

# 选择性环氧合酶-2 抑制剂的三维定量构效研究

雷新胜, 朱七庆, 屈凌波, 郭宗儒\*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 目的: 建立环氧合酶-2 选择性抑制剂的三维构效关系, 设计新型的环氧合酶-2 抑制剂。方法和结果: 通过 44 个抑制剂与环氧合酶-2 的对接确定分子的叠合模式, 利用比较分子力场分析方法建立了 44 个选择性环氧合酶-2 抑制剂的三维定量构效模型。模型的交叉验证系数  $R_{CV}^2 = 0.709$ , 传统相关系数  $R_{CV}^2 = 0.911$ ,  $F_{5, 38} = 75.66$ , 标准偏差  $SE = 0.242$ 。结论: 利用 DOCK 和 CoMFA 相结合的方法提供了分子设计的新途径。

**关键词** 环氧合酶-2; 选择性环氧合酶-2 抑制剂; 比较分子力场分析; 对接

非甾体抗炎药 (NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs) 通过抑制环氧合酶催化花生四烯酸炎症介质前列腺素, 达到解热、镇痛及治疗多种炎症的目的。环氧合酶有两种结构亚型<sup>[1~3]</sup>, 即结构型环氧合酶-1 (cyclooxygenase 1, COX-1) 和诱导型环氧合酶-2 (cyclooxygenase 2, COX-2)。环氧合酶-1 主要存在于正常的组织细胞中, 如分布于血管、胃肠道、肾脏等组织, 催化产生维持正常生理功能的前列腺素; 诱导型的环氧合酶-2 主要存在于炎症组织细胞中, 在炎症介质的诱导下产生的环氧合酶-2 催化花生四烯酸, 产生致炎介质前列腺素。现有的非甾体抗炎药由于不加选择地抑制两种环氧合酶, 因而在治疗炎症的同时也抑制了正常生理功能所需的前列腺素, 造成胃肠道刺激、损伤和溃疡等毒副作用。研制高效、低毒、副作用小的非甾体抗炎药的新途径是开发选择性环氧合酶-2 抑制剂。

尼米舒利 (nimesulide) 和美洛昔康 (meloxicam) 是已上市的环氧合酶-2 抑制剂。日本大正公司和美国杜邦公司发现的化合物 NS-398<sup>[4]</sup> 和 DuP697<sup>[5]</sup> 为两个代表性的选择性环氧合酶-2 抑制剂。为了开发选择性环氧合酶-2 抑制剂, 药物化学家合成了大量具有选择性抑制环氧合酶-2 的化合物<sup>[6~9]</sup>。为进一步阐明选择性环氧合酶-2 抑制剂的定量构效关系, 本文利用比较分子力场分析方法 CoMFA (comparative molecular field analysis)<sup>[10]</sup> 对三环系环氧合酶-2 抑制剂进行了三维定量构效分析。

所有计算工作在本所合成室的 SGI Indigo R4000 计算机工作站上完成, 所用计算程序为 Tripos 公司最新提供的 Sybyl 6.4<sup>[11]</sup> 分子设计软件包。计算过程中除非特别指明, 所选用的参数均为缺省值。环氧合酶-2 结合抑制剂的复合物晶体结构数据从 PDB 数据库中获得<sup>[12]</sup>。

## 计算方法

### 1 化合物选择

目前, 进入临床实验的环氧合酶-2 抑制剂大多属于三环系化合物。构效研究表明: (1) 通过中间桥连环连接的两个芳环对于化合物选择性结合环氧合酶-2 是必需的, 且需处于 *cis*-构型; (2) 桥连的一个芳环上的甲磺基或磺胺基也是必需的, 桥连环起着脚手架的支撑作用。三环系化合物的结构修饰主要集中在中间桥环和无甲磺基和磺酰胺基芳环上。为了充分反映该类化合物的三维定量构效关系, 选取化合物应尽可能多地包括各种结构类型。所选取的化合物类型及相应的取代基分别见图 1 和表 1<sup>[13, 14]</sup>。所用化合物的生物活性指标都用  $IC_{50}$ , 所有化合物的活性都来源于同一实验室, 在每次测试中, 对照样品的活性值都相同, 比较分子力场分析采用  $IC_{50}$  的负对数形式  $-\log IC_{50}$ 。

