

螺环吲哚类 MDM2 抑制剂的分子对接、定量构效关系和分子动力学模拟

李博^a 周锐^a 何谷^{*,a,b} 郭丽^{*,a} 黄维^c

(^a 四川大学华西药学院 成都 610041)

(^b 四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室 成都 610041)

(^c 成都中医药大学药学院 成都 611137)

摘要 采用分子对接、三维定量构效关系(3D-QSAR)和分子动力学方法研究了 21 个螺环吲哚类化合物与 MDM2 蛋白的相互作用,并建立了相关预测模型.比较分子场分析法(CoMFA)和比较分子相似性指数分析法(CoMSIA)模型的交互验证相关系数 q^2 分别为 0.573 和 0.651,非交互验证相关系数 r^2 分别为 0.948 和 0.980.分子对接得到的结合模式与分子动力学模拟得到的结果一致,结合模式表明该类螺环吲哚化合物主要通过疏水相互作用和氢键与 MDM2 结合.基于上述相互作用模型设计并合成了 6 个新结构螺环吲哚化合物,并在 MDM2 高表达的前列腺癌 LNCaP 细胞株上测定其活性,结果表明化合物 5,6 的半数抑制浓度均低于 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,可作为新的抗肿瘤药物先导化合物进一步深入研究.本研究对以 MDM2 为靶点的新结构螺环吲哚类抑制剂的开发提供了理论和实验依据.

关键词 螺环吲哚衍生物;分子对接;分子动力学;比较分子场分析;比较分子相似性指数分析

Molecular Docking, QSAR and Molecular Dynamics Simulation on Spiro-oxindoles as MDM2 Inhibitors

Li, Bo^a Zhou, Rui^a He, Gu^{*,a,b} Guo, Li^{*,a} Huang, Wei^c

(^a West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041)

(^b State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041)

(^c School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137)

Abstract Inhibition of the MDM2-p53 interaction is considered to be a new therapeutic strategy to activate wild-type p53 in tumors. Recently, a series of potent and specific small-molecule spiro-oxindole inhibitors of the MDM2 were reported. In the current study, the interaction modes between 21 spiro-oxindole MDM2 inhibitors and the protein were studied by using the combination of molecular docking, molecular dynamics simulation and three-dimensional quantitative structure-activity relationships (3D-QSAR). The QSAR predictive models were established by using comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative similarity indices analysis (CoMSIA) techniques. The predictive power of the 3D-QSAR models were determined from external test sets that were excluded during model development. The inhibitors in test sets were given exactly the same pretreatment as the inhibitors in the corresponding training sets. The correlation between the experimental and predicted activity for all models was calculated as a predictive r^2 value. With the CoMFA model, the cross-validated value (q^2) was 0.573, the non-cross-validated value (r^2) was 0.948. And with the CoMSIA model, the corresponding q^2 and r^2 were 0.651 and 0.98, respectively. The interaction mode obtained by molecular docking was in agreement with the results of molecular dynamics simulations, the interaction mode revealed that the hydrophobic interaction and H-bond played an important role in the binding of spiro-oxindole derivatives and MDM2. Compounds designed by our group were synthesized and tested their *in vitro* cytotoxic activities against the MDM2 positive prostatic carcinoma LNCaP cell line. Two compounds, namely 5 and 6, with favorable scores from the CoMFA and CoMSIA models, showed potent cytotoxic activities with IC_{50} values lower than $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The result was corresponding with that in experiment. And it was very significance to discover novel spiro-oxindole inhibitors which are mainly aimed at the MDM2-p53 interaction. It was expected that the information provided here was helpful for the study toward more accurate structure based on 3D-QSAR modeling and anti-tumor drug design and discovery.

Keywords spiro-oxindole derivatives; molecular docking; molecular dynamics; comparative molecular field analysis; comparative molecular similarity indices analysis

* E-mail: heguscu@163.com; rosaguoli2000@yahoo.com.cn

Received April 6, 2013; published August 25, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81001357, 81273471) and the Open Research Fund of State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine.

项目受国家自然科学基金(Nos. 81001357, 81273471)和中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地开放课题资助。

1 引言

MDM2 (Murine Double Minute 2) 是一类最先在鼠源细胞系的双微染色体基因扩增中发现的肿瘤相关蛋白, 是 RING (Really interesting new gene) 型泛素蛋白连接酶的重要成员之一, 在鼠和人的多处组织中均有表达^[1]. MDM2 最主要的生理功能是负调控抑癌蛋白 p53, 在正常细胞中, MDM2 和野生型 p53 有着精细的平衡, 其相互调节形成负反馈回路: p53 诱导 MDM2 的表达, MDM2 与 p53 结合形成 p53-MDM2 复合物, 使 p53 泛素化, 而被蛋白酶降解^[2]. 由于 p53 蛋白功能障碍通常与癌症的发生有关, p53 的失活是肿瘤发生过程中最常见的事件之一, 有 50%~60% 的癌症与 p53 发生异常有关^[3]. 因此, 设计高效且特异通过靶向 MDM2 从而激活 p53 的药物是治疗癌症的重要方向. 目前主要有 3 种方法: (1) 减弱 MDM2 表达; (2) 抑制 MDM2 泛素连接酶活性; (3) 阻断 p53-MDM2 结合^[4].

近年来, 利用小分子化合物阻断 p53-MDM2 相互作用, 激活 p53 活性这一肿瘤治疗的新策略取得了较大的进展, 研究者们基于该思路已经设计和合成了多种 MDM2 抑制剂, 如 p53 的多肽类似物 chlorofusin、顺式咪唑啉类(*cis*-imidazolines, 如 Nutlin-3 等)、螺环吡啶酮类(spiro-oxindoles, 如 MI-63, MI-319 等)、1,4-苯并二氮卓-2,5-二酮类(BDPs)、查尔酮类、降冰片烷类、异吡啶酮衍生物、喹啉衍生物等, 这些抑制剂有些已进入临床试验阶段^[5~11]. 随着 p53-MDM2 复合物晶体结构的阐明, 以及计算机辅助药物设计方法的应用, 为基于靶点结构的 MDM2 抑制剂设计和研发提供了可能. 最近, 多个研究小组分别使用分子动力学、3D-QSAR 和分子对接等方法研究了 p53 多肽、顺式咪唑啉类化合物和 1,4-苯并二氮卓-2,5-二酮类化合物等和 MDM2 或其同源蛋白 HDM2 的相互作用^[12~18], 但螺环吡啶酮类化合物和 MDM2 的作用模式和 QSAR 尚未见文献报道.

