



© 1994 М. Я. Карнейский, Н. Ш. Падюкова,
В. П. Варламов*, Г. Е. Банникова*

НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ — ПРОИЗВОДНЫЕ ВИТАМИНА В₆

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва;
* Центр «Биоинженерия» РАН, Москва

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, ингибиторы, производные витамина В₆.

В работе предлагается новый подход к созданию ингибиторов ацетилхолинэстеразы. Показано, что производные пиридоксамина представляют интерес в создании обратимых ингибиторов ацетилхолин-эстеразы.

Ацетилхолинэстераза (КФ 3.1.1.7; АСНЕ) — фермент, катализирующий быстрый гидролиз ацетилхолина, интенсивно исследуется в течение многих лет биохимиками, фармакологами, химиками и физиологами. Наряду с ацетилхолиновым рецептором он играет ключевую роль в деятельности центральной и периферической нервной системы, осуществляя передачу нервного импульса через синапсы.

АСНЕ — высокочувствительная мишень для природных и синтетических холинэргических токсинов, токсичных гликоалкалоидов, ядовитых фосфорорганических и карбаматных инсектицидов, пептидов змеиного яда и некоторых синтетических терапевтических агентов [1, 2].

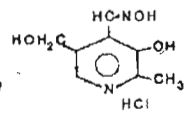
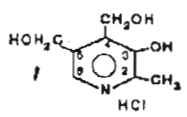
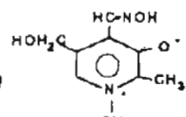
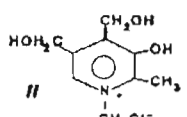
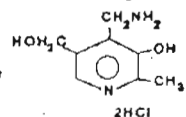
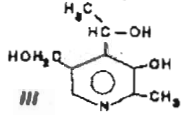
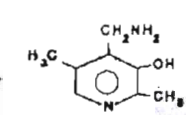
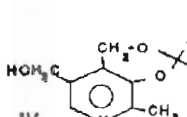
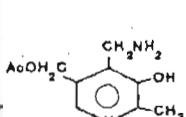
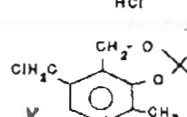
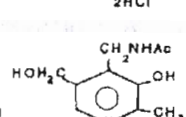
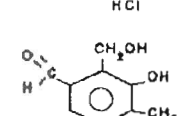
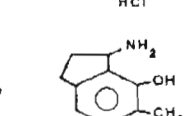
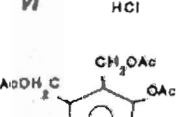
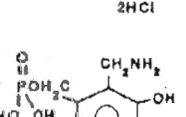
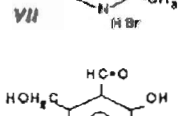
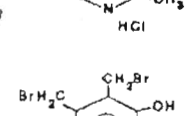
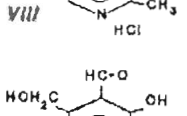
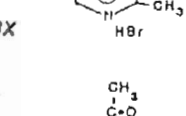
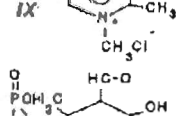
Изучение механизма взаимодействия АСНЕ с субстратами и ингибиторами дает возможность получать информацию о строении активного центра фермента [1—4].

В 1991 г. Сассман с сотр. [3] определил трехмерную структуру АСНЕ из *Torpedo californica* методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,8 Å [3]. В сложной структуре активного центра АСНЕ имеется несколько областей, ответственных за полную картину связывания лиганда. На основе кристаллографических данных можно предположить, что в состав активного центра входят участки белка, обеспечивающие продвижение лиганда в щель, где находятся каталитический центр и функционально важные аминокислотные остатки (заряженные, неполярные и остатки, связанные водородной связью), расположенные по ее длине. «Анионный центр» фермента, видимо, представляет собой сложный комплекс нескольких дисперсных Asp/Glu-остатков, включая Asp-70, расположенных вдоль щели по направлению к каталитической триаде: Ser-200, Glu-327 и His-440. Каталитический центр находится на дне глубокой и узкой щели, окруженной 14 ароматическими остатками.

Анализ экспериментальных данных, полученных в различных группах [1—5], дает возможность предположить, что несколько молекул субстрата предварительно связываются по внутреннему краю щели, ожидая своей очереди к каталитическому центру.

Таким образом, можно думать, что обратимые ингибиторы АСНЕ должны

Ингибирование ацетилхолинэстеразы производными витамина В₆
 Приведена I₅₀, мкМ

<chem>CH3CH2CH2-PBu3Br</chem>	50		>15000
	9700		>2800
	4300		900
	12000		400
	5200		777
	1300		11300
	11600		300
	7980		8800
	9200		5900
	3000		590
	1100		

представлять собой соединения, способные связываться на периферии активного центра.