### 2 活性构象确定及相关分子三维结构建模

确定活性构象是 CoMFA 分析成功与否的第一个关键步骤。本文用环氧合酶-2 抑制剂 SC-558 结合酶的复合物晶体结构。在 Sybyl 6.4 中, 从复合物晶体结构中剥离出 SC-558, 经分子力学程序 Minimize 进行优化, 所得构象与复合物中的 SC-558

收稿日期: 1998-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770877)

\* 联系人 Tel: (010) 63165249, Fax: (010) 63017757,

E-mail: guozr@hotmail.com

雷新胜 男, 30 岁, 博士研究生

郭宗儒 男, 61 岁, 研究员, 博士生导师

原构象比, 未见明显变化, 因此优化后的 SC-558 可作为三环类化合物的活性构象, 二者叠合见图 2。

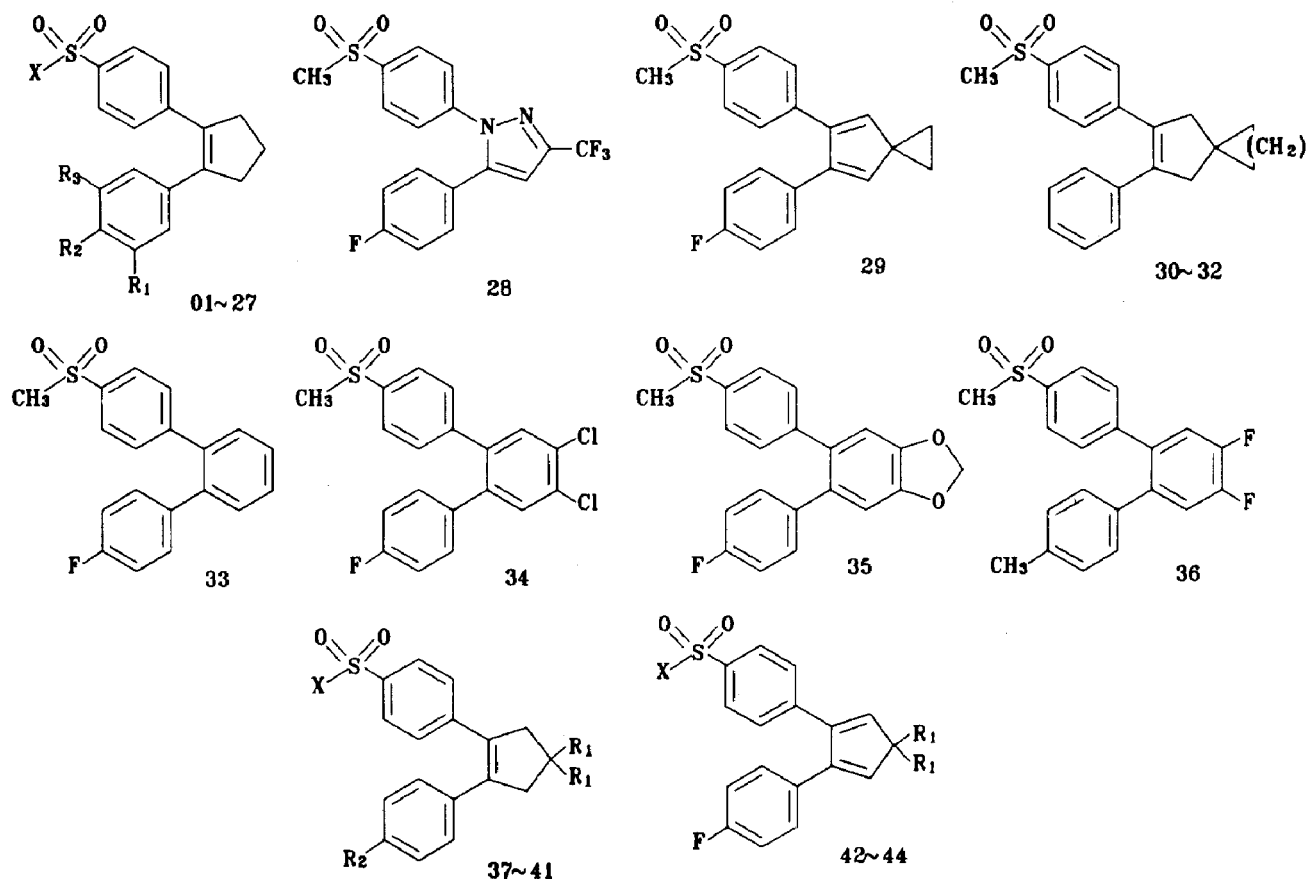


Fig 1 Structures of compounds selected for CoMFA analysis.

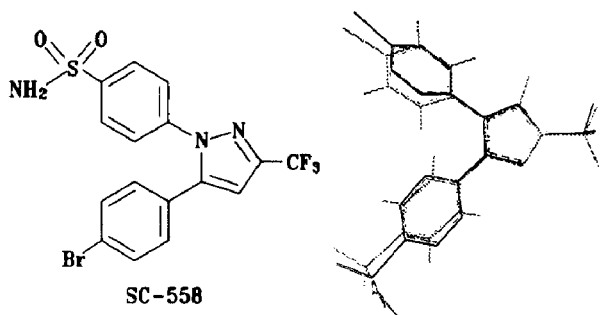


Fig 2 Superimposition of energy-minimized SC-558 and SC-558 of complex.

用于比较分子力场分析的 44 个三环类化合物的三维结构都是以优化后的 SC-558 结构为模板, 取代相应的基团和原子后, 以分子力学程序 Minimize 进行能量优化而得到。优化过程中采取 Powell 能量梯度法, 所用力场为 Tripos 力场, 能量收敛限定为  $0.01 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。由于经典分子力学不能精确计算磺基-SO<sub>2</sub>-的电荷, 因此分子电荷的计算用量子化学软件包 MOPAC 6.0 中的 PM3 计算, 分子最终荷载 MOPAC 电荷。

