

膦肽类化合物对血管紧张素转化酶的体外抑制活性及构效关系*

陈何如** 徐杰诚***

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

摘要 设计与合成了一系列膦三肽化合物。测定化合物对血管紧张素转化酶的体外抑制活性。结果表明, 有些化合物的体外抑制活性已接近 captopril 的水平。在此基础上, 探讨抑制剂的结构与抑制活性之间的关系。

关键词 血管紧张素转化酶抑制剂; 高血压药物, 膦三肽

血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂在治疗高血压中的地位早在 1965 年便得到确认^[1]。然而直到 80 年代初期, 才由 Squibb 公司 Ondetti 等人合成第一个口服有效的非肽类药物巯甲丙脯酸(captopril), 在临床应用上取得成功, 从而开创了治疗高血压的新纪元^[2]。为寻找药理活性强、毒副作用小、体内耐受性、生物选择性及生物利用度更大的治疗高血压药物, 根据基于结构合理药物设计理论^[3], 按照 Ondetti 所提出的 ACE 的假想活性结构, 我们设计和合成具下列结构特征的膦三肽(图 1):

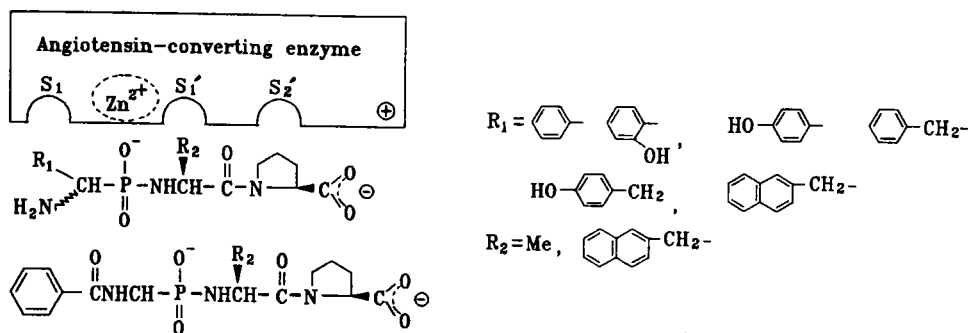


Fig 1 Hypothetical model of the active site of ACE and interaction between the inhibitors and active site.

这类化合物由于在 P_1 与 P'_1 , 即在酶作用的肽键断裂部位引入 $-P(O)-NH-$ 替代正常的肽键($-CONH-$), 从而使酶对该类化合物的降解作用削弱。另外, 引入不同的 R_1, R_2 基团, 以探讨何种结构的化合物与 ACE 之间具更大的亲和力。该类化合物的详细合成方法见文献^[4]。本文报道该类化合物的 ACE 体外抑制活性并进一步探讨结构与抑制活性的关系。

本文于 1995 年 7 月 21 日收到。

*国家自然科学基金资助课题。

**现在广东汕头大学化学系工作, 邮编 515063。

*** 通讯联系人。

材 料 和 方 法

仪器和试剂

Varian SY5000 液相色谱仪(北京分析仪器厂)。Varian UV-100 型可变紫外分光检测器。HP3390A 型积分仪(惠普公司)。81-2 型磁力恒温搅拌器。贝克曼接触温度计。200 μl 自动吸液管。

Angiotensin-converting enzyme(EC 4.15.1, from rabbit lung, 2.7 unit/mg)购自 Sigma 公司; Hepes 试剂和马尿酸甘氨酸均为生化试剂, 购自上海丽珠东风生物技术有限公司; 马尿酸(色谱纯)购自第二军医大学医学系合成药物研究室; 甲醇为 HPLC 纯; 水为双蒸水; NaCl, Na_2SO_4 和 NaOH 均为分析纯; 三氟乙酸经重蒸。

抑制剂 磷三肽(见表 1), 系用液相法合成。即由混旋的 α -氨基烷基磷酸单酯酰氯与相应的 N-端游离二肽缩合而成。得到的差向异构体磷三肽脱除保护基后, 用反相硅胶柱层析分离, 得到光学纯磷三肽, 其纯度均由元素分析、NMR 与 MS 鉴定。其中 α -氨基烷基磷酸中碳的构型系由 ^{31}P -NMR 推定, 详细的合成工作另文发表^[4]。

0.05 mol·L⁻¹ Hepes-NaOH 缓冲液的配制 Hepes 试剂 2.98 g, NaCl 1.46 g 和 Na_2SO_4 21.305 g 溶解于水 125 ml 中, 用 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调至 pH 8.0, 用水稀释至 250 ml, 缓冲液中含 0.1 mol·L⁻¹ NaCl 和 0.6 mol·L⁻¹ Na_2SO_4 。

酶溶液的配制 ACE 0.12 mg 溶解于上述 Hepes 缓冲液中, 稀释至 5 ml, 冰箱冷藏待用。

5.0 mmol·L⁻¹ 底物(马尿酸甘氨酸)溶液用 Hepes 缓冲溶液配制; 0.2 mmol·L⁻¹ 标准马尿酸溶液用水配制; 各抑制剂溶液均用 Hepes 缓冲液配成 1.0 mmol·L⁻¹ 溶液, 再依具体情况稀释至相应的浓度。

色谱条件 检测灵敏度 0.05 Au/mV; 检测波长 228 nm; 积分仪纸速 0.4 cm·min⁻¹; 色谱柱: Φ 4.5×300 mm 不锈钢柱; 固定相: Lichrosorb-Si-60 C₁₈ (particle size: 5 μm), 由上海药物研究所电子室装填; 柱压 68~74 atm; 流速 0.8 ml·min⁻¹; 柱温: 25~27°C; 淋洗程序: 等强度淋洗; 淋洗剂: 甲醇(含 0.1% TFA)一水(40:60)。

酶解抑制动力学研究的实验方法

预先开动 HPLC 色谱仪, 先运转一段时间, 使仪器稳定, 同时开动恒温槽, 使其恒温在 37°C。

在每个酶解反应开始之前, 先向色谱仪中注入 0.2 mmol·L⁻¹ 马尿酸溶液 10 μl , 其出峰面积作为参比标准。每个酶解反应均在 13×100 mm 小玻璃试管中进行, 恒温 37°C。按照底物浓度要求准确移取相应量 5.0 mmol·L⁻¹ 底物溶液, 加入已计算量的抑制剂(对照实验不加), 用 Hepes 缓冲溶液稀释至总体积为 1000 μl , 37°C 恒温 3~5 min。加入酶溶液 30 μl , 启动反应, 同时计时。反应开始后, 不时摇动试管, 使其成均相体系。用平头注射器分别在反应进行至 5, 12, 19, 26 min 时准确移取反应液 10 μl 注入 HPLC 中进行分析。这时由于反应液处在强酸性淋洗液环境中, 酶反应终止。产物马尿酸和底物在色谱柱上得到良好分离并定量检测, 从而得到酶反应在不同时间的产物浓度(或底物浓度), 依此作图, 从图中可求得酶解反应的初始速率。

用上述方法可获得酶解反应在不同浓度抑制剂存在下的反应初速率, 按 Dixon 作图法^[5]求得抑制常数(K_i)并推断抑制类型。按 Cheng YC 和 Prusoff WH 所推导的半抑制浓度(IC₅₀)与 K_i 的关系式^[6], 可求出底物浓度为 0.4 mmol·L⁻¹ 时各个抑制剂的 IC₅₀ 值。

结果和讨论

合成膦三肽的 ACE 体外抑制活性见表 1。从表中可看出该类化合物的酶抑制类型均为竞争性抑制。与参比化合物 captopril 相比, 化合物 **b**, **f**, **h**, **i** 的 IC_{50} 与其处于同一水平。图 2a 和 2b 显示酶解反应在无抑制剂和有一定浓度化合物 **b** 存在下的 HPLC 谱图, 由谱图中产物峰随时间而变化的规律可看出, 化合物 **b** 确实对 ACE 的酶解活性有抑制作用。图 3 显示由 Dixon 作图法求抑制常数的过程, 并由图形推断抑制的类型。

Tab 1 Inhibition properties of synthesized phosphonotriptides

Compound	Structure	Inhibitive type	Ki ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	IC_{50} ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
* Captopril		competitive	1.7	1.8
a		competitive	55	58
b		-	4.0	4.2
b		-	30	32
c		-	120	130
d		-	170	180
e		-	75	79
f		-	6.8	7.2
f		-	49	52
g		-	620	680
h		-	5.1	5.4
i		-	8.2	8.7
i'		-	96	102
j		-	600	640

* Purchased from Sigma Co.

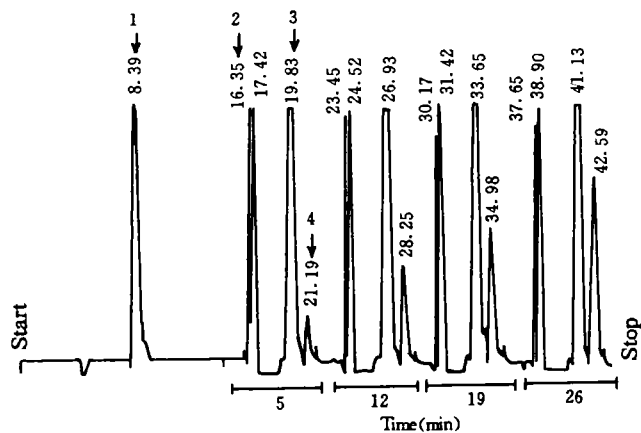


Fig 2a HPLC profile of the controlled enzyme reaction without inhibitor. $[S] = 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.
1: Standard hippuric acid solution for control; 2: Impurities; 3: Substrate; 4: Product.

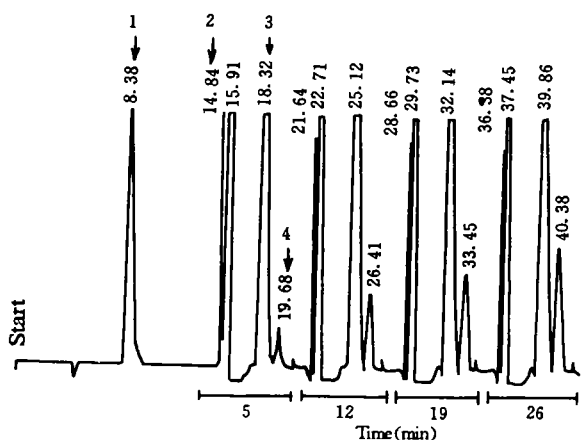


Fig 2b HPLC profile of the compound **b** inhibition test with $15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ inhibitor. $[S] = 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 1: Standard hippuric acid solution for control; 2: Impurities; 3: Substrate; 4: Product.

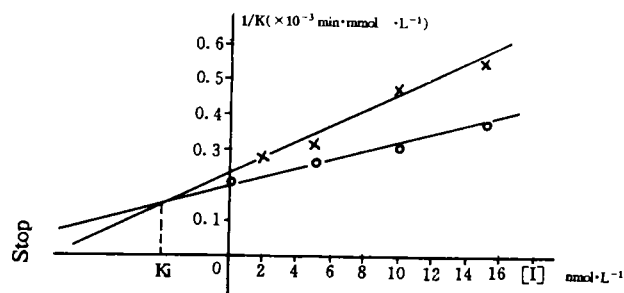


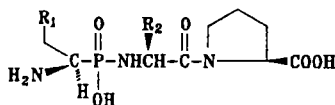
Fig 3 Determination of K_i of compound **b**(*R*, *S*, *S*) by M Dixon Method. $K_i = 4.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; inhibitive type: competitive. $\times - \times$ $[S] 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $o - o$ $[S] 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

仔细考察合成化合物的结构与其体外抑制活性之间的关系, 可得出一些有意义的结论。对于差向异构体(*b/b'*, *f/f'*, *i/i'*), 当差异的手性中心为 *R* 构型时, 其抑制活性要比相应的 *S* 构型高 7~11 倍, 其原因可能与 ACE 的 S_1 亚基位置为疏水性口袋有关(见图 1)。当 c^* 为 *R* 构型时, 疏水基团 R_1 与 S_1 口袋接近, 其亲和力大; 相反, c^* 为 *S* 构型时, 疏水基团远离 S_1 口袋, 极性基团 $-NH_2$ 与之接近, 从而导致亲和力降低, 这一点也从如下两方面得到佐证: 当 **b** 的苯基对位有羟基取代即化合物 **c**, $IC_{50} = 130 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 抑制活性较之 **b** 几乎降低 30 倍; 另外, 当相应的苯基上有极性取代基的化合物 **d, e**, 其抑制活性均较低。可以说, 抑制剂 P_1 位置与酶的 S_1 亚基的匹配是相当重要的^[7], 化合物 **g** 和 **j** 由于其 P_1 位置以 $-CO-NH-$ 方式存在, 碳与氮原子之间有一定的双键性质, 较之以单键形式存在的一级胺结构, 不能与 S_1 口袋很好吻合, 这就使得其抑制活性大大降低。化合物 **f** 和 **b, i** 与 **h** 相比较, 反映了 S_1 口袋的大小对抑制活性的影响。当与之作用的基团从苯基转变为较大的萘基时, 使抑制活性略微降低。

化合物 **a** 与 **b** 相比, 只是在 P_1 位置的碳链少了一个碳原子, 但抑制活性却相差很多。e 和 c 的情况与 a 和 b 类似, 但 e 的抑制活性却比 c 高。这似乎可以解释为, 虽然多一个碳原子使得 c 的芳基能更好地接近 S_1 口袋, 但极性基团的直接作用大大削弱了抑制剂与酶之间的亲和力。

关于酶 S'_1 亚基的性质, 文献报道认为抑制剂在该位置的构型为 S 才较为有利^[1,8], 本文合成的化合物在该位置均为 S 构型。当其它部位相同, 而将 R_2 由甲基替换成 2-萘甲基时, 抑制活性并未提高, 相反却导致略微的降低。这从一个侧面说明 Pascard 的结论^[8]是正确的。他认为 S'_1 口袋较小, 而且极有可能与 S'_2 混在一起。

综上所述, 我们认为下列结构的磷三肽对 ACE 具较高的抑制活性:



其中 R_1 为不含极性取代基的芳香基团, R_2 为较小的烃基。

参 考 文 献

- 1 谢美华. 血管紧张素转化酶抑制剂研究进展. 中国医药工业杂志, 1990, 21:277
- 2 Petrillo EW, Ondetti MA. Angiotensin converting enzyme inhibitors: medicinal chemistry and biological actions. *Med Res Rev*, 1982, 2:1
- 3 Abraham DJ. The potential role of single crystal X-ray diffraction in medicinal chemistry. *Intra Sci Chem Rep*, 1974, 8(4):1
- 4 陈何如, 徐杰诚. 作为血管紧张素转化酶抑制剂-磷三肽的合成研究. 化学学报, 待发表
- 5 Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J*, 1953, 55:170
- 6 Cheng YC, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which cause 50 percent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*, 1973, 22:3099
- 7 Patchett AA, Harris EE, Tristram EW *et al.* A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature*, 1980, 28:280
- 8 Pascard CJ, Guilhem J, Vincent M *et al.* Configuration and preferential solid-state conformations of perindoprilat (S-9780). Comparison with crystal structures of other ACE inhibitors and conclusions related to structure-activity relationships. *J Med Chem*, 1991, 34:663

IN VITRO INHIBITIVE ACTIVITY OF PHOSPHOTRIPEPTIDES TOWARD ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME AND STUDY ON STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP

HR Chen and JC Xu*

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai 200032)

ABSTRACT A series of phosphotripeptides were synthesized according to structure-based rational drug design. The *in vitro* inhibitive activities of these compounds toward angiotensin-converting enzyme were determined. The *in vitro* activities of some of these compounds were shown to be comparable with that of Captopril. Furthermore, the structure-activity relationship (SAR) of these compounds was discussed.

Key words Angiotensin-converting enzyme inhibitors; Hypertension drugs; Phosphotripeptides