

A 03.00.14  
Г - 835

ՀՀ ԱռեվՏրի եվ Տնտեսական Ձևագրման և Անարձագանքի  
«Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ» ՓԲԸ

Գրիգորյան Հասմիկ Ասլանի

$\alpha, \beta$ -Դեհիդրոամինազների ընկալիչների հետազոտումը և կառուցված  
տիպի ներմուծման համար արգելափակման հետազոտումը

Գ.00.14 - «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ  
բիմիակարգի գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան – 2006 թ.

---

МИНИСТЕРСТВО ТОРГОВЛИ И ЭКОНОМИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ РА  
ЗАО «НИИ БИОТЕХНОЛОГИИ»

Григорян Асмик Аслановна

ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ,  
СКОНСТРУИРОВАННЫХ НА ОСНОВЕ  $\alpha, \beta$ -ДЕГИДРОАМИНОКИСЛОТ

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук по  
специальности 03.00.14 – «Биотехнология»

Ереван – 2006 г.

Ատենախոսության բնման հաստատվել է ՀՀ Առևտրի և Տնտեսական զարգացման նախարարության «Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ» ՓԲԸ գիտությունների նիստում:

Գիտական ղեկավար՝ քիմիական գիտությունների դոկտոր,  
Ղ.Պ. Հալեբյան


Պաշտոնական քննդիմախոսներ՝ ՀՀ ԳԱԱ թղթ. անդամ՝  
Ա. Ա. Շահինյան  
քիմիական գիտությունների թեկնածու, դոցենտ՝  
Ա. Ռ. Միրաչյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Ա.Լ. Մնջոյանի անվ. Նորր օրգանական քիմիայի Ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է «23» 06. 2006 թ. ժ. 14<sup>00</sup> -ին Միկրոբիոլոգիայի և Կենսատեխնոլոգիայի 018 Մասնագիտական Խորհրդի նիստում, «Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ»-ի շենքում, հետևյալ հասցեով՝ 375056, ՀՀ, Երևան, Գյուրջյան փող. 14:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ Առևտրի և Տնտեսական զարգացման նախարարության «Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ» գրադարանում:

Սնդմագիրն առարկած է «22» 05 2006 թ.

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
քիմիական գիտությունների դոկտոր՝  Ղ.Պ. Հալեբյան

Тема диссертации утверждена на совместном заседании ученого совета «НИИ Биотехнологии».


Научный руководитель: доктор химических наук,  
Алебян Г.П.  
Официальные оппоненты: член корр. НАН РА  
Шагинян А. А.  
кандидат химических наук, доцент  
Микаелян А. Р.

Ведущая организация: Институт Тонкой Органической Химии им. А. Л. Мнджояна  
НАН РА

Защита диссертации состоится «23» 06 2006 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании Специализированного Совета 018 Микробиологии и Биотехнологии в здании «НИИ Биотехнологии» по адресу – 375056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «НИИ Биотехнологии» Министерства торговли и экономического развития РА.

Автореферат разослан «22» 05 2006 г.

Ученый секретарь Специализированного Совета,  
доктор химических наук  Алебян Г.П.



23.06.2006

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Биотехнология в целом, и в частности, биотехнология ферментов, начиная со второй половины XX столетия приобрела важное значение для медицины и народного здравоохранения. Ферменты используются как готовые лекарственные средства, применяются в диагностике. В тонком органическом синтезе они являются незаменимыми инструментами, позволяющими создавать модельные системы для целенаправленного синтеза и отбора новых высокоактивных и высокоспецифичных физиологически активных веществ.

В наши дни замечается новый всплеск особого внимания к ХЭ и веществам антихолинэстеразного характера, который обусловлен по крайней мере двумя важными причинами: тенденцией беспрецедентного увеличения числа пациентов с заболеванием Альцгеймера (более чем 24 млн.) (<http://www.alzheimer.ca/english/disease/stats-people.htm>) и родственными заболеваниями, а также все возрастающей угрозой терроризма с применением химических ядов, действующих на холинэргическую систему организма. Один из путей лечения этой болезни основан на применении антихолинэстеразных препаратов, имеющих различное сродство к АХЭ и БуХЭ – такрин, ривастигмин, галантамин, донепезил (Nordberg 1998). Однако, известно также, что перечисленные лекарственные средства во многих случаях оказывают побочные действия на организм, что и затрудняет их длительное применение.

Изложенное свидетельствует о необходимости постоянного обновления банка антихолинэстеразных веществ. Поиск и разработка новых лекарственных средств в основном должны быть нацелены на создание препаратов, которые отличаются от своих предшественников избирательностью, эффективностью, минимальным проявлением побочных действий и т.д.

**Цель исследований.** Цель данной работы заключается в конструировании и исследовании нового класса антихолинэстеразных соединений на основе N-замещенных дегидроаминокислот, обладающих высокими значениями сродства к АХЭ и БуХЭ, а также в установлении закономерностей изменений ингибиторных свойств от структуры синтезированных соединений методами ферментативной кинетики и компьютерного молекулярного моделирования.

Для достижения поставленной цели нами проведены следующие исследования:

- **Кинетические исследования (in vitro)** – определены значения IC50 соединений, изучены их ингибиторные и (или) субстратные свойства (определены параметры  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$ ,  $K_i'$ ), с использованием «диких» и мутантных форм ферментов.
- **Токсикологические исследования (in vivo)** – определены значения LD50 высокоактивных ингибиторов на «диких» (АХЭ+/+) и нулизоготных (АХЭ/-) мышцах.
- **Компьютерное молекулярное моделирование** – с использованием метода минимизации энергий внутри- и межмолекулярных связей, изолированных молекул лигандов и фермент – лигандных комплексов, выявлены вероятные взаимодействия между атомами молекулы лиганда и аминокислотными остатками макромолекулы фермента. Проведена визуализация энергетически более стабильных состояний систем. В данных исследованиях применены компьютерные программы *Autogrid*, *Autodock*, *Pymol*, *MM2* и *МОРАС*.

**Научная новизна.** Описан новый класс ингибиторов ХЭ (около 70 соединений), которые являются эфирами или амидами дегидроаминокислот. Данные ингибиторы активны в концентрации, приемлемых для фармакологического применения, наиболее активные из них обладают значениями IC50, равными 22 ÷ 80 наномолей. В

результате токсикологических исследований наиболее активных соединений выявлена низкая токсичность синтезированных нами ингибиторов.

Выявлено вероятное применение некоторых исследованных соединений с антихолинэстеразными свойствами против воздействия более опасных фосфорорганических соединений – ФОС (*пароксон, зоман*).

**Практическая ценность.** На основании полученных показателей IC50 и токсикологических исследований, ряд N-замещенных  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот может быть рекомендован для испытаний в целях лечения БА. Полученные в работе результаты могут быть применены для поиска новых антихолинэстеразных веществ.

**На защиту выносятся:**

- Результаты систематических кинетических исследований ингибиторных свойств N-замещенных  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот (около 70 соединений).
- Результаты токсикологических исследований наиболее активных соединений на «диких» (АХЭ+/+) и нулизиготных (АХЭ/-) мышах.
- Результаты исследований защитных свойств наиболее активных антихолинэстеразных веществ от воздействия ФОС.
- Результаты докиннг анализа взаимодействий конструированных нами лигандов с ферментами АХЭ и БуХЭ.
- Закономерности изменений ингибиторных свойств от структуры лиганда.

