

糖蛋白 IIb/IIIa 受体拮抗剂三维构效关系研究

张洪旺, 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: 研究三维构效关系, 建立药效模型, 为设计新型糖蛋白 IIb/IIIa 受体拮抗剂提供指导。方法和结果: 利用比较分子力场方法, 建立了 IIb/IIIa 受体拮抗剂的三维定量构效模型。在比较分子力场分析中, 利用拮抗剂晶体结构为模板, 进行了多种分子叠合形式研究, 建立了具有良好预测能力的三维定量构效关系模型, 表征模型预测能力的交叉验证系数 $R_{CV}^2 = 0.834$, 传统相关系数 $R^2 = 0.988$, $F = 323.63$, 标准偏差 $SE(\text{Standard Error of Estimate}) = 0.135$ 。结论: 所得模型解释了已有的构效关系, 系数等势图映射的受体性质与实验结果相一致, 可以指导新的拮抗剂设计。

关键词 IIb/IIIa 拮抗剂; 三维构效关系

血小板活化在血栓性疾病中起关键作用。动脉血栓性疾病及其相应的缺血性并发症可引起多种临床综合症, 如中风、心肌梗塞或外周动脉疾病等。目前, 在所用的抗血小板药物中, 以乙酰水杨酸的疗效最好。但是, 乙酰水杨酸只能抑制血栓素(TXA_2)介导的血小板聚集, 抗血小板作用相对较弱。其它药物如噻氯匹啶和水蛭素, 作用机理是抑制 ADP 和凝血酶, 在临床应用上, 也有局限性。开发抑制全部内源性血小板激动剂的抗血小板聚集药物, 寻找特异性的血小板聚集拮抗剂, 成为心血管药物研究的一个重点^[1]。

生物化学和分子病理学研究表明, 血小板聚集主要发生在活化血小板之间, 虽然有多种因素诱导血小板的活化, 但是纤维蛋白原(fibrinogen)结合于活化的血小板是完成聚集的最后一步, 糖蛋白 IIb/IIIa 是完成这种结合的重要媒介^[2-4]。血小板表面的糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体由 IIb 和 IIIa 两个亚单位组成, 两个亚单位借非共价键结合。未活化的血小板表面大约有 50 000 个 GPIIb/IIIa 分子, 被激活后血小板颗粒膜上的 GPIIb/IIIa 也移到血小板表面, 使数目增加到 70 000 ~ 90 000。GPIIb/IIIa 受体可连接纤维蛋白原、纤维连接素、vwf 和玻璃体结合蛋白等粘附蛋白。这些蛋白与 GPIIb/IIIa 结合后发生血小板交联, 然后介导血小板聚集。因为这种结合是所有血小板激动剂引起血小板聚集的最后共同

环节, 故针对 IIb/IIIa 作为靶点抑制血小板集聚, 开发用于治疗血小板聚集性心血管疾病是可靠的^[5]。

单克隆抗体 C7E3 是最早上市的以 GPIIb/IIIa 为靶位的治疗药物, 但临床使用有出血和血小板减少的副作用。另一个多肽类药物已上市, 但存在着选择性不高, 临床使用费用昂贵和存在抗原性等缺点, 限制了作为抗血栓药的普遍应用。短肽 RGD 类似物口服生物利用度较差, 为此合成了大量的非肽类化合物, 进行了生物活性评价^[6,7]。为进一步阐明 GPIIb/IIIa 拮抗剂的定量构效关系, 建立具有提示高活性化合物信息及预测能力的构效模型, 本文利用比较分子力场方法 CoMFA (comparative molecular field analysis) 对苯脒类化合物拮抗剂进行了三维定量构效分析。

所有计算工作都是在本所合成室的 SGI O₂ 计算机工作站上完成的, 所用计算程序为 Tripos 公司最新提供的 Sybyl 6.4 分子设计软件包^[8], 计算过程中除非特别指明, 所选用的参数均为缺省值。

计算方法

1 化合物选择

GP IIb/IIIa 是跨膜蛋白, 其三维结构尚不清楚。苯甲脒类是研究最为活跃的非肽类 GP IIb/IIIa 受体拮抗剂的结构类型, 如进入 3 期临床的 sibrafiban, lamifiban 和 xemilofiban 化合物。构效关系分析得知, 这类化合物基本模拟了四肽类化合物, 其药效基团分别是苯甲脒基、羧基或酯基, 中间骨架

