

COX 抑制剂——氟比洛芬衍生物的作用方式及选择性研究

郭长彬 易翔 徐志斌 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 用 DOCK4.0 程序搜索氟比洛芬衍生物与环氧合酶结合的构象,用 Cscore 综合评分体系确定最佳构象,复合物经分子力学优化后,发现衍生物在 COX-1 中的取向和位置与 X 射线衍射测得的晶体复合物中氟比洛芬作用方式相同;衍生物在 COX-2 中也有与氟比洛芬类似的结合方式. 衍生物对 COX-2/COX-1 的选择抑制性与衍生物作用于两种酶的结合自由能之差有较好的相关性,相关系数 $R^2 = 0.71$, 标准偏差 $S = 0.47$, $F_{(1,14)} = 34.74$.

关键词 环氧合酶(cyclooxygenase, COX), 氟比洛芬, 分子对接(Dock), Cscore 评分

Study on Molecular Mechanism and COX-2 Selectivity of Flurbiprofen Derivatives

GUO, Chang-Bin YI, Xiang XU, Zhi-Bin GUO, Zong-Ru^{*}

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

Abstract One of approaches to reducing NSAIDs (nonsteroidal antiinflammatory drugs)-associated gastrointestinal adverse is to convert NSAIDs into selective COX-2 inhibitors by structural modifications. However recent observations indicate that the expression of COX-2 appears to be required for ovulation and fertilization. This implicates that the optimal compromise between the beneficial and the deleterious effects of selective COX-2 inhibitors should be made for the treatment of inflammation. In the present paper the molecular mechanism of a series of Flurbiprofen derivatives targeting towards COX-1 and COX-2 was explored by application of DOCK4.0 program and minimization method. The significant correlation between compound selectivity (COX-2 vs COX-1) and the difference of docking energy [$E_{(\text{COX-2})} - E_{(\text{COX-1})}$] provides some insights into that the substituents in the distal phenyl ring have no positive effect on the binding to both COX-1 and COX-2 compared with Flurbiprofen. However, the COX-2 selectivity has been effectively improved. Expansion of the approach may be envisioned for the modification of other COX inhibitors containing phenyl ring binding at this pocket.

Key words cyclooxygenase (COX), flurbiprofen, dock, Cscore

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是炎症治疗的重要靶点. 1991 年,环氧合酶被确证存在两种亚型,即结构型环氧合酶-1(COX-1)和诱导型环氧合酶-2(COX-2)^[1]. 由 COX-1 催化合成的前列腺素有保护胃肠道黏膜免受外界刺激,维持正常的肾功能和凝血等作用,而 COX-2 催化合成的前列腺素则有致炎症效应. 目前上市的塞来昔布、罗非昔布及美洛昔康等选择性地抑制 COX-2,有效抑制炎症的同时可以避免胃肠道副作用,已广泛用于治疗骨关节炎和风湿性关节炎等疾

病. 然而近来亦有文献报道,单纯的抑制 COX-2 而不抑制 COX-1,血栓素(thromboxane A₂, TXA₂)增加而使患者心肌梗塞的发病率增高^[2]. 而且药理实验发现小鼠的排卵、受精及蜕膜化等生理过程与 COX-2 的高表达密切相关^[3]. 因此在进一步研制 COX 酶抑制剂的过程中,既要保持一定的 COX-2 选择性,以确保高抗炎活性和避免胃肠道副作用,同时也要避免过分抑制 COX-2 而引起的心血管系统和生殖功能的不良作用.

* E-mail: zrguo @imm. ac. cn; Tel: 010-63165249; Fax: 010-83155752.

Received December 10, 2002; revised April 18, 2003; accepted June 8, 2003.

国家自然科学基金(No. 20072057)资助项目.

