



УДК 577.152.314.042:547.241

© 1990 г.

*В. В. Куусек, И. В. Морозова, Р. С. Агабекян,  
А. Ю. Аксиченко, Т. А. Епашина, В. Б. Соколов,  
Н. В. Ковалева, А. Н. Раздольский, В. И. Фетисов,  
И. В. Мартынов*

**ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ  
ФТОРСОДЕРЖАЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ  
 $\alpha$ -АМИНОФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ**

*Институт физиологически активных веществ АН СССР,  
Черноголовка Московской обл.*

Синтезирован ряд *O,O*-диэтил-1-(*N*- $\alpha$ -гидрогексафторизобутирил)аминоалкилфосфонатов, и изучено их взаимодействие с ацетилхолинэстеразой эритроцитов крови человека и бутирилхолинэстеразой сыворотки крови лошади. Рассчитаны константы скорости необратимого ингибирования и константы диссоциации фермент-ингибиторного комплекса. Методом молекулярной механики и корреляционным анализом количественной связи структура — активность (КССА) построен ряд количественных моделей взаимодействия ингибитора с ферментом, включающих в себя учет как гидрофобных, так и расчетных стерических факторов. На основании сопоставления моделей КССА сделан вывод об определяющей роли гидрофобных взаимодействий в связывании аминоалкилфосфонатов с активным центром ацетилхолинэстеразы, в то время как во взаимодействии изучаемых ингибиторов с бутирилхолинэстеразой определяющую роль играют стерические факторы.

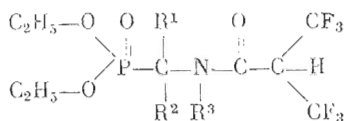
Интерес к синтезу и исследованию фосфорных аналогов  $\alpha$ -аминокислот в последние 10—15 лет обусловлен обнаружением широкого спектра физиологической активности этого класса соединений. Так, фосфорные аналоги глицина и аланина являются регуляторами роста растений [1, 2], аналоги глутаминовой и аспарагиновой кислот — антибиотиками [3, 4], обладающими также антивирусной активностью [5]. Аналоги глутаминовой кислоты проявляют, кроме того, гербицидную активность [6]. Ряд *N*-замещенных производных  $\alpha$ -аминофосфоновых кислот, таких, как дифениламинометилфосфонаты, малотоксичные в отношении теплокровных, проявляют инсектицидную [7], фунгицидную и антибактериальную активности [8].

Из производных  $\alpha$ -аминофосфоновых кислот наименее изучены фторсодержащие  $\alpha$ -аминоалкилфосфонаты, хотя есть основание полагать, что эти соединения могут обладать различной физиологической активностью. Показано, например, что некоторые производные фторфосфоновых кислот являются эффективными ингибиторами сериновых гидролаз, таких, как эластаза и  $\alpha$ -химотрипсин [9, 10].

С целью расширения сведений о синтезе и биологической активности фторсодержащих производных  $\alpha$ -аминофосфоновых кислот нами синтезирован ряд *O,O*-диэтил-1-(*N*-гидрогексафторизобутирил)аминоалкилфосфонатов и изучен механизм их взаимодействия с ферментами класса холинэстераз.

Результаты изучения кинетики взаимодействия синтезированных аминоалкилфосфонатов с ацетилхолинэстеразой (КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразой (КФ 3.1.1.8) показывают, что все эти соединения, за исключением соединения (VIII), необратимо ингибируют активность обоих ферментов. Соединение (VIII), содержащее фенильный фрагмент, инги-

Сокращения: КССА — количественная связь структура — активность.



Соединение	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
I	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
II	»	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	»
III	»	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	»
IV	»	CH <sub>3</sub>	II
V	»	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	»
VI	»	<i>i</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	»
VII	»	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	»
VIII	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	»

бирует активность обеих холинэстераз обратимо, по механизму смешанного типа действия. Процесс необратимого ингибирования активности ферментов включает в себя стадию образования промежуточного фермент-ингибиторного комплекса [11] по схеме



Расчитанные значения констант  $K_i$  и  $k_{ин}$  представлены в табл. 1.

Для выявления количественных закономерностей, связывающих физико-химические параметры изученных соединений с их антихолинэстеразной активностью, с помощью методов математического моделирования нами построен ряд регрессионных уравнений. Используемые в них параметры структуры заместителей приведены в табл. 2.

Неудовлетворительно описывает образование комплекса аминоктилфосфонат — фермент липейная модель:

$$\begin{aligned}
 -\lg K_i^A &= 3,588 + (0,535 \pm 0,315) \pi \\
 n &= 8, r = 0,569, s = 0,534, F = 2,9 \\
 -\lg K_i^B &= 4,081 + (0,517 \pm 0,558) \pi \\
 n &= 8, r = 0,354, s = 0,944, F = 0,9
 \end{aligned}$$

где  $n$  — количество точек,  $r$  — коэффициент множественной корреляции,  $s$  — стандартное отклонение,  $F$  — критерий Фишера.

Введение в корреляционные уравнения  $\pi^2$  улучшает модель:

$$\begin{aligned}
 -\lg K_i^A &= 0,81 + (4,98 \pm 0,97)\pi - (1,49 \pm 0,32) \pi^2 \\
 n &= 8, r = 0,94, s = 0,24, F = 17,2
 \end{aligned} \quad (2)$$

Однако нельзя считать, что и в случае бутирилхолинэстеразы связывание аминоктилфосфоната с ферментом определяется гидрофобностью, поскольку

$$\begin{aligned}
 -\lg K_i^B &= 1,42 + (4,77 \pm 3,44) \pi - (1,42 \pm 1,14) \pi^2 \\
 n &= 8, r = 0,58, s = 0,90, F = 1,3
 \end{aligned} \quad (3)$$

Наглядно это представлено на рисунке.

Для учета других физических параметров ингибиторов в рассмотренной была введена стерическая константа Тафта ( $E_s$ ), часто используемая в уравнениях КССА. Этот экспериментальный параметр может быть рассчитан [13] по формуле

$$E_s = [\lg (0,801 - \sum (r_i^2/4R_i^2))] + 0,1684/0,0325,$$

где  $r_i$  — атомный радиус  $i$ -го атома заместителя,  $R_i$  — расстояние от  $i$ -го атома до реакционного центра, а суммирование проводится по всем атомам заместителя.

**Кинетические константы взаимодействия**  
**О,О-диэтил-1-(N- $\alpha$ -гидрогексафторизобутирил)аминоалкилфосфонатов**  
**с ацетилхолинэстеразой и бутирилхолинэстеразой**

Соединение	Ацетилхолинэстераза			Бутирилхолинэстераза		
	$K_i^A \cdot 10^3, M$	$k_{ин} \cdot 10^2, \text{мин}^{-1}$	$k_2^* \cdot 10^{-3}, M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	$K_i^B \cdot 10^3, M$	$k_{ин} \cdot 10^2, \text{мин}^{-1}$	$k_2^* \cdot 10^{-3}, M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$
I	3,9	7,8	2,0	1,3	18	13
II	1,4	18	13	0,017	12	710
III	6,4	2,6	0,4	1,0	6,4	6,4
IV	63	2,5	0,04	20	3,0	0,15
V	7,5	1,5	0,2	13	2,0	0,15
VI	0,8	9,7	12	1,8	1,8	1,0
VII	3,1	18	5,8	0,58	3,6	6,2
VIII	1,2	—	—	2,1	—	—

\*  $k_2$  — бимолекулярная константа необратимого ингибирования, равная  $k_{ин}/K_i$ . Средне-квадратичные ошибки определения  $K_i$  и  $k_{ин}$  не превышают 20 и 10% соответственно.

Таблица 2

**Параметры структуры соединений ряда**  
**О,О-диэтил-1-(N- $\alpha$ -гидрогексафторизобутирил)аминоалкилфосфонатов\***

Соединение	$\pi$	$E_s^C$	$E_s^D$
I	0,9	-3,421	-1,517
II	1,4	-3,654	-2,016
III	2,4	-4,036	-2,512
IV	0,6	-2,530	-1,185
V	1,1	-2,918	-1,413
VI	1,9	-3,524	-2,050
VII	2,1	-3,660	-1,918
VIII	1,96	-2,685	-1,565

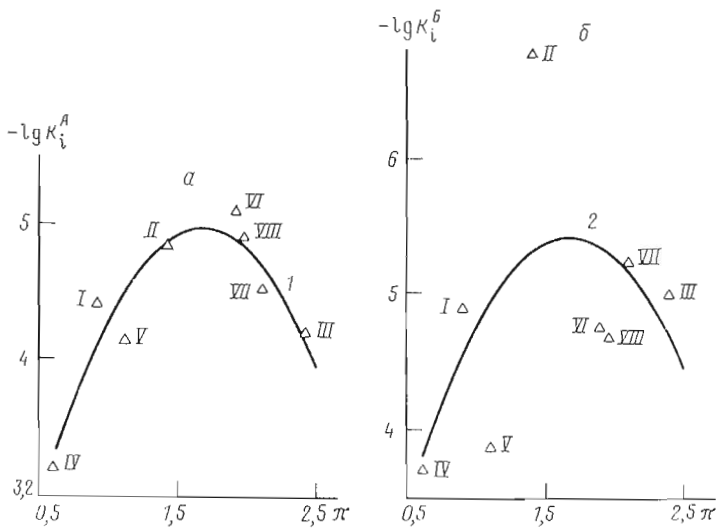
\*  $\pi$  — константа гидрофобности для соединений (I) — (VII) рассчитывалась по аддитивной схеме, приведенной в [12]; экспериментальное значение  $\pi$  для соединения (VIII) взято там же;  $E_s^C, E_s^D$  — стерические константы, рассчитанные по работе [13] в предположении, что реакционным центром является соответственно карбонильный атом С или атом Р.

В отличие от традиционных фосфорорганических ингибиторов холинэстераз, соответствующих по строению структуре Шрадера, ингибирующее действие которых обусловлено их способностью фосфорилировать сериновый остаток эстеразного центра фермента, в случае изученных  $\alpha$ -аминофосфонатов молекулярный механизм инактивации холинэстераз неизвестен. В связи с этим нами рассматриваются два возможных варианта пары реакционный центр — заместитель:

а) реакционный центр — атом фосфора, а часть молекулы, начинающаяся с  $\alpha$ -углеродного атома, — заместитель при фосфоре (в этом случае использовалась константа  $E^P$ );

б) реакционный центр — атом углерода карбонильной группы амида, а  $\alpha$ -аминофосфонатный фрагмент — заместитель при атоме углерода (использовалась константа  $E_s^C$ ).

Первый вариант отражает процесс необратимой инактивации фермента вследствие образования фосфорилированного производного. Этот механизм характерен для фосфорорганических ингибиторов холинэстераз [14]. Процесс фосфорилирования серинового остатка эстеразного центра хо-



Зависимость констант связывания О,О-диэтил-1-(N-1 $\alpha$ -гидрогексафтор-изобутирил)амидоалкилфосфонатов с ацетил- (а) и бутирилхолинэстеразой (б) от гидрофобности заместителей. 1 и 2 — теоретические кривые, проведенные согласно уравнениям (2) и (3). Нумерация экспериментальных точек соответствует нумерации соединений

линэстераз традиционными фосфорорганическими ингибиторами — эфирами и тиоэфирами кислот фосфора, а также алкилфторфосфатами происходит в результате разрыва связи Р—О (в случае, если в уходящей части молекулы содержится арильная группа), Р—S- или Р—F-связи соответственно. В случае изученных нами соединений (I)—(VIII) разрыв Р—О-связи не происходит, так как заместителем у атома фосфора является не ароксигруппа, а алкоксигруппа [10]. Наиболее вероятен разрыв Р—С-связи. Тот факт, что существует возможность ферментативного превращения фосфонатов в фосфаты [15], позволяет рассматривать такой вариант превращения.

Второй вариант связан с возможностью ферментативного гидролиза рассматриваемых ингибиторов холинэстеразами с разрывом СО—NR<sup>3</sup> связи, аналогичной пептидной. На справедливость рассмотрения этого варианта указывает и тот факт, что в последнее время появились работы, в которых показано, что ацетилхолинэстераза [16] и бутирилхолинэстераза [17] помимо эстеразной проявляют и пептидную активность.

Дополняя регрессионные уравнения параметрами  $E_s^p$  или  $E_s^c$ , имеем для ацетилхолинэстеразы:

$$-\lg K_i^A = 0,57 + (4,90 \pm 1,05)\pi - (1,50 \pm 0,35)\pi^2 - (0,22 \pm 0,42)E_s^p$$

$$n = 8, r = 0,94, s = 0,27, F = 9,9 \quad (4)$$

или

$$-\lg K_i^A = 0,50 + (4,92 \pm 1,05)\pi - (1,49 \pm 0,35)\pi^2 - (0,12 \pm 0,24)E_s^c$$

$$n = 8, r = 0,94, s = 0,27, F = 9,8 \quad (5)$$

А для бутирилхолинэстеразы:

$$-\lg K_i^B = -0,96 + (4,07 \pm 2,70)\pi - (1,60 \pm 0,89)\pi^2 - (2,21 \pm 1,08)E_s^p$$

$$n = 8, r = 0,82, s = 0,71; F = 2,8 \quad (6)$$

или

$$-\lg K_i^B = -1,68 + (4,17 \pm 2,83)\pi - (1,43 \pm 0,93)\pi^2 - (1,22 \pm 0,65)E_s^c$$

$$n = 8; r = 0,80, s = 0,74, F = 2,4 \quad (7)$$

Рассмотрение уравнений (4)—(7) и сравнение их с уравнениями (2) и (3) позволяют сделать вывод, что для описания взаимодействия изученных ингибиторов с ацетилхолинэстеразой введение стерической константы несущественно, тогда как для бутирилхолинэстеразы стерические факторы играют определенную роль.

Построены также регрессионные уравнения с использованием только  $E$  и  $(E_s)^2$ :

$$-\lg K_i^B = -5,90 - (10,99 \pm 5,43)E_s^p - (2,63 \pm 1,47)(E_s^p)^2 \quad (8)$$

$$n = 8, r = 0,78, s = 0,65, F = 3,9$$

$$-\lg K_i^B = -8,01 - (6,90 \pm 9,15)E_s^c - (0,89 \pm 1,41)(E_s^c)^2 \quad (9)$$

$$n = 8, r = 0,69; s = 0,80, F = 2,2$$

$$-\lg K_i^A = -5,28 - (10,41 \pm 2,22)E_s^p - (2,65 \pm 0,60)(E_s^p)^2 \quad (10)$$

$$n = 8, r = 0,92, s = 0,28, F = 13,3$$

$$-\lg K_i^A = -12,02 - (9,90 \pm 6,08)E_s^c - (1,46 \pm 0,94)(E_s^c)^2 \quad (11)$$

$$n = 8, r = 0,66, s = 0,53, F = 2,0$$

Из сравнений уравнений (8) и (9) с уравнением (3) видно, что стерические свойства заместителя существенно лучше описывают связывание ингибиторов с БуХЭ, чем гидрофобность. Вместе с тем из уравнений (2), (10), (11) следует, что в случае ацетилхолинэстеразы замена  $\pi$  на  $E_s$  только ухудшает модель. Из уравнений (8), (9), (10) и (11) видно, что для обеих холинэстераз лучшие результаты дает использование параметра  $E_s^p$ , а не  $E_s^c$ . Для выяснения причин этого был проведен факторный анализ параметров, использованных в данной работе. Из него следует, что  $\pi$  коррелирует с  $E_s$ , причем коэффициенты корреляции  $r(\pi - E_s)$  и  $r(\pi - E_s^p)$  равны соответственно 0,85 и 0,92. Это объясняет большую достоверность модели связывания аминокилфосфонатов с ацетилхолинэстеразой с использованием параметра  $E_s^p$  по сравнению с моделью, описываемой уравнением (11). Кроме того, из сравнения соотношений (2), (10) и (11) следует, что зависимость  $K_i^A$  от структуры ингибитора определяется гидрофобностью заместителей ( $\pi$ ). Иная ситуация в моделях (3), (8), (9). В этом случае можно предположить, что взаимодействие аминокилфосфонатов с бутирилхолинэстеразой в большей степени определяется стерическим влиянием заместителей, чем гидрофобностью, а именно стерическим влиянием заместителя у фосфора.

Нелинейность зависимостей констант ингибирования от стерических констант и констант гидрофобности заместителей в аминокилфосфонатах свидетельствует о наличии как минимум двух участков связывания этих ингибиторов [18].

Следует отметить, что соединение (VIII), имеющее параметры, лежащие в середине областей определения  $\pi$  и  $E_s$  для данного ряда, и константу ингибирования, хорошо коррелирующую с тенденциями зависимости  $\lg K_i$  от этих параметров, тем не менее ингибирует оба фермента только обратимо. Возможным объяснением этого служит следующее предположение. Первая стадия взаимодействия ингибитора с ферментом (см. схему 1) представляет собой сорбцию его на активном центре фермента (обратимое ингибирование), причем разрыв связи и дальнейшая модификация функциональной группы активного центра фермента не происходит до тех пор, пока молекула ингибитора не примет «нужную» конформацию. Вероятность принятия такой конформации, по-видимому, зависит от жесткости заместителя. В случае соединения (VIII) эта вероятность существенно ниже вследствие того, что фенильный радикал более «жесткий», чем алкильный.

Таким образом, в настоящей работе описан синтез ряда  $\alpha$ -аминокилфосфонатов и изучено их взаимодействие с ацетил- и бутирилхолинэстеразами. Показано, что в зависимости от структуры соединения этого ряда могут быть как обратимыми, так и необратимыми ингибиторами изучен-

ных ферментов. На основании моделей КССА сделан вывод об определяющей роли гидрофобных взаимодействий в связывании изученных ингибиторов с активным центром ацетилхолинэстеразы, а в случае бутирилхолинэстеразы — о большей роли стерических взаимодействий по сравнению с гидрофобными в связывании фермента с ингибиторами этого ряда. Для построения более детальных моделей ингибирования активности холинэстераз  $\alpha$ -аминоалкилфосфонатами необходимо, по-видимому, проведение дополнительных кинетических исследований.

### Экспериментальная часть

*О,О-Диэтил-1-амино-1-метилалкилфосфонаты* синтезировали по методике [19].

*О,О-Диэтил-1-(N- $\alpha$ -гидрогексафторизобутирил)метиламино-1-метилалкилфосфонаты (I)–(III)*. Раствор 0,01 моль О,О-диэтил-1-метиламино-1-метилалкилфосфоната и 0,015 моль бис(трифторметил)кетена в 20 мл эфира выдерживали в запаянной ампуле 1 сут при 20° С. Ампулу вскрывали, эфир упаривали, остаток перегоняли в вакууме и получали соответствующий фосфонат.

*О,О-Диэтил-1-(N- $\alpha$ -гидрогексафторизобутирил)амино-1-метилалкилфосфонаты (IV)–(VIII)*. Раствор 0,01 моль соответствующего О,О-диэтил-1-амино-1-метилалкилфосфоната и 0,015 моль бис(трифторметил)кетена в 10 мл ацетонитрила выдерживали в запаянной ампуле 1 сут при 20° С. Ампулу вскрывали, выпавший осадок отфильтровывали при охлаждении, промывали холодным ацетонитрилом, сушили и получали требуемый фосфонат. Выход и свойства синтезированных фосфонатов приведены в табл. 3.

*Спектры ЯМР* снимали на приборе Bruker СХР-200 в ацетоне — относительно  $\text{Me}_4\text{Si}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOH}$  и 85%-ной  $\text{H}_3\text{PO}_4$  соответственно. Химические сдвиги приведены в шкале  $\delta$ . Температуры плавления определяли в запаянном капилляре. Характеристики спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  фосфонатов (I)–(VIII) приведены в табл. 4.

В кинетических экспериментах использовали частично очищенный препарат ацетилхолинэстеразы эритроцитов крови человека с удельной активностью 2,8 МЕ/мг и очищенный препарат бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади с удельной активностью 156 МЕ/мг. Оба препарата производства Пермского НИИ вакцин и сывороток. В качестве субстрата применяли ацетилхолинйодид марки ч.д.а.

Скорость ферментативного гидролиза ацетилхолина измеряли методом потенциометрического титрования при постоянном рН на автитраторе RTS-822 (Radiometer, Дания) (в присутствии 1 мМ фосфатного буфера и 20 мМ  $\text{KCl}$ ) при 25° С и оптимальных значениях рН и концентрации субстрата (для ацетилхолинэстеразы рН 7,55 и  $[\text{S}] = 0,5$  мМ, концентрация фермента 0,02 мг/мл; для бутирилхолинэстеразы рН 7,8 и  $[\text{S}] = 10$  мМ, концентрация фермента 0,015 мг/мл). Скорость реакции в присутствии предварительно инкубированного с ингибитором фермента регистрировали в момент достижения стационарности за счет установления нового равновесия. Растворы ингибиторов готовили разбавлением запасных растворов в этаноле водой, так, чтобы содержание этанола в реакционной смеси не превышало 4%. Концентрации ингибиторов подбирались для каждого из соединений так, чтобы вызываемое ими торможение активности ферментов лежало в пределах от 20 до 80%.

Математическая обработка схемы (1) в стационарном приближении при  $[\text{E}]_0/[\text{E}]_i^{\text{ст}} = v_0/v_i$  приводит к выражению [11, 20]

$$[\text{I}]/\left(\Delta \ln \frac{v_0}{v_t}/\Delta t\right) = \frac{K_i}{k_{\text{ин}}} + \frac{1}{k_{\text{ин}}} [\text{I}],$$

где  $v_0$  — скорость гидролиза субстрата в отсутствие ингибитора,  $v_t$  — скорость ферментативного гидролиза субстрата после инкубации фермента с ингибитором в течение  $t$  минут,  $[\text{I}]$  — концентрация ингибитора,  $[\text{E}]_0$  — начальная концентрация активных центров фермента,  $[\text{E}]_i^{\text{ст}}$  —

Выход и свойства О,О-диэтил-1-(N-α-гидрогексафторизобутирил)аминоалкилфосфонатов

Соединение	Выход, %	Т. кип., °С (мм рт. ст.); Т. пл., °С	Брутто-формула **
I	40	130–134 (2)	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> P
II	44	142–144 (3)	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> P
III	56	152 (3)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> P
IV	45	68–70	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> P
V	81	89–90	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> P
VI	40	103–105	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> P
VII	71	107–109	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> P
VIII	71	214–216	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> P

\* Дана для соединений (IV)–(VIII).

\*\* Результаты элементного анализа аминоалкилфосфонатов (I)–(VIII) удовлетворительно совпадают с вычисленными.

Таблица 4

Спектры ЯМР О,О-диэтил-1-(N-α-гидрогексафторизобутирил)аминоалкилфосфонатов в ацетоне-d<sub>6</sub>

Соединение	<sup>1</sup> H-ЯМР, δ, м. д., мультиплетность				CH(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<sup>19</sup> F-ЯМР, δ, м. д.	<sup>31</sup> P-ЯМР, δ, м. д.
	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> O	R <sup>1</sup> *	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>			
I	1,32т, 4,16м		1,68д	3,20с	4,54 септ	12,98	25,98
II	1,32т, 4,18м	1,68д	0,90т, 1,76м (1H), 2,66м (1H)	3,17с	4,50 »	13,41	21,19
III	1,32т, 4,14м	1,70д	0,90т (3H), 1,33м (5H), 1,68м (1H)	3,14с	4,48 »	12,56	26,01
IV	1,32т, 4,10м		1,58д	8,14с	4,56 »	12,56	26,31
V	1,32т, 4,10м	1,58д	0,92т (3H), 1,70м (1H), 2,12м (1H)	8,16с	4,58 »	12,62	26,55
VI	1,30т, 4,12м	1,68д	0,90д (6H), 1,32м (1H), 1,88–2,02м (2H)	8,15с	4,62 »	12,62	26,49
VII	1,34т, 4,10м	1,62д	0,90т (3H), 1,32м (4H), 1,68м (1H), 2,20м (1H)	8,16с	4,64 »	12,66	26,43
VIII	1,38т, 4,18м	5,62д	7,25–7,45	9,65д J <sub>P,H</sub> 8 Гц	4,62 »	12,68	20,95

\* Для R<sup>1</sup> = Me <sup>3</sup>J<sub>P,H</sub> 15 Гц.

концентрация необратимо инактивированного фермента после инкубации с ингибитором,  $K_i$  — константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса,  $k_{ин}$  — константа скорости необратимой инактивации фермента.

Построив сначала график зависимости  $\ln v_0/v_t$  от  $t$ , а затем график зависимости  $[I]/\left(\Delta \ln \frac{v_0}{v_t} / \Delta t\right)$  от  $[I]$  [20], определили значения  $k_{ин}$  и  $K_i$ .

Межатомные расстояния вычисляли из координат атомов, полученных расчетами методом молекулярной механики (программа MM2) [21]. Параметры силового поля ( $k_0$  (P=O),  $l_0$  (P=O),  $k_0$  (P—O),  $l_0$  (P—O),  $\mu$  (P=O) и др.) для фосфатного и фосфонового фосфора и фрагмента  $-C(O)-N-$  были подобраны по следующим правилам (без уточнения методом наименьших квадратов):

а) константы напряжения длин связей и валентных углов составили 0,7–0,9 от соответствующих спектроскопических констант;

б) дипольные моменты связей (P=O), (P—O) и других взяты из работы [22];

в) оптимальные значения длин связей ( $l_{oi}$ ) и валентных углов ( $\theta_{oi}$ ) получены усреднением соответствующих данных по [23];

г) форма и величина барьеров вращения вокруг связей (P—O, P—C) подбирались так, чтобы воспроизвести результаты работ [24—26];

д) параметры функции нековалентного взаимодействия, имеющиеся в оригинальной версии программы, оставлены без изменения.

Возможность использования полученного набора параметров была проверена на нескольких фосфорорганических соединениях ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>P=O, (CH<sub>3</sub>O)P=O и др.), для которых имелись соответствующие структурные данные, величины дипольных моментов или расчеты ab initio молекул.

Авторы выражают благодарность В. И. Шестову за предоставление программы для расчета стерических констант.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пат. 3894861 (США) 1975.
2. Baylis E. K., Campbell C. D., Dingwall J. G. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1984. № 12. P. 2845—2853.
3. Bayer E., Gugel K. H., Hagele M., Hagenmaier M., Jessipow S., Konig W. A., Zahner H. // Helv. chim. acta. 1972. V. 55. P. 224—239.
4. Пат. 2236599 (ФРГ) 1973.
5. Пат. 2823346 (ФРГ) 1979.
6. Schwedtle F., Bieringer H., Finke M. // Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz. 1981. B. 9. S. 431—437.
7. Пат. 100452 (Япония) 1977.
8. Neuzil E., Cassaigne A. // Ann. Biochem. Exp. Med. 1980. V. 34. P. 165—173.
9. Lamden L. A., Bartlett P. A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 112. № 3. P. 1085—1090.
10. Bartlett P. A., Lamden L. A. // Bioorgan. Chem. 1986. V. 14. № 4. P. 356—377.
11. Main A. R. // Science. 1964. V. 144. № 362. P. 992—993.
12. Hanch C., Leo A. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. N. Y.: Wiley-Intersci., 1979. 309 p.
13. Галкин В. И., Черкасов Р. А. // Реакц. способ. орган. соедин. 1981. Т. 18. № 1. С. 111—131.
14. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965. 248 с.
15. Avila L. Z., Loo S. H., Frost J. N. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 22. P. 6758—6764.
16. Small D. H., Ismael Z., Chubb I. W. // Neuroscience. 1987. V. 21. P. 991—995.
17. Chatonnet A., Masson P. // C. r. Acad. sci. 1984. V. 299. Ser. 111. № 13. P. 529—534.
18. Kubinyi H. // Arzneimittel Forsch. 1976. B. 26. № 11. S. 1991—1997.
19. Filds E. K. // J. Amer. Chem. Soc. 1952. V. 74. P. 1528—1531.
20. Соляков Л. С., Саблин С. О., Кууск В. В., Агабеян Р. С. // Биохимия. 1989. Т. 54. № 1. С. 88—94.
21. Буркерт У., Эллинджер Н. Л. Молекулярная механика. М.: Мир, 1986. 364 с.
22. Раевский О. А. Пространственная структура и внутримолекулярные взаимодействия в ряду ациклических фосфорорганических соединений: Дис. ... д-ра хим. наук. Ростов-на-Дону: РГУ, 1977. 364 с.
23. Наумов В. А., Вилков Л. В. Молекулярные структуры фосфорорганических соединений. М.: Наука, 1986. С. 107—246.
24. Шагидуллин Р. Р., Шакиров И. Х., Плямоватый А. Х., Аршинова Р. П., Нуретдинов И. А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1984. № 11. С. 2517—2523.
25. Дашевский В. Г., Баранов А. П., Медведь Т. Я., Кабачник М. И. // Теорет. и эксперим. химия. 1977. Т. 13. № 3. С. 340—348.
26. Раевский О. А., Умарова И. О. // Теорет. и эксперим. химия. 1983. Т. 19. № 6. С. 732—735.

Поступила в редакцию  
15.VIII.1989

После доработки  
16.II.1990



V. V. KUUSK, I. V. MOROZOVA, R. S. AGABEKYAN, A. Yu. AKSINENKO,  
T. A. EPISHINA, V. B. SOKOLOV, N. V. KOVALEVA, A. N. RAZDOLSKY,  
V. I. FETISOV, I. V. MARTYNOV

INHIBITION OF CHOLINESTERASE ACTIVITY  
BY FLUORINE-CONTAINING DERIVATIVES  
OF  $\alpha$ -AMINOALKYLPHOSPHONIC ACIDS

*Institute of Physiologically Active Substances,  
Academy of Sciences of the USSR, Chernogolovka, Moscow Region*

A series of O,O-diethyl-1-(N- $\alpha$ -hydrohexafluoroisobutyryl)aminoalkylphosphonates (Aph) has been synthesized and their interaction with human erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) and with horse serum butyrylcholinesterase (BuChE) studied. Most of the Aphs inactivated the cholinesterases irreversibly through formation of the enzyme-inhibitor intermediate. The inactivation rate constants and the enzyme-inhibitor intermediate dissociation constants are calculated. The quantitative structure-activity relationships including both hydrophobic and calculated steric parameters of substituents are developed for Aph — ChE interactions. Molecular mechanics (programme MM2) was used for determining steric parameters ( $E_s$ ). On the basis of QSAR models analysis it was concluded that hydrophobic interactions play an essential role in Aph — AChE binding, whereas for Aph — BuChE binding steric interactions are essential. Presence of at least two Aph binding centres on the surface of AChE and BuChE is suggested.