Взаимодействие молекулы протонированного ингибитора с ионизованной Asp-70, расположенной на вершине щели, может способствовать связыванию ингибитора в периферической части активного центра, в результате чего нормальное расположение молекул ацетилхолина в фермент-субстратном комплексе, обеспечивающее быстрое его поступление в каталитический участок активного центра, окажется нарушенным. (Анализ структуры активного центра АСНЕ проведен на основе изучения молекулярной модели фермента, построенной по координатам, любезно предоставленным доктором Ж. Сассманом.)

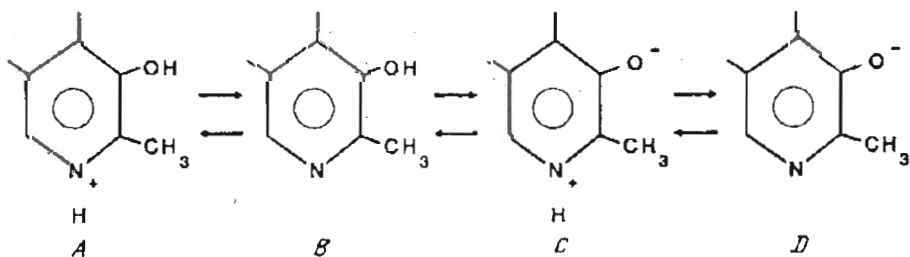
В настоящей работе предложен подход к созданию новых обратимых ингибиторов АСНЕ, базирующийся на анализе структуры и свойств АСНЕ. Результатом этого анализа явился вывод о том, что полифункциональные природные соединения, относящиеся к группе витаминов В₆, могут служить базовыми структурами для создания эффективных обратимых ингибиторов АСНЕ.

На основе указанных представлений из большого количества производных витамина В₆ были выбраны те соединения, от которых можно было ожидать проявления ингибирующих свойств, и исследовано их взаимодействие с АСНЕ из эритроцитов человека.

В таблице представлены структуры полученных соединений и концентрация, при которой подавляется 50% ферментативной активности (I_{50}). Первая строчка в таблице — данные для одного из наиболее эффективных обратимых ингибиторов АСНЕ — трибутилпропилфосфонийбромида.

Анализ полученных данных показывает, что существенное значение для проявления ингибирующих свойств производными витамина В₆ имеет наличие неполярного заместителя в положении 5 пиридинового цикла (соединения XIV, XVII, XX). Не менее важный фактор — CH_2NH_3^+ -группа в положении 4 (соединения XIII, XIV, XV, XVII). Ее ацилирование (XVI) или замена на гидроксиметильную (I), альдегидную (VIII) или оксимную (XI) группы приводит к заметному снижению ингибирующего эффекта.

Как и следовало ожидать, метилирование атома азота пиридинового цикла и введение тем самым положительно заряженного четвертичного аммониевого основания в структуре изучаемых производных улучшает их ингибирующую активность (сопоставление I_{50} соединений (I, II; XIII, IX; XI, XII)), хотя и не так значительно, как в других классах соединений [1]. Отсутствие значительного эффекта, по-видимому, обусловлено тем, что в условиях эксперимента как для исходных, так и для метилированных соединений основной ионной формой является форма С [6] с ионизованным фенольным гидроксилом, тогда как активной формой служит протонированная форма А. Наличие отрицательно заряженной фенольной группы в исследованных соединениях оказывает дестабилизирующее влияние на устойчивость комплекса, поскольку в периферической части активного центра фермента, где, по-видимому, связываются молекулы исследуемых ингибиторов, расположены отрицательно заряженные карбоксильные группы остатков Asp и Glu.



Спектры ПМР регистрировали на спектрометре XL-100 (Varian, США) с рабочей частотой 100 МГц при концентрации образцов $\sim 5 \cdot 10^{-2}$ М при 35° С. Измерения проводили с внутренним стандартом *трет*-бутанолом и пересчитывали относительно Me_4Si , принимая химический сдвиг *трет*-бутанола относительно Me_4Si равным 1,27 м. д. УФ-спектры снимали на приборе Specol II (Германия). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧСФР). Системы, использованные для хроматографии: бутанол — ацетон — CH_3COOH — 5% NH_4OH — H_2O , 35 : 25 : 15 : 15 : 10 (А); этилацетат — ацетон — NH_4OH , 20 : 10 : 1,5 (В); бутанол — NH_4OH — H_2O , 40 : 9 : 1 (С). Использованы ацетилхолинэстераза из эритроцитов крови человека (КФ 3.1.1.7; НИИ вакцин и сывороток, Пермь), реактив Элмана — 5,5'-бис-2-нитробензойная кислота (Sigma); ацетилхолинбромид (Chemapol, ЧСФР). Индивидуальность и структура полученных соединений подтверждены спектрами ПМР и поведением в условиях хроматографии в различных системах. Кристаллические соединения дают удовлетворительный элементный анализ С, Н, N, отличающийся от вычисленного не более чем на 0,3%. Пиридоксин (I), пиридоксаль (VIII), пиридоксамин (XII), пиридоксальфосфат (X) и пиридоксаминфосфат (XVIII) использовались без дополнительной очистки (Sigma). 4'-Метилпиридоксин (III) [8], R_f 0,56 (С), 3,4'-О-изопропилиденпиридоксин (IV) [9], R_f 0,52 (В), 0,82 (С), 3,4'-О-изопропилиден-5'-дезоксипиридоксин (V) [10], R_f 0,78 (А), 0,92 (С), изопиридоксаль (VI) [11], R_f 0,47 (А), 0,23 (С), 3,4', 5'-три-О-ацетилпиридоксин (VII) [11], оксим N-метилпиридоксаля (XII) [13], 5'-дезоксипиридоксамин (XIV) [14], R_f 0,27 (А), 0,67 (В), 0,36 (С), 5'-О-ацетилпиридоксамин (XV) [15], R_f 0,4 (А), 0,39 (В), 0,35 (С), N-ацетилпиридоксамин (XVI) [15], R_f 0,4 (А), 0,42 (В), 0,33 (С), 5-метил-4-окси-3-амино-6-азагидринден (XVII) [16], R_f 0,22 (А), 0,06 (В), 0,22 (С), 4',5'-дибромпиридоксин (XIX) [17], R_f 0,5 (А), 0,04 (В), 0,19 (С), 5'-дезоксипиридоксаль (XX) [18], R_f 0,64 (А), 0,12 (В), 0,42 (С) получены по известным методикам.

N-Метилпиридоксиниодид получен по методу [7]. Выход иодида количественный. Желтые кристаллы иодида растворяли в 30 мл воды, пропускали через колонку с Dowex-1 (СГ) (10 мл), продукт элюировали водой до прекращения поглощения в УФ. Водный раствор упаривали, остаток обрабатывали ацетоном, сушили, получали 500 мг (96%) *N*-метилпиридоксинхлорида (II), т. пл. 196° С, R_f 0,35 (А); ПМР (D_2O), σ : 8,22 с (1Н, 6-Н), 4,98 с (2Н, 4- CH_2), 4,88 с (2Н, 5- CH_2), 4,21 с (3Н, N- CH_3), 2,66 с (3Н, 2- CH_3).

N-Метилпиридоксальиодид получали по методу [12]. Для перевода метилиодида полуацетата пиридоксаля в *N*-метилпиридоксальхлорид (IX) использовали Dowex-1 (СГ), как описано для получения соединения (II); R_f 0,09 (А), 0,29 (В). ПМР (D_2O), σ : 8,32 с (1Н, 6-Н), 6,77 д (1Н, 4'-Н), 5,32 д (2Н, 5- CH_2), 4,32 с (3Н, N- CH_3), 2,76 с (3Н, 2- CH_3).

Оксим пиридоксаля, хлоргидрат (XI) получали обработкой раствора оксима основания в этаноле 1 н. HCl до pH 2, раствор упаривали в вакууме, упаривали с этианолом, ацетоном. Выход количественный, R_f 0,77 (С).

Определение ингибиторной активности [19]. К 0,25 мл 1 мМ раствора реактива Элмана в 100 мМ фосфатном буфере, pH 7,5, добавляли 0,25 мл раствора фермента, 0,25 мл 0,5 М KCl, 0,25 мл H_2O (в контроле) или 0,25 мл раствора ингибитора (в пробе) и затем 0,25 мл 2,5 мМ раствора ацетилхолинбромида. Определяли время (с), за которое оптическая плотность реакционной смеси в области 412 нм возрастет на величину 0,1. Находили концентрацию ингибитора I_{50} , при которой $t_{on}/t_k = 2$ (t_k — время в контрольном опыте, t_{on} — время в опыте с ингибитором).

ВЫВОДЫ

1. Представлен новый подход к созданию обратимых ингибиторов АСНЕ — производных природных соединений на примере группы витамина B₆.
2. Анализ полученных результатов выявил основные структурные требования к 3-оксипиридиновой молекуле: молекула пиридоксамина — структура, представляющая интерес для создания эффективных ингибиторов АСНЕ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Quinn D.//Chem. Rev. 1987. V. 87. P. 955—979.
2. Taylor P.//The Pharmacological Basis of Therapeutics/Eds Gilman A. G., Rall T. W., Nies A. S., Taylor P. N. Y.: Pergamon Press, 1990. P. 131—147.
3. Sussman J. L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I.//Science. 1991. V. 253. P. 872—879.
4. Taylor P.//The Pharmacological Basis of Therapeutics/Eds Gilman A. G., Rall T. W., Nies A. S., Taylor P. N. Y.: Pergamon Press, 1990. P. 122—130.
5. Tan R. C., Truong T. N., McCammon J. A., Sussman J. L.//Biochemistry. 1993. V. 32. P. 401—403.
6. Morozov Yu. V.//Pyridoxal Phosphate: Chemical, Biochemical and Medical Aspects/Ed. Dr. J. Dolphin. N. Y.: John Wiley and Sons, Inc. 1989. Part A. V. 1A. P. 131—222.
7. Korytnyk W., Ikawa M.//Meth. Enzymol. 1970. V. 18A. P. 524—566.
8. Doktorova N. A., Ionova L. V., Karpeisky M. Ya., Padyukova N. Sh., Turchin K. F., Florentiev V. L.//Tetrahedron. 1969. V. 25. P. 3527—3553.
9. Korytnyk W., Wiedeman W.//J. Chem. Soc. 1962. P. 2531—2532.
10. Bennett R., Burger A., Umbreit W. W.//J. Med. Pharm. Chem. 1959. V. 1. P. 213.
11. Korytnyk W., Kris E. J., Singh R. P.//J. Org. Chem. 1964. V. 29. P. 574—579.
12. Heyl D., Luz E., Harris A., Folkers K.//J. Amer. Chem. Soc. 1951. V. 73. P. 3430—3433.
13. Pocker E., Fisher E. H.//Biochemistry. 1969. N12. P. 5181—5188.
14. Докторова Н. А., Карпейский М. Я., Падюкова Н. Ш., Турчин К. Ф., Флорентьев В. Л.//Химия гетероцикл. соединений. 1971. N 3. P. 365—367.
15. Paul B., Korytnyk W.//Tetrahedron. 1969. V. 25. P. 1071—1087.
16. Карпейский М. Я., Падюкова Н. Ш., Турчин К. Ф., Флорентьев В. Л.//Изв. АН СССР. Сер. хим. 1969. V. 10. P. 2280—2284.
17. Korytnyk W.//J. Med. Chem. 1965. V. 8. P. 112—115.
18. Падюкова Н. Ш., Флорентьев В. Л., Карпейский М. Я.//Изв. АН СССР. Сер. хим. 1973. V. 5. P. 1101—1106.
19. Жуковский Ю. Г., Колчанова Н. А., Розенгарт Е. В., Фарцейгер Н. А., Бровко В. С., Скворцов Н. К. Ингибиторы холинэстераз: А. с. 1114698 СССР//Б. И. 1984. № 35. С. 63.

Поступила в редакцию 19.VII.1993

После доработки 20.IX.1993

M. Ya. Karpeisky, N. Sh. Padyukova, V. P. Varlamov, G. E. Bannikova**

NEW INHIBITORS OF ACETYLCHOLINESTERASE — DERIVATIVES OF VITAMIN B₆

V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow;

** Bioengineering Centre, Russian Academy of Sciences, Moscow*

A new approach to design of reversible inhibitors of acetylcholinesterase (ACHE) — derivatives of natural compounds — has been worked out, as exemplified by vitamins of the B₆ group. Analysis of the data obtained revealed main structural elements of the 3-hydroxypyridine molecule related to the inhibitory properties. Pyridoxamine derivatives are of interest in constructing new potent inhibitors of ACHE.

Технический редактор *Н. Н. Беляева*

Сдано в набор 20.06.94 Подписано к печати 05.09.94. Формат бумаги 70×100^{1/16}
Офсетная печать Усл. печ. л. 9,1 Усл. кр.-отт. 4,0 тыс. Уч.-изд. л. 10,8 Бум. л. 3,5
Тираж 429 экз Зак. 1409

Адрес редакции: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, корп. 32, комн. 504
Телефон: 330-60-38

Московская типография № 2 РАН 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6