF-R β tyrosine kinases[J]. J Med Chem, 2000, 43:2655-2663.
 [7] Miyazaki Y, Matsunaga S, Tang J, et al. Novel 4-amino-furo[2, 3-d]pyrimidines as Tie-2 and VEGFR2 dual inhibitors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15:2203-2207.
 [8] Liu H, Huang X, Shen J, et al. Inhibitory mode of 1, 5-dia-rylpyrazole derivatives against cyclooxygenase-2 and cyclooxygenase-1: molecular docking and 3D QSAR analyses[J]. J Med Chem, 2002, 45:4816-4827.
 [9] Mohammadi M, McMahon G, Sun L, et al. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors[J]. Science, 1997, 276:955-960.
 [10] Underiner T L, Ruggeri B, Gingrich D E. Development of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy[J]. Curr Med Chem, 2004, 11:731-745.

[收稿日期] 2007-01-22

[修回日期] 2007-06-07

[本文编辑] 尹 茶