

NMDA受体甘氨酸位点拮抗剂的三维构效关系研究

王小芳, 黄牛, 屈凌波, 杨光中*

(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 NMDA 受体甘氨酸位点拮抗剂的三维构效关系(3D-QSAR)模型。方法和结果 使用比较分子场分析法(CoMFA)建立的 3D-QSAR 模型, 交叉验证回归系数 R^2_{cv} 、非交叉验证回归系数 R^2 和标准偏差 SEE 分别为 0.650, 0.940 和 0.330, 说明系列化合物分子周围立体场和静电场的分布与生物活性间存在良好的相关性。结论 所得模型较好的模拟了受体结合腔穴的立体和静电性质, 可用于综合解释已报道的甘氨酸位点拮抗剂构效关系研究结果, 并对文献中较少或较模糊的一些区域作了新的探讨, 可用来指导设计新的先导物分子。

关键词: NMDA 受体甘氨酸位点拮抗剂; 比较分子场分析法(CoMFA); 三维构效关系模型

中图分类号: R914.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2000)05-0347-06

NMDA 受体是一种与 Ca^{2+} 通道偶联的离子型兴奋性氨基酸(EAA)受体, 广泛存在于脊椎动物的中枢神经系统, 参与多种兴奋性突触传递, 其中甘氨酸位点是调节受体功能的一个重要靶点^[1,2]。

最早的 NMDA 受体甘氨酸位点拮抗剂是 1988~1989 年间发现的犬尿喹啉酸类衍生物^[3], 随后的研究又逐渐发现了四氢喹啉酸类、吡啶-2-羧酸类、喹啉二酮类和喹诺-2-酮类等十多种有甘氨酸位点拮抗活性的结构类型。对喹啉酸类的构效关系研究表明, 库仑相互作用的 A 区, 作为氢给体形成氢键的 B 区, 有一定体积限制的疏水作用的取代苯环 C 区, 以及分子右上方电荷-电荷相互作用的 D 区和大体积疏水作用的 E 区(图 1)对活性很重要。

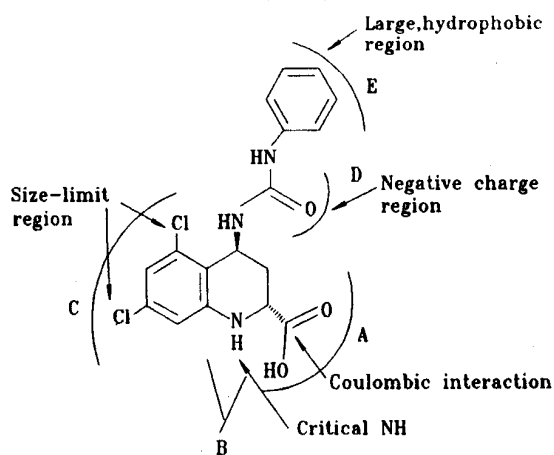


Fig 1 A pharmacophore model of antagonists at the glycine site of the NMDA receptor, the center molecule is L689,560

但是,不同结构类型,在各个区域内的性质要求又存在许多差异,如苯环上相应位置取代基的构效关系不同,犬尿喹啉酸类,喹啉二酮类等刚性平面骨架的小分子缺少右上方大体积取代基等。对此,不同的研究报告所进行的构效关系分析由于仅基于一类或几类结构骨架的分子,构效关系研究具有很大局限性,难以作出确切的解释。本文从已报道的各种结构类型的甘氨酸位点拮抗剂^[4~24]中选择疏水性、电性、立体性质及生物活性有较大变动范围的 133 个化合物,建立了一个较合理的 NMDA 受体甘氨酸位点拮抗剂的 3D-QSAR 模型,综合考察配体和受体结合时立体和电性的要求,可用来指导设计新的高活性化合物。

实验方法

所有工作均是在 SGI O₂ 图形工作站上,用 Tripos 公司提供的 SYBYL6.4 软件完成的。化合物在 SYBYL 的“Build/Edit”下构建,采用 Tripos 力场,荷载 Gasteiger Huckle 电荷,以 Maximin2 程序进行能量优化。选择结构特征较典型、活性较高的 L689,560 为模板分子进行分子叠合。围绕所有分子在“QSAR/CoMFA”模块中“自动建造”三维网格,以 sp^3 杂化的 C^+ 为探针原子,设定立体场和静电场效应能的阈值分别为 $20 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,计算分子周围立体场和静电场的场值。并采用偏最小二乘方法(partial least square, PLS),对分子周围分布的势场值与其生物活性进行回归分析,建立 CoMFA 模型。