### 3 分子叠合

分子叠合对于建立三维构效模型有重要影响。当活性构象确定后, 一般根据一定的规则如药效团、力场等进行分子叠合, 使每一个分子采取具有最大力场相似性的空间取向进行力场计算。这些叠合方法仅仅是一种近似的手段。事实上, 分子是以结合后的力场分布与大分子相互作用的, 结合后分子的场分布理应与活性具有最好的相关性。基于这一原理, 本文首次利用对接程序 DOCK 模拟 44 个选择性环氧合酶-2 抑制剂的结合, 以对接后分子所处的位置作为叠合方式来进行比较分子力场分析, 具体操作如下:

- (1) 读取选择性抑制剂 SC-558 结合环氧合酶-2 的复合物晶体结构, 以 Sybyl 6.4 中的 Flexible Dock 定义配体结合腔, 所定义的结合腔包括配体分子  $8 \text{ \AA}$  范围内的氨基酸残基;
- (2) 给蛋白质分子环氧合酶-2 加上必须的氢原子并使分子荷载 Kollman all-atom 电荷, 操作均由 Flexible Dock 中的选项完成;
- (3) 以复合物中的 SC-558 分子为模板叠合待对接的分子, 叠合原子为两个芳环的碳原子及联结两个芳环的碳、氮原子;

- (4) 删除复合物中的 SC-558 分子, 执行 Sybyl 6.4 的 DOCK 子程序初始化对接过程;
- (5) 键入 Minimize 命令优化抑制剂与酶的相互作用, 计算仅考虑抑制剂分子 4 Å 范围内的氨基酸残基与配体的相互作用, 该过程由 DOCK 程序自动完成。优化时结合腔内的氨基酸残基侧链构象不作任何限制, 其余原子的位置保持不变。所用力场为 Tripos 力场, 蛋白质分子带