**Связь работы с научными тематиками.** Работа выполнена в рамках Госбюджетной темы РА (№ 0819, 2002-2004гг., «Получение биологически активных веществ (аминокислоты и их производные, аминокислоты и пептиды) биокаталитическим методом и их исследование») и гранта Американского Фонда Гражданских Исследований и Развития (CRDF) (№ AB2-2301-YE-02, 2002-2004 гг., «Синтез и антихолинэстеразные свойства некоторых амидов и эфиров N-ацил- $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот»).

**Личный вклад соискателя.** Собственный вклад автора включает решение основных задач исследований, поиск и анализ научной литературы по теме, выполнение экспериментальных работ, участие в обобщении результатов исследований, оформлении научных статей и диссертационной работы. Постановка основных задач и разработка методических подходов прорабатывались под руководством научного руководителя, Г.П. Алебяна, при участии д.х.н. В.О. Топузяна. Отдельные разделы исследований проводились совместно с к.б.н. А.А. Амбарцумяном (обработка кинетических результатов), профессором О. Lockridge, профессором Р. Masson, PhD E.G. Duysen (токсикологические исследования), PhD F. Nachon (молекулярное моделирование). Вещества синтезированы научным сотрудником ИТОХ им. А.Л. Мнджояна НАН РА М.В. Мкртчян, под руководством д.х.н. В.О. Топузяна.

**Апробация диссертации.** Результаты работы докладывались и обсуждались на семинарах лабораторий д.х.н. В.О. Топузяна (ИТОХ им. А. Л. Мнджояна НАН РА), профессора О. Lockridge (University of Nebraska Medical Center, UNMC, Epplay Institute, NE, USA) и профессора Р. Masson (Centre de Recherche du Service de Sante des Armees "EMILE PARDE", CRSSA, La Tronche Cedex, France), а также в лаборатории Инженерной энзимологии «НИИ Биотехнологии». Материалы диссертации докладывались на Первом Международном Медицинском Конгрессе в Ереване (Ереван, Республика Армения, 2003 г.), на Втором Московском Международном Конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, РФ, 2003 г.), на Республиканской Конференции молодых ученых «Органическая химия» (ИОХ, НАН РА, Ереван, 2004 г.), а также на международном симпозиуме «INTAS-South Caucasus 2006» (Тбилиси, Грузия, 2006 г.).

4

**Место выполнения работы.** Работа выполнена в НИИ Биотехнологии (РА), в Медицинском Центре Университета Небраски (UNMC, NE, USA) и в Научно-Исследовательском Центре Медицинской Службы Спасения Армии Франции им. Эмиль Парди (CRSSA, La Tronche Cedex, France).

**Структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, постановки задачи, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения, заключения, выводов, 284 наименований цитируемой литературы и приложения. Диссертация изложена на 146 страницах, содержит 19 таблиц, 31 рисунок, 7 схем.

**Публикации.** Основные результаты исследований, изложенные в диссертационной работе, опубликованы в 8 научных работах (5 научных статей и 3 тезиса международных научных конференций).

**Глава 1** посвящена обзору литературы. В ней обобщены современные представления о холинэстеразах, включая их функции и каталитическую активность в организме. Рассмотрены вопросы структурных особенностей ХЭ и их генетических вариантов. Проанализирована литература, относящаяся к ингибиторам ХЭ и их применению при лечении БА и других родственных ему заболеваний. Особенное внимание отведено обсуждению материала, касающегося производных аминокислот - субстратов и ингибиторов холинэстераз. Отдельный параграф посвящен роли молекулярного моделирования, как современного высокотехнологического виртуального метода, позволяющего улучшить качество исследований в области конструирования, синтеза, скрининга БАВ и поиска корреляций типа структура – активность.

## **Глава 2** МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Ферментные препараты.** В работе использован ферментный препарат дикой формы АХЭ, выделенный автором по методу Fairbanks (Fairbanks 1971) из эритроцитов крови человека. Высокоочищенный препарат БуХЭ плазмы крови человека, любезно предоставлен профессором О. Lockridge. Мутантные формы БуХЭ (Asp70Gly, Trp82A, Tyr332A и Asp70Gly/Tyr332A) получены во Франции методом полицепной реакции сотрудниками лаборатории профессора Р. Masson.

**Производные N-замещенных  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот.** Исследованы четыре группы производных  $\alpha,\beta$  – дегидроаминокислот: 2-(диметиламино)этиловые эфиры N-замещенных  $\alpha,\beta$  – дегидроаминокислот (**1a**) и их йодметилаты (**1b**), 2-(гексаметилен-имино)этиловые эфиры N-замещенных  $\alpha,\beta$  – дегидроаминокислот (**2a**) и их йодметилаты (**2b**), 2-(гексаметиленимино)этиловые амиды N-замещенных  $\alpha,\beta$  – дегидроаминокислот (**3a**) и их йодметилаты (**3b**), а также йодметилаты диэтиламиноэтиловых эфиров N-замещенных  $\alpha,\beta$  – дегидропептидов (**4b**). Структуры веществ приведены на рис. 1.

**Субстраты, ингибиторы и вспомогательные реагенты.** В работе были использованы следующие реагенты: *субстраты* - ацетилтиохолин (АТХ),  $\alpha$ -нафтилацетат ( $\alpha$ НА), нитрофенилбутират ( $\alpha$ НФБ), *ФОС* - пароксон (ПОКС), *ректив Элмана* - 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота (ДТНБ) производства SIGMA. Использованные в работе другие вспомогательные химические реагенты ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , КОН, НСІ,  $C_2H_5OH$ ,  $CH_3OH$ ) соответствовали марки х.ч.

**Объекты токсикологических исследований.** Для изучения токсикологических свойств соединений были использованы мыши с нормальным уровнем АХЭ активнос-

ти (АХЭ+/+) в организме и нокаутированные, нулизогтные особи без АХЭ активности (АХЭ -/-).

**Компьютерное моделирование.** Для моделирования фермент – ингибиторных комплексов использованы следующие компьютерные программы: ChemDraw Ultra 9.0 и Chem3D Ultra 9.0, AutoDock Tools 3.0.5, AutoGrid 3.0.5, AutoDock 3.0.5 и Python 2.3.3, PyMol v0.98. Рентгеноструктурные характеристики АХЭ (1В41) и БуХЭ (1Р01) человека взяты из Brookhaven Protein Data Bank.

**Определение активности ХЭ.** Для определения скорости холинэстеразного гидролиза АТХ использован спектрофотометрический метод Элмана (Ellman 1961). В стандартных опытах, для определения значений IC50 (концентрация исследуемого соединения, при которой наблюдается 50 %-ное торможение скорости холинэстеразного гидролиза), реакционная среда в 2,5 мл конечного объема содержала реагенты в следующих концентрациях: фосфатный буфер 0,1 М, рН 7,6 ± 0,1, ДТНБ 0,4 мМ, АТХ 0,1 мМ, ингибитор в концентрациях, вызывающих торможение ХЭ активности на 10-90 % и фермент в необходимом количестве. Реакцию проводили в термостатируемой ячейке спектрофотометра “Specord UV-Vis” (ГДР) или “Uvicon” (Швейцария) при температуре 25°С. Накопление продукта реакции тиохолина с ДТНБ регистрировали при λ = 412 – 420 нм (ε412 = 14150 М<sup>-1</sup> × см<sup>-1</sup>) (Riddles 1979).

