

1-咪唑基苯并二氮杂萘类法呢基蛋白转移酶抑制剂的三维定量构效关系研究

万升标, 易翔, 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 建立法呢基蛋白转移酶抑制剂的三维定量构效关系, 设计高效法呢基蛋白转移酶抑制剂。方法和结果 利用比较分子力场分析方法(CoMFA)建立了 32 个法呢基蛋白转移酶抑制剂的三维定量构效关系, 模型的交叉验证相关系数 $R_{cv}^2 = 0.602$, 非交叉验证相关系数 $R^2 = 0.958$, 标准偏差 $SE = 0.270$, $F = 124.5$ 。结论 此模型对设计和预测高活性结构类型的化合物有一定的可靠性。

关键词: 法呢基蛋白转移酶; 1-咪唑基苯并二氮杂萘; 比较分子力场分析(CoMFA)

中图分类号: R916.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2001)06-0423-04

Ras 蛋白在细胞生长和增殖过程中起信号转导作用^[1-3]。正常的 Ras 蛋白经法呢基化后, 以 GDP 的活性结合形式到细胞膜内侧上进行信号转导, 再与 GDPase 作用转变为 GTP 非活性形式结束。当 *ras* 基因发生突变, 其表达产物 Ras 蛋白始终结合为 GDP 活性形式, 连续的生长信号失控导致细胞增殖, 造成细胞癌变。在信号转导过程中 Ras 蛋白只有结合到细胞膜上才能起作用, 但其本身疏水性差难以结合到细胞膜上, Ras 蛋白须在法呢基蛋白转移酶(FPTase)催化下进行法呢基化, 增加亲脂性与细胞膜结合。所有的 Ras 蛋白 C 端均有一个向外伸展的片段 CAAX, 法呢基化即发生 CAAX 上, 其中 C 为半胱氨酸, A 为含疏水性侧链的氨基酸, X 为甲硫氨酸或丝氨酸。法呢基化是法呢醇焦磷酸酯(FPP)中的法呢基(十五碳三烯基)在 FPTase 催化下与半胱氨酸中的巯基结合的过程^[4-7]。研究发现 50% 的结肠癌和 90% 的胰腺癌中 *ras* 癌基因显著表达^[8]。因此抑制 FPTase 的活性, 阻止 Ras 蛋白进行信号转导, 是寻找抗癌药物的重要靶点。

为了研制法呢基蛋白转移酶抑制剂, 已合成了^[9]大量 CAAX 四肽模拟物和非肽类似物。本文利用比较分子力场分析方法 CoMFA(comparative

molecular field analysis)^[10]对 1-咪唑基取代的 2,3,4,5-四氢-1,4-苯并二氮杂萘类抑制剂进行了三维定量构效分析, 以期设计合成高活性非肽类 FPT 抑制剂。

所有计算工作在本研究室的 O2 工作站上完成。所用计算机程序为 Tripos 公司提供的 sybyl 6.5 分子设计软件包。计算中除特别指出外, 所用参数均为缺省值。

方 法

1 化合物的选择

FPTase 与 CAAX 的复合物单晶结构表明, 其活性中心含有锌离子^[11,12], 半胱氨酸残基和锌配位结合, A 中的疏水侧链是与酶结合所必需。因此所设计的 FPTase 抑制剂需有以下特征: 分子中有一个与锌离子特异性结合的基团, 如巯基、咪唑基或吡啶基等; 有一定的疏水区; X 用疏水基团代替^[9]。据此本文选择了 1-咪唑基苯并二氮杂萘类化合物(表 1 和表 2)^[13]。所用化合物的生物活性指标都用 IC_{50} , 其活性值均来源于同一实验室, 活性具有可比性。比较分子力场分析用 IC_{50} 的负对数形式 $-\log IC_{50}$ 。

2 活性构象的确定及相关分子三维建模

确定活性构象是 CoMFA 分析的第 1 个关键步骤。由于所选取的化合物未发现有单晶结构和与酶复合物单晶结构的报道, 本文以化合物最低能量构象为起始构象。先用系统搜索法(system search)和分子力学程序(minimize)确定基本骨架苯并二氮

收稿日期: 2000-11-06.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973 项目: G1998051102)。