Kollman allatom 电荷, 抑制剂分子荷载 PM3 计算的 MOPAC 电荷, 能量收敛限为 0.1 kcal·mol<sup>-1</sup>;

- (6) 从对接后的“酶-抑制剂复合物”中剥离出抑制剂分子并存入 Database;
- (7) 重复步骤(3)~(6)进行下一个分子的对接, 直至完成 44 个分子的对接操作。

**Tab 1 The substituents and activities of selective cox-2 inhibitors used for CoMFA**

Compd	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	X	IC <sub>50</sub> ( μmol·L <sup>-1</sup> )	- log (IC <sub>50</sub> )
1	H	F	H	CH <sub>3</sub>	0.026	7.58
2	H	F	H	NH <sub>2</sub>	0.007	8.16
3	H	F	F	CH <sub>3</sub>	0.051	7.29
4	H	F	F	NH <sub>2</sub>	0.018	7.75
5	H	F	Cl	CH <sub>3</sub>	0.030	7.52
6	H	F	Cl	NH <sub>2</sub>	0.010	8.00
7	H	Cl	H	CH <sub>3</sub>	0.003	8.52
8	H	Cl	H	NH <sub>2</sub>	0.003	8.52
9	H	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	0.010	8.00
10	H	Cl	Cl	NH <sub>2</sub>	0.002	8.70
11	H	CH <sub>3</sub> O	F	CH <sub>3</sub>	0.120	6.90
12	H	CH <sub>3</sub> O	F	NH <sub>2</sub>	0.016	7.80
13	H	CH <sub>3</sub> O	Cl	CH <sub>3</sub>	0.140	6.85
14	H	CH <sub>3</sub> O	Cl	NH <sub>2</sub>	0.009	8.05
15	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N	H	CH <sub>3</sub>	0.005	8.30
16	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N	H	NH <sub>2</sub>	0.002	8.77
17	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	0.003	8.52
18	H	CF <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	0.870	6.06
19	H	CF <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	0.150	6.82
20	H	CF <sub>3</sub>	F	CH <sub>3</sub>	0.760	6.12
21	H	CF <sub>3</sub>	F	NH <sub>2</sub>	0.170	6.77
22	H	CH <sub>3</sub> O	H	CH <sub>3</sub>	0.005	8.30
23	H	CH <sub>3</sub> O	H	NH <sub>2</sub>	0.002	8.70
24	Cl	CH <sub>3</sub> O	Cl	CH <sub>3</sub>	0.002	8.49
25	Cl	CH <sub>3</sub> O	Cl	NH <sub>2</sub>	0.009	8.05
26	H	OCH <sub>2</sub> O		CH <sub>3</sub>	0.021	7.68
27	H	OCH <sub>2</sub> O		NH <sub>2</sub>	0.002	8.70
28	SC-58125				0.050	7.30
29					0.026	7.59
30	n= 0				0.008	8.12
31	n= 1				0.004	8.40
32	n= 2				0.062	7.21
33					0.260	6.59
34					0.240	6.62
35					0.083	7.08
36					0.014	7.08
37	CH <sub>3</sub>	F		CH <sub>3</sub>	0.015	7.82
38	CH <sub>3</sub>	F		NH <sub>2</sub>	0.008	8.10
39	CF <sub>3</sub>	F		CH <sub>3</sub>	0.067	7.17
40	CH <sub>3</sub>	Cl		NH <sub>2</sub>	0.007	8.16
41	CH <sub>3</sub>	Cl		CH <sub>3</sub>	0.001	9.00
42	CH <sub>3</sub>			CH <sub>3</sub>	0.052	7.28
43	CH <sub>3</sub>			NH <sub>2</sub>	0.003	8.52
44	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>			CH <sub>3</sub>	0.170	6.77