**Определение констант ингибирования обратимых ингибиторов.** Для определения типа и констант ингибирования экспериментальные результаты подвергнуты графическому анализу, предложенному Диксоном (1/v = f [I]) (Dixon 1953) и Корниш-Боуденом (s/v = f [I]) (Cornish-Bouden 1974). Константы ингибирования также определены методом многомерного линейного регрессионного анализа (Cornish Bouden 2004). Расчеты проводились по компьютерным программам Microsoft Office Excel 2003, Sigma Plot 7.01 и GAUSS 4.0.15.

**Определение субстратных свойств аминоксифоров и амидов N-замещенных α,β-дегидроаминокислот под действием ХЭ.** Скорость ферментативного гидролиза лигандов определяли способом непосредственного спектрофотометрического измерения концентрации образовавшейся кислоты или по убыванию степени торможения ферментативной реакции гидролиза АТХ. Значения K<sub>m</sub> и V<sub>max</sub> были определены графическим методом Лайнуивера-Бэрка (1/v = f (1/S)) (Lineweaver and Burk 1934).

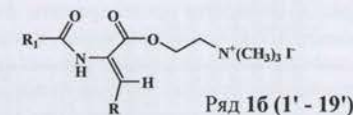
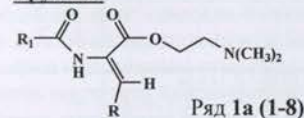
**Определение защитных свойств обратимых ингибиторов от воздействия ФОС на ХЭ человека.** Для определения защитных свойств ингибиторов от необратимо инактивирующего воздействия ФОС использован известный метод (Petrotianu 2005).

**Определение токсикологических свойств ингибиторов ХЭ in vivo.** Токсикологические эксперименты проводились на «диких» (АХЭ+/+) и нулизогтных (АХЭ -/-) мышах. В качестве токсикологического теста использована схема наблюдения поведенческих изменений животных под воздействием исследуемого вещества (Moser 1990).

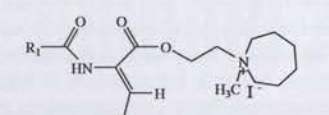
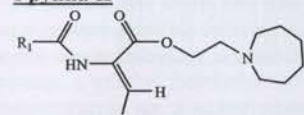
**Главы 3 и 4** посвящены описанию результатов и их обсуждению.

**Логика конструирования соединений.** На основе структуры АХ, с использованием α,β-дегидроаминокислот, конструированы и исследованы четыре группы соединений, потенциальных обратимых ингибиторов ХЭ, общие формулы которых приведены ниже на рис. 1. В каждой из вышеприведенных групп соединений структурные вариации проведены в ацильном фрагменте, а фрагмент уходящей группы сохранен без изменения (с азотом, либо в третичном, либо в четвертичном состоянии, кроме четвертой группы, куда входят только четвертичные производные).

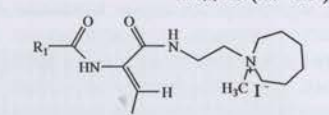
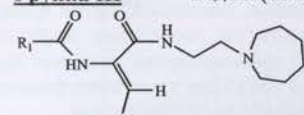
#### Группа I



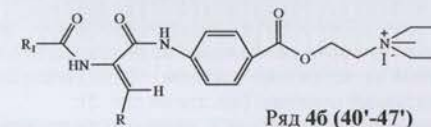
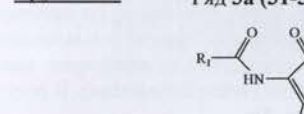
#### Группа II



#### Группа III



#### Группа IV



где R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> {1(1'), 2(2'), 3(3'), 4(4'), 5(5'), 6(6'), 7(7'), 20(20'), 21(21'), 22(22'), 23(23'), 31(31'), 32(32'), 33(33'), 40', 41', 42'}, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O\* {8(8'), 10', 16', 30(30')}, 4-*i*-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {9', 13', 17', 19', 24(24'), 34(34')}, 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {12', 15', 18', 26(26'), 29(29')}, 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {14', 25(25'), 35(35'), 38(38'), 43', 44', 45'}, 2-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {27(27'), 36(36')}, 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {28(28'), 37(37'), 46'}, 3,4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>3</sub> {39(39')}, 3-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {47'}, Z\*\* {11'}; R<sub>1</sub> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> {1(1'), 9', 12', 20(20'), 24(24'), 31(31'), 34(34'), 40', 43'}, 2-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {2(2')}, 2-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {3(3')}, 21(21'), 32(32'), 47'}, 3-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {4(4')}, 44'}, 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {5(5'), 10', 11', 13', 14', 15', 22(22'), 25(25')}, 35(35')}, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O\* {8(8'), 30(30')}, 46'}, 2-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {6(6'), 18', 19', 23(23'), 27(27'), 28(28'), 33(33')}, 36(36'), 37(37'), 39(39')}, 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {7(7')}, 4-*n*-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {16', 17', 45'}, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH=CH {29(29')}, 2,4-ClC<sub>6</sub>H<sub>3</sub> {41'}, 3-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> {42'}

\* фурил; \*\* Z =

Рис. 1. Общие формулы исследованных соединений

Синтез и исследование соединений первой группы преследовали цель, выявления влияния структурных вариаций, проведенных в ацильном фрагменте АХ на их сродство к АХЭ и БуХЭ. В структуре соединений второй группы, в целях дополнительного повышения сродства веществ к ХЭ, в спиртовом фрагменте холиновой головка заменена остатком гексаметиленмина. Использование упомянутого остатка как фактора, положительно влияющего на сродство к ХЭ, ранее было показано сотрудниками ИТОХ на примере производных алифатических дикарбоновых кислот (Мнджоян 1982). В этой же работе показано, что переход от холиновых производных дикарбоновых кислот к 2-(гексаметиленмино)этиловым, приводит также к значительному сни-

жению  $V_{max}$  (БуХЭ), что очень важно для конструирования обратимых ингибиторов на основе структур, содержащих сложнэфирную группу. В третьей группе соединений нами проведена замена сложнэфирной группы на амидную группу. Такая замена должна, в принципе, предотвращать ферментативный гидролиз этих лигандов под действием ХЭ. В четвертой группе, путем введения дегидропептидного остатка проведено значительное увеличение объема ацильного фрагмента молекул, при сохранении сложнэфирной группы. Исходя из современных представлений структуры активного центра ХЭ и в этом случае, вероятно, можно ожидать низкую вероятность холинэстеразного гидролиза. Ход приведенных выше рассуждений нами специально был подвергнут предварительному анализу методом компьютерного моделирования, в результате чего были получены дополнительные подтверждения правомерности избранной стратегии синтеза соединений. В подавляющем большинстве, наряду с третичными производными были синтезированы также и соответствующие им четвертичные аналоги, в виде йодметилатов. Синтез третичных и четвертичных аналогов, по крайней мере, мотивируется двумя важными обстоятельствами. Во-первых, путем введения в структуру лиганда положительного заряда, достигается увеличение электростатического взаимодействия между лигандом и анион связывающими центрами ХЭ. Во-вторых, предотвращение возможного преодоления лигандом гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), допускает проявления свойств периферического характера.