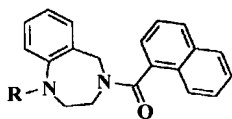
作者简介: 万升标, 男, 博士研究生;

郭宗儒, 男, 研究员, 博士生导师。

* 通讯作者 Tel: (010)63165249, Fax: (010)83155752,

E-mail: zrguo@imm.ac.cn

Tab 1 Structures and activities of compounds 1 - 7 for CoMFA



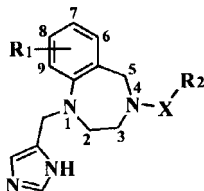
No.	R	IC ₅₀ / μmol·L ⁻¹	- log IC ₅₀
1	Imidazol-4-ylethyl	0.34	6.47
2	Imidazol-4-yl methyl	0.46	6.34
3	Imidazol-2-ylpropyl	0.59	6.23
4	2-(2-Aminoethyl)imidazol-5-yl methyl	0.84	6.08
5	1-Phenylmethylimidazol-5-yl methyl	1.1	5.96
6	2-(2-Aminoethyl)imidazol-5-yl methyl	1.3	5.89
7	Imidazol-2-yl methyl	21	4.68

杂萘环的最低能量构象,然后固定骨架,以相同的方法寻找侧链的低能构象。以训练集(training set)中活性最高的化合物 8 为模板,其他 31 个化合物的构象都参照 8,以相同的方法确定了低能构象。优化过程中采用 Powell 能量梯度法,所用力场为 Tripos 力场,载 Gasteiger Huckel 电荷,能量收敛限定为 0.05 kcal·mol⁻¹。

3 分子叠合

分子叠合对建立三维构效模型有重要影响。当低能构象确定后,一般根据药效团进行分子叠合,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。本文以苯并二氮杂萘环为叠合点,对 32 个化合物进行了叠合(图 1),考察 1,4,7 和 8 位取代基对活性的影响。

Tab 2 Structures and activities of compounds 8 - 32 for CoMFA



No.	R1	R2	X	IC ₅₀ / μmol·L ⁻¹	- log IC ₅₀
8	H	2-biphenyl	CO	0.32	6.50
9	H	1-naphthalenyl	SO ₂	0.48	6.32
10	H	2-(phenylmethylamino)phenyl	CO	0.60	6.22
11	H	2-(methoxycarbonyl)phenyl	SO ₂	0.72	6.14
12	7-(pyrid-4-yl)	1-naphthalenyl	CO	15.4	4.81
13	8-NHCO-cyclohexyl	1-naphthalenyl	CO	18.1	4.74
14	8-NHCO-cyclohexyl	1-naphthalenyl	CO	28	4.55
15	8-NHCO-phenyl	1-naphthalenyl	CO	28.5	4.54
16	7-phenyl	1-naphthalenyl	CO	95	4.02
17	7-(pyrid-3-yl)	1-naphthalenyl	CO	145	3.84
19	7-(pyrid-2-yl)	1-naphthalenyl	CO	177	3.75
20	7-cyclohexyl	1-naphthalenyl	CO	186	3.73
21	7-Br	1-naphthalenyl	CO	228	3.64
22	9-Me	1-naphthalenyl	CO	350	3.46
23	8-Cl	1-naphthalenyl	CO	540	3.27
24	8-NH ₂	1-naphthalenyl	CO	1000	3.00
25	7-pyrid-4-yl	2-trifluoromethoxyphenyl	CO	24	4.62
26	7-phenyl	2-methoxynaphth-1-yl	CO	58	4.24
27	7-phenyl	4-methoxyphenyl	CO-CO	91	4.04
28	7-phenyl	2-(hydroxyethylthio)phenyl	CO	124	3.91
29	7-phenyl	1-naphthalenyl	SO ₂	426	3.37
30	7-phenyl	1-phenyltetrazol-5-yl	-	702	3.15
31	7-phenyl	4-chlorophenyl	C(NCN)NH	1423	2.85
32	7-phenyl	1-naphthalenyl	CH ₂	2968	2.53

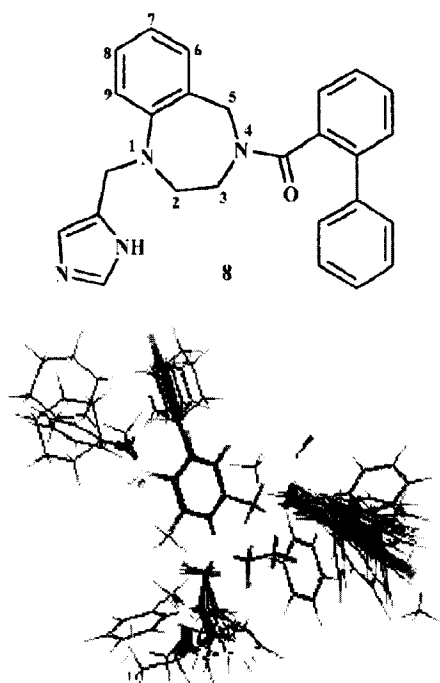


Fig 1 Model compound 8 and alignment of compounds 1 - 32

4 比较分子力场分析

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: -1.93—0.53 nm; Y: -1.12—0.83 nm; Z: -1.22—1.33 nm。探针原子行进步长为 0.2 nm, 最终分别以交叉验证(cross-validated)和非交叉验证(non 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 $4.8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。最终以 Spreadsheet 中的 ViewCoMFA 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, 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

比较分子力场分析得到的 CoMFA 模型的统计学参数为: 交叉验证相关系数 $R_{CV}^2 = 0.602$, 最佳主成分数为 6, 通常 $R^2 > 0.5$ 表明相应的变量建立的模型具有较好的预测能力。由最佳主成分数建立的 CoMFA 模型的非交叉验证相关系数 $R^2 = 0.958$, 标准偏差 SE(standard error) = 0.242, $F = 124.5$ 。用此 CoMFA 模型对 4 个化合物进行活性预测(表 3),

结果预测值与实测值相当。

Tab 3 Comparison of the values of predicted and measured activities

No	R ₁	R ₂	X	measure d/ - log IC ₅₀	predicted/ - log IC ₅₀
1	H	(C ₆ H ₅) ₂ NH	CO	5.921	5.454
2	8- NHCONH-	1- Naphthalenyl	CO	4.450	4.406
		cyclohexyl			
3	8- NHSO ₂ -	1- Naphthalenyl	CO	3.604	3.351
4	7- Phenyl	Tetrahydroquinol-	CO	3.688	3.875
		1-yl			

2 CoMFA 系数等势图

CoMFA 模型的系数等势图见图 2, 图中参照化合物为 8。绿色和黄色代表立体场对化合物活性的影响, 绿色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, 黄色则相反。红色和蓝色则表示静电场对活性的影响, 红色区域引入负电性基团有利于提高活性, 蓝色区域引入正电性基团有利于提高活性。从系数等势图可见苯并二氮杂萘环的苯环 7, 8, 9 位有两个黄色区域, 表明在该区域引入体积较大的基团不利于提高化合物的活性。化合物 12 - 32 分别在 7, 8, 9 位有不同取代基团, 由于增加了立体场作用, 与 8 比较这些化合物的活性有明显的降低。图中可见有 3 个绿色区域, 其中 1 个处于咪唑环附近, 说明咪唑环的立体场作用对该类化合物的活性有一定贡献。另两个绿色区域处于与 4 位氮间接相连的芳环附近, 说明在该区域增加立体场作用有利于提高活性。化合物 8 的芳基为联苯基, 其中 1 个苯环处于 1 个绿色区域内, 而化合物 9 - 12 的芳基部分不同程度的偏离绿色区域, 活性降低。化合物 25 - 28 的芳环上的取代基团处于绿色区域, 所以活性较 29 - 32 高。化合物 25 和 26 的取代基在邻位与绿色区域重叠较好, 活性比 27 高。化合物 28 的取代基虽在绿色区域, 但取代基

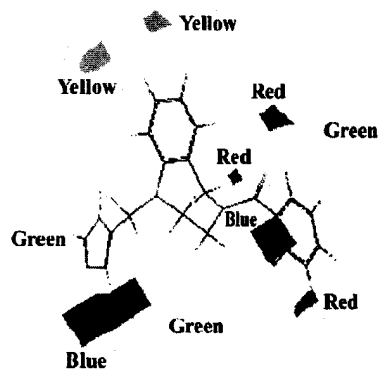


Fig 2 Coefficient contour maps

的末端羟基处于蓝色区域,这一负电性基团不利于活性的提高,所以 28 的活性低于 25。图 2 中与 4 位氮直接相连的羰基氧附近有一红色区域,表明该区域有负电性基团,有利于活性提高。化合物 29 和 16 分别由羰基和磺酰基与 4 位氮相连,负电性的氧原子处于红色区域内,有利于提高活性,而化合物 32 由亚甲基与之相连活性较 29 和 16 降低许多。

以上研究表明,本文建立的 CoMFA 模型有较高的交叉验证系数 R_{CV}^2 ,说明模型有较好的预测能力。此模型揭示了该类抑制剂分子的构效关系,映射受体的性质与实验结果一致。以此模型设计和预测高活性的结构类型化合物有一定可靠性。

REFERENCES:

- [1] Casey PJ, Solski PA, Der CJ, *et al.* p21 Ras is modified by a farnesyl isoprenoid [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(21): 8323 - 8327.
- [2] Hancock JF, Magee AI, Chilad JE, *et al.* All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated [J]. *Cell*, 1989, **57**(7): 1167 - 1177.
- [3] Schafer WR, Kim R, Sterne R, *et al.* Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in ras genes of yeast and humans [J]. *Science*, 1989, **245**: 379 - 385.
- [4] Ashby MN, King DS, Rine J. Endoproteolytic processing of a farnesylated peptide *in vitro* [J]. *Proc*

Natl Acad Sci USA, 1992, **89**(10): 4613 - 4617.

- [5] Ma Y-T, Rando RR. A microsomal endoprotease that specifically cleaves isoprenylated peptides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(13): 6275 - 6279.
- [6] Boyartchuk VL, Rine J. Roles of prenyl proteins in maturation of *Saccharomyces cerevisiae* α -factor [J]. *Genetics*, 1998, **150**(1): 95 - 101.
- [7] Otto JC, Kim E, Yong SG, *et al.* Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein specific protease [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(13): 8379 - 8382.
- [8] Barbacid M. The ras oncogene [J]. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**: 779 - 828.
- [9] Daniele M, Leonard, Judith S, *et al.* Ras farnesyltransferase inhibitors [J]. *Drugs of the Future*, 1999, **24**(10): 1099 - 1106.
- [10] Grammer RD, Patterson DE, Bunce JD. Comparative molecular field analysis (CoMFA) 1: effect of shape on binding of steroids to carrier proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 1988, **110**(18): 5959.
- [11] Huang CC, Casey PJ, Fierke CA. Evidence for a catalytic role of zinc in protein farnesyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**(1): 20 - 23.
- [12] Strickland CL, Windsor WT, Syto R, *et al.* Crystal Structure of farnesyl diphosphate analogue [J]. *Biochemistry*, 1998, **37**(47): 16601 - 16611.
- [13] Charles ZD, Roberta B, Rajeev B, *et al.* Discovery and structure-activity relationships of imidazole-containing tetrahydrobenzodiazepine inhibitors of farnesyltransferase [J]. *J Med Chem*, 1999, **42**(25): 5241 - 53.

THREE DIMENSIONAL QUANTITATIVE STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIP OF FARNESYL PROTEIN TRANSFERASE INHIBITORS

WAN Sheng-biao, YI Xiang, GUO Zong-ru

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

ABSTRACT: AIM To build a three dimensional structure model that correlates the biological activities and the structures of a series of farnesyl protein transferase (FPT) inhibitors exemplified by the compound of 2, 3, 4, 5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-4-(2-biphenylcarbonyl)-1H-1, 4-benzodiazepine. **METHODS AND RESULTS** Thirty-two FPT inhibitors with two types of scaffold were analyzed. Active conformations of which were studied using system search, a 3D-QSAR model were constructed using the method of comparative molecular field analysis (CoMFA). The resulting of cross-validated $R_{CV}^2 = 0.602$, non-cross-validated $R^2 = 0.958$, SE = 0.270 and F = 124.5 indicate that the 3D model possesses an ability to predict activities of new inhibitors. **CONCLUSION** The information of CoMFA model offers an approach to designing new FPT inhibitors.

KEY WORDS: farnesyl protein transferase (FPT); benzodiazepine; comparative molecular field analysis (CoMFA)