15 个代表性的抑制剂分子经对接后的“自然叠合”如图 3 所示。

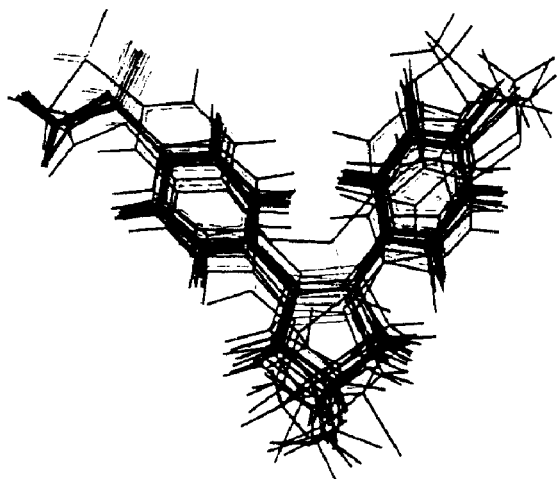


Fig 3 The coordinates of 15 representative COX-2 inhibitors after being docked.

#### 4 比较分子力场分析

比较分子力场分析由 Svbvl 6.4 中的 OSAR 模块完成。计算的力场包括立体场和静电场, 探针原子选用  $sp^3$  杂化的  $C^+$ , 由 create automatically 产生的三维网格大小为 X:  $-15.84 \text{ \AA} \sim 5.33 \text{ \AA}$ , Y:  $-10.92 \text{ \AA} \sim 9.00 \text{ \AA}$ , Z:  $-5.64 \text{ \AA} \sim 8.33 \text{ \AA}$ , 探针原子的行进步长为  $2 \text{ \AA}$ , 总共计算的网格点数为  $11 \times 10 \times 7 = 770$  个, 立体场和静电场的能量阈值皆为  $30.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。最终分别以交叉验证 (cross-validated) 和非交叉验证 (cross-validated) 的偏最小二乘法 (PLS, partial least square) 确定最佳主成分数并建立最终的比较分子力场模型。为提高信号噪音比, 进行 PLS 分析时设定 column filtering 为  $2.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

最终以 Spreadsheet 中的 View CoMFA 将活性与立体场和静电场的相互关系以系数等势图 (coefficient contour maps) 在图形工作站上显示出来, 直接给出影响活性的立体场和静电场信息。

## 结果与讨论

### 1 CoMFA 模型

比较分子力场分析所得 CoMFA 模型的统计学参数为: 交叉验证相关系数  $R_{cv}^2 = 0.709$ , 最佳主成分数为 5, 通常,  $R_{cv}^2 > 0.5$  即表明由相应的变量建立的模型将具有较好的预测能力。由最佳主成分建立的 CoMFA 模型的传统相关系数  $R^2 = 0.911$ ,

$F_{5,38} = 75.606$ , 标准偏差 SE (standard error) =  $0.242$ 。立体场和空间场对构效方程的贡献分别为  $65.2\%$  和  $34.8\%$ , 这表明该类抑制剂与酶 COX-2 的立体场作用强于静电场。 $-\log IC_{50}$  与 5 个主成分的相关方程为:

$$-\log IC_{50} = 0.696Z_1 + 0.536Z_2 + 0.504Z_3 + 0.465Z_4 + 0.463Z_5$$

该 CoMFA 模型对 44 个化合物的活性预测值与实验测定值的相关图见图 4。

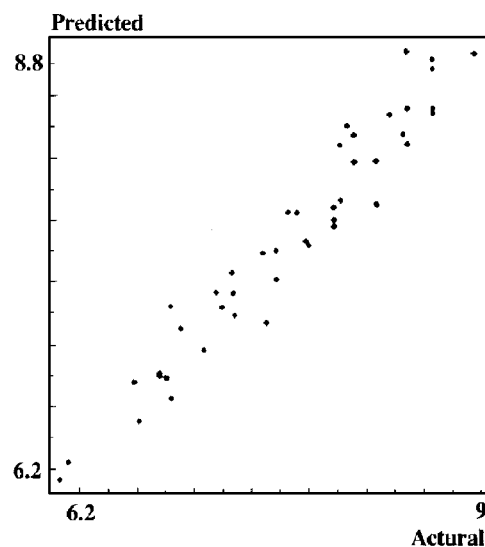


Fig 4 Actual vs predicted activities of 44 inhibitors from CoMFA model.