计算过程中其他参数的设置除特别指明外均选

收稿日期: 1999-09-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29472083)

*联系人 Tel: (010) 63165249, Fax: (010) 63017757

取其缺省值。

1 化合物的选择

本文选取的 133 个化合物分属于 14 类不同的结构类型(图 2),均为选择性的 NMDA 受体甘氨酸位点拮抗剂,理化性质及生物活性有较大的跨度。化合物的拮抗活性用其与 NMDA 受体结合时对标记配体的竞争性抑制常数 K_i 表示,在 CoMFA 中使用它的负对数形式 PK_i 。 K_i 和 IC_{50} 的相互换算根据 Cheng-Prusoff 方程 $K_i = IC_{50} / (1 + S / K_m)$ 。

由于化合物来自不同实验小组并且测定时选用的标记配体不同,我们对活性数值进行了严格考察。收集的化合物中共使用 3 种标记配体: $[^3H]$ Gly, $[^3H]$ DCKA 和 $[^3H]$ L689,560 并且一般都是在各自建立的标准实验模型的条件下进行活性测

定^[25-27]。当同一化合物分别使用不同的标记配体进行药理评价时,得到的活性数值有以下对应关系^[26,27]:

$$PK_{i[3H]Gly} = PK_{i[3H]DCKA}$$

$$IC_{50[3H]Gly} = 2 \times IC_{50[3H]L689,560} \rightarrow PK_{i[3H]Gly} = PK_{i[3H]L689,560} - 0.28$$

因此,将相应的活性数据经过数学转换,均以 $PK_{i[3H]Gly}$ 表示,通过考察不同研究小组对共同对照样品的活性报告,确认所有数据具可比性,可以用于 CoMFA 分析。