发现选择性 COX-2 抑制剂的途径主要有两个,其一是新结构类型先导物的发现和优化,目前有三环类、烷基磺酰苯胺类和双叔丁基苯酚类等三大类结构成为研究热点,其中三环类已经有 5 个药物上市(塞来昔布、罗非昔布、Valdecoxib, Parecoxib sodium, Etoricoxib),三类结构中有许多化合物处在不同的临床研究阶段^[4];其二是对传统 COX 非选择性的非甾体类抗炎药(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)进行结构改造,吲哚美辛^[5,6]、氟比洛芬^[7]、阿司匹林^[8]和双氯芬酸^[9]等药物通过结构改造提高了对 COX-2 的选择性。

氟比洛芬(flurbiprofen)对于 COX-1 和 COX-2 均有抑制作用,但对 COX-2 没有选择性。Bayly 等对氟比洛芬进行结构改造,得到一系列的衍生物,对 COX-2 的选择性抑制作用有所提高^[7],本文用计算机模拟方法试图从分子水平探索氟比洛芬衍生物与 COX 酶的结合作用,通过研究化合物在 COX-1 和 COX-2 两种酶中的结合方式和作用强度,阐述该类抑制剂在酶的活性口袋中的结合特征以及其结构和选择性的规律,用于指导其他 COX 抑制剂的设计与合成。

1 研究背景

COX-1 和 COX-2 的晶体结构分别于 1994 年^[10]和 1996 年^[11]得到解析,极大地推动了 COX-2 选择性抑制剂的发展。Gerse 等通过定位突变法找到三环类化合物对 COX-2 产生选择性抑制作用的关键氨基酸残基——COX-2 中的 Val523 (COX-1 中对应的是 Ile509)^[12],关于 COX-2 选择性抑制剂三维定量构效关系(3D-QSAR)研究^[13,14]和抑制剂与酶的结合作用模式研究^[15,16]有大量的文献报道。

环氧合酶的两亚型具有 60% 的同源性,其结合腔附近的氨基酸保守性更高。氟比洛芬作为一种非甾体抗炎药与 COX-1 和 COX-2 复合物的晶体结构均已解析^[17,18],图 1 为二者氨基酸主链的叠合图,由图可见氟比洛芬在 COX-1 和 COX-2 中占据相同的疏水腔,且羧基均与 Arg120 的末端胍基形成氢键。氟比洛芬衍生物(见表 1)与 COX 的结合方式没有 X 射线衍射的晶体数据可考证,但计算化学和分子模拟方法的发展使我们可以理论上模拟其复合物的结构。DOCK4.0 程序广泛用于大型数据库虚拟筛选以寻找先导化合物,其结合位点匹配方法和自然增长理论也可用来模拟配体和受体的理论结合方式;但该程序的评分体系采用 Amber 力场,仅考虑配体和受体的范德华和静电作用,过于简化。本文中采用 Tripos 公司的 Cscore 模块对于 DOCK4.0 的结果进一步优化,综合考虑分子内和分子间的范德华力、静电、氢键以及 Helmholtz 自由能,以期得到更为客观的结果。

2 研究方法

本文研究的氟比洛芬衍生物及其活性数据(对酶 50% 活性抑制的浓度, IC₅₀)均来自文献^[7], Flurbiprofen/ COX-1

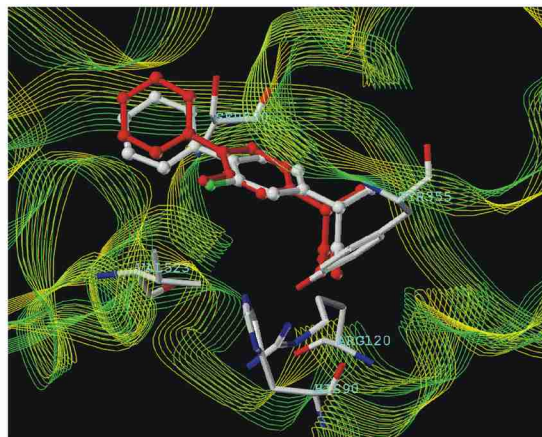


图 1 氟比洛芬与 COX-1 (白色) 和 COX-2 (红色) 的结合模式比较, COX-1 氨基酸主链用黄色表示, COX-2 氨基酸主链用绿色表示

Figure 1 Comparison of the binding mode of Flurbiprofen in the active pocket of COX-1 (white) and COX-2 (red). The COX-1 and COX-2 enzyme fold are indicated by a yellow and green line-ribbon display respectively encoding secondary structure elements

(PDB code 1egh) 和 Flurbiprofen/ COX-2 (PDB code 3pgh) 复合物晶体结构取自 PDB 库。所有工作均在 SGI O2 工作站用 Tripos 公司 SYBYL 6.8 软件包、Kuntz 实验室提供的 DOCK4.0 程序及 Midasplus 软件完成,除特殊指明外,所有参数均取缺省值。

2.1 氟比洛芬衍生物的分子对接

SYBYL 软件构建 16 个化合物的结构(见表 1),存为能被 DOCK4.0 程序识别的 mol2 格式数据库。从 COX-1 和 COX-2 的复合物晶体结构中删除氟比洛芬和结晶水,用 Midasplus 软件中的 dms 程序生成大分子的溶剂可及化表面,DOCK4.0 程序的 SPHGEN 方法对结合腔的空间填球,COX-1 和 COX-2 分别选取氟比洛芬周围的 176 和 191 个球,用于数据库的匹配和对接。化合物的构象用锚点搜寻(anchor search)的方法产生,锚点由 10 个原子组成,每循环产生 25 个构象,最多产生 500 种取向(maximum orientation),以能量评分记录每个化合物 20 个最佳结合构象。

2.2 Cscore 软件确定对接的最佳构象

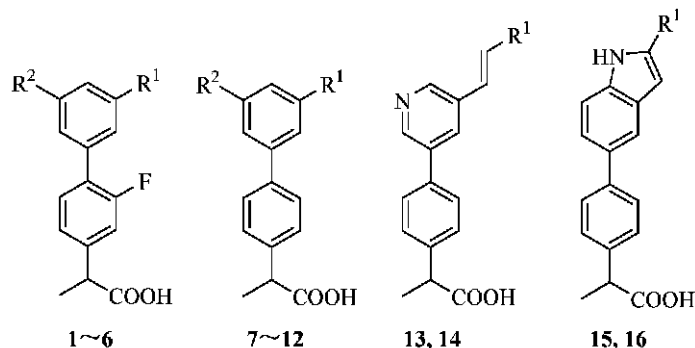
DOCK4.0 的能量评分建立在化合物与受体的范德华及静电作用基础上,对于氢键能和化合物本身的能量不予考虑,为避免因这种评分的过于简单而会丢失化合物的某些合理构象,将对接得到的化合物的多个构象用 SYBYL 软件的 Cscore 模块作进一步评分。Cscore 采用综合评分体系,包括 G. score, F. score, D. score, PMF. score 和 Chem. score 五种评价标准^[19,20],其评分函数除考虑复合物的范德华及静电作用外,还包括氢键作用、亲水作用、化合物的内能以及 Helmholtz 自由能和已有的大分子晶体结构所得的经验数据。得分较好的化合物构象用于分子力学优化。

2.3 分子力学优化

配体与受体的结合是相互诱导契合的过程,因此在寻找

表1 氟比洛芬衍生物的结构,COX-1 和 COX-2 活性及相互作用能

Table 1 Structures, COX-1 and COX-2 activity data and docking energy of Flurbiprofen derivatives



No.	R ¹	R ²	-lg IC ₅₀ (COX-1)	-lg IC ₅₀ (COX-2)	E/ (kJ · mol ⁻¹) (COX-1)	E/ (kJ · mol ⁻¹) (COX-2)	Selectivity ^a	E ^b / (kJ · mol ⁻¹)
1	H	H	7.96	8.00	- 173.08	- 197.87	0.04	- 24.79
2	OEt	H	7.85	7.85	- 203.69	- 190.04	0	13.65
3	<i>i</i> -Pr	H	4.82	4.00	- 203.69	- 111.70	- 0.82	91.99
4	OEt	OEt	5.11	7.00	- 175.97	- 291.07	1.89	- 115.10
5	OMe	OMe	7.20	7.15	- 257.15	- 207.96	- 0.05	49.19
6	Me	Me	4.82	4.72	- 158.93	- 154.07	- 0.1	4.86
7	H	H	8.00	7.68	- 231.24	- 179.78	- 0.32	51.46
8	OEt	OEt	4.60	6.49	- 190.67	- 252.88	1.89	- 62.21
9	SEt	H	5.51	6.48	- 111.75	- 165.34	0.97	- 53.59
10	Vinyl	H	5.89	6.14	- 176.52	- 192.30	0.25	- 15.78
11	Et	H	5.24	5.62	- 136.53	- 146.96	0.38	- 10.43
12	<i>Trans</i> -propenyl	H	5.85	6.82	- 131.47	- 184.85	0.97	- 53.38
13	H		6.72	6.72	- 166.17	- 192.01	0	- 25.84
14	Me		4.81	6.17	- 138.62	- 239.44	1.36	- 100.82
15	H		7.00	6.72	- 214.82	- 202.52	- 0.28	12.30
16	Me		4.98	6.64	- 177.10	- 198.71	1.66	- 21.61

^a Selectivity is expressed by $-\lg [IC_{50}(\text{COX-2})/IC_{50}(\text{COX-1})]$; ^b $E = E_{(\text{COX-2})} - E_{(\text{COX-1})}$.

化合物的活性构象时应同时考虑受体的柔性,为此分别对 COX-1 和 COX-2 的受体配体复合物进一步作分子力学优化.选取配基周围 0.6 nm 氨基酸和配体同时优化,采用 MMFF94 力场,载 MMFF94 电荷,最陡下降法 1000 步,共轭梯度法 1000 步.能量收敛值设为 2.1 kJ/mol.从最终得到的复合物中剥离配体,计算配体和 COX-1 及 COX-2 的相互作用能.

2.4 相互作用能与活性的相关性分析

氟比洛芬衍生物的活性值 IC₅₀来自文献报道的 COX-1 和 COX-2 纯酶的竞争性结合常数^[7],在理论上对数形式的 IC₅₀应与复合物的结合自由能呈线性相关.较为经典的结合自由能的计算方法是自由能微扰和热力学积分法,但计算量大,且只能计算差别较小的两态之间的相对结合自由能,因此在药物设计中受到限制^[21].本文的结合自由能采用较为简化的真空中配基与受体的相互自由能表征,即由 SYBYL 软件的 DOCK 模块计算得到 E .分别计算 COX-1 和 COX-2 的 E 与活性的相关性,以及 COX-2/COX-1 选择性与结合自由能之比的相关性.

3 结果与讨论

3.1 分子对接及评分结果

DOCK4.0 对接结果发现,化合物在 COX-1 和 COX-2 的结合腔内均有多种取向和构象存在.我们对与 COX-2 结合的化合物的 DOCK4.0 评分和 Cscore 评分进行比较,16 个化合物中有 12 个的评分结果一致,即两种评分软件筛选的优势构象相同,但化合物 5, 9, 11, 15 则有不同结果.例如化合物 9 在 COX-2 中的结合构象有五种,如以 DOCK4.0 的能量评分标准筛选,则构象 a 为最终的优势构象,但 Cscore 的综合评分体系认为 c 更有利于同 COX-2 结合(图 2).

3.2 化合物与酶的相互作用分析

上文已说明了氟比洛芬与 COX-1 和 COX-2 的结合模式,其衍生物的结合与氟比洛芬在结合腔中的取向具有类似性.该系列衍生物与 COX-2 结合时未进入 COX-2 特有的位于 His90 附近的空腔,再者,氟比洛芬与 COX-2 的复合物结

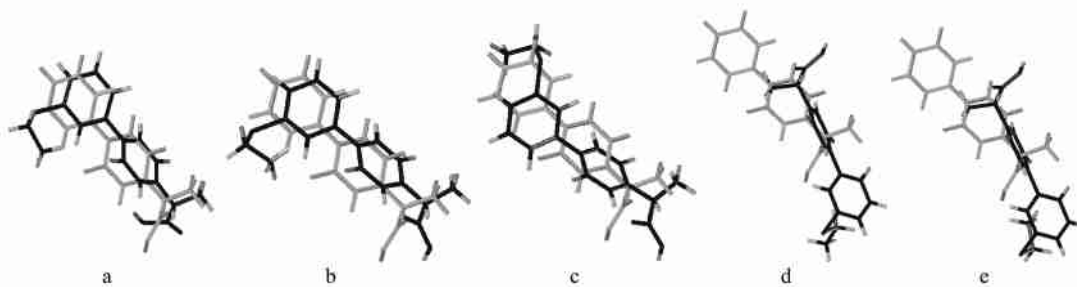


图2 DOCK对接的活性构象,其中浅色化合物为氟比洛芬,深色化合物为No. 9,以氟比洛芬为模板,化合物9在结合腔中有五种取向,以DOCK4.0评分a为最终的优势构象,以Cscore评分确定c为最佳结合构象

Figure 2 Comparison of five active conformations of compound 9 (dark) calculated by DOCK4.0 and flurbiprofen (light) in the binding pocket of COX-2. Conformation a is preferred by DOCK4.0, while Conformation c is the best according to Cscore system

构显示,其末端苯环附近空间有限,无法容纳苯环上较大的取代基,因此推测该类衍生物与COX-2的结合常数不会明显增加.这一结论与药理实验的结果相符,表1中的活性数据表明,衍生物的COX-2活性均低于氟比洛芬(compound 1).COX-1和COX-2结合腔的氨基酸有相似性,化合物末端苯环所在的空腔也无法容纳较大的基团,因此化合物与COX-1的结合活性也没有明显提高.分子模拟的结果显示,化合物末端苯环与Gly526,Ala527和Tyr385有范德华相互作用,羧基均与Arg120的末端氨基成氢键.化合物2,4,5,8,9苯环取代基的杂原子还能与COX-1和COX-2的Ser530形成氢键(图3).

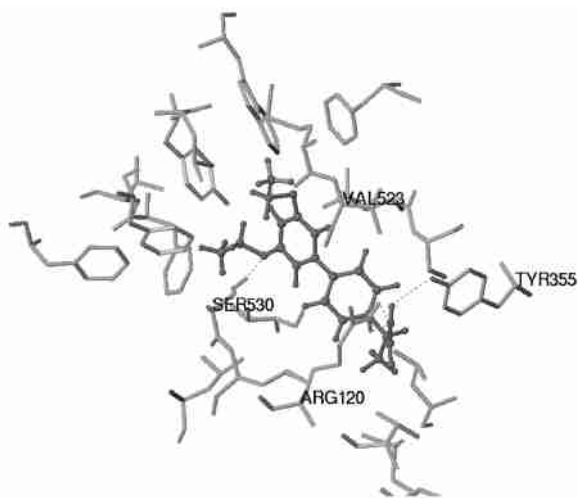


图3 分子模拟的化合物8与COX-2的复合物结构,羧基与Tyr355和Arg120成盐桥,末端苯环取代基的氧原子与Ser530成氢键

Figure 3 Complex structure of compound 8 and COX-2 from molecular simulation. The carboxyl interacts with Tyr355 and Arg120 in the term of salt bridge. One of the oxygen atoms connected with distal phenyl ring forms hydrogen bond with Ser530

3.3 相互作用能与活性的相关性分析

将化合物对COX-1和COX-2的活性 IC_{50} 值取负对数,分

别与对接并优化后的相互作用能 E 作相关分析,结果如下:

$$\begin{aligned} \text{COX-1: } -\lg IC_{50} &= 3.145 - 0.0676 E \\ n &= 16; R^2 = 0.25; S = 1.11; F_{(1,14)} = 4.72 \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \text{COX-2: } -\lg IC_{50} &= 4.034 - 0.0534 E \\ n &= 16; R^2 = 0.26; S = 0.94; F_{(1,14)} = 4.96 \end{aligned} \quad (2)$$

线性回归分析结果表明COX-1和COX-2的活性和相互作用能的相关性差, R^2 均较小,推测其原因是能量计算时仅考虑真空中配体与酶的结合自由能 E ,忽略了分子的溶剂化效应和熵变,亦即将不同化合物的溶剂化和熵变视作常数,而真实条件下各个化合物之间是不同的,因此方程不能精确模拟化合物与受体的相互作用,导致相关性较低.

化合物对COX-2和COX-1抑制活性的比值是选择性的量度,与其结合自由能之差作相关性分析,得到如下方程:

$$\begin{aligned} -\lg [IC_{50}(\text{COX-2})/IC_{50}(\text{COX-1})] &= (1.278 \pm 0.123) - \\ &(0.055 \pm 0.009) [E_{(\text{COX-2})} - E_{(\text{COX-1})}] \\ n &= 16; R^2 = 0.71; S = 0.47; F_{(1,14)} = 34.74 \end{aligned} \quad (3)$$

方程(3)表明选择性与相互作用能差值的相关性显著提高,相关系数 R^2 为0.71.二者的相关性分析见图4.COX-2/COX-1选择性与结合自由能之差呈现线性相关规律,可以认为同一化合物分别作用于COX-1和COX-2时,它的熵效应和溶剂化能具有相似性,在计算COX-1与COX-2结合自由能之差时作为常数项被消除,因此化合物的选择性主要取决于相互作用能的强弱,即 E 的比较.

观察表1中化合物选择性与 E 的关系,对COX-2的抑制作用强于COX-1时, E 为负值,且COX-2的抑制作用越强, E 的绝对数值越大;相反,对COX-1的抑制作用较强时, E 为正值,且 E 的数值越大,COX-1的选择性越强.本文研究的16个化合物中有10个具有COX-2的选择抑制性,其中末端苯环连接一定体积的柔性基团时,如化合物

4, 8, 9, 12 和 14 与 COX-2 酶的结合同时与 COX-1 的结合更稳定, DOCKING 程序显示的化合物进入 COX-2 结合腔时范德华和静电作用均强于化合物与 COX-1 的相互作用, 因此 COX-2 选择性提高。

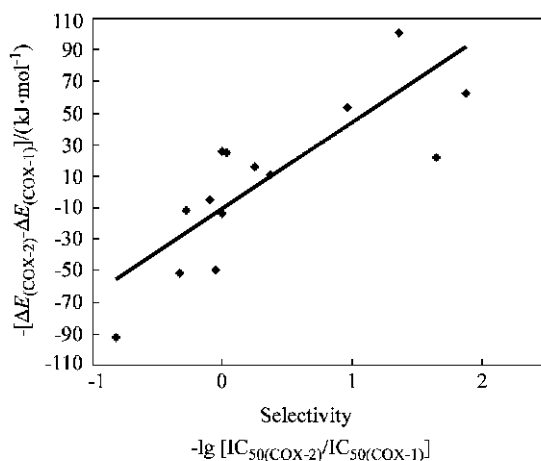


图4 氟比洛芬衍生物的 COX-2/ COX-1 选择性与结合自由能的相关图

Figure 4 Correlation of selectivity of COX2 vs. COX1 and the difference of docking free energy between COX2 and COX1

4 结论

本文通过分子模拟和结合自由能计算研究了氟比洛芬类衍生物与环氧合酶的结合机制, 分子对接和分子力学优化的结果显示, 该系列化合物在 COX-1 的活性口袋中有类似的取向和结合方式; 化合物与 COX-2 的结合也具相似性, 即联苯环的取向相同, 空间位置接近。对氟比洛芬末端苯环取代基的改造, 很难使其 COX-1 和 COX-2 的结合活性有较大的增加; 虽然 COX-1 和 COX-2 的活性腔穴的氨基酸序列具有高度保守性, 但与氟比洛芬末端苯环作用的氨基酸 Leu384 在 COX-1 和 COX-2 中取向明显不同, 该氨基酸附近 COX-2 比 COX-1 有较大的空间, 使得 COX-2 酶相对更能容纳苯环上引入的较大取代基, 因而导致化合物的选择性差异。由于三环类 COX-2 选择性抑制剂不带磺酰基的环也进入了氟比洛芬末端苯环所在的结合腔^[22], 推测对该环进行结构修饰, 也能适当调整其 COX 的选择性, 从而避免 COX-2 酶高度抑制或 COX-1 过于活化带来的不良反应。

References

- Xie, W. L.; Chipman, J. G.; Robertson, D. L.; Erikson, R. L.; Simmons, D. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 2692.
- Vane, J. R. *Science* **2002**, 296, 474.

- Wolfe, M. M. *Am. J. Med.* **1998**, 105, 45.
- Flower R. J. *Nat. Rev. Drug Dis.* **2003**, 2, 179.
- Kalgutkar, A. S.; Marnett, A. B.; Crews, B. C.; Rimmel, R. P.; Marnett, L. J. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2860.
- Black, W. C.; Bayly, C.; Belley, M.; Chan, C. C.; Charleson, S.; Denis, D.; Gauthier, J. Y.; Gordon, R.; Guay, D.; Kargman, S.; Lau, C. K.; Leblanc, Y.; Mancini, J.; Ouellet, M.; Percival, D.; Roy, P.; Skorey, K.; Tagari, P.; Vickers, P.; Wong, E.; Xu, L.; Prasit, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 725.
- Bayly, C. I.; Black, W. C.; Leger, S.; Ouimet, N.; Ouellet, M.; Percival, M. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 307.
- Kalgutkar, A. S.; Crews, B. C.; Rowlinson, S. W.; Garner, C.; Seibert, K.; Marnett, L. J. *Science* **1998**, 280, 1268.
- Sorbera, L. A.; Castañer, J. L.; Bayés, M.; Silvestre, J. S. *Drugs Future* **2002**, 27, 740.
- Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. M. *Nature* **1994**, 367, 243.
- Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Gerse, J. K.; McDonald, J. J.; Stegeman, R. A.; Pak, J. Y.; Gildehaus, D.; Miyashiro, J. M.; Penning, T. D.; Seibert, K.; Isakson, P. C.; Stallings, W. C. *Nature* **1996**, 384, 644.
- Gerse, J. K.; McDonald, J. J.; Hauser, S. D.; Rangwala, S. H.; Koboldt, C. M.; Seibert, K. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 15810.
- Desiraju, G. R.; Gopalakrishnan, B.; Jetti, R. K. R.; Nagaraju, A.; Raveendra, D.; Sarma, J. A. R. P.; Sobhia, M. E.; Thilagavathi, R. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4847.
- Liu, H.; Huang, X.-Q.; Shen, J.-H.; Luo, X.-M.; Li, M.-H.; Xiong, B.; Chen, G.; Shen, J.-K.; Yang, Y.-M.; Jiang, H.-L.; Chen, K.-X. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4816.
- Llorens, O.; Perez, J. J.; Palomer, A.; Mauleon, D. *J. Mol. Graphics Modell.* **2002**, 20, 359.
- Pouplana, R.; Lozano, J. J.; Ruiz, J. J. *Mol. Graphics Modell.* **2002**, 20, 329.
- Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Gerse, J. K.; McDonald, J. J.; Stegeman, R. A.; Pak, J. Y.; Gildehaus, D.; Miyashiro, J. M.; Penning, T. D.; Seibert, K.; Isakson, P. C.; Stallings, W. C. *Nature* **1997**, 385, 555.
- Selinsky, B. S.; Gupta, K.; Sharkey, C. T.; Loll, P. J. *Biochemistry* **2001**, 40, 5172.
- Jones, G.; Willett, P. W.; Gen, R.; Leach, A. R.; Tayler, R. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727.
- Muegge, I.; Martin, Y. C. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 791.
- Kollman, P. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2395.
- Palomer, A.; Cabre, F.; Pascual, J.; Campos, J.; Trujillo, M. A.; Entrena, A.; Gallo, M. A.; Garcia, L.; Mauleon, D.; Espinosa, A. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1402.