### 2 CoMFA 系数等势图

CoMFA 模型的系数等势图见图 5, 其中参照分子为化合物 2。绿色和黄色区域代表立体场对化合物活性的影响, 绿色区域表示在该区域附近引入体积大的基团所增加立体场作用有利于提高活性, 黄色区域则表明该区域附近不宜引入大的取代基, 否则会降低化合物的活性。红色区域和蓝色区域则表示静电场对活性的影响, 红色区域附近引入负电性基团有利于提高活性, 蓝色区域附近引入正电性基团有利于提高活性。在氟取代苯环和联结两个芳环的环戊烯附近分别存在一个大的绿色区域, 表明这两个位置引入体积大的基团将有利于提高化合物的活性。这一结果与构效分析也是一致的, 化合物 15 ~ 16, 17, 22 ~ 25 和 26 ~ 27 分别以  $N(CH_3)_2$ ,  $CH_3$ ,  $OCH_3$ ,  $-(OCH_2O)-$  这些大体积基团取代苯环上的氟原子, 由于增加了立体场作用, 增强了化合物活性。化合物 30 ~ 32, 37 ~ 43 的中间桥连环引入甲基或环烷基增加该区域的立体场效应, 活性也有明显的提高。除上述两个绿色的区域外, 在甲磺酰基的



- inhibitors: novel 1, 2-diarylcyclopentenes are potent and orally active cox-2 inhibitors. *J Med Chem*, 1994, **37**: 3878
- 10 Gramer RD, Patterson DE, Bunce JD. Comparative molecular field analysis (CoMFA) 1: effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc*, 1988, **110**: 5959
- 11 The program Sybyl 6. 4/6. 04 is available from Tripos Assoc., 1699 S. Hanley Rd., St. Louis, MO 63144
- 12 Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJB, *et al.* The protein data: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol*, 1977, **112**: 535
- 13 Li JJ, Anderson GD, Burton EG. 1, 2-Diarylcyclopentenes as selective cyclooxygenase-2 inhibitor and orally active anti-inflammatory agents. *J Med Chem*, 1995, **38**: 4570
- 14 Richard R, Hamer L, Tegeler JJ. Diarylspiro(2, 4) heptenes as orally active highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor: synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem*, 1996, **39**: 253
- 15 Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK. Structural basis for selective inhibitor of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 1996, **384**: 644

## THREE DIMENSIONAL QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP OF SELECTIVE CYCLOOXYGENASE-2 INHIBITORS

Lei Xinsheng(Lei XS), Zhu Qiqing(Zhu QQ), Qu Lingbo(Qu LB) and Guo Zongru(Guo ZR)

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

**ABSTRACT AIM:** The discovery of cyclooxygenase-2 (COX-2) provides a new target for designing nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) with less side effects. A series of inhibitors were analyzed in order to disclose the relationship between activity and structure. **METHODS AND RESULTS:** Forty four selective COX-2 inhibitors were investigated by means of dock and comparative molecular field analysis (CoMFA). Based upon the active conformation extracted from the SC-558/COX-2 complex all inhibitors were docked into receptor and aligned. The model from dock-CoMFA showed higher ability to explain and predict the activity of selective COX-2 inhibitors, cross-validated  $R_{cv}^2 = 0.709$ , non-cross-validated  $r^2 = 0.911$ ,  $F_{5,38} = 75.606$ ,  $SE = 0.242$ . **CONCLUSION:** The combination of dock-CoMFA offers an approach to design new molecule.

**KEY WORDS** cyclooxygenase-2, selective COX-2 inhibitors, comparative molecular field analysis, DOCK