收稿日期: 1999-03-23

* 联系人 Tel: (010) 631 65249, Fax: (010) 6301 7757,
E-mail: zrguo@public.intercom.com.cn

空间上应满足 8 ~ 10 Å 的距离要求,事实上是应有 11 ~ 14 个键长。本文选择了 16 个已知苯甲胺类 GPIIb/ IIIa 拮抗剂进行 CoMFA 研究,所选取的化合物类型及相应的取代基、活性分别见图 1 和表 1。

所有化合物的活性测定都来源于同一个实验室。在每次测试中,对照样品的活性都相同,表明具有可比性。比较分子力场分析所用的活性采用 IC₅₀ 的负对数形式 $-\log IC_{50}$ 。

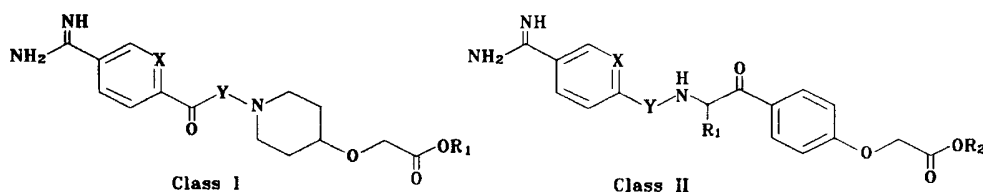


Fig 1 Structures of compounds I and II.

Tab 1 Substituent of all compounds, the observed and predicted activity and their deviations

Compound	X	Y	R ₁	R ₂	Biological activity (PI ₅₀)		
					Observed	Predicted	Residual
I-1	CH	Gly	H		6.95	6.98	-0.03
I-2	CH	D-Ala	H		6.05	6.08	-0.03
I-3	CH	Orn	H		7.00	7.07	-0.07
I-4	CH	Asp	H		6.46	6.45	-0.01
I-5	CH	Pro	H		7.22	7.30	-0.07
I-6*	CH	Tyr	H		7.52	7.50	0.02
I-7	CH	Ala	H		7.30	7.00	0.30
I-8	N	Ala	H		7.70	7.67	0.03
I-9*	CH	Tyr	Et		7.20	7.07	0.13
I-10	CH	Ala	Et		6.30	6.59	-0.29
II-11	CH	SO ₂	CH ₃	Me	5.01	4.92	-0.08
II-12	CH	SO ₂	CH ₃	H	5.13	5.26	0.03
II-13*	CH	SO ₂	CH ₃	H	3.94	3.85	0.09
II-14	CH	SO ₂	H	H	4.82	4.96	-0.14
II-15	CH	CO	H	Me	6.05	5.98	0.07
II-16	CH	CO	H	H	6.10	5.96	0.13

* Predicted compounds.

2 活性构象确定及相关分子结构建模

确定活性构象是 CoMFA 分析成功与否的一个关键步骤。由于与受体结合的配体分子的活性构象无法获得,因此通常认为分子的药效构象接近最低能量构象。对于拟肽分子,由于存在着较多的可旋转柔性键,其最低能构象的确定比较困难。化合物的晶体结构常常接近最低能量构象,选择化合物的晶体结构作为研究药效构象的起始模板,进行分子构象的优化,可以提供构效关系研究的药效构象。GPIIb/ IIIa 拮抗剂构效关系分析表明,小肽类和伪肽类的拮抗剂处于一种线性分子状态。GPIIb/ IIIa 拮抗剂 sibrafiban 的晶体结构已经测定,证明整个分子在空间上处于伸展状态。在我们的研究中,活性

构象的确定以 sibrafiban 的晶体结构作为起始构象,在 Sybyl 6.4 中用 Build/ Edit 模块中的 Crystals 进行操作,经分子力学程序 Minimize 2 进行能量优化后所得的构象作为模板分子,进行 CoMFA 研究。

所有用于比较分子力场分析的 16 个化合物的三维结构都是以优化后的 sibrafiban 结构为模板,变换相应的基团和原子后,以分子力学程序 Minimize 2 进行能量优化。优化过程中采取 Powell 能量梯度法,采用 Tripos 力场,能量收敛限定为 0.01 kcal·mol⁻¹。由于经典分子力学不能精确计算硫基 SO₂ 的电荷,分子电荷的计算采用量子化学软件包 Mopac 6.0 中的 PM3 计算,分子最终荷载为 MOPAC 电荷。

