

基于双中心理论的乙酰胆碱酯酶抑制剂研究进展

靳广毅, 瑕瑜, 白东鲁*

(中国科学院上海药物研究所, 上海生命科学研究院, 上海 200031)

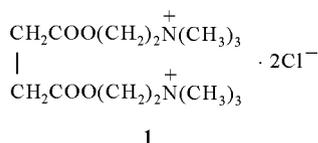
关键词: 双中心理论; 乙酰胆碱酯酶抑制剂; 抗老年痴呆药物; 石杉碱甲

中图分类号: R916.2; R9-13

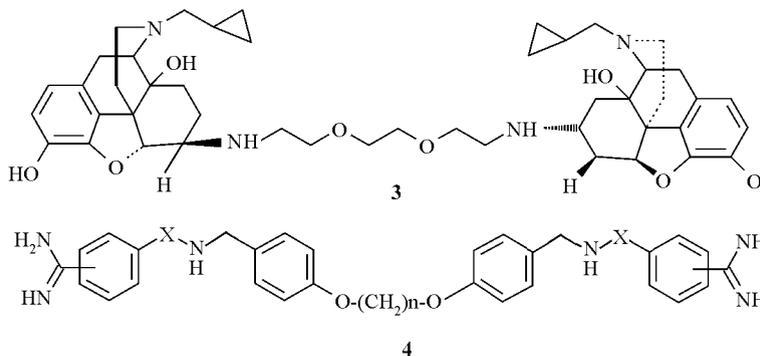
文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)09 - 0749 - 04

双中心理论早就应用于一些受体中, 例如胆碱能烟碱受体双中心假说在 50 年前就已提出, 并依此设计出许多对称的双季铵盐化合物, 例如氯化琥珀

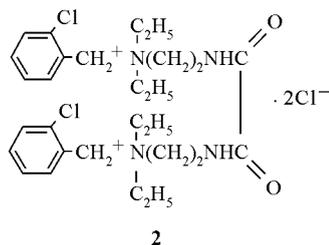


1982 年, Erez 等^[2]发展了阿片受体的双中心理论, 设计并合成了 P-X-P 形式的双分子化合物, 其中 X 代表直链烃基, P 为原活性化合物。并用实验证实了活性和链长的关系, 确定两个活性中心有一定的间距。在恰当的链长度, 双分子化合物活性比母体化合物有所增强。据此, 1985 年, Portoghese^[3]合成了第一个选择性好、活性高的阿片受体拮抗剂 TENA(1, 8-bis(β-naltrexamino)-3, 6-dioxaoctane, 3)。



双分子化合物与受体和酶的结合方式大致有 I 和 II 两种模式(图 1)。链长相适的双分子配体与受

胆碱(succinylcholine chloride, 1)^[1]、氯化美的明(ambenonium chloride, 2)及箭筒毒碱(tubocurarine)、肌安松(paramylon)等。



在该化合物中, 选择烷氧链是为了增加水溶性, 后者也是目前影响双分子化合物活性的一个难题。1999 年, Burgess 等^[4]设计并合成了系列基于上述理论的双分子胰蛋白酶抑制剂, 双苯脒化合物(bis-benzamide, 4), 用于治疗哮喘。此外, Hanessian^[5]设计合成了腺苷琥珀酸合成酶抑制剂的双分子化合物。这些化合物活性都高于单分子母体化合物。

体和酶虽可能有 I 和 II 两种结合方式, 但 II 显然不如 I 在能量上稳定, 因此最终以 I 式对接为主。当链太长或太短时, 双分子配体将以 II 的方式与受体结合, 因此活性下降。

收稿日期: 2001-12-14.

* 通讯作者 Tel: (021)64311833 - 628, Fax: (021)64370269,

E-mail: dlbai@mail.shcnc.ac.cn

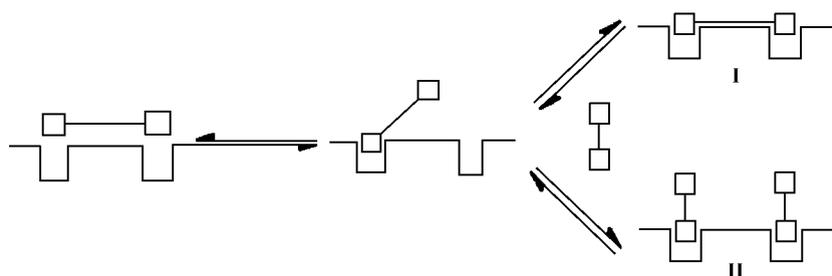


Figure 1 The binding modes of bivalent ligand to receptor

近 10 年来,在抗老年痴呆药物研究中最活跃的领域是乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI)及其机理研究。AChEI 作用机理比较明确,动物模型成熟,临床疗效肯定,因此是许多研究人员寻找治疗老年痴呆新药的目标物。近期上市的几个抗老年痴呆药,例如他克林、E2020 及艾斯能等,均属此类。1996 年, Pang^[6,7]设计合成了双分子他克林,其抗乙酰胆碱酯酶活性比单分子他克林显著提高。至今双分子型 AChEI 还很少,因此,合成更多的双分子 AChEI 进行构效分析研究,对于验证 AChE 的双活性中心理论和寻找高效的抗老年痴呆新药具有重要意义。

早在 1991 年, Sussman 等^[8]发表了他们对加利

福尼亚电鳐乙酰胆碱酯酶(TcAChE)的 X 射线晶体衍射分析结果,确定了乙酰胆碱酯酶的三维空间结构(图 2)。结果表明,通向酶活性中心的是一个细长的、下端扩展的通道。在底部的活性中心有由 Ser200、His440 和 Glu327 组成的催化三联体酯水解中心;在通道的外周边缘还存在一个外周结合部位,主要为 Trp279。

1993 年, Sussman 等^[9]用单晶 X 光衍射法进一步证实了乙酰胆碱酯酶存在两个活性中心,确定其间距为 1.2 nm,这为合成活性更高的双分子 AChEI 提供了实验证据。近年来找到的 E-2020(donepezil, 5)和双分子他克林均同时与两个活性中心结合。

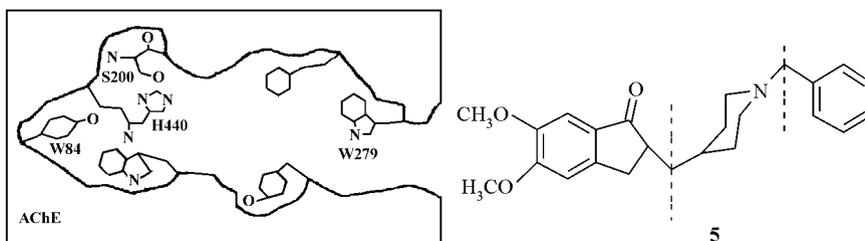


Figure 2 Structure of active sites in TcAChE

1 E-2020 与 AChE 的双活性中心结合

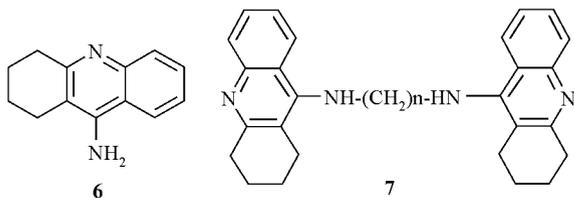
E-2020(5)是新的 AChEI,于 1996 年经美国 FDA 批准上市,用于治疗老年痴呆症。1999 年, Sussman^[10]发表了 E-2020 和 TcAChE 复合物的晶体 X 射线衍射分析结果,表明 E-2020 与中心和外周两个部位均有结合。出人意料的是苯基部分在活性中心与 Trp84 并行产生 $\pi-\pi$ 堆积作用,同时与一个结晶水产生 $OH-\pi$ 作用。中间的哌啶环作用于通道中间部位,其 N 原子质子化后与 Phe330 的苯环产生阳离子- π 作用,同时又与一个结晶水形成氢键。而茛菪酮部分则和外周的活性部位作用,与 Trp279 形成 $\pi-\pi$ 堆积作用。由于 E-2020 与酶的中心和外周活性位点均有很好的结合,而且在中间部位也有结合点,所以显示出很好的对乙酰胆碱酯酶的抑制活性。

2 双分子他克林及其衍生物

他克林(tacrine, 6)是美国 FDA 批准的第一个治疗老年痴呆症的 AChEI,虽然临床有效,但对肝脏的高毒性被严格地限制其应用。Pang 等^[11]利用 SYSDOC 程序计算推测了他克林和 TcAChE 结合部位的三维结构。他克林不仅结合在酶的中心部位,也结合在外周部位。这是他克林-TcAChE 复合物单晶 X 射线衍射结果所未显示的。据认为,该外周活性部位与配体的亲和力较弱,其作用是富集乙酰胆碱,从而利于向活性中心输送。如果该部位亲和力太强,则降低了到达中心部位配体的浓度。

1996 年 Pang 等^[6,7]根据以上推理,设计并合成了他克林的系列双分子化合物。将两个他克林分子以不同长度的碳链连接以期找到更合适的、可同时与酶的两个部位相结合的双分子衍生物(alkylene-linked bis-tacrine, 7)。经体外活性测试,当 $n = 7$ 时,

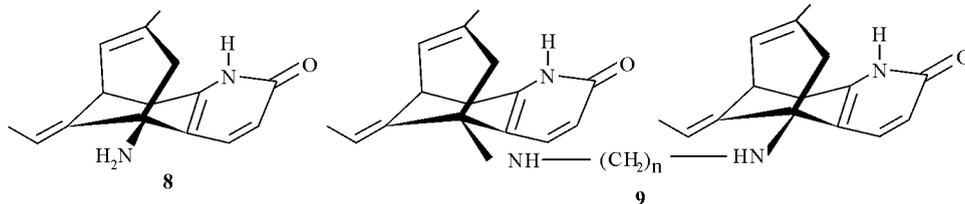
活性最高,是他克林的 150 ~ 1 000 倍。该化合物的链长为 1.8 nm,与两个他克林单分子分别在中心和外周两个活性部位结合时相距 1.6 nm 接近。



3 双分子石杉碱甲的化学药理研究

3.1 HupA TcAChE 复合物单晶结构

石杉碱甲 (huperzine A, HupA, 8) 作为 AChEI 具有活性强、生物利用度高、选择性好等特点,一直是许多学者研究的热点。受双分子他克林工作的启发,药物学家也希望通过双分子石杉碱甲得到活性更高、选择性更好的化合物。



3.2 双分子 HupA 的计算机模拟分子对接研究、合成和活性

我们设想在石杉碱甲上连接一定长度的碳链和活性基团,使合成的双分子石杉碱甲能同时与两个活性部位结合。罗小民^[13]用 Sybyl 程序分析了双分子石杉碱甲与乙酰胆碱酯酶的结合构象。结果显示,当 $n=5 \sim 9$ 时,双分子化合物才能将酶的上下两个活性部位较好地同时结合。当 $n=1 \sim 4$ 时,只是一个母体石杉碱甲单元结合在外周部位,另一个暴露在外。当 $n=10 \sim 12$ 时,一个石杉碱甲单元结合在底部活性中心,另一个则在外周活性部位的外端,结合较弱。只有 $n=5 \sim 9$ 时,双分子一端的石杉碱甲单元才可能与外周部位 Trp279 的芳香环发生 $\pi-\pi$ 作用或阳离子- π 相互作用(图 3)。在石杉碱甲与酶的活性中心的结合中,存在阳离子- π 电子作用、超共轭的甲基及羰基的氢键以及通过水分子产生的桥氢键等相互作用力,这是目前的分子力场计算方法难以处理的。然而,我们可以由此得出一些对设计双分子石杉碱甲衍生物有参考性的信息。

我们完成了用天然石杉碱甲作原料的双分子石杉碱甲 (alkylene-linked bis-HupA, 9, $n=7 \sim 12$) 的合成。其抑制 AChE 活性均不如天然 HupA,总的趋势

1997 年, Sussman 小组^[12]发表了石杉碱甲和 TcAChE 复合物的晶体结构。石杉碱甲结合在酶的中心部位,在外周空腔未观察到。这可能是 X 射线晶体衍射方法的不足,因为在外周空腔酶与配体的结合力弱,不能在单晶中保持原有的结合状态。

通过对复合物晶体结构的分析发现:石杉碱甲的羰基氧与活性中心底部的 Tyr130 的侧链酚羟基形成氢键,酰胺的氢原子通过一分子结晶水,与 Glu199 的侧链羧基、Tyr130 的酚羟基以及 Gly177 的骨架酰胺之间形成桥氢键。环外甲基乙烯基与 His440 形成一个特殊氢键。 $^+NH_3$ 正离子与 Trp84 以及 Phe330 的侧链芳香环生成阳离子- π 相互作用,另外还通过结晶水桥氢键与 Ser81, Asp72, Asn85, Tyr70 及 Tyr121 5 个残基相互作用。因此,石杉碱甲的吡啶酮环和氨基是与酶结合的必需结构。

为 7 ~ 9 碳链长的双分子石杉碱甲的活性好于其它链长的双分子化合物^[14],这与计算机对接研究预测的结果相符。

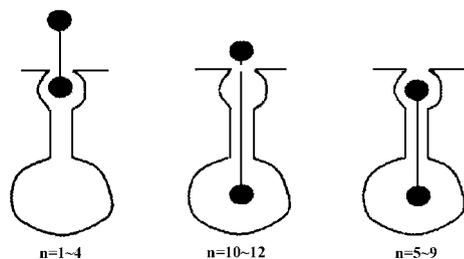
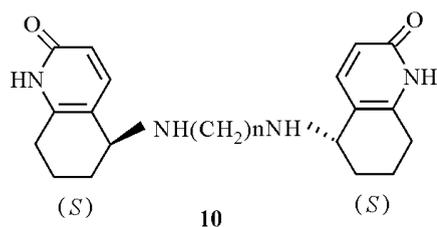


Figure 3 Binding modes of bis-huperzine A with different chain lengths to acetylcholinesterase

3.3 HupA 结构简化物的双分子化合物

Carrier 等^[15]合成了如下的结构简化的双分子化合物 (bis-(5-amino-5,6,7,8-tetrahydro-2(1H)-quinolinone), 10), 合成产物可为外消旋或内消旋体,当 $n=12$ 时,各化合物均显示出高活性。 $n=12$ 或 13 的 (S,S) 构型的双分子化合物对酶的抑制活性比天然石杉碱甲高 2 倍。此项工作的重要意义在于这些双分子化合物的母体单分子对酶没有显著的活性,当将其相连形成双分子化合物后,却显示出很高的活性。这是对 AChE 存在双活性中心的又一例证。



4 结 语

在一些酶和受体的作用部位可能存在多个活性中心。作为抑制剂,能同时可逆地抑制这些活性中心,有可能大大提高药物的活性。乙酰胆碱酯酶的双中心理论是近几年才发展起来的,据此理论解释和设计的抑制剂已有 E-2020 和双分子他克林等。双分子石杉碱甲及其衍生物研究是乙酰胆碱酯酶双中心理论的一个重要实践领域。随着研究的深入,有可能由此发现新的作用于乙酰胆碱酯酶双中心的作用特异的抑制剂。

REFERENCES :

- [1] a) Fusco R, Palazzo G, Chiavarelli S, *et al.* Synthetic curare derivatives III Aliphatic trialkyl-ethanalammonium diesters [J]. *Gazz Chim Ital*, 1949, **79** :129 - 141 ;
 b) Tammelin LE. Succinylcholine iodide (celocurin) —— A synthetic drug with a curate-like effect [J]. *Acta Chem Scand*, 1953, **7**(1) :185 - 195 .
- [2] Erez M, Take mori AE, Portoghese PS. Narcotic antagonistic potency of bivalent ligands which contain β naltrexamine, evidence for bridging between proximal recognition sites [J]. *J Med Chem*, 1982, **25**(7) :847 - 849 .
- [3] Portoghese PS, Take mori AE. TENA, a selective kappa opioid receptor antagonist [J]. *Life Sci*, 1985, **36**(8) :801 - 805 .
- [4] Burgess LE, Newhouse BJ, Ibrahim P, *et al.* Potent selective nonpeptidic inhibitors of human lung tryptase [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, **96**(15) :8348 - 8352 .

- [5] Henessian S, Lu PP, Sanceau JY, *et al.* An enzyme - bond bisubstrate hybrid inhibitor of adenylosuccinate synthetase [J]. *Angew Chem Int Ed*, 1999, **38**(21) :3160 - 3162 .
- [6] Pang YP. Highly potent, selective and low cost bis-tetrahydroamiacrine inhibitors of acetylcholinesterase [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(39) :23646 - 23649 .
- [7] Pang YP, Hong F, Quiram P, *et al.* Synthesis of alkylene linked bis-THA and alkylene linked benzyl-THA as highly potent and selective inhibitor [J]. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1997, **2** :171 - 176 .
- [8] Sussman JL, Harel M, Frolov F, *et al.* Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*, a prototypic acetylcholine binding protein [J]. *Science*, 1991, **253**(5022) :872 - 879 .
- [9] Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, *et al.* Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, **90**(19) :9031 - 9035 .
- [10] Kryger G, Silman I, Sussman JL, *et al.* Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from *Torpedo californica* [J]. *Structure*, 1999, **7** :297 - 307 .
- [11] Pang YP, Kozikowski AP. Prediction of the binding sites of huperzine A in acetylcholinesterase by docking studies [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 1994, **8**(4) :669 - 693 .
- [12] Raves ML, Harel M, Pang YP, *et al.* Structure of acetylcholinesterase complexed with the nontropic alkaloid, (-)-huperzine A [J]. *Nat Struct Biol*, 1997, **4** :57 - 63 .
- [13] Luo XM. *The Application of Docking Methods in Drug Design* [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences. 2000 .
- [14] Guang YJ, He XC, Zhang HY, *et al.* Synthesis of alkylene-linked dimers of (-)-huperzine A [J]. *Chin Chem Lett*, 2002, **13**(1) :23 - 26 .
- [15] Carrier PR, Du D, Han Y, *et al.* Dimerization of an inactive fragment of huperzine A produces a drug with twice the potency of natural product [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2000, **39**(10) :1775 - 1777 .

ADVANCES IN SEARCH FOR ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR BASED ON THE DOUBLE ACTIVE SITES HYPOTHESIS

JIN Guang-yi, XIA Yu, BAI Dong-lu

(Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

KEY WORDS: double active sites; acetylcholinesterase inhibitor; anti-senile dementia drug; huperzine A