**Значения IC50 обратимых ингибиторов ХЭ.** Для всех синтезированных соединений, для АХЭ и БуХЭ человека определены значения IC50. Как видно из приведенных диаграмм (рис. 2), проведенные все структурные вариации приводят к изменениям в значениях  $\lg(IC50)$  в пределах 3-ех единиц. К структурным вариациям наименее чувствительна система четвертичных лиганды – АХЭ (всего 2 единицы). В результате проведенных исследований показано (см. также рис. 2):

1. структурные вариации, проведенные в ацильном фрагменте АХ с использованием N-замещенных ароматических дегидроаминокислот (группы соединений I - III) и дегидропептидов (группа IV) оказывают сильное влияние на значения IC50, как в случае АХЭ, так и БуХЭ;
2. кватернизация лигандов (группа I) приводит к снижению значений IC50 и это снижение значительно больше в случае АХЭ;
3. кватернизация третичных аналогов (группы II - III) приводит к значительному ухудшению ингибиторных свойств веществ, как по отношению к БуХЭ (до 30 раз), так и к АХЭ (до 7 раз).
4. ингибиторы группы II, в среднем, по отношению к I, являются значительно более сильными ингибиторами и мало отличаются от III.
5. как третичные производные, так и четвертичные проявляют большую селективность по отношению к БуХЭ (группа I - III).
6. в отличие от групп соединений I - III соединения IV проявляют большую селективность по отношению к АХЭ.

Приведенные все 4 диаграммы (рис. 2) показывают, что практически во всех случаях, в основном, наблюдается смешанное чередование соединений из разных рядов. Это, вероятно, свидетельствует о том, что проведение одновременных изменений в структурах лигандов, затрагивающих как ацильный, так и уходящий фрагменты не вносят чисто аддитивный вклад в фермент – лигандное взаимодействие. В области высоких значений IC50 сравнительно компактно расположены третичные аналоги из первой группы (АХЭ, БуХЭ) и йодметилаты аминоэфиров дегидропептидов (4б, БуХЭ). Анализ структур показывает, что среди использованных N- защитных групп, наиболее

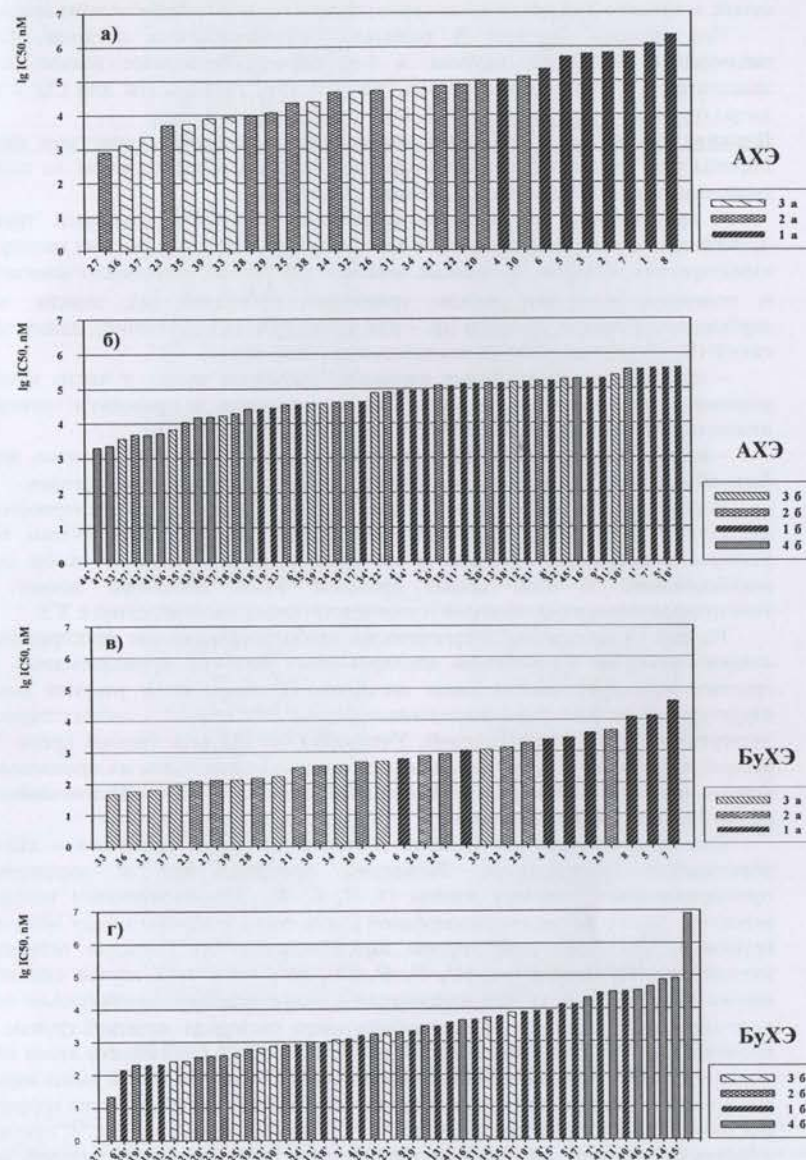


Рис. 2. Диаграмма распределения значений IC50 третичных (а, в) и четвертичных (б, г) аналогов N-замещенных  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот.

часто встречается *o*-метоксibenзойная кислота – 10 из 14-ти рассмотренных соединений, и только в 3-ех соединениях присутствуют *o*- или *m*-бромбензойные кислоты.

Что касается боковых R радикалов аминокислотных остатков, то здесь наблюдается следующая картина: в 4-ех случаях бензольное кольцо не имеет заместителей, в 5-ти – заместителем является атом галогена (Br или Cl), в 1-ном – нитро группа, в 1-ном – метокси и 1-ном – изопропокси группы.

**Влияние структурных вариаций на молекулярные характеристики лигандов.**

Расчеты ряда молекулярных характеристик лигандов и исследование их щелочного гидролиза позволяют сделать следующие заключения:

- при условии неизменного сохранения структуры уходящей группы, и проведения структурных вариаций в ацильном фрагменте, ряд важных молекулярных характеристик лигандов, дипольные моменты ( $\mu$ ), первые потенциалы ионизации (IP) и поляризуемости ( $\alpha$ ), заряды граничных орбиталей ( $q$ ), заряды эфирных карбонильных атомов углерода ( $qC$  - для четвертичных соединений), длины эфирных связей ( $R_{C-O}$ ) не подвергаются значительным изменениям;

- проведенные структурные вариации, указанные выше, в чисто химической реакции щелочного гидролиза, как и следовало ожидать, не приводят к значительным изменениям реакционной способности сложноэфирной группы;

- изменение значений IC50 более чем на полтора порядка, вероятно, не может быть объяснено обсуждаемыми молекулярными характеристиками лигандов.