3 分子叠合

比较分子力场分析建立的分子周围三维网格点上静电场和立体场与活性的相关性,格点上场能的大小与分子的相对位置有关。根据构效关系的分析,在确定了药效团模型后,药效团的叠合和刚性基团的叠合,可以保证分子采取具有最大力场相似性的空间取向进行力场计算。根据以上分析,以两个六元环的质心及其中间连接的4个原子为位点,进行分子叠合,所使用的操作为 Fit Atom。16个化合物叠合结果见图2。

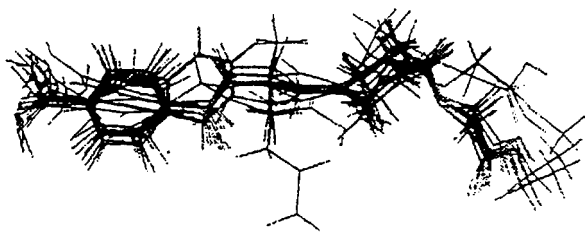


Fig 2 Stereoview of superimposition of 16 IIb/IIIa antagonists used for CoMFA.

4 比较分子力场分析

CoMFA分析由 Sybyl6.4 中的 QSAR 模块完成。分析力场包括立体场和静电场,探针原子选用 sp^3 杂化的 C^+ ,步长为 2 \AA ,其 Van der Waals 半径为 1.52 \AA (它对于立体场和静电场都具有较好的描述)。每个分子总共计算了 $14 \times 8 \times 11 = 1232$ 个点的数值,立体场和静电场的能量阈值分别为 $50.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。选择其中的 13 个化合物进行模型的建立,以交叉验证(cross-validate)和非交叉验证(cross-invalidated)系数,确定最佳主成分数,用偏最小二乘法(PLS, partial least square)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 $2.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

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 $R_{cv}^2 = 0.834$ 最佳主成分数为 3,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。由最佳主成分数建立的 CoMFA 模型的传统相关系数 $R^2 = 0.988$, $F =$

323.63 ,标准方差 $SE(\text{standard error of estimate}) = 0.135$ 。立体场和静电场对构效方程的贡献分别为 44.9% 和 55.1% 。静电场强于立体场。该 CoMFA 模型对 16 个化合物的活性预测值与实测值的相关性如图 3a。为了验证 CoMFA 模型预测能力,利用所建立的三维定量构效关系模型,对于未参加训练建模的 3 个同类分子进行了活性预测,预测结果见表 1。预测结果和实测结果的相关性如图 3b。预测值和实测值的最大偏差为 0.2 对数单位,可以认为模型的预测能力较好。 PI_{50} 与 3 个主成分的方程为 $PI_{50} = 0.770 \text{ Comp}_1 + 0.830 \text{ Comp}_2 + 0.844 \text{ Comp}_3$

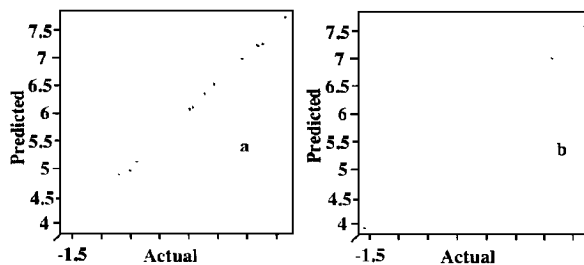


Fig 3 Predicted vs actual values of biological activity(PI_{50}). a: training set; b: predicted set.

2 CoMFA 系数等势图

CoMFA 模型系数等势图见图 4,其中的参照分子为化合物 I_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的立体场有利于活性的提高,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。这一结果与构效分析也是一致的。

红色和蓝色区域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,结果显示两个六元环中间 L-Ala 手性碳的甲基附近以及苯甲脒的苯环一侧有一个大的绿色区域,碳酰胺具有较强的负电性,在等势图上显示不利影响,化合物 16 的拮抗活性几乎比化合物 14 高出 1 个数量级即说明了这一点。在脒基的氮原子附近有一块大的蓝色区域,化合物 13 和化合物 14 之间的 1 个甲基,导致两个化合物的活性相差 10 倍,从而证实了酰胺/磺酰胺邻位手性碳的重要性。增加脒基上正电性以及苯甲脒的苯环一侧引入较大的基团均有利于提高生物活性。