为验证建立的 CoMFA 模型的预测能力,随机挑选了 18 个化合物,以余下的 115 个化合物建立的模型对其活性进行预测。

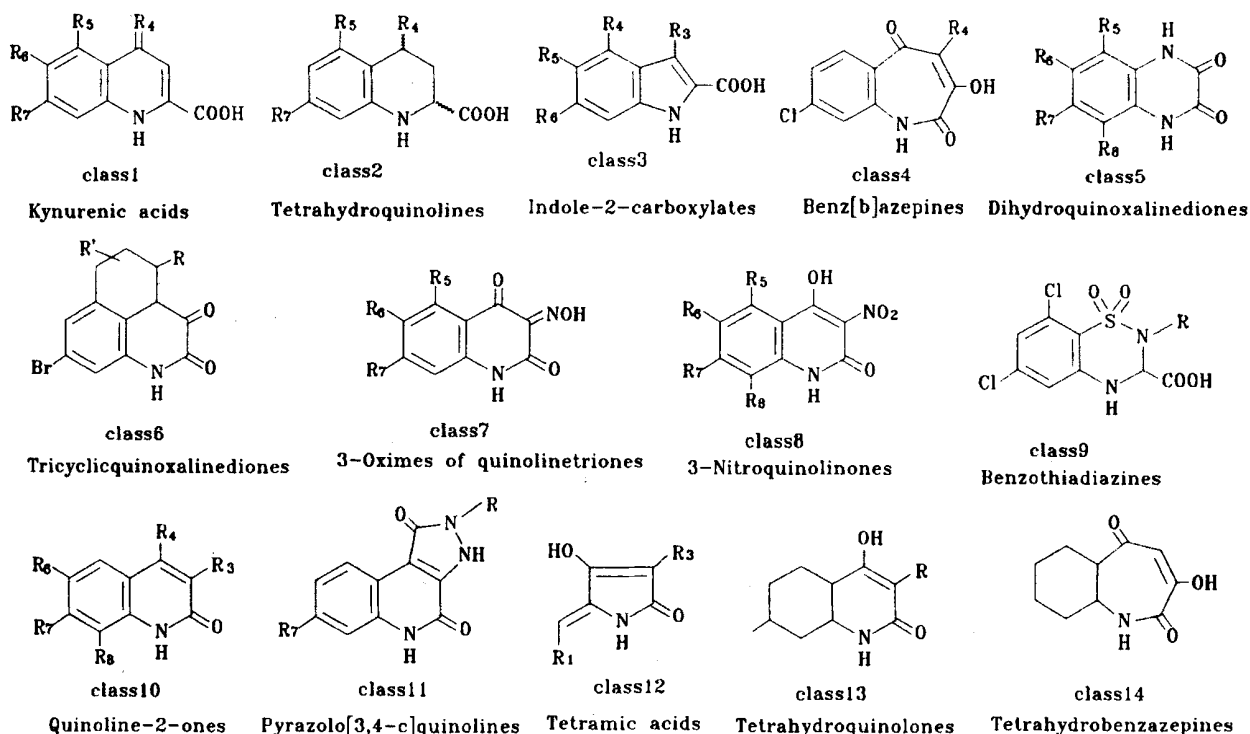


Fig 2 Structures of fourteen classes of antagonists at the glycine site of the NMDA receptor

2 活性构象的确定

确定活性构象是建立 CoMFA 分析的第一关键步骤。因受体结构未知,则以分子的最低能量构象作为最可能的药效构象。根据 Leeson 等^[7]对于结构典型的化合物 L689,560 及其类似物的核磁共振 (NMR) 和 X-ray 晶体衍射研究结果,确立了 L689,560 2-位羧酸为假 e 键,4-位取代为假 a 键的有利优势构象(图 3)。其他化合物的三维构象则以优化后

的 L689,560 为模板,根据力场相似性确定空间取向,经 Maximin2 程序进行能量优化后得到。

3 分子叠合

CoMFA 假设配体和受体通过静电作用、疏水作用、范德华力等相互作用,系列配体与受体之间的上述力场应有某种相似性,力场的大小及方向也应与生物活性值具有相关性。因此,对涉及多种结构类型的系列配体,需反复尝试确定一定的规则,使每一

个分子采取具有最大力场相似性的空间取向和位置,以保证得到的立体场和静电场的合理性。本文以活性、选择性都很高的化合物 L689,560 为模板分子,以星号(*)表示的方式进行叠合,通过研究 3 种不同的叠合方式(图 3),考察其交叉验证回归系

数及所得模型的残差分布,确定最佳叠合规则。对于没有稠合芳环的化合物(class12),为使其与模板分子 L689,560 的力场差别最小,采用其氢键相互作用的 N 原子,羧基 C 和 C4 原子分别与 L689,560 的 N1,羧基 C 和 C4 进行叠合。

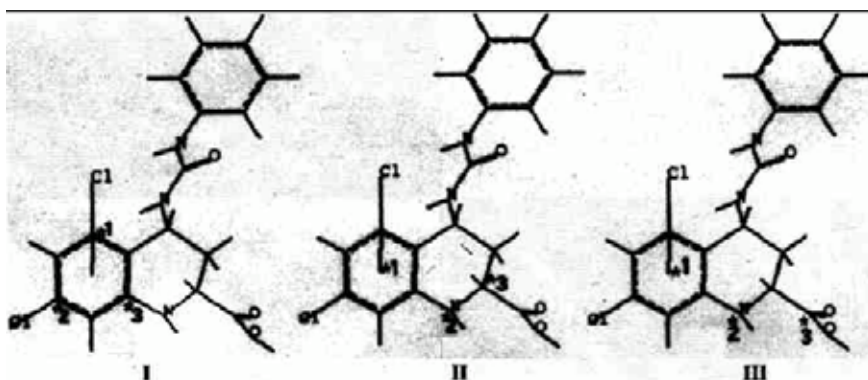


Fig 3 Three different modes of superimposition selected for CoMFA analysis

结 果 与 讨 论

1 叠合方式的优化

为建立多种不同结构类型化合物的统一的 CoMFA 模型,分子叠合的选择和优化是至关重要的。本文考察了 3 种不同的叠合方式,所得的 PLS 分析结果如表 1 所示。

Tab 1 PLS results based on three different superimpositions

	Crossvalidation		Non-crossvalidation		
	R ² _{cv}	opt. comp	R ²	SEE	F
Rule I	0.574	4	0.820	0.564	125.687
Rule II	0.487	6	0.892	0.441	149.225
Rule III a	0.621	6	0.904	0.417	169.138
b	0.650	7	0.940	0.330	240.133