Вероятно, для исследуемых нами систем, в поиске закономерностей типа структура – активность, в обязательном порядке должны быть учтены большие размеры исследуемых лигандов и их возможные изменения в самом процессе ингибирования. С этой целью проведен более детальный докинг анализ конструированных нами лигандов и соответствующих им комплексов с ХЭ.

На рис. 3 приведены энергетически наиболее стабильные пространственно – конформационные изображения изолированных молекул, принадлежащих разным группам конструированных нами лигандов. В левой части рисунка помещены структуры третичных (протонированные формы), а в правой – соответствующие им четвертичные аналоги соединений. Учитывая, что pH реакционной среды 7,5 при расчете конформаций третичных аналогов нами за основу взяты их протонированные формы, так как значения pKa диметиламиноэтанола и 2-(гексаметиленимино)этанола равны 10,2 и 11,01 соответственно.

Для всех приведенных молекул наблюдается общая тенденция – склонность образовывать псевдоциклы. Интересно отметить, что в соединениях с протонированным аминным азотом (1, 7, 6, 23, 33) стабилизация псевдоцикла, вероятно, происходит за счет водородной связи, образовавшейся между NH уходящей группы и C=O защитной группы аминокислоты. Что касается четвертичных, метилированных соединений (1', 7', 6', 23', 33'), то в этом случае стабилизация, вероятно, происходит за счет кулоновского взаимодействия положительно заряженного атома азота и того же атома карбонильного кислорода защитной группы аминокислоты. При сопоставлении межатомных расстояний ( $l$ ) ближайшего атома водорода аминного азота уходящей группы от кислородного атома указанной выше карбонильной группы с экспериментальными значениями IC50, нами обнаружена корреляционная связь. Как видно из графиков  $\lg IC50 = f(l)$  приведенных на рис. 4, обсуждаемая зависимость наиболее четко просматривается для четвертичных соединений, в случае которых коэффициент корреляции достигает до значения 0,94431 (см. рис. 4).

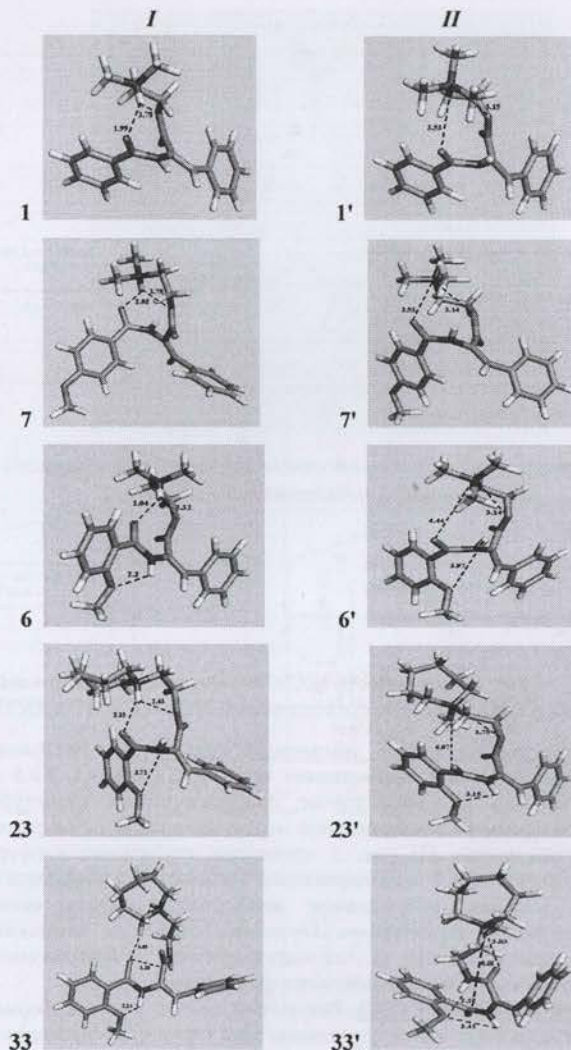


Рис. 3. Пространственные структуры изолированных молекул (компьютерные программы MM2 и MOPAC)

Вероятно, эту связь можно объяснить следующим предположением – конформационная стабильность лиганда (стабильность псевдоцикла), ограничивает степень свободы при образовании межмолекулярных связей между аминокислотными остатками активного центра фермента и лиганда.

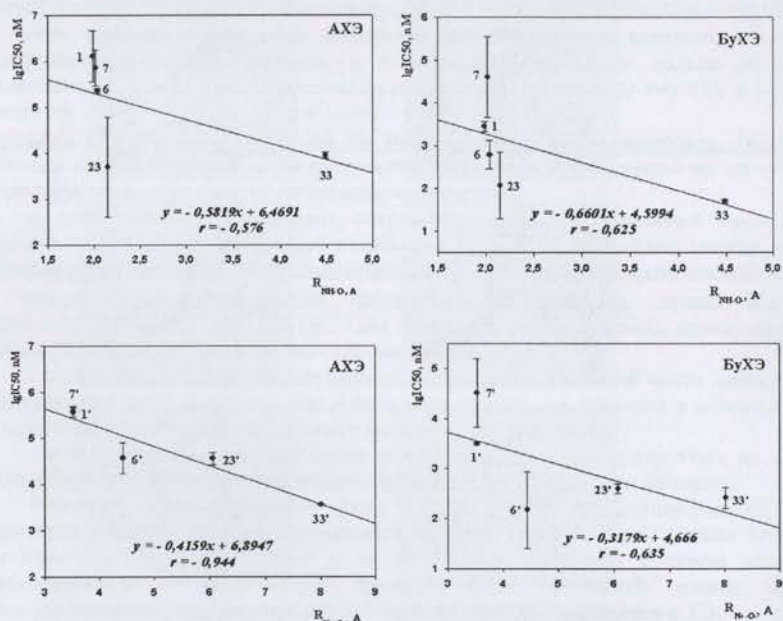


Рис. 4. Зависимости lgIC50 от межатомных расстояний / для изолированных молекул соединений 1(1'), 6(6'), 7(7'), 23(23'), 33(33').

**Анализ структур фермент – лигандных комплексов.** Исследование фермент – лигандных комплексов с применением программ AutoDock 3.0.5 и AutoGrid 3.0.5 показало, что ни в одном случае пространственная структура энергетически выгодного конформера изолированной молекулы лиганда не сохраняется в фермент – лигандном комплексе. На рис. 5 приведены стабильные конформеры молекулы обратимого ингибитора 6' в изолированном состоянии и в комплексе с БуХЭ. Как ясно видно из рисунка, обсуждаемые конформеры сильно отличаются своими пространственными структурами. Очевидно, структура молекулы ингибитора в комплексе стабилизирована за счет взаимодействий с функциональными группами аминокислотных остатков активного центра фермента.

**Корреляция  $\lg IC_{50} = f(\Delta G)$ .** Результаты докинг анализа фермент – лигандных комплексов позволили найти корреляции типа структура – активность, с значительно лучшими коэффициентами корреляции (в среднем), чем в случае, когда были рассмотрены изолированные молекулы лигандов. Как видно из графиков lgIC50 от вычисленных значений комплексообразования  $\Delta G$ , приведенных на рис. 6, обсуждаемая зависимость четко просматривается как для протонированных, так и для четвертичных соединений. Во всех случаях коэффициент корреляции превышает значение 0,7. Наблюдаемая корреляция, по крайней мере показывает, что компьютерное моделирование фермент – лигандных комплексов позволяет с довольно высокой степенью достоверности предсказать вероятную активность виртуального вещества – аналога данного ряда.