自从 2005 年首次报道螺环吡啶酮类化合物的 MDM2 抑制活性以来^[19], 有多篇文献报道了该结构类型的 MDM2 抑制剂, 其中 MI-147 对 MDM2 蛋白的结合常数 K_i 可达 0.6 nmol/L, 是至今为止所有小分子抑制剂中活性最强的, 且该化合物在体外和体内抗肿瘤试验中均表现出了良好的药效^[20~24].

本文采用分子动力学和分子对接方法探讨了螺环吡啶酮化合物与 MDM2 蛋白的作用模式, 并利用 CoMFA 和 CoMSIA 方法对一组螺环吡啶酮衍生物类 MDM2 抑制剂进行 3D-QSAR 研究^[25,26], 讨论了其三维静电场、立体场空间结构与抗肿瘤活性之间的关系, 以期得到较好的 QSAR 模型; 分析了结构与活性的关系, 并用分子动力学和分子对接得到的结合模式进行验证. 本研究组在前期研究中已经利用串联反应或[3+2]环加成反应一次构建多个手性中心, 通过催化剂和底物结构

精确的控制产物的构型, 建立了一系列不对称合成新型螺环吡啶酮类化合物的方法^[27,28], 本文的研究结果将为进一步设计、合成新型的螺环吡啶酮衍生物类 MDM2 抑制剂提供理论基础.

2 结果与讨论

2.1 CoMFA 和 CoMSIA 模型

选取结构上具有相同骨架的 21 个螺环吡啶酮衍生物类 MDM2 抑制剂为研究对象^[20~23], 其结构如图 1 所示, 化合物的活性值列于表 1.

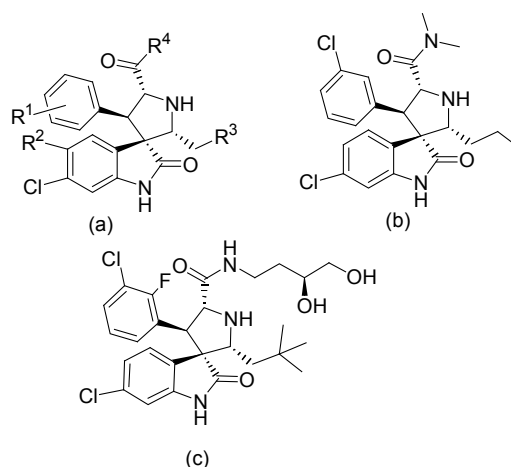


图 1 MDM2 抑制剂的结构

Figure 1 Structures and activities of MDM2 inhibitors
(a) Common structure; (b) Compound 5; (c) Compound 16

在 CoMFA 研究中发现, 网格点步长选取 0.1 nm, 静电场能和立体场能的 energy cutoff 值设为 70.0 kJ·mol⁻¹ 时得到 CoMFA 模型的结果最为理想. 最佳 CoMFA 模型的统计学参数如表 2 所示, 其中交叉验证相关系数 $q^2=0.573$, 最佳主成分数为 6. 一般认为, q^2 大于 0.4 时, 所得模型具有可靠的预测能力^[29~31]. 由最佳主成分数进行非交叉验证建立的 CoMFA 模型的非交叉验证相关系数 $R^2=0.948$, 标准偏差(SEE)为 0.203, 立体场和静电场的贡献值分别为 67% 和 33%, 表明基团的空间效应和电性分布对活性均有一定影响, 立体场的影响高于静电场.

对于 CoMSIA 模型, 选取静电场、立体场、疏水场、氢键受体场和氢键给体场 5 种场的不同组合来考察化合物与受体的相互作用, 发现静电场、立体场、疏水场和氢键受体场的组合所得结果最佳, 当网格点步长为 0.15 nm 时所得结果最为理想. 在 CoMSIA 计算中, 采用高斯函数计算分子的相似性指数, 函数中的 α 为衰减因子, 其取值对计算结果有一定影响, 最佳值一般在 0.2~0.4 之间. 衰减因子在 0.2~0.4 范围内 CoMSIA 模型均得到了理想的统计结果, 当衰减因子为 0.3 时, 得到最佳的 CoMSIA 模型. 其统计学参数见表 2.

表 1 MDM2 抑制剂的结构与活性

Table 1 Structures and activities of MDM2 inhibitors

No.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Observed activity (pK _i)	Predicted activity (pK _i)	
						CoMFA	CoMSIA
1	H	H	<i>i</i> -Pr	N(CH ₃) ₂	5.07	5.06	5.08
2	3-Cl	H	<i>i</i> -Pr	N(CH ₃) ₂	6.52	6.49	6.60
3 ^a	4-Cl	H	<i>i</i> -Pr	N(CH ₃) ₂	5.11	5.18	5.10
4	3-Cl	H	<i>t</i> -Bu	N(CH ₃) ₂	7.07	6.80	7.17
5	3-Cl	H	Et	N(CH ₃) ₂	6.19	6.14	6.13
6 ^a	3-Cl	H	<i>i</i> -Bu	N(CH ₃) ₂	6.41	6.76	6.37
7	3-Cl	H	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ -(4-morpholine)	7.89	7.89	7.84
8	2-F, 3-Cl	H	<i>t</i> -Bu	N(CH ₃) ₂	7.42	7.44	7.27
9	3-Cl, 4-F	H	<i>t</i> -Bu	N(CH ₃) ₂	6.77	6.95	6.71
10 ^a	3-Cl, 5-F	H	<i>t</i> -Bu	N(CH ₃) ₂	7.36	7.48	7.54
11	2-F, 3-Cl	H	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ -(4-morpholine)	8.52	8.30	8.64
12	3-Cl	5-F	<i>t</i> -Bu	NH-((<i>S</i>)-butane-1,2-diol)	7.88	7.91	7.58
13	2-F, 3-Cl	H	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ -(1-piperidine)	7.41	7.91	7.40
14 ^a	2-F, 3-Cl	H	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ -methylpiperazine	8.82	8.51	8.68
15	2-F, 3-Cl	H	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ -methylpiperidine	8.70	8.79	8.84
16	2-F, 3-Cl	H	<i>t</i> -Bu	NH-((<i>S</i>)-butane-1,2-diol)	9.22	8.59	8.75
17	2-F, 3-Cl	H	<i>t</i> -Bu	NH-(1-ethoxy-2-methoxyethane)	9.10	9.01	9.13
18	3-Cl	H	<i>t</i> -Bu	NH-((<i>S</i>)-butane-1,2-diol)	8.40	8.52	8.43
19	3-Cl	5-F	<i>t</i> -Bu	NH-((<i>R</i>)-butane-1,2-diol)	7.90	7.89	7.87
20 ^a	3-Cl	5-F	<i>t</i> -Bu	NH-((<i>R</i>)-propane-1,2-diol)	7.81	7.92	7.93
21	2-F, 3-Cl	5-F	<i>t</i> -Bu	NH-((<i>S</i>)-butane-1,2-diol)	8.02	8.56	8.44

^a Compound in the test set.

表 2 最佳 CoMFA 和 CoMSIA 模型统计参数

Table 2 Statistical parameters of the best CoMFA and CoMSIA models

Model	N	q ²	r ²	F	SEE	Field contribution/%			
						Steric	Electrostatic	Hydrophobic	H-bond acceptor
CoMFA	4	0.573	0.948	74.81	0.203	67.0	33.0		
CoMSIA	3	0.651	0.980	143.72	0.179	26.2	22.1	26.0	25.7

2.2 3D-QSAR 模型的验证

为验证所得到的 CoMFA 及 CoMSIA 模型的稳定性和预测能力, 对训练集中的 16 个化合物进行活性预测, 并将未参加构建模型的测试集的 5 个结构类化合物放入已建立的 3D-QSAR 模型中, 得到测试集化合物及训练集化合物活性的预测值. CoMFA 及 CoMSIA 模型对 21 个化合物抑制活性实验值与预测值均列在表 1 中. 将预测值与实验值进行线性拟合, 如图 3 所示. 其中测试集分子的实验活性值和 CoMFA, CoMSIA 预测值之间的相关系数分别为 0.948 和 0.980. 从图 2 可以看出, 所有训练集化合物的预测活性和实验活性数据线性关系比较理想, 表明由训练集所得的 CoMFA, CoMSIA 模型都具有较好的相关性. 测试集的 6 个分子的预测值和实测值也都集中在直线附近, 实测值与预测值之间的残

差不大, 这也进一步证明此模型具有较好的预测能力, 可以用于预测与骨架结构相似化合物的生物活性.

2.3 三维等值线图分析

图 3 是 CoMFA 立体场(a)和静电场(b)的三维等值线图. 黄色区域表示相应位置减小基团的体积有利于提高活性, 绿色区域表示此处增加基团的体积有利于提高活性; 蓝色区域表示增加化合物的正电性将有利于化合物活性的提高, 红色区域表示增加化合物的负电性有利于化合物活性的提高. 图 3 中加入的化合物为模板分子 16.

由图 3(a)可见, 在化合物 16 的 R³ 的上方位置有一块绿色区域, 下方有 3 块较小的黄色区域, 说明此处若存在的取代基向上方适当增大体积可以提高化合物的活性, 而向其他方向伸展则会降低活性. 例如化合物

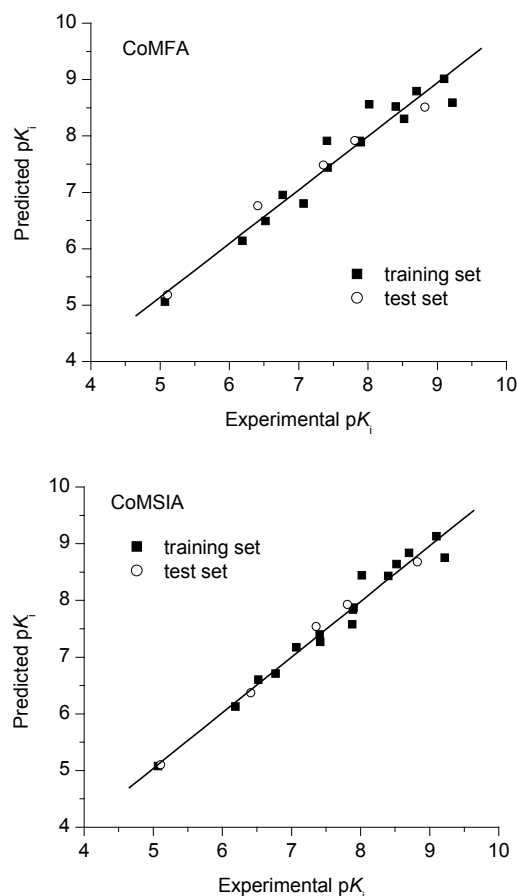


图2 实验测定的 pK_i 值与 CoMFA 和 CoMSIA 预测的 pK_i 值的比较
Figure 2 Plots of experimental and calculated pK_i for CoMFA and CoMSIA analyses

7~21, 当 R^3 位置为叔丁基时, 化合物的活性相对较高, 而当 R^3 位置为其他体积较小基团, 例如乙基或异丙基等取代时, 化合物的活性则有不同程度的下降. 图中的化合物 16 的邻二羟基取代基附近有大块绿色区域, 说明此处取代基可以进一步增大体积; 但 R^4 位置附近有较大的黄色区域, 说明此处不宜有较大的取代基. 例如化合物 7, 10~21, R^4 取代基酰胺键的 N 为单取代, 且 N 取代碳链末端取代基较大; 活性明显高于 N,N 二甲基取代的化合物. 由图 3(b) 可见, 在 R^1 所在苯环处有一大一一小两块蓝色区域, 说明在此处若连接有吸电子基团时, 可以降低环上电子云密度, 将有利于提高活性, 例如化合物 8~11, 13~17, 21 在苯环位置上连有两个吸电子卤素基团, 其活性要比只连接有一个卤素或无取代基的化合物活性高; 从图 3 中还可看出, R^4 取代基所在区域下方有一大块蓝色区域, 结合该位置的取代基有较大的柔性, 故 R^4 取代基带有吸电子基团可以增加化合物的活性. 模型中立体场的贡献(67%)明显大于静电场的贡献(33%), 所以对化合物的修饰改造应首先满足空间位阻的需求, 再均衡考虑静电效应.

图 4 为 CoMSIA 模型的立体场、静电场、疏水场和氢键受体场等值线图. 在图 4(a)中, 绿色区域表示引

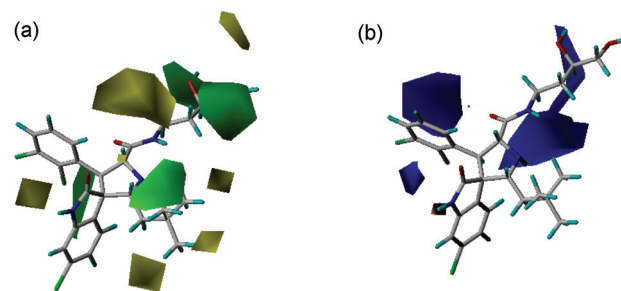


图3 CoMFA 模型三维等值线图

Figure 3 Three dimensional (3D) contour plots of the CoMFA model (a) steric field; (b) electrostatic field

入大体积取代基将有利于化合物活性的提高, 黄色区域表示引入大体积取代基将有可能降低化合物的活性. 图 5(b) 的蓝色区域表示增加化合物的正电性将有利于化合物活性的提高, 红色区域表示增加化合物的负电性有利于化合物活性的提高. CoMSIA 模型的立体场和静电场分布趋势均主要在 R^1 和 R^4 取代基所在位置, 提示 R^1 所在苯环应尽量选择小体积和吸电子的取代基; R^4 取代基则应控制好取代基的伸展方向, 并且供电子或吸电子取代基应处于末端位置. 在疏水场等值线图中, 天蓝色区域表示增加疏水性有利于提高活性, 白色区域表示减少疏水性有利于化合物活性的提高, 如图 4(c) 所示, 在 R^1 , R^2 和 R^3 所在位置均有天蓝色区域, 表明在这些位置提高取代基疏水性有利于增加活性. 在氢键受体场等值线图中, 红色区域表示减小氢键受体场有利于提高活性,

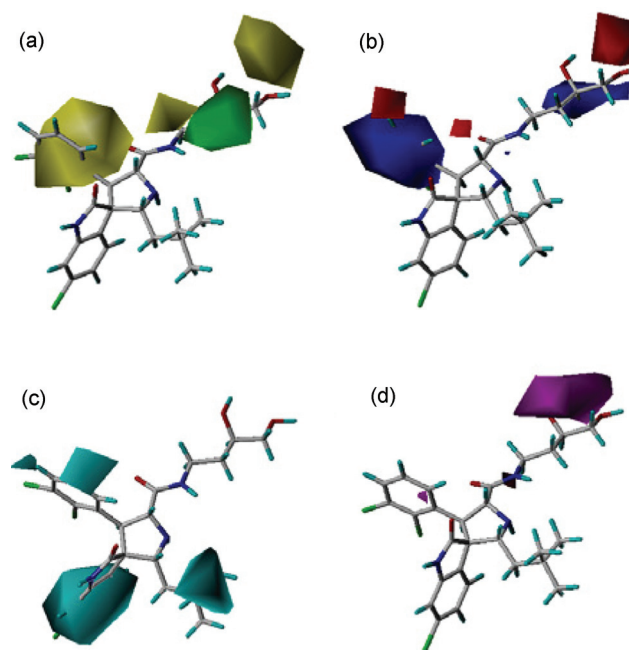


图4 CoMSIA 模型三维等值线图

Figure 4 Three dimensional (3D) contour plots of the CoMSIA model (a) steric field; (b) electrostatic field; (c) hydrophobic field; (d) H-bond acceptor field

紫色区域表示增大氢键受体场有利于化合物活性的提高. 如图 4(d)所示, 在 R^4 取代基所在位置末端覆盖有紫色区域, 说明此处宜引入氢键受体基团. 结合分子对接和分子动力学模拟结果, CoMSIA 模型的结果可与之较好的对应起来, 且 CoMSIA 模型的预测能力比 CoMFA 要强, 因此 CoMSIA 模型可较好指导对化合物修饰改造.

2.4 分子对接和分子动力学模拟结果分析

为更深入地了解 MDM2 蛋白和螺环吡啶酮类抑制剂的作用模式, 对每个体系进行约 5 ns 的常规动力学模拟, 用 RMSD 来衡量体系是否稳定. 分析表明, 各体系常规动力学过程前半阶段中 RMSD 值波动较大. 为弄清引起 RMSD 值波动的原因, 对动力学过程中各氨基酸残基主链 C_α 原子的 B 因子作分析. B 因子可以反映体系在整个模拟过程中相对于平均结构所发生的构象变化, B 因子较大说明对应残基的柔性大. 将 B 因子换算成均方根涨落(RMSF), 如图 5 所示, MDM2 蛋白与化合物 5 和化合物 16 复合物 RMSF 值较大的残基基本一致, 柔性较大的残基大部分均为与小分子相互作用的残基. MDM2 与化合物 16 的复合物中, 残基 91~95 的 RMSF 值明显高于化合物 5 的复合物, 结合分子对接结果分析, 该处 Val93 和 Lys94 残基主要和 R^4 取代基发生相互作用, 化合物 5 的 R^4 取代基为 N,N -二甲氨基, 距离这两个残基太远, 无法发生相互作用; 而化合物 16 的 R^4 取代基为 1,2-二羟基-4-氨基丁基, 末端的双羟基可以和 Lys94 侧链末端的氨基形成氢键. 将两个体系主链 C_α 原子的 RMSD 值随模拟时间变化图(图 6). 图 6 表明, 各体系在 3 ns 后趋于稳定, 可以对稳定后的体系进行分析.

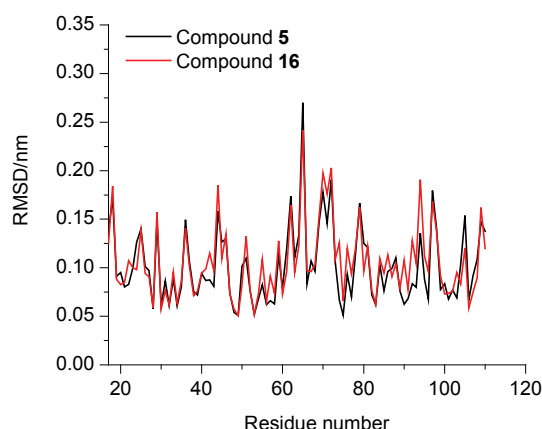


图 5 两个模拟体系主链 C_α 原子的 RMSF 值
Figure 5 Root mean square fluctuation (RMSF) values of backbone C_α atoms of two simulated system

化合物 5 和化合物 16 与 MDM2 蛋白对接得到的构象与其分子动力学模拟平衡后的构象叠合, 结果见图 7(a)和(b), 图中红色分子为分子对接产生的构象, 黑色分子为分子动力学模拟平衡后的构象. 为了更清楚地显

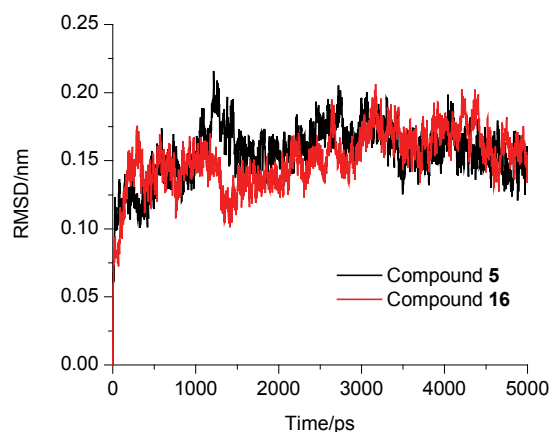


图 6 主链 C_α 原子的 RMSD 随模拟时间变化图
Figure 6 RMSD of the backbone C_α atoms versus simulation time

示小分子化合物和 MDM2 蛋白的相互作用, 图 7(a)中蛋白质以其主链原子的二级结构用飘带显示, 图 7(a)中蛋白质以溶剂可及表面显示. 从图 7(a)和(b)中可以看出, 分子对接产生的化合物构象和分子动力学模拟平衡后的构象非常相似, 小分子化合物的 RMSD 分别为 0.012 和 0.018 nm, 说明分子对接较好的体现了小分子化合物与 MDM2 的相互作用关系, 基于分子对接产生的构象和分子叠合用于 3D-QSAR 研究也是合理的. 从图 7(b)中可以观察到, 化合物 16 的 R^1 , R^2 和 R^3 取代基所在位置正好是 MDM2 蛋白结合位点的 3 个口袋, 其中 R^1 所在的苯环和 R^2 所在的吡啶环均正好伸入到口袋中; R^3 取代基则稍偏结合位点外侧, 叔丁基正好将空间充满且不与左右两侧的氨基酸残基发生碰撞; R^4 取代基则正好伸展在结合位点外侧的凹槽中, 其末端羟基位于 Lys94 侧链附近, 可能通过与 Lys94 末端的氨基形成氢键维持构象的稳定.

图 7(c)为化合物 16 与 MDM2 活性位点主要氨基酸残基的作用模式. 可见化合物 16 的 R^1 取代基所在苯环伸入到活性口袋中并与氨基酸残基 Ile99 的侧链存在疏水作用, 同时 Tyr100 的存在限制了 R^1 所在苯环 4 位取代基团的体积, 如化合物 3 在该位置取代之后几乎完全丢失了活性. 化合物 16 的 R^2 取代基所在苯环伸入到由 Leu54, Leu57, Gly58 和 Ile103 等残基构成的口袋中, 该活性口袋中几乎都是疏水氨基酸残基, 说明该位置以疏水相互作用为主, 这与 CoMSIA 的结果也是一致的. 化合物 16 的 R^3 取代基则伸入到由 Gly58, Ile61, Tyr67, Val75 和 Phe91 等残基构成的口袋中, 该活性口袋也是以疏水相互作用为主, 因此具有最强疏水性的叔丁基取代基的化合物普遍具有较好的活性, 这与 CoMSIA 疏水场的结果也是一致的. 化合物 16 的 R^4 取代基主要与 Val93 和 Lys94 相互作用, Val93 较大体积的侧链导致该取代基酰胺键附近空间位阻较大, 而 Lys94 侧链末端氨基则提示该取代基末端存在氢键受体或带负电基团可提高活性, 该结合口袋位于结合位点外侧, 取代基的柔

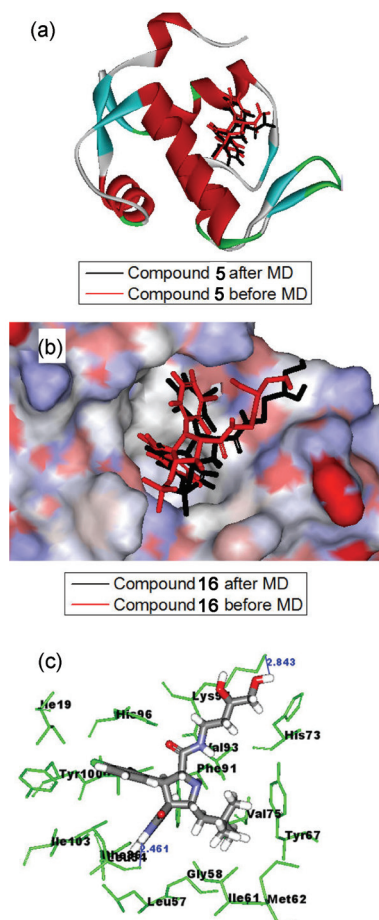


图7 化合物与MDM2活性位点的作用模式

Figure 7 Interaction pattern of MDM2 active site with inhibitors

性可以适当增加,这也与CoMFA和CoMSIA的结果一致。由于作为骨架的四氢吡咯环连接4个取代基所在基团的碳原子均为手性碳,并且作为四氢吡咯环本身并不参与结合,在后期结构改造时可以考虑在保证取代基的合适空间构型的前提下更换为其他骨架,为设计合成全新结构的MDM2抑制剂提供新的思路。

2.5 新结构MDM2抑制剂的设计与初步活性验证

根据前面已建立的3D-QSAR模型及有关分析结果,我们现以表1中生物活性较高的化合物为起始化合物,结合相互作用模式和课题组的研究基础,尝试对其分子结构进行修饰,新设计的化合物结构如表3所示,用建立的3D-QSAR模型进行活性预测,得到的CoMFA,CoMSIA预测值见表3。新结构螺环吡啶化合物的合成方法见参考文献[28],以MDM2高表达的前列腺癌LNCaP细胞株为筛选模型进行初步生物活性测试,该系列化合物的初步活性基本验证了我们的设想,进一步的深入研究正在进行中。

3 结论

综合采用CoMFA,CoMSIA方法建立了3D-QSAR

表3 新设计化合物的体外和预测活性

Table 3 Predicted and *in vitro* activities of new designed compounds

No.	R ¹	R ²	R ³	CoMFA predicted ^a	CoMSIA predicted ^a	LNCaP Cytotoxicity ^b
N1	H	H	H	6.51	6.07	>20
N2	F	2-Me	4-F	6.66	6.25	18.5
N3	F	2-OMe	4-Morpholine	6.95	6.68	7.9
N4	H	2-Br	4-N(CH ₃) ₂	7.12	6.98	3.6
N5	F	2-OMe	4-Morpholine	7.66	7.34	0.35
N6	F	2-OMe	4-N(CH ₃) ₂	7.49	7.21	0.89

^apIC₅₀; ^bIC₅₀ (μg·mL⁻¹).

模型,交叉验证的相关系数分别为0.57和0.65,表明该模型具有良好的预测能力,并用分子对接和分子动力学方法对结合模式进行了验证。其三维等值线图直观地解释了化合物的构效关系,从立体场、静电场、疏水场和氢键受体场方面全面地揭示了影响化合物活性的分子结构特征。对于设计新结构的MDM2抑制剂来说,在保证化合物合适的空间结构取向的基础上,在R¹,R²和R³取代基所在的位置引入体积合适的基团并保证较强的疏水相互作用,R³取代基位置酰胺键上的N应单取代,末端适合引入体积较大基团,并宜引入氢键受体基团。这些结论为进一步结构优化、设计和合成新型的MDM2抑制剂提供了重要依据。

4 实验部分

4.1 化合物的选择

选取结构上具有相同骨架的21个螺环吡啶酮衍生物类MDM2抑制剂为研究对象,其结构如图1所示,它们均是同一个研究小组合成并测定活性的,这些化合物对MDM2的抑制活性数据测定条件、方法相同,数据具有可比性。它们的生物活性指标用半数结合常数K_i的负对数,即pK_i进行量度,化合物的活性值列于表1。在具体计算时,随机选取5个化合物(表中带*号的化合物)作为测试集来评价模型的预测能力,其余16个化合物作为训练集产生3D-QSAR模型。本研究所有工作都是在Sybyl-X 2.0软件上完成的,计算中如未经特别指明,各参数均为Sybyl默认值^[32]。

4.2 分子对接

用于分子对接的MDM2晶体结构从蛋白质结构数据库获得(PDB ID: 3LBL)^[33]。对接前用Discovery Studio

3.5 软件除去晶体结构中受体结合的原配体分子和水分子^[34], 并对受体蛋白进行加氢加电荷. 利用 CDOCKER 模块对上述 21 个 MDM2 抑制剂和受体蛋白进行分子对接, 获得小分子与受体蛋白的结合构象和对接作用模式图.

4.3 活性构象确定及分子叠合

在 CoMFA 和 CoMSIA 计算中的关键步骤之一是确定所研究分子的活性构象, 并对这些活性构象进行合理的叠合, 叠合结果的好坏将直接影响最终模型的好坏, 是 CoMFA 和 CoMSIA 计算能否成功的前提条件^[35]. 本文利用分子对接方法选取分子的结合构象作为其活性构象, 采用基于分子对接的叠合方式, 以化合物中活性最高的分子 **16** 为模板, 模板分子结构如图 1c 所示, 将分子对接得到的受体-配体复合物, 用 Align and Superimpose Proteins 模块将其余复合物与模板分子复合物的蛋白质骨架叠合, 去除蛋白后小分子叠合效果如图 8 所示, 表明这些化合物分子能很好地叠合.

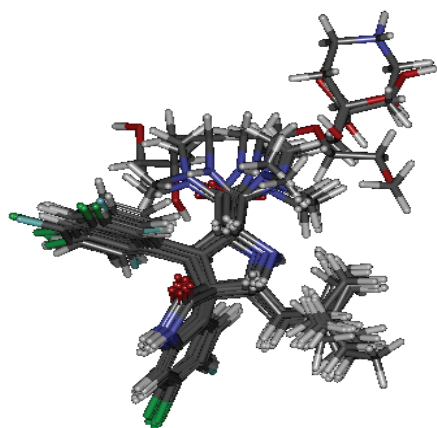


图 8 基于对接的分子叠合图

Figure 8 Image of all molecules superimposed based on molecular docking

4.4 CoMFA 模型的建立

CoMFA 分析在 Sybyl-X 2.0 软件包的 QSAR 模块中进行. 分析力场包括静电场和立体场, 本实验考察步长 (0.05~0.2 nm) 以及静电场能和立体场能的 cutoff 值 (4.187~502.4 kJ·mol⁻¹) 对 CoMFA 结果的影响. 以 sp³ 杂化的 C⁺ 为探针原子, 采用偏最小二乘法 (PLS) 对分子周围分布的势场值和生物活性进行回归分析^[36-38]. 实验中先用留一法 (LOO)^[39] 进行交叉验证分析, 来确定模型的交叉验证相关系数 (q^2) 和最佳主成分数 N . 然后再根据得到的最佳主成分数进行非交叉验证来建立最终的比较分子场模型, 柱过滤值 (column filtering) 设为 8.374 kJ·mol⁻¹.

4.5 CoMSIA 模型的建立

CoMSIA 模型的建立方法与 CoMFA 类似, 在建模的过程中, 选取静电场、立体场、疏水场、氢键受体场

和给体场考察化合物与受体的相互作用, 通过考察不同场的组合寻找具有最好交叉验证系数的分子场. 利用所得最佳场组合, 进一步研究网格步长 (0.05~0.2 nm) 和衰减因子 (0.2~0.4) 对 CoMSIA 结果的影响. 采用 LOO 法进行交叉验证, 得到对应的交叉验证相关系数 (q^2) 和最佳主成分数 N , 随后通过非交叉验证进行回归计算, 从而建立相应的 CoMSIA 模型.

4.6 分子动力学模拟

本文选取了活性最高的化合物 **16** (图 1c) 和结构较具代表性的化合物 **5** (图 1b) 来探讨不同的取代基对结合模式的影响. 本文中的分子动力学模拟采用 GROMACS 4.5 程序包^[40]. MDM2 和小分子配体力场均采用 GROMOS96 力场. 小分子的部分电荷和拓扑文件采用 PRODRG 2.5 程序产生^[41,42]. 本文采用一个边长为 65.34 Å 的立方体盒子进行模拟, 蛋白与盒子边界的最小距离不小于 10 Å, 加入 4 个氯离子作为抗衡离子保证整个体系的电中性. 采用 SHAKE 算法^[43] 用来限制所有含氢键的伸缩振动, 模拟步长设为 2 fs. 模拟使用了周期性边界条件, 非键相互作用截断值取为 0.8 nm, 使用 PME 方法用于计算长程静电作用^[44]. 整个体系先用 5000 步最陡下降法, 紧接着 5000 步共轭梯度法消除分子间的高能碰撞, 而后约束溶质对体系升温到 300 K, 体系密度在 1 g·cm⁻³ 平衡 500 ps. 取消溶质的约束, 每个体系运行 5 ns 的恒温 (310 K) 恒压 (1.013×10⁵ Pa) 动力学模拟. 对最后 2 ns 进行采样, 每 20 ps 取一次构象进行计算^[45].

4.7 体外活性测试

MTT 法 (四甲基偶氮唑蓝法) 测定化合物对 LNCaP 细胞的抑制活性: 取处于对数生长期的 LNCaP 细胞, 用完全培养液调整细胞浓度为 3.5×10⁴ cells·mL⁻¹, 接种于 96 孔板上, 每孔 100 μL, 在 37 °C, 5% CO₂ 下, 孵育 24 h. 设置药物的浓度梯度为 20 μg·mL⁻¹, 对半稀释, 以空白培养基做对照. 每孔 100 μL, 在 37 °C, 5% CO₂ 下, 孵育 48 h. 每孔加入 5 mg·mL⁻¹ MTT 20 μL, 孵育 4 h, 除去培养基, 加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪 (λ=570 nm) 测吸光度, 取其平均值. 该浓度下相对细胞增殖抑制率 (%) = (对照组 A₅₇₀ - 实验组 A₅₇₀) / 对照组 A₅₇₀ × 100%, 所得不同浓度下的抑制率用于计算 IC₅₀.

References

- [1] Kubbutat, M. H.; Jones, S. N.; Vousden, K. H. *Nature* **1997**, *387*, 299.
- [2] Ashcroft, M.; Taya, Y.; Vousden, K. H. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 3024.
- [3] Lai, Z. H.; Yang, T.; Kim, Y. B.; Sielecki, T. M.; Diamond, M. A.; Strack, P.; Rolfe, M.; Caligiuri, M.; Benfield, P. A.; Auger, K. R.; Copeland R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 14734.
- [4] Yang, Y.; Ludwig, R. L.; Jensen, J. P.; Pierre, S. A.; Medaglia, M. V.; Davydov, I. V.; Safiran, Y. J.; Oberoi, P.; Kenten, J. H.; Phillips, A. C.; Weissman, A. M.; Vousden, K. H. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 547.

- [5] Vassilev, L. T.; Vu, B. T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; Fotouhi, N.; Liu, E. A. *Science* **2004**, *303*, 844.
- [6] Chène, P.; Fuchs, J.; Bohn, J.; García-Echeverría, C.; Furet, P.; Fabbro, D. *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 245.
- [7] Parks, D. J.; Lafrance, L. V.; Calvo, R. R.; Milkiewicz, K. L.; Gupta, V.; Lattanze, J.; Ramachandren, K.; Carver, T. E.; Petrella, E. C.; Cummings, M. D.; Maguire, D.; Grasberger, B. L.; Lu, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 765.
- [8] Hu, C. Q.; Hu, Y. Z. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1720.
- [9] Stoll, R.; Renner, C.; Hansen, S.; Palme, S.; Klein, C.; Belling, A.; Zeslawski, W.; Kamionka, M.; Rehm, T.; Mühlhahn, P.; Schumacher, R.; Hesse, F.; Kaluza, B.; Voelter, W.; Engh, R. A.; Holak, T. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 336.
- [10] Wang, W. S.; Hu, Y. Z. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 1159.
- [11] Zhuang, C. L.; Miao, Z. Y.; Sheng, C. Q.; Yao, J. Z.; Zhang, W. N. *Chin. J. Med. Chem.* **2010**, *20*, 403. (庄春林, 缪震元, 盛春泉, 姚建忠, 张万年, 中国药物化学杂志, **2010**, *20*, 403.)
- [12] Macchiarulo, A.; Giacche, N.; Carotti, A.; Baroni, M.; Cruciani, G.; Pellicciari, R. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 1999.
- [13] Chen, J. Z.; Wang, J. N.; Xu, B. S.; Zhu, W. L.; Li, G. H. *J. Mol. Graphics Modell.* **2011**, *30*, 46.
- [14] Fu, T.; Min, H.; Xu, Y.; Chen, J.; Li, G. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 9709.
- [15] Barakat, K.; Mane, J.; Friesen, D.; Tuszyński, J. *J. Mol. Graphics Modell.* **2010**, *28*, 555.
- [16] Cheng, W. Y.; Chen, J. Z.; Liang, Z. Q.; Li, G. H.; Yi, C. H.; Wang, W.; Wang, K. Y. *Comput. Theoret. Chem.* **2012**, *984*, 43.
- [17] Lu, S. Y.; Jiang, Y. J.; Zou, J. W.; Wu, T. X. *J. Mol. Graphics Modell.* **2011**, *30*, 167.
- [18] Wang, F. F.; Li, Y.; Ma, Z.; Wang, X.; Wang, Y. H. *J. Mol. Model.* **2012**, *18*, 295.
- [19] Ding, K.; Lu, Y.; Nikolovska-Coleska, Z.; Qiu, S.; Ding, Y.; Gao, W.; Stuckey, J.; Krajewski, K.; Roller, P. P.; Tomita, Y.; Parrish, D. A.; Deschamps, J. R.; Wang, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10130.
- [20] Ding, K.; Lu, Y.; Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, G.; Qiu, S.; Shangary, S.; Gao, W.; Qin, D.; Stuckey, J.; Krajewski, K.; Roller, P. P.; Wang, S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3432.
- [21] Yu, S.; Qin, D.; Shangary, S.; Chen, J.; Wang, G.; Ding, K.; McEachern, D.; Qiu, S.; Nikolovska-Coleska, Z.; Miller, R.; Kang, S.; Yang, D.; Wang, S. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7970.
- [22] Shangary, S.; Wang, S. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 5318.
- [23] Canner, J. A.; Sobo, M.; Ball, S.; Hutzen, B.; DeAngelis, S.; Willis, W.; Studebaker, A. W.; Ding, K.; Wang, S.; Yang, D.; Lin, J. *Brit. J. Cancer* **2009**, *101*, 774.
- [24] Popowicz, G. M.; Domling, A.; Holak, T. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2680.
- [25] Kubinyi, H. *Drug Discovery Today* **1997**, *11*, 457.
- [26] Kubinyi, H. *Drug Discovery Today* **1997**, *12*, 538.
- [27] Xie, X.; Peng, C.; He, G.; Leng, H. J.; Wang, B.; Huang, W.; Han, B. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10487.
- [28] Wu, G. S.; Ouyang, L.; Liu, J.; Zeng, S.; Huang, W.; Han, B.; Wu, F. B.; He, G.; Xiang, M. L. *Mol. Divers.* **2013**, *17*, 271.
- [29] Clark, M.; Cramer, R. D.; Jones, D. M.; Patterson, D. E.; Simeroth, P. E. *Tetrahedron Comput. Method* **1990**, *3*, 47.
- [30] He, G.; Qiu, M. H.; Li, R.; Ouyang, L.; Wu, F. B.; Song, X. R.; Cheng, L.; Xiang, M. L.; Yu, L. T. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79*, 960.
- [31] Ouyang, L.; He, G.; Huang, W.; Song, X. R.; Wu, F. B.; Xiang, M. L. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 5348.
- [32] SYBYL *Molecular Modeling Software*, Tripos Inc., St. Louis, MO, USA, **2002**.
- [33] <http://www.rcsb.org>.
- [34] *Discovery Studio*, version 3.5, Accelrys Inc.: San Diego, CA, USA, **2012**.
- [35] Zhu, R. X.; Wang, F.; Liu, Q.; Kang, T. G. *Acta Chim. Sinica* **2011**, *69*, 1731. (朱瑞新, 王飞, 刘琦, 康廷国, 化学学报, **2011**, *69*, 1731.)
- [36] McIntosh, A. R.; Bookstein, F. L.; Haxby, J. V.; Grady, C. L. *Neuroimage* **1996**, *3*, 143.
- [37] Cramer, R. D. *Perspect. Drug Discovery Des.* **1993**, *1*, 269.
- [38] Qiao, K.; Zeng, L. X.; Jin, H. W.; Liu, Z. M.; Zhang, L. R. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2012**, *28*, 1509. (乔康, 曾凌晓, 金宏威, 刘振明, 张亮仁, 物理化学学报, **2012**, *28*, 1509.)
- [39] Tropsha, A.; Golbraikh, A. *J. Mol. Graphics Modell.* **2002**, *20*, 269.
- [40] van der Spoel, D.; van Buuren, A. R.; Tieleman, D. P.; Berendsen, H. J. C. *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 229.
- [41] van Aalten, D. M. F.; Bywater, R.; Findlay, J. B. C.; Hendlich, M.; Hooft, R. W. W.; Vriend, G. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, *10*, 255.
- [42] Niu, C.; Xu, Y.; Xu, Y.; Luo, X. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23730.
- [43] Zhan, D.-L.; Wang, S.; Han, W.-W.; Liu, J.-S. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 217. (詹冬玲, 王嵩, 韩巍巍, 刘景圣, 化学学报, **2012**, *70*, 217.)
- [44] Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327.
- [45] Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577.

(Qin, X.)