R²_{cv} is crossvalidation standard error; opt. comp is optimal number of components; R² is non-crossvalidation correlation coefficient; SEE is standard deviation of estimate; F is the value of F test

方式(IIIa)的交叉验证值 R²_{cv} 明显高于方式(I)和(II),提示以方式(IIIa)叠合所建立的模型具有较好的预测能力。然而,进一步考察其预测值和实测值之间的残差分布相关图,却发现最大偏差值达 1.97,且偏差大的化合物主要集中于喹啉二酮类、三环喹啉二酮类及 3-脲-喹诺酮类等化合物。由于这些化合物,特别是喹啉二酮类化合物,其稠

合苯环上相应取代基的构效关系明显不同于其他结构类型如犬尿喹啉酸类化合物等所显示的 5-I,7-Cl 的最佳组合,因此推测这些化合物叠合时分子定位不理想。考虑到这些化合物分子具有烯醇式 β-二酮结构并进而形成非定域阴离子结构,其 2,3-二酮(或脲)均可与受体相应部位的正电区作用,因此取其 C2, O2, C3, O3(或 N3)四原子质心作为新的叠合原子 * 3,重新进行叠合(IIIb)后显示苯环上相应取代基的空间取向及位置与犬尿喹啉酸类不再相同(图 4),且交叉验证值提高到 R²_{cv} = 0.650,化合物的活性预测偏差大大减小,说明改变后的分子力场定位合理,此叠合方式所建立的模型较好的模拟了受体结合腔穴的立体和静电性质。

2 CoMFA 模型的评价和解释

用 PLS 验证和建立的 CoMFA 模型,其交叉验证值 R²_{cv} = 0.650,最佳组分数为 7,以最佳组分数作为非交叉验证的主因子数,所得传统相关系数 R² = 0.940, F_{7,107} = 240.133,标准偏差 SEE = 0.330,立体场和静电场对构效方程的贡献分别为 42.5% 和 57.5%,说明系列化合物周围立体场和静电场的分布与其生物活性间存在良好的相关性,配体与受体的静电场作用强于立体场。图 5 给出了 CoMFA 模型对化合物预测活性与实测活性之间的相关图。

用建立的模型预测随机挑选出来的另外 18 个化合物的活性,偏差在 0.018 ~ 0.536 对数单位之间,提示该模型具有较好的活性预测能力。

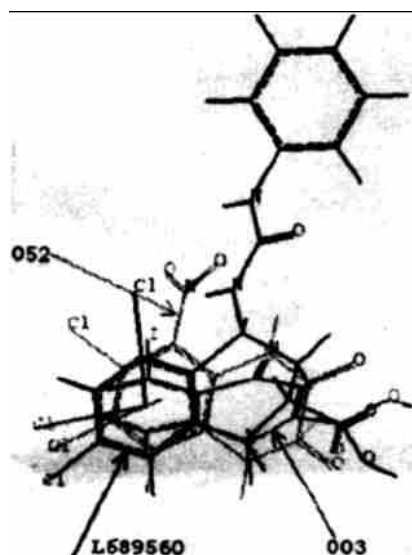


Fig 4 Superimposition of compounds L689, 560, 5-I, 7-Cl kynurenic acid and 5, 7-dichloride dihydroquinoxaline diones

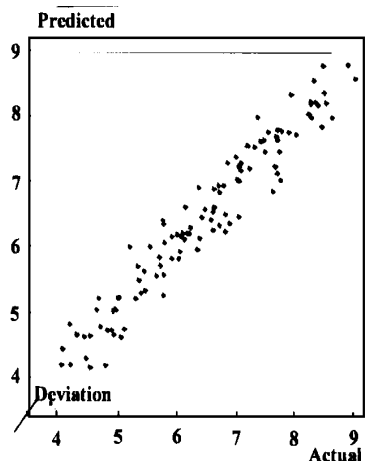


Fig 5 Actual vs predicted activities of 115 compounds from CoMFA model

由于参与 CoMFA 分析的自变量大大多于因变量,非交叉验证结果难以用简单的函数方程式表示,因而采用直观的等势面系数图,分别代表立体场和静电场的分布和对活性的贡献。如图 6 显示,立体场系数图中,绿色区域表示增加取代基的体积有利于化合物与受体结合,黄色区域则提示不宜有大的取代基;静电场系数图中,红色区域表示该位置的负电荷有利于活性,蓝色区域则表示提高正电性有利于结合。由此可见,CoMFA 等势面系数图所映射的结合部位的性质基本囊括了目前已报道的 NMDA 受体甘氨酸位点拮抗剂的构效关系研究,在一定程度上反映了受体结合部位的拓扑特征和理化性质。