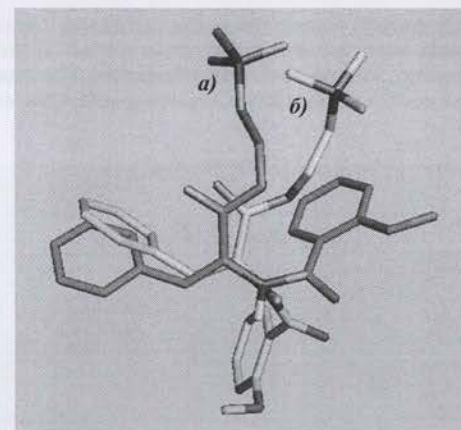


Рис. 5. Изолированная структура молекулы лиганда 6' (а) и его соответственная структура, моделированная с ферментом (б).

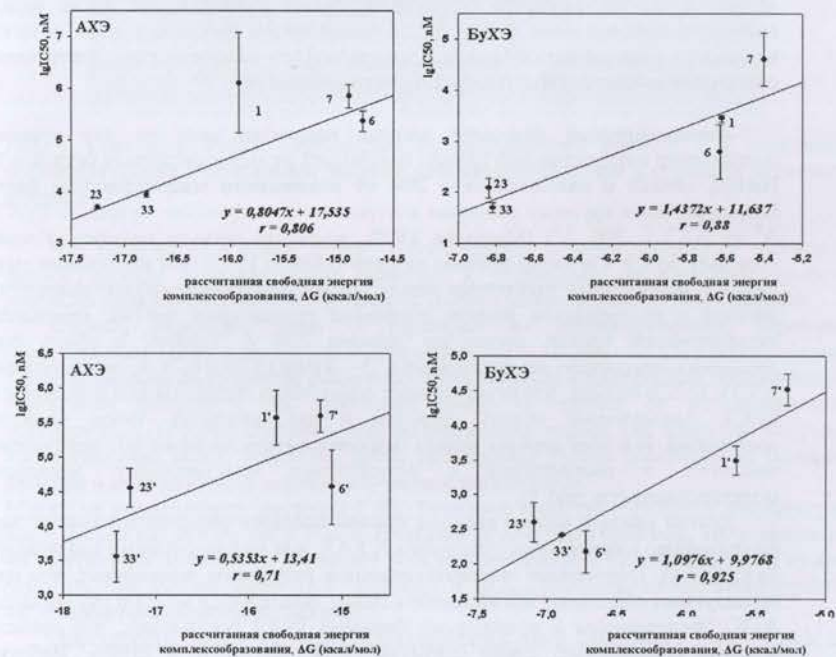


Рис. 6. Зависимости lgIC50 от энергии комплексообразования  $\Delta G$ .

**Субстратные и ингибиторные свойства лигандов.** Согласно логике конструирования лигандов наилучшими субстратами должны были быть производные дегидроаминокислот, что нашло свое экспериментальное подтверждение.

Результаты докинг анализа на примере систем БуХЭ – 40' проиллюстрированы на рис. 7 (а, б).

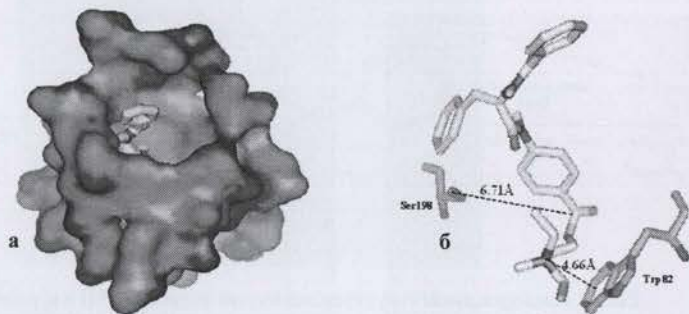


Рис. 7. Пространственное строение фермент – лигандного комплекса БуХЭ (а, б) с соединением 40'. Показаны пространственное расположение лиганда внутри «ущелья» активного центра фермента (а) и то же самое расположение после «удаления» полипептидной оболочки фермента, за исключением аминокислотных остатков Ser, входящего в состав каталитической триады и Trp - аминокислоты, ответственной за связывание аммонийной катионной головки лиганда (б).

Аминоспиртовый фрагмент лиганда направлен вниз ко дну «ущелья», в направлении каталитической триады (состоящей из аминокислотных остатков Ser198, His438, Glu325 и находящейся в 20Å от поверхности макромолекулы фермента). Благодаря более крупным размерам внутреннего пространства «ущелья» БуХЭ – 500 Å<sup>3</sup> (у АХЭ – 300 Å<sup>3</sup>) (Massoulié 1999), молекула лиганда полностью «тонет» в «ущелье» БуХЭ. Согласно мнению авторов (Masson 1997), для протекания гидролиза лиганда, необходимое расстояние между углеродным атомом сложноэфирной группы лиганда и кислородным атомом спиртовой группировки Ser198, принадлежащей каталитической триаде, составляет порядка 2,16 Å. Однако, в обоих фермент-лигандных комплексах это расстояние в 3 – 4 раза (5,26 и 6,71 Å, соответственно для АХЭ и БуХЭ) больше, что резко снижает вероятность гидролиза под действием АХЭ и БуХЭ. Аналогичный анализ проведен и для остальных типов четвертичных соединений. И в этих случаях низкая гидролизуемость лигандов под действием БуХЭ находится в соответствии с результатами компьютерного молекулярного моделирования (см. рис. 8).

Другой важный вопрос касается причин высокого сродства изученных лигандов по сравнению с природным субстратом ХЭ АХ, или их ближайшими аналогами (АТХ, БуХ, БуТХ). Полученные экспериментальные результаты показывают, что сродство исследуемых обратимых ингибиторов к дикой форме БуХЭ до 1000 раз больше, чем у АТХ. Эксперименты с мутантными формами БуХЭ показывают, что проведенные мутации сравнительно слабо сказываются на  $K_m$  БуТХ и оНФБ. Наблюдаемое повышение значений  $K_m$  составляет 1,5 ÷ 11,2 раза, в то время как значения  $IC_{50}$  увеличиваются на 161 ÷ 25760 раза. Согласно результатам моделирования, изученные

нами лиганды, не имеют возможности взаимодействовать с гидроксилом серина каталитической триады активного центра фермента, в то время как для АТХ эта возможность сохраняется во всех случаях. Поэтому этот путь связывания, вероятно, обуславливает сравнительно малую чувствительность АТХ к мутациям в структуре фермента.

