

VEGFR-2 酪氨酸激酶抑制剂的 三维定量构效关系研究*

伍小云, 张嘉杰, 吴曙光
(南方医科大学药学院, 广东 广州 510515)

摘要: 运用比较分子力场分析对 28 个氨基吡唑并吡啶二芳基脲类 VEGFR-2 酪氨酸激酶抑制剂进行了三维定量构效关系研究。所得 CoMFA 模型交叉验证系数 $q^2 = 0.681$, 回归系数 $r^2 = 0.958$, 统计方差比 $F = 64.964$, 影响药效的立体场和静电场的贡献分别为 65.7% 和 34.3%。CoMFA 模型的三维等值图为化合物的结构改造提供了参考。

关键词: 三维定量构效关系; 比较分子力场分析; 氨基吡唑并吡啶二芳基脲类; VEGFR-2 酪氨酸激酶抑制剂
中图分类号: O641; R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2010) 01-0057-05

Three Dimensional Quantitative Structure Activity Relationship of VEGFR-2 Tyrosine Kinase Inhibitors

WU Xiaoyun, ZHANG Jiajie, WU Shuguang

(School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: The three dimensional structure activity relationship was studied on a series of aminopyrazolopyridine diaryl urea VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors by comparative molecular field analysis (CoMFA). The results indicated that the CoMFA model had a cross validated coefficient q^2 of 0.681 and the relation non-cross validated coefficient r^2 of 0.958. The F value was 64.964. The contributions of steric and electrostatic fields to the activity were 65.7% and 34.3%, respectively. The CoMFA model gave the basis on the structure modification of aminopyrazolopyridine diaryl urea VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors.

Key words: three dimensional quantitative structure activity relationship (3D-QSAR); comparative molecular field analysis (CoMFA); aminopyrazolopyridine diaryl urea; VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors

肿瘤新生血管生成对肿瘤的生长和浸润转移至关重要, 诱发新生血管生成是具有转移潜能的肿瘤细胞特性之一。在已知参与肿瘤血管形成的因子中, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前发现的作用最强、特异性最高的促血管生成因子^[1]。VEGF 是一种特异性调控内皮细胞的有丝分裂素和血管生长因子, 在脉管生成、血管形成和血管迁移过程中起重要调节作用, 可有效促进人体内新生血管的形成。VEGF 不仅在

正常组织中有表达, 在多种恶性肿瘤中已被证实呈现过度表达, 且和多种肿瘤的生长、转移、预后有关。VEGF 通过与内皮细胞的两种高亲和性的酪氨酸受体 Flt-1 和 VEGFR-2 特异性结合而产生作用^[2]。其中血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) 不仅分布于组织的血管内皮细胞, 也分布于部分肿瘤细胞, 对 VEGF 的信号传导和血管内皮生长起主导作用^[3], 对于肿瘤增殖与新血管形成有着重要作

* 收稿日期: 2009-07-21

基金项目: 广州市粤港关键领域重点突破资助项目 (2006z1-E6021)

作者简介: 伍小云 (1979 年生), 女, 讲师; E-mail: shmily80@163.com

用^[4]。研究表明阻断 VEGF 与 VEGFR-2 的相互作用能在一定程度上抑制动物体内实体瘤的生长, 达到治疗肿瘤、抑制肿瘤生长的目的。因此以 VEGFR-2 为靶点进行肿瘤生物治疗的研究逐渐成为当今研究的一个重要方向。

近年来, 人们开发了许多 VEGFR-2 酪氨酸激酶抑制剂, 其中包括喹唑啉类、吡啶酮类、咪唑啉类、喹啉类等结构^[5]。最近发现二芳基脲类化合物具有很好的抑制 VEGFR-2 的活性, 如氨基苯并异噁唑二芳基脲, 氨基吡啶二芳基脲以及氨基吡啶并吡啶二芳基脲类等^[6-8], 这些化合物中都含有二芳基脲结构, 结构见图 1, 其中化合物 ABT-869 已经进入临床 II 期研究^[7]。

比较分子力场分析 (comparative molecular field analysis, CoMFA) 是目前应用最广泛的一种 3D-QSAR 研究方法^[9], 在药物设计方面取得了较大的成功。本文利用 CoMFA 研究了氨基吡啶并吡啶二芳基脲类化合物的构效关系, 为开发高效的 VEGFR-2 酪氨酸激酶抑制剂提供参考。

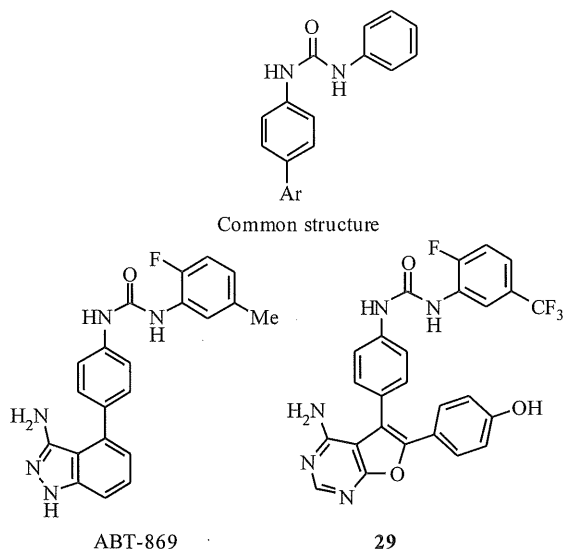


图 1 二芳基脲类化合物的结构

Fig. 1 Structure of diaryl ureas

1 计算方法

本文采用 Tripos 公司的 Sybyl7.3 商业软件包开展相关的研究工作, 如无特殊说明, 所选参数均为默认值。

1.1 化合物及活性数据

本文研究的 28 个氨基吡啶并吡啶二芳基脲类抑制剂结构与活性数据都来自文献 [8], 化合物的公共结构见图 2, 所选用的化合物结构和活性见

表 1。化合物的活性指标用 IC_{50} 表示, 活性数据形式经过负对数变换 ($pIC_{50} = 9 - \lg IC_{50}$), 这种变换不影响模型的内在规律。随机选取其中的 4 个化合物作为测试集, 其他 24 个化合物为训练集进行三维定量构效关系研究。

1.2 活性构象确定及分子叠合

由于 CoMFA 研究涉及到化合物分子的三维结构, 因此确定活性构象是 CoMFA 研究的关键步骤。由于没有所研究的化合物与 VEGFR-2 复合物的晶体结构。本文作者在 Protein Data Bank (PDB) 中查到二芳基脲类似物 29 与 VEGFR-2 复合物的晶体结构 (PDB 登记号为 1YWN)。根据复合物晶体结构显示^[10], 二芳基脲是化合物与 VEGFR-2 结合的重要区域, 其中 CO 和 NH 通过氢键与 VEGFR-2 结合。将化合物 29 从 VEGFR-2 复合物的晶体结构中提出, 以此为参照在 Sybyl 7.3 软件中构建化合物 17 的分子结构, 然后以分子力学程序 Minimize 进行能量优化, 优化过程中采用 Powell 能量梯度法、Tripos 力场、Gasteiger-Hückel 电荷, 迭代 1000 次, 能量收敛限定为 $0.005 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 得到该分子的初始构象。然后对化合物 B 环和 C 环之间的单键进行 Grid Search 寻找最低能量构象, 最后用上述相同方法进行优化后作为分子药效构象。其它化合物在 17 上取代相应的基团和原子, 以同样条件优化后, 作为其药效构象。

分子叠合也是 CoMFA 方法中的关键一步, 对于所建立的三维构效关系模型质量有重要影响。当活性构象确定后, 一般根据一定的规则, 如药效团、力场、公共骨架等进行分子叠合, 使每个分子采用具有最大力场相似性的空间取向进行计算。本研究选择活性最好的化合物 1 为模板分子, 将训练集以图 2 中标记 * 的原子作为叠合点, 用 Align database 进行骨架叠合, 叠合图如图 3 所示。

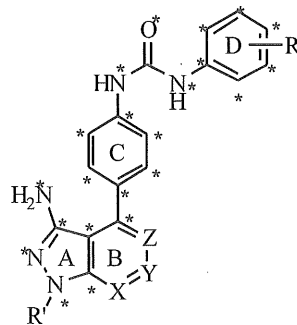


图 2 吡啶并吡啶二芳基脲类化合物的结构

Fig. 2 Structure of aminopyrazolopyridine diaryl ureas

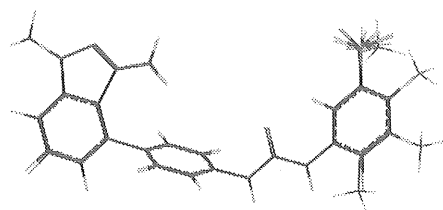


图 3 化合物的分子叠合图

Fig. 3 Superimposition of compounds

1.3 CoMFA 方法

将重叠好的分子置于自动生成的三维网格中,

网格包含所有分子,并且在 X、Y、Z 轴方向至少延伸 0.4 nm。用一个 sp^3 杂化的正碳原子探测每个格点上的立体场与静电场能,立体场一般采用 Lennard-Jones 势的计算公式,静电场采用 Coul 势,能量截断值 (cutoff) 设为 $30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。利用偏最小二乘法 (PLS) 建立模型,首先用 SAMPLS 方法做 LOO (Leave-one-out) 交叉验证,得到最佳主成分数和交叉验证系数 q^2 。然后在最佳主成分数下做非交叉验证,建立相应的 CoMFA 模型。随后,采用 SteDev * Coeff 方法显示三维等值图,直观地反映出立体场和静电场对活性的影响。

表 1 化合物的结构、活性数据及预测结果

Table 1 The structures, experimental and predicted activity values of the compounds

No.	R'	X	Y	Z	R	IC ₅₀		pIC ₅₀	
						(nmol · L ⁻¹)	experimental	predicted	residual
1	H	CH	N	CH	<i>m</i> -Me	0.7	9.155	9.076	0.079
2	H	CH	N	CH	<i>m</i> -Cl	1.2	8.921	9.061	-0.140
3	H	CH	N	CH	2-F-5-CF ₃	1.0	9.000	9.012	-0.012
4	H	CH	N	CH	4-F-5-CH ₃	0.7	9.155	9.052	0.103
5	Me	CH	N	CH	<i>m</i> -Me	4.6	8.337	8.375	-0.038
6	Me	CH	N	CH	2-F-5-CH ₃	7.7	8.114	8.188	-0.074
7	Me	CH	N	CH	4-F-5-CF ₃	3.7	8.432	8.303	0.129
8	H	N	CH	CH	H	4.5	8.347	8.362	-0.015
9	H	N	CH	CH	<i>o</i> -Me	35	7.456	7.422	0.034
10	H	N	CH	CH	<i>m</i> -Me	2.0	8.699	8.799	-0.100
11	H	N	CH	CH	<i>p</i> -Me	2.9	8.538	8.536	0.002
12	H	N	CH	CH	<i>m</i> -Cl	1.0	9.000	8.817	0.183
13	H	N	CH	CH	<i>m</i> -CF ₃	1.7	8.770	8.912	-0.142
14	H	N	CH	CH	<i>m</i> -OMe	3.8	8.420	8.424	-0.004
15	H	N	CH	CH	3, 5-diMe	1.0	9.000	9.011	-0.011
16	H	N	CH	CH	2-F-5-CH ₃	2.0	8.699	8.645	0.054
17	H	N	CH	CH	2-F-5-CF ₃	2.4	8.620	8.739	-0.119
18	H	N	CH	CH	4-F-3-CH ₃	1.1	8.959	8.805	0.154
19	H	N	CH	CH	4-F-3-CF ₃	2.0	8.699	8.711	-0.012
20	H	N	CH	CH	3-Cl4-F	1.8	8.745	8.785	-0.040
21	H	CH	CH	N	<i>m</i> -Cl	12	7.921	7.899	0.022
22	H	CH	CH	N	<i>m</i> -CF ₃	7.1	8.149	8.004	0.145
23	H	CH	CH	N	2-F-5-CH ₃	18	7.745	7.768	-0.023
24	H	CH	CH	N	4-F-3-CH ₃	20	7.699	7.869	-0.170
25*	H	CH	N	CH	2-F-5-CH ₃	2.1	8.678	8.864	-0.186
26*	Me	CH	N	CH	<i>m</i> -Cl	1.5	8.824	8.437	0.387
27*	H	N	N	CH	3, 5-diF	6.3	8.201	8.549	-0.348
28*	H	CH	CH	N	3, 5-diMe	12	7.921	8.085	-0.164

*: 测试集化合物

2 结果与讨论

2.1 CoMFA 模型

CoMFA 计算中, 网格点步长的改变对模型有显著的影响, 本文在自动生成的网格的基础上, 考察了不同的步长对模型的影响, 结构见表 2。

表 2 不同步长对 CoMFA 计算结果的影响

Table 2 Comparison of CoMFA results with different grid space

Grid space/nm	N	q^2
0.05	6	0.677
0.10	6	0.681
0.15	7	0.647
0.20	8	0.642

从表 2 可以看出, 探针原子行进的步长对 CoMFA 模型有一定影响, 在步长较小时, 计算速度比较慢, 并且会给 PLS 计算带来噪音, 而当步长过大时, 可能会造成某些区域重要分子信息的丢失, 当步长为 0.10 nm 时, 得到的 CoMFA 模型效果最好。

在自动生成的网格上, 以 sp^3 杂化的正碳原子为探针, 0.10 nm 为步长所得 CoMFA 模型的统计学参数为: 交叉验证相关系数 q^2 为 0.681, 最佳主成分数为 6; 由最佳主成分数进行非交叉验证得到常规相关系数 r^2 为 0.958, 标准方差 (SEE) 为 0.113。立体场和静电场的贡献值分别为 65.7% 和 34.3%, 表明空间效应是主要的影响因素。一般认为, q^2 大于 0.5 时, 所得模型具有可信的预报能力, 非交叉验证的常规相关系数大于 0.9 时, 表明模型有很好的自身一致性。本模型 q^2 达到 0.681, r^2 达到 0.958, 说明该模型具有较好的预测能力和自身一致性。测试集化合物的活性实测值与预测值见表 1, 图 4 为活性实测值与预测值的关系。

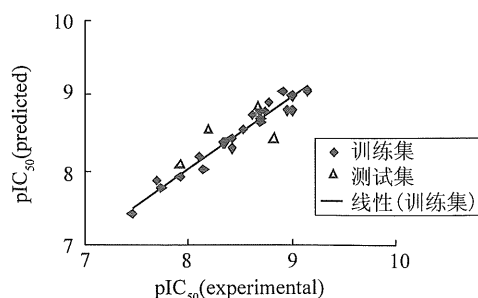


图 4 CoMFA 模型预测活性与实验活性之间的关系

Fig. 4 Predicted and experimental pIC_{50} for the CoMFA model

2.2 CoMFA 等值图

从立体与静电作用能分数比 0.657/0.343 可以看出, 对化合物的活性影响, 立体场起主要作用。图 5 显示了 CoMFA 模型立体场和静电场 (化合物 1 为参考分子) 的三维等值图。图 5 (a) 为立体场图, 图中绿色区域表示该区域增大取代基的体积有利于增加化合物的生物活性, 黄色区域表示该区域减少立体位阻对化合物的生物活性有利; 图 5 (b) 为静电场分布图, 图中蓝色区域表示增加正电荷有利于提高化合物的生物活性, 红色区域表示增加负电荷有利于提高生物活性。综合立体场和静电场三维等值图, 苯环 D 的邻位的立体场有一黄色区域, 静电场有一蓝色区域, 说明位阻小的正电荷有利。苯环 D 的间位的立体场有一绿色区域, 说明位阻大基团有利, 因此间位有甲基或 CF_3 取代时, 其活性相应较高。A 环的氮上的取代基 R' 立体场所在为一黄色区域, 说明位阻小对活性有利, 因此没有取代基活性高, 如甲基取代的化合物 5, 6, 7, 26 较相应的无取代的化合物 1, 2, 3, 4 活性降低。B 环的 Z, Y 立体场分别处于绿色和黄色, 而静电场分别处于蓝色和红色, 说明 Z 为位阻大的正电荷, Y 为位阻小的负电荷对活性有利。比较 C 和 N 的体积和电负性, 氮的电负性大于碳, 而碳的体积大于氮, 因此 Z 为 C, 而 Y 为氮时对活性有利, 因此化合物 1, 2, 3, 4 的活性较高。综上所述, 当二芳基脲上取代的芳基吡啶并吡啶的拼合方式为吡啶并 [3, 4-c] 吡啶 (化合物 1, 2, 3, 4 的拼合方式), D 环的邻位为位阻小的正电性取代基、间位为位阻大的取代基取代对提高化合物的活性有利。

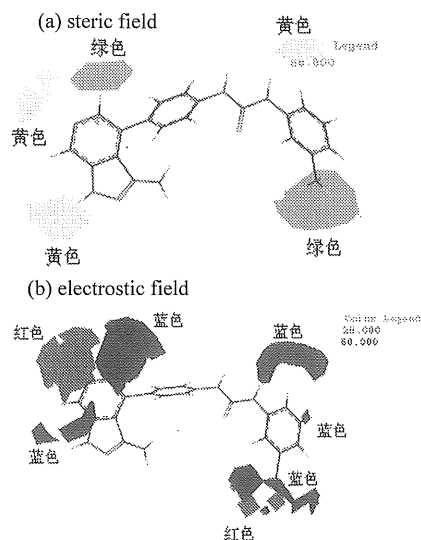


图 5 CoMFA 模型等值图

Fig. 5 3D contour plot of the CoMFA model

3 结 论

采用 Tripos 公司的商用软件 sybyl7.3 对 28 个二芳基脲类 VEGFR-2 酪氨酸激酶抑制剂进行了 3D-QSAR 研究, 构建了一个预测能量较强的 CoMFA 模型, 其交叉验证系数 $q^2 = 0.681$, 非交叉验证系数 $r^2 = 0.958$, 统计方差比 $F = 64.964$; 影响药效的立体场和静电场的贡献分别为 65.7% 和 34.3%。CoMFA 模型的三维等值图为设计高活性的化合物提供了参考。

参考文献:

- [1] GUO P, XU L, PAN S, et al. Vascular endothelial growth factor isoforms display distinct activities in promoting tumor angiogenesis at different anatomic sites[J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (23): 8569 - 8577.
- [2] FERRARA N, DAVIS-SMYTH T. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. *Endocr Rev*, 1997, 18 (1): 4 - 25.
- [3] SHINKARUK S, BAYLE M, LAIN G, et al. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy[J]. *Curr Med Chem Anti Cancer Agents*, 2003, 3(2): 95 - 117.
- [4] CROSS M J, DIXELIUS J, MATSUMOTO T, et al. VEGF-receptor signal transduction[J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28: 488 - 494.
- [5] 茆勇军, 张佩璇, 田广辉, 等. 血管内皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(7): 544 - 550.
- [6] JI Z Q, AHMED A A, ALBERT D H, et al. 3-Amino-benzo[d]isoxazoles as novel multitargeted inhibitors of receptor tyrosine kinases[J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 1231 - 1241.
- [7] DAI Y J, HARTANDI K, JI Z Q, et al. Discovery of N-(4-(3-amino-1H-indazol-4-yl) phenyl)-N'-(2-fluoro-5-methylphenyl) urea (ABT-869), a 3-aminoindazole-based orally active multitargeted receptor tyrosinekinase inhibitor[J]. *J Med Chem*, 2007, 50: 1584 - 1597.
- [8] DAI Y, HARTANDI K, SONI N B, et al. Identification of aminopyrazolopyridine ureas as potent VEGFR/PDGFR multitargeted kinase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 386 - 390.
- [9] CRAMER R D, PATTERSON D E, BUNCE J D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins[J]. *J Am Chem Soc*, 1988, 110: 5959 - 5967.
- [10] 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] 刘爱荣, 张俊平, 王定文, 等. 蝴蝶拱桥的有限元分析及模型试验研究[J]. *中南公路工程*, 2006, 31(5): 59 - 62.
- [9] 李健, 辛克贵, 张崇厚, 等. 梁拱组合体系桥梁的设计实例[J]. *河北工程大学学报: 自然科学版*, 2008, 25(1): 5 - 8.
- [10] KURANISHI Shigera, YABUKI Tetsuya. Required out-of-plane rigidities of steel arch bridges with two main arch ribs subjected to vertical and lateral loads [R]. The Technology Reports of Tohoku University, Sendai, Japan, 1981, 46: 47 - 72.
- [11] YONGLIN P I, TRAHIR N S. Out-of-plane inelastic buckling and strength of steel arches[J]. *Journal of the Structural Engineering, ASCE*, 1998 (2): 174 - 183.
- [12] YABUKI Tetsuya, VINNAKOTA Sriramulu, KURANISHI Shigera. Lateral load effect on load carrying capacity of steel arch bridge structures [J]. *Journal of Structural Engineering, ASCE*, 1983, 10(109): 2434 - 2449.
- [13] 黄海云, 赵新生, 刘爱荣. 中山市长江大桥主桥动静载试验检测评估报告[R]. 广州: 广州大学, 2008.

(上接第 56 页)