3 有关 3D QSAR 的新信息

以化合物 L689, 560, 5-碘, 7-氯犬尿喹啉酸和 5, 7-二氯喹啉二酮作为参照分子置于系数图中,结合分子结构特征,研究发现,犬尿喹啉酸类化合物和喹啉二酮类化合物苯环上相应取代基周围立体场和静电场的环境确实不同。犬尿喹啉酸类化合物的 5 位, 7 位取代基均处于黄色区域,有较大的立体位阻;而喹啉二酮类化合物的 5 位, 7 位取代却处于绿色区,可容纳相对较大的取代基。由此可以解释其构效关系的差异,并再次验证了分子叠合方式的合理性。

另外,苯环周围分布大块红色区域,可能表示取代基的拉电子性质,但一些较高活性的化合物,其苯环上取代基的拉电子性质并不很强而且有时并非必要的^[12],提示可能相邻苯环区的电子云密度可以降低。这与新近报道的苯环部分饱和或不合苯环的化合物如 class12 等仍具一定活性相符合。因此受体对拮抗剂分子中大的平面疏水苯环的要求是否必要,或这种要求的严格程度,还需继续考察。

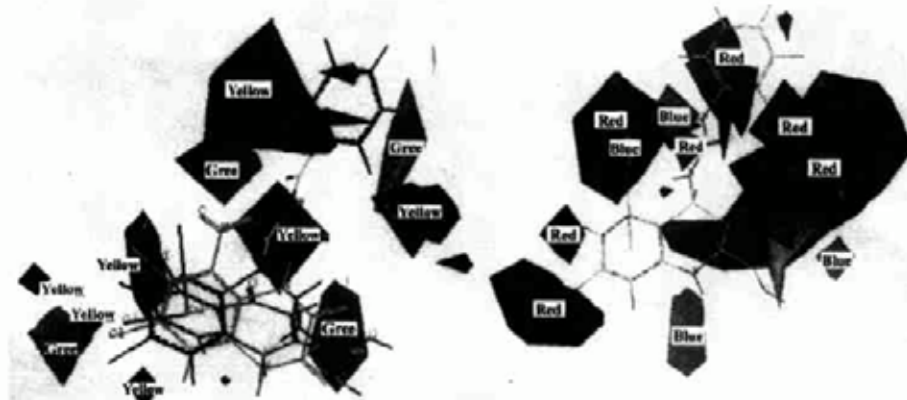


Fig 6 CoMFA contour plot from PLS analysis

对于分子平面右上方大体积疏水区域(E区), 考虑到如犬尿喹啉酸类化合物 5-碘, 7-氯犬尿喹啉酸及喹啉二酮类化合物 5, 7-二氯喹啉二酮等, 虽然缺少此活性位点, 但仍具有很高的活性, 因此, 取缺少此区的 class1 和 class5 化合物建立 CoMFA 模型, 其交叉验证值 $R^2_{cv} = 0.557$, 说明建立的模型是有效的, 此区可能是作为受体腔穴的次级作用点存在或是对相邻区域(D区)电荷-电荷相互作用的补充而增加亲和性。

以上研究表明, 通过对系列配体进行相应的 atom to atom 叠合, 能够近似地反映分子之间场的相似性, 以此建立的模型具有较好的预测能力, 在一定程度上模拟了受体结合腔穴的立体和静电性质, 可用于指导设计新的 NMDA 受体甘氨酸位点拮抗剂分子。

致谢 本所郭宗儒教授在 CoMFA 模型的建立和解释方面, 提供了许多宝贵意见。

参考文献:

- [1] Paul DL, Leslie LI. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential [J]. *J Med Chem*, 1994, **37**: 4053.
- [2] Hargreaves RJ, Rigby M, Smith D, et al. Competitive as well as uncompetitive N-methyl D-aspartate receptor antagonists affect cortical neuronal morphology and cerebral glucose metabolism [J]. *Neurochem Res*, 1993, **18**: 1263.
- [3] Birth PJ, Grossman CJ, et al. Kynurenic acid antagonists responses to NMDAA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor [J]. *Eur J Pharmacol*, 1988, **154**: 85.
- [4] Boyd LH, Bruce MB, Diane MC, et al. 4-[(Carboxymethyl)oxy] and 4-[(carboxymethyl)amine] 5, 7-dichloroquinoline-2-carboxylic acid: new antagonists of the strychnine-insensitive glycine binding site on the N-methyl D-aspartate receptor complex [J]. *J Med Chem*, 1990, **33**: 3130.
- [5] Paul DL, Raymond B, Robert WC, et al. Kynurenic acid derivatives. Structure-activity relationships for excitatory amino acid antagonism and identification of potent and selective antagonists at the glycine site on the N-methyl D-aspartate receptor [J]. *J Med Chem*, 1991, **34**: 1243.
- [6] Robert WC, Paul DL, Angela MM, et al. 2-Carboxy-tetrahydroquinolines. Conformational and stereochemical requirement for antagonism of the glycine site on the NMDA receptor [J]. *J Med Chem*, 1992, **35**: 1942.
- [7] Paul DL, Robert WC, Kevin WM, et al. 4-Amino-2-carboxy-tetrahydroquinolines. Structure-activity relationships for antagonism at the glycine site of the NMDA receptor [J]. *J Med Chem*, 1992, **35**: 1954.
- [8] Francesco GS, Boyd LH, Bruce MB, et al. 3-(2-Carboxyindol-3-yl) propionic acid-based antagonists of the N-methyl D-aspartate acid receptor associated glycine binding site [J]. *J Med Chem*, 1992, **35**: 1791.
- [9] Nancy MG, Michael SD, Brian KC, et al. Novel indole-2-carboxylates as ligands for the strychnine-insensitive N-methyl D-aspartate-linked glycine receptor [J]. *J Med Chem*, 1992, **34**: 1283.
- [10] Romano DF, Anna MC, Nadia C, et al. Substituted indole-2-carboxylates as *in vivo* potent antagonists acting as the strychnine-insensitive glycine binding site [J]. *J Med Chem*, 1997, **40**: 841.
- [11] Paul FJ, Timothy WD, Laura G, et al. Synthesis and biological activity of a series of 4-aryl substituted benz[b]azepines: antagonists at the strychnine-insensitive glycine site [J]. *Bio Med Chem Lett*, 1995, **5**: 3097.
- [12] Cai SX, Sunil MK, Zhou ZL, et al. Structure-activity relationships of alkyl- and alkoxy-substituted 1, 4-dihydroquinoxaline-2, 3-diones: potent and systemically active antagonists for the glycine site of the NMDA receptor [J]. *J Med Chem*, 1997, **40**: 730.
- [13] Cai SX, Zhou ZL, Huang JC, et al. Synthesis and structure-activity relationships of 1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline-2, 3, 4-trione-3-oximes: Novel and highly potent antagonists for NMDA receptor glycine site [J]. *J Med Chem*, 1996, **39**: 3248.
- [14] Nagata R, Tanno N, Kodo T, et al. Tricyclic quinoxalinediones: 5, 6-dihydro-1H-pyrrolo[1, 2, 3-de]quinoxaline-2, 3-diones and 6, 7-dihydro-1H, 5H-pyrrolo[1, 2, 3-de]quinoxaline-2, 3-diones as potent antagonists for the glycine binding site of the NMDA receptor [J]. *J Med Chem*, 1994, **37**: 3956.
- [15] Nagata R, Ae N, Tanno N. Structure-activity relationships of tricyclic quinoxalinediones as potent antagonists for the glycine binding site of the NMDA receptor [J]. *Bio Med Chem Lett*, 1995, **5**: 1527.
- [16] Cai SX, Zhou ZL, Huang JC, et al. Structure-activity relationships of 4-hydroxy-3-nitroquinolin-2(1H)-ones as novel antagonists at the glycine site of N-methyl D-aspartate receptors [J]. *J Med Chem*, 1996, **39**: 4682.
- [17] Jimonet P, Audiau F, Aloup JC, et al. Synthesis and SAR of 2H-1, 2, 4-benzothiadiazine-1, 1-dioxide-3-carboxylic acid derivatives as novel potent glycine antagonists of the NMDA receptor-channel complex [J]. *Bio Med Chem Lett*, 1994, **4**: 2735.
- [18] Michael R, Paul DL, Graeme IS, et al. 3-Acyl-4-hydroxyquinolin-2(1H)-ones. Systemically active anticonvulsants acting by antagonism at the glycine site of the N-methyl D-aspartate receptor complex [J]. *J Med Chem*, 1993, **36**: 3386.
- [19] Janusz JK, Raymond B, Neil RC, et al. 3'-(Arylmethyl)- and 3'-(aryloxy)-3-phenyl-4-hydroxyquinolin-2(1H)-ones: Orally active antagonists of the glycine site

- on the NMDA receptor [J]. *J Med Chem*, 1994 ,**37**: 1402 .
- [20] Robert WC, Paul DL, Kevin WM, *et al*. 4-Substituted-3-phenylquinolin-2(1H)-ones: Acidic and nonacidic glycine site of the N-methyl-D-aspartate antagonists with *in vivo* activity [J]. *J Med Chem*, 1997 ,**40**: 754 .
- [21] Angus MM, Sarah G, Cheryl B, *et al*. Identification of 3,5-dihydro-2-aryl-1H-pyrazolo[3,4-c]quinoline-1,4(2H)-diones as novel high affinity glycine site N-methyl-D-aspartate antagonists [J]. *J Med Chem*, 1995 ,**38**: 2239 .
- [22] Ian MM, Janusz JK, Paul DL, *et al*. Tetramic acids as novel glycine site antagonists [J]. *Bio Med Chem Lett*, 1995 ,**5**: 2643 .
- [23] Michael R, Paul L, Sarah G, *et al*. 5,6,7,8-tetrahydroquinolones as antagonists at the glycine site of the NMDA receptor [J]. *Bio Med Chem Lett*, 1995 ,**5**: 2089 .
- [24] Anthony PG, Edward RW, Richard MW, *et al*. Synthesis of racemic 6,7,8,9-tetrahydro-3-hydroxy-1H-1-benzazepine-2,5-diones as antagonists of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors [J]. *J Med Chem*, 1997 ,**40**: 2424 .
- [25] Bristow DR, Bowery NG, Woodruff GN. Light microscopic autoradiographic localisation of [³H]glycine and [³H]strychnine binding sites in rat brain [J]. *Eur J Pharmacol*, 1986 ,**126**: 303 .
- [26] Canton T, Doble A, Miquet JM, *et al*. A rapid filtration assay for the glycine binding site on the NMDA receptor in rat cortical membranes using [³H]dichlorokynurenic acid [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1992 ,**44**: 812 .
- [27] Shrah G, Angela MM, Robert WC, *et al*. Characterization of the binding of [³H]L689,560, an antagonist for the glycine site on the N-methyl-D-aspartate receptor, to rat brain membranes [J]. *Mol Pharmacol*, 1992 ,**41**: 913 .

STUDIES ON THE THREE DIMENSIONAL QUANTITATIVE STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIP OF ANTAGONISTS AT THE GLYCINE SITE OF THE N-METHYL-D ASPARTATE RECEPTOR

WANG Xiao Fang, HUANG Niu, QU Ling Bo, YANG Guang Zhong

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

ABSTRACT: **AIM** To develop a 3D-QSAR model and gain further insights into the common requirements for the binding of structurally diverse antagonists at the glycine site of the NMDA receptor. **METHODS AND RESULTS** Based on comparative molecular field analysis (CoMFA), a predictive pharmacophore model was established. The correlation between the activities and structures was significant with cross-validated value (R^2_{cv}), non-cross-validated value (R^2) and standard error of estimate (SEE) of 0.650, 0.940 and 0.330, respectively. **CONCLUSION** The obtained model successfully mimics the steric and electrostatic environment around ligands interacting with the receptor. It would contribute to the understanding of the pharmacology of antagonists at the glycine site of the NMDA receptor and direct designation of novel potent lead molecules.

KEY WORDS: NMDA receptor antagonists; comparative molecular field analysis; 3D-QSAR model