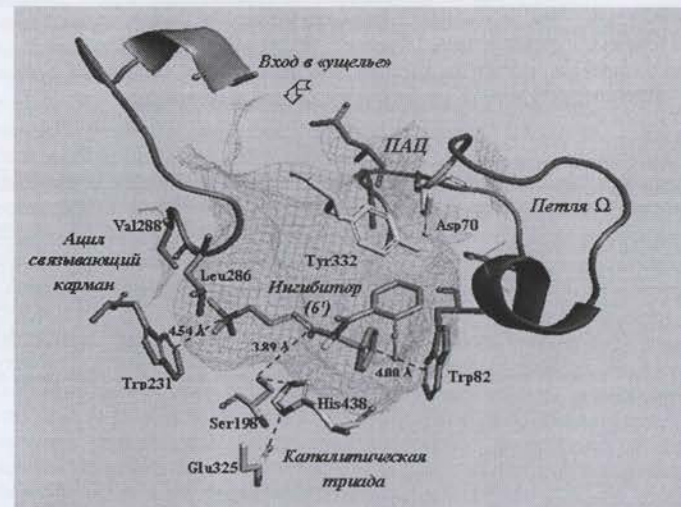


Рис. 8. Пространственное изображение моделированного фермент – 6' комплекса соответствующий минимальной энергии комплексообразовани в «ущелье» активного центра БуХЭч.

Что касается того факта, почему в большинстве случаев переход от третичной формы лиганда к четвертичной приводит к ухудшению ингибиторных свойств довольно сложно объяснить, и этот вопрос требует дополнительных исследований.

Однако, переходы форм – третичная ↔ протонированная, вероятно, предоставляют лиганду значительно более широкие возможности для взаимодействия с функциональными группами аминокислотных остатков фермента (как положительно заряженная частица и как свободный амин), в отличие от метилированных четвертичных, которые способны взаимодействовать только как молекулы несущие положительный заряд. Вероятно, также необходимо учесть сравнительно большие размеры и гидрофобность молекул изучаемых ингибиторов.

**Могут ли преодолевать лиганды ГЭБ.** Защитные свойства обратимых ингибиторов исследованы как *in vitro* так и *in vivo*. В опытах *in vitro* было показано, что соединение 48' достаточно эффективно защищает БуХЭ от воздействия ПОКС. При этом нужно отметить, что двойное увеличение значения  $IC_{50}$ ПОКС наблюдается при концентрации 48', равной приблизительно 100 nM.

Определение защитных свойств исследуемых нами обратимых ингибиторов от воздействия нервно-паралитического яда зомана *in vivo* показало, что предварительное введение в организм мышей соединения 36 оказывает защитное

действие. При этом значение LD50 *зомана* по сравнению с контролем увеличивается в 1,5 раза<sup>1</sup>. Этот результат косвенно подтверждает, что синтезированные нами третичные лиганды проникают через ГЭБ.

**Токсикологические свойства.** Согласно токсикологическим исследованиям (АХЭ+/+ и АХЭ -/- мыши) наиболее активных соединений (аминоэфир **28** и **23'**), можно сделать вывод, что данные обратимые ингибиторы токсичны только при высоких, значительно превышающих фармакологически допустимые дозы (табл. 1). Безусловно, ограниченное число исследованных соединений не позволяет прогнозировать такую же низкую токсичность для остальных соединений, однако приведенные результаты вселяют определенный оптимизм.

Табл. 1

*Токсикологические характеристики соединений 27 и 27'*

Идент. номер животного	Пол	Возраст (дни)	Масса тела (г)	Номер соед.	Доза препарата	Комментарии (л.и.)
F17031208 (F6M2)M9-/+	мужской	56	15.8	27'	65 мг/кг	50 мин
F14031218 (F2M8)M4+/+	мужской	46	23.0	27'	215 мг/кг	120 мин
F14031209 (F4M8)M3-/-	мужской	52	14.8	27	165 мг/кг	80 мин
F16031223 (F9M7)M2+/+	мужской	41	23.1	27	450 мг/кг	выжил

\* л.и. – летальный исход

\*\* в связи с низкой растворимостью соединения 27, летальная доза не была достигнута для мышей с диетой АХЭ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важные функциональные предназначения холинэстераз в организме, их уникальные каталитические свойства, и наконец, уязвимость холинэстераз высокоспецифичными и высокотоксичными ядами являются основными причинами, благодаря которым почти 100 лет эти ферменты находятся в центре внимания энзимологов всего мира. Приведенный нами анализ научной литературы с одной стороны показывает достижения ученых в данной области, а с другой стороны, ясно вычерчивает спектр задач, подлежащих решению. Достаточно сказать, что, несмотря на тысячи опубликованных работ, посвященных каталитическим свойствам холинэстераз (субстраты, необратимые и обратимые ингибиторы, активаторы), до сих пор не существует единой теории или модели, которая могла бы обобщить, объяснить и предсказать закономерности холинэстеразного катализа, наблюдаемые в эксперименте. Однако, накопленный опыт позволяет исследователям успешно применять холинэстеразы для решения многих научно – практических задач. Достаточно упомянуть применение препаратов холинэстераз в лечебных и профилактических целях, в качестве высокочувствительных детекторов ряда токсичных соединений, модельных систем для дизайна и скрининга новых физиологически активных соединений и др.

<sup>1</sup> Эксперименты проведены научными сотрудниками института им. Эмиля Парди (Centre de Recherche du Service de Sante des Annees "EMILE PARDE", France). Результаты приведены в приложении 5 диссертационной работы.

В рамках данной работы нами была поставлена и достигнута цель - на основе структуры ацетилхолина, с использованием  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот сконструировать и исследовать новый тип обратимых ингибиторов ХЭ, содержащих в своей структуре сложноэфирную (или амидную) группу, которая повторяет расположение аналогичной группы в молекуле ацетилхолина. При этом, особенный упор сделан на применение современных биотехнологических подходов, включающих использование холинэстераз в качестве мишени для скрининга и компьютерного моделирования для целенаправленного дизайна лигандов.

В результате проведенной работы показана плодотворность поиска обратимых ингибиторов ХЭ, синтезированных на основе аминокислот. Показано также, что с применением простых и эффективных методов синтеза, возможно, сконструировать обратимые ингибиторы, которые в 1000 раз более эффективно связываются с ХЭ, чем их природные субстраты. Учитывая их низкую токсичность и близкие значения IC50 для третичных и четвертичных аналогов, можно предположить, что названные ингибиторы избирательно можно направлять в орган – системы организма, которые контролируются периферической и/или центральной нервной системой. В этой связи важно отметить, что описанные нами ингибиторы проявляют избирательность по отношению к БУХЭ, а их третичные аналоги способны преодолевать ГЭБ. Важность сказанного заключается в том, что современный подход лечения БА с применением ингибиторов ХЭ, в отличие от прежнего, предполагает чередующееся применение избирательных ингибиторов АХЭ и БУХЭ, а арсенал малотоксичных препаратов – избирательных по отношению к БУХЭ требует необходимого восполнения.

Учитывая полученные нами положительные результаты и на основе вышесказанного можно сделать заключение о необходимости более разносторонних исследований описанных нами наиболее активных соединений. Кроме этого, необходимо констатировать целесообразность параллельного расширения работ проводимых по компьютерному моделированию систем лиганд – ХЭ и синтезу новых соединений, производных дегидроаминокислот.