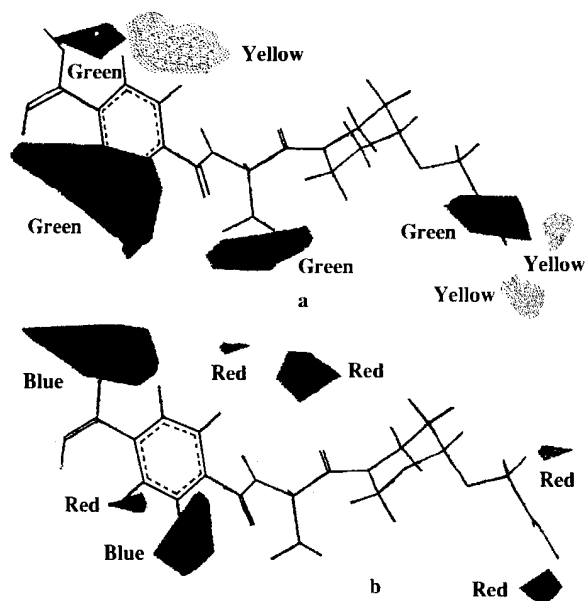


Fig 4 Stereoview of CoMFA standard deviation^{*} coefficients contour map. a: steric standard coefficient contour map; b: electrostatic standard coefficient contour map.

小 结

肽类和拟肽类药物的分子设计与三维定量构效关系研究有密切关系。以上研究表明,对于柔性键较多的拟肽分子,利用已知的晶体结构作为药效构象的优化起始模板,通过分子力学和分子动力学的

结构优化,根据药效团模型选择合适的分子叠合,可得具有较高预测能力的 CoMFA 模型。本文所建立的 IIb/ IIIa 拮抗剂 CoMFA 模型全面揭示了三环系拮抗剂分子的三维定量构效关系,具有良好的预测能力,同时也提示增加胍基上正电性和苯甲脒的苯环一侧引入较大的基团均有利于提高生物活性。

参 考 文 献

- 1 Moran J. *Thrombolytic Treatment: The Market Clinical Background and Future Therapies*. New York: Scrippib Publication, 1990
- 2 Blackburn A, Gadek TR. Glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Annu Rep Med Chem*, 1993, **28**: 79
- 3 Ramjit B DR, Lynch JJ, Sitko GR, *et al*. Antithrombotic effects of MK-0852, a platelet fibrinogen receptor antagonist, in canine models of thrombosis. *J Pharmacol Esp Ther*, 1993, **266**: 1501
- 4 Phillips DR, Charo IF, Parise L. The platelet membrane glycoprotein complex. *Blood*, 1988, **71**: 831
- 5 Cook NS, Kottirsch G, Zerwes HG. Platelet glycoprotein antagonists. *Drug Future*, 1994, **19**: 135
- 6 Alig L, Edenhofer A, Hadvary P, *et al*. Low molecular weight, nonpeptide fibrinogen receptor antagonists. *J Med Chem*, 1992, **35**: 4393
- 7 Weller T, Alig L, Beresini M, *et al*. Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. amidoximes as prodrugs of amidines. *J Med Chem*, 1996, **39**: 3139
- 8 The program sybyl 6.4/6.04 is available from Tripos Assoc, 1996. S. Hanley RD, St. Louis MO63144

THREE DIMENSIONAL QUANTITATIVE STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIP OF GPIIb/ IIIa ANTAGONISTS

Zhang Hongwang, Qu Lingbo and Guo Zongru

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

ABSTRACT AIM: To disclose the relationship between activity and structure of a new class of nonpeptide fibrinogen receptor antagonists. **METHODS AND RESULTS:** A series of 16 GPIIb/IIIa antagonists were investigated with the aim of developing a 3D-QSAR model using comparative molecular field analysis (CoMFA). The active conformation and the alignment of the whole molecule were extracted from the sibrifiban crystal structure. The model shows higher ability to explain and predict the activity of GPIIb/IIIa antagonists, and cross-validated $R_v^2 = 0.834$, Non cross-validated $R^2 = 0.988$, $F = 323.63$, SE (standard error of estimate) = 0.135. **CONCLUSION:** The 3D model is consistent with the experiments.

KEY WORDS GPIIb/IIIa antagonists; 3D-QSAR