

Օրիգինալ հոդվածներ • Оригинальные статьи • Original articles

Биолог. журн. Армении, 1-2 (57), 2005

УДК 577.153

**НОВЫЕ ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗ НА
ОСНОВЕ АМИНОЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ
 α,β -ДЕГИДРОАМИНОКИСЛОТ**

А.А. ГРИГОРЯН*, А.А. АМБАРЦУМЯН*, М.В. МКРТЧЯН, В.О. ТОПУЗЯН**,
Г.П. АЛЕБЯН***

*НИИ Биотехнологии, 375056, Ереван

**Институт тонкой органической химии им. А.Л. Миндзосяна НАН РА,
375014, Ереван

Синтезированы новые обратимые ингибиторы холинэстераз - диметиламиноэтиловые и 2-гексаметиламиноэтиловые эфиры N-замещенных α,β -дегидроаминокислот и их соответствующие четвертичные аналоги, всего 20 соединений. Определены значения IC_{50} для эритроцитарного АХЭ и плазменного БуХЭ человека. Показано, что эфиры, гексаметиламиноэтиловые производные, практически во всех случаях являются более сильными ингибиторами. Все соединения являются от 30 до 700 раз более специфичными к БуХЭ ингибиторами. Константы ингибирования одного из наиболее сильных ингибиторов (йодметилат гексаметиламиноэтилового эфира N-(2-метоксибензоил)- α,β -дегидрофенилаланина) для АХЭ имеют значения $K_i=11,48\pm 0,96$ мкМ и для БуХЭ - $K_i=0,127\pm 0,046$ мкМ; $K_i'=0,240\pm 0,08$ мкМ.

Սինթեզված են քլինիկական նպատակներով դարձելի նոր արգելակիչներ՝ N-սեղակալված α,β -դեհիդրոամինոէթիլների դիմեթիլամինոէթիլ և 2-հեքսամեթիլամինոէթիլ էստերներ, ընդհանուր թվով 20 միացություններ: Մարդու արյան էրիթրոցիտների Սևտ և պլազմայի Բուխտ համար որոշվել են դրանց IC_{50} արժեքները: Ցույց է տրվել, որ հեքսամեթիլամինոէթիլ ածանցյալներին պատկանող էստերները զորոճականում համարյա բոլոր դեպքերում հանդիսանում են առավել ուժեղ արգելակիչներ: Այս միացությունները ավելի բարձր ընտրողականություն (30-700 անգամ) են ցուցաբերում Բուխտ-ի, քան Սևտ-ի նկատմամբ: Ուսումնասիրված միացություններից ամենաուժեղ արգելակիչի համար (N-(2-մեթօքսիբենզոիլ)- α,β -դեհիդրոֆենիլալանինի հեքսամեթիլամինոէթիլ էստերի յոդմեթիլատ) որոշվել են արգելակման հաստատունները՝ $K_i=11,48\pm 0,96$ մկМ (Սևտ) և $K_i=0,127\pm 0,046$ մկМ; $K_i'=0,240\pm 0,08$ մկМ (Բուխտ):

A set of 20 new reversible inhibitors of cholinesterase - dimethylaminoethyl and 2-hexamethylaminoethyl esters of N-substituted α,β -dehydroamino acids and their corresponding quaternary analogs were synthesized. The inhibiting potency of the mentioned compounds was tested by measuring IC_{50} values for human red cell acetylcholinesterase and human plasma butyrylcholinesterase. It was shown that esters of 2-hexamethylaminoethyl alcohol were stronger inhibitors almost in any case. All compounds were more selective (30 - 700 times) inhibitors for BuChE. The inhibition constant values of one of the strongest compound (methyl iodide salt of hexamethylaminoethyl ester of N-(2-methoxybenzoyl)- α,β -dehydrophenylalanine) were evaluated for AChE ($K_i=11,48\pm 0,96$ mkM) and BuChE ($K_i=0,127\pm 0,046$ mkM; $K_i'=0,240\pm 0,08$ mkM), respectively.

*Ацетилхолинэстераза - бутирилхолинэстераза-аминоэфиры
 α,β -дегидроаминокислот - обратимые ингибиторы холинэстераз
- значения IC_{50}*

Хорошо известно, что многие лекарственные препараты конструированы исходя из структуры ацетилхолина — химического компонента передачи нервного импульса. Препараты, конструированные исходя из этой модели, в настоящее время широко применяются в медицинской практике для лечения таких заболеваний, как паркинсонизм, болезнь Альцгеймера, старческое слабоумие различного происхождения, миастения Гревиса, некоторые сердечные заболевания, глаукома, язвы желудочно-кишечного тракта, а также в качестве миорелаксантов при хирургических вмешательствах [2]. Эти соединения в большинстве своем являются или обратимыми ингибиторами, или очень плохими субстратами холинэстераз. Типичными примерами препаратов — обратимых ингибиторов, являются арпенал, кватерон, мебедрол, а субстратов — дитилин и мивакуриум.

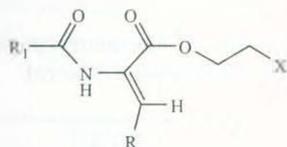
Поиск и разработка новых лекарственных средств в основном нацелены на создание препаратов, которые отличаются от своих предшественников избирательностью, эффективностью, минимальным проявлением побочных действий и т.д. Задача отбора перспективных веществ значительно облегчается, если проводится предварительная оценка их сродства к холинэстеразам. Как правило, высокие значения сродства к ацетилхолин эстеразе (АХЭ) и/или бутирилхолин эстеразе (БухЭ) являются показателями, которые позволяют ожидать высокую активность этих веществ в качестве лигандов холинэргической системы организма.

Ранее нами было показано, что вещества, синтезированные с включением в кислотный фрагмент ацетилхолина N-ацилированных аминокислот, являются субстратами БухЭ и обратимыми ингибиторами АХЭ [3]. В дальнейшем было выявлено, что замена фрагмента N-ациламино кислоты N-замещенной α,β -дегидроаминокислотой приводит к практически полной потере способности холинэстераз гидролизовать эти соединения [1]. Таким образом, был найден ранее не изученный класс соединений, на основании которых целесообразно конструировать новые обратимые ингибиторы холинэстераз. На наш взгляд, проведение исследований в направлении синтеза новых соединений аминоэфиров дегидроаминокислот может оказаться полезным также в поиске лекарственных средств для лечения болезни Альцгеймера и родственных заболеваний, особенно если учитывать современную точку зрения относительно непосредственной причастности не только АХЭ, но и БухЭ к данной патологии [5,10].

В настоящем сообщении приведены результаты сравнительного изучения взаимодействия диметиламиноэтиловых и 2-гексаметиламиноэтиловых эфиров N замещенных α,β -дегидроаминокислот и их четвертичных аналогов с эритроцитарной АХЭ и плазменной БухЭ человека.

Материал и методика. Синтез аминоэфиров N-замещенных α,β -дегидроаминокислот (структурные формулы приведены ниже) проведен согласно методу [4].

Биохимическая часть. В работе применялись АХЭ из эритроцитов [8] и БуХЭ высокой степени очистки из сыворотки крови человека, последняя была любезно предоставлена Локридж [9].



R и R₁ приведены в таблице 1.

Скорость холинэстеразного гидролиза ацетилтиохолина измеряли по модифицированному методу Элмана [7]. Реакционная среда в 2,5 мл конечного объема содержала реагенты в следующих концентрациях: фосфатный буфер 0,1М, pH 7,6, 5,5'-дितिобис-2-нитробензойная кислота (ДТНБ) 0,4 мМ, ацетилтиохолин 0.1 мМ, фермент в необходимом количестве и исследуемый ингибитор в различных концентрациях. Реакцию проводили в термостатируемой ячейке спектрофотометра "Specord UV-Vis" (ГДР) при температуре 25°. Расчет констант ингибирования (K_i и K_i') проводили по компьютерной программе Microsoft Excel на основе многомерного линейного регрессионного анализа по аналогии с подходом, примененном в [6]. *Молекулярное моделирование.* Для определения взаимосвязи структура-активность исследуемых соединений были рассмотрены некоторые параметры изолированных молекул эффикторов. Расчеты по минимизации энергий внутримолекулярных связей были проведены компьютерными программами MM2 и МОРАС, а визуализация конечных результатов произведена на основе программы Rупol.

Результаты и обсуждение. Для синтеза новых обратимых ингибиторов на основе α,β -дегидроаминокислот в качестве спиртовых фрагментов нами были выбраны два типа спиртов-диметиламиноэтанол и 2-гексаметиламиноэтанол и их кватернизированные аналоги. Первый из них, как известно, является третичной формой холина, а структура второго аминок спирта подобрана исходя из структуры галантамина. Галантамин - природный алкалоид, выделенный из клубней подснежника Воронова, является одним из сильнейших обратимых ингибиторов холинэстераз и применяется в медицинской практике при миастении, прогрессивной мышечной дистрофии, при остаточных явлениях после нарушения мозгового кровообращения и др [1]. Наш предыдущий опыт дал нам основание ожидать, что вещества, синтезированные с использованием фрагмента галантамина, должны иметь высокую активность в качестве обратимых ингибиторов холинэстераз.

Для всех синтезированных соединений определены значения IC_{50} (концентрация исследуемого ингибитора, при которой наблюдается 50%-ное торможение скорости холинэстеразного гидролиза 0,1 мМ АТХ) для эритроцитарной АХЭ и для плазменной БуХЭ человека (табл. 1).

Приведенные в табл. 1 результаты показывают, что все третичные аналоги холина являются значительно более слабыми ингибиторами для АХЭ, чем сами холиновые эфиры, а в случае БуХЭ такая разница отсутствует (кроме – серия № 4, ряд 1). Несколько иначе ведут себя 2-гексаметиламиноэтиловые эфиры - третичные аминок эфиры для АХЭ являются несколько более сильными ингибиторами, чем их четвертичные формы, а для БуХЭ картина аналогична наблюдаемой для соединений первого ряда. Во всех

рассматриваемых случаях при переходе от производных диметиламиноэтанола к производным 2-гексаметиламиноэтанола в основном наблюдается резкое увеличение ингибирующей силы соединения как по отношению к АХЭ, так и по отношению к БуХЭ. Все соединения являются более специфичными ингибиторами БуХЭ.

Таблица 1. Значения IC_{50} (мкМ) исследованных соединений для эритроцитарной АХЭ и плазменной БуХЭ человека (остальные условия приведены в тексте).

№ серии	R ₁	R	Состояние атома азота	Ряд 1			Ряд 2		
				АХЭ (А)	БуХЭ (В)	А/В	АХЭ (А)	БуХЭ (В)	А/В
1.	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	Трет.	1330	2,90	458,6	95,0	0,48	198
			Четв.	386,0	3,10	124,5	158	0,40	395
2.	2-BrC ₆ H ₄	C ₆ H ₅	Трет.	690,0	1,00	690,0	72,0	0,30	240
			Четв.	167,0	0,72	231,9	180	0,44	409
3.	4-BrC ₆ H ₄	C ₆ H ₅	Трет.	462,0	16,0	28,90	82,0	1,32	62,1
			Четв.	390,0	16,0	24,40	86,0	2,00	43,0
4.	2-CH ₃ OC ₆ H ₄	C ₆ H ₅	Трет.	250,0	0,70	357,1	4,50	0,10	45,0
			Четв.	29,00	0,16	181,3	34,0	0,40	85,0
5.	C ₄ H ₆ O'	C ₄ H ₆ O'	Трет.	1840	12,0	153,3	106	0,52	204
			Четв.	185,0	9,20	20,11	340	0,85	400

Примечание: Приведены средние значения IC_{50} , среднеарифметическая погрешность – не более 15 %; * фурил

Вариация заместителей (R₁) во всех случаях приводит к ощутимым изменениям как значений IC_{50} , так и соотношений А/В. Более детальное исследование одного из сильных ингибиторов – серия № 4, ряд 2 четвертичная форма, показало, что он является конкурентным для АХЭ ($K_i=11,48\pm 0,96$ мкМ) и принадлежит к смешанному типу для БуХЭ ($K_i=0,127\pm 0,046$ мкМ; $K'_i=0,240\pm 0,08$ мкМ).

Таким образом, как показывают полученные результаты, синтез аминоэфиров α,β -дегидроаминокислот в качестве обратимых ингибиторов холинэстераз с использованием структурного фрагмента галантамина является плодотворным подходом.

Для выявления структурных особенностей диметиламиноэтиловых и 2-гексаметиламиноэтиловых производных α,β -дегидроаминокислот нами произведены расчеты, направленные на определение наиболее стабильных форм изолированных молекул изученных соединений. Результаты визуализации произведенных расчетов на примере четвертичных аминоэфиров из серии № 4 приведены на рис. 1. Как видно из приведенных изображений, при переходе от одного типа эфира к другому в пространственных структурах изученных веществ резких изменений не наблюдается.

Следовательно, только пространственные структуры изолированных молекул в обсуждаемом случае не могут служить основой для поиска

объяснений различных ингибирующих свойств данных веществ. По этой причине нам кажется целесообразным в дальнейшем компьютерное моделирование проводить в направлениях, учитывающих особенности каталитических поверхностей АХЭ и БуХЭ с привлечением докинг программ типа Autodock и Autogrid, а также программ и методов кванто-химических расчетов.

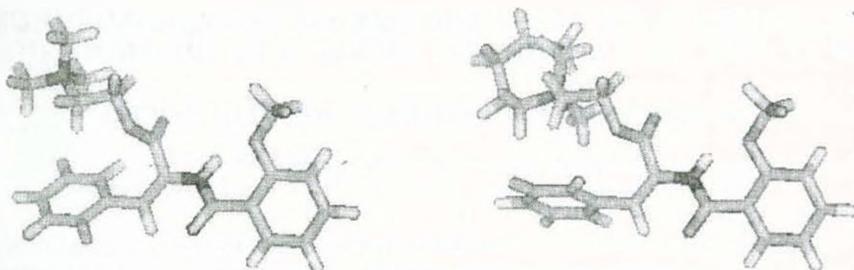


Рис. 1. Пространственное строение веществ из серии № 4: а - холиновый и б - четвертичная соль 2-гексагидроазепинэтилового эфира.

Поскольку в изученных рядах обоих типов эфиров наблюдаются непредсказуемые изменения сродств изученных производных к холинэстеразам, вероятно, дальнейшие поиски эффективных обратимых ингибиторов являются вполне перспективными.

Авторы выражают благодарность О. Локридж (Университет медицинского центра штата Небраска, США) за любезное предоставление высокоочищенной БуХЭ из плазмы человека, а также за полезные обсуждения, ценные советы и постоянную поддержку в ходе выполнения работы.

Данная работа проведена в рамках гранта Американского Фонда Гражданских Исследований и Развития (CRDF) № АВ2-2301-УЕ-02 (руководители проекта - О. Локридж, Г.П. Алебян).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алебян Г.П., Топузьян В.О. Тез. докл. Химическая наука Армении на пороге XXI века, Ереван, 112, 2000.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Новая Волна, Москва, в 2 томах, 2001.
3. Топузьян В.О., Алебян Г.П., Мнджоян О.Л. Хим.-фарм. журн., 18(7), 798-802, 1984.
4. Топузьян В.О., Несунц А.С., Пароникян Р.Г. и др, Хим.-фарм. журн., 31(1), 21-24, 1997.
5. Ballard C.G., McKeith I.G. and O'Brien K. Neurology, 58, 43, 2002.
6. Cornish-Bowden A. Principles of enzyme kinetics. Butterworth & Co. 1976.
7. Ellman G.L., Coutney K.D., Andres V. Jr and Feather-Stone R.M. Biochem. Pharmacol., 7, 88-95, 1961.
8. Fairbanks G., Steck T.L. and Wallach D.F. Biochemistry, 10(13), 2606-2617, 1971.
9. La Du B.N., Bartels C.F., Nogueria C.P. et al. Clin. Biochem., 23, 423-431, 1990.
10. Yu Q.S., Holloway H.W., Utsuki T. et al. J. Med. Chem., 42, 1855-1861, 1999.

Поступила 24.XII.2004