## ВЫВОДЫ

1. Сконструированы и охарактеризованы около 70 ранее не описанных в литературе новых высокоспецифичных обратимых ингибиторов холинэстераз – аминоэтиловых эфиров и амидов N-замещенных  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот и  $\alpha,\beta$ -дегидропептидов в виде третичных и четвертичных аналогов.
2. Показано, что исследованные соединения, являясь аналогами ацетилхолина, в подавляющем большинстве практически не подвергаются ферментативному гидролизу под действием эритроцитарной и плазменной холинэстераз человека.
3. Большая часть описанных обратимых ингибиторов обладают значениями IC50 в наномолярном концентрационном интервале, имеют слабо выраженные токсикологические свойства и могут быть рекомендованы для дальнейших фармакологических исследований.
4. Показано, что в отличие от йодметилатов, третичные аналоги исследованных соединений способны пересекать ГЭБ и, следовательно, могут быть рассмотрены и исследованы как препараты с перспективой их применения для лечения БА и (или) защиты организма от фосфорорганических ядов.

- Выявлено, что все изученные эфиры и амиды N-замещенных  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот являются более специфичными по отношению к БуХЭ, а эфиры  $\alpha,\beta$ -дегидропептидов – к АХЭ. Для некоторых лигандов эта разница в специфичности достигает до тысячи раз.
- Впервые обнаружено, что кватернизация третичного азота в структуре лиганда, расположенного в позиции катионной головки ацетилхолина приводит к снижению сродства молекулы ингибитора к АХЭ и БуХЭ.
- С помощью методов компьютерного моделирования впервые показана корреляция между структурой и ингибиторной активностью веществ данного ряда соединений по отношению к ХЭ, интерпретирован ряд особенностей и специфических явлений, присущих взаимодействию аминоэтиловых эфиров и амидов N-замещенных  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот и  $\alpha,\beta$ -дегидропептидов с холинэстеразами.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ РАБОТ

- A.A. Григорян, А.А. Амбарцумян, М.В. Мкртчян, В.О. Топузьян, Г.П. Алебян, А.А. Оганесян, М.С. Овсепян. Синтез и антихолинэстеразные свойства диалкиламиноэтиловых эфиров N-замещенных  $\alpha,\beta$ -дегидропептидов. Биотехнология. 2005, 4(5), 59-66.
- A. A. Григорян, А. А. Амбарцумян, М.В. Мкртчян, В.О. Топузьян, Г.П. Алебян, Р.С. Асатрян. Синтез и антихолинэстеразная активность 2-(диметиламино)этиловых и холиновых эфиров N-замещенных  $\alpha,\beta$ - дегидроаминокислот. Хим.-Фарм. Ж., 2006, 40(3), 114-119.
- H. A. Grigoryan, A. A. Hambardzumyan, M. V. Mkrтчyan, V. O. Topuzyan, G. P. Halebyan, R. S. Asatryan.  $\alpha,\beta$ -dehydrophenylalanine choline esters: potent reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. Elec. J. Natur. Sci., National Academy of Sciences of RA, 2006, 1(6), 14-20.
- Grigoryan H., Grigoryan N., Hambardzumyan A., Halebyan G., Harutyunyan L., Mkrтчyan M., Topuzyan V. New anticholinesterase compounds on the basis of  $\alpha,\beta$ -dehydroamino acids: synthesis and interaction with human erythrocyte AChE and human serum BuChE. Proceedings of the First International Medical Congress of Armenia. Yerevan, July 1-3, 2003, pp. 84-85.
- G. Halebyan, H. Grigoryan, A. Hambardzumyan, L. Harutyunyan, M. Mkrтчyan, V. Topuzyan. Choline esters of N-substituted  $\alpha,\beta$ -dehydroamino acids inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. II Moscow International Congress "Biotechnology: State of the Art and prospects of development". Moscow, November 10-14, 2003, pp 230-231.
- Григорян А. А. Антихолинэстеразные свойства йодметилатов холиновых эфиров N-замещенных  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот. *Наука и техника, 2005, №1, 23-28*
- A. A. Григорян, А. А. Амбарцумян, М.В. Мкртчян, В.О. Топузьян, Г.П. Алебян. Новые обратимые ингибиторы холинэстераз на основе аминоэтиловых эфиров  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот. Биол. Ж. Армении, 2005, 1-2(57), 3-7.

## Գրիգորյան Հասմիկ Ասլանի

$\alpha,\beta$ -ԴԵՀԻԴՐՈԱՄԻՆՆԱԹԹՈՆԵՐԻ ՎԻՄԱՆ ՎՐԱ ԿԱՌՈՆՅՎԱԾ  
ՄՈԼԵԿՆԵՄԹԵՐԱԶՆԵՐԻ ՆՈՐ ԱՐԳԵԼԱԿԻՉՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Որոշիչ բառեր՝ խոլինէսթերազների, խոլինէսթերազների դարձելի արգելակիչներ, IC50 արժեք, Ալցհեյմերի հիվանդություն, պաշտպանություն ֆոսֆորոպահական թույներից, մոլեկուլային մոդելավորում

Թեկնածուական ատենախոսությունը վերաբերում է  $\alpha,\beta$ -դեհիդրոամինաթթուների հիման վրա ստեղծված խոլինէսթերազների ավելի քան 70 նոր դարձելի արգելակիչների հատկությունների ուսումնասիրմանը: Նշված արգելակիչները ակտիվ են թերապևտիկ կիրառելի կոնցենտրացիաների սահմաններում և դրանց IC50 արժեքները տատանվում են  $22 \div 80$  նանոմոլ միջակայքում: Առավել ակտիվ միացությունների թունաբանական հատկությունների ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ դրանց տոքսիկ ազդեցությունը ի հայտ է գալիս բարձր կոնցենտրացիաների կիրառման պայմաններում, ինչը հնարավորություն է տալիս հետազոտված միացությունները առաջարկել Ալցհեյմերի հիվանդության բուժման նպատակով փորձարկելու համար: *In vitro* և *in vivo* հետազոտությունները խոսում են նշված միացությունների հետագա ավելի խոր ուսումնասիրությունների նպատակահարմարության մասին՝ որպես խոլինէսթերազների ֆոսֆորոպահական թույներից պաշտպանող ազդեցություն: Համակարգչային մոլեկուլային մոդելավորման միջոցով ստացվել են էներգետիկ տեսակետից կայուն, ինչպես իզոպրոպիլային տարածական կոնֆորմացիոն պատկերները: Հաստատվել է կորելյացիոն գծային կախվածություն՝ արգելակիչ հաշվարկային քիմիական կառուցվածքի և էքսպերիմենտալ հակախոլինէսթերազային ակտիվության միջև:

Grigoryan Hasmik Aslan

THE RESEARCH OF NEW INHIBITORS OF CHOLINESTERASES ON THE BASIS OF  
 $\alpha,\beta$ -DEHYDROAMINO ACIDS

ABSTRACT

**Key words:** cholinesterases, reversible inhibitors of cholinesterases, values of IC50, Alzheimer's disease, protection against organophosphorus poisons, molecular modeling

A new class of cholinesterase inhibitors was designed and tested (more than 70 new compounds). These inhibitors are esters and amides of dehydroamino acids. The inhibitors are potent in the physiological range; the more active ones have IC50 values of 22 - 80 nanomolar. The toxicological investigations of the most active compounds gave evidence of low toxicity of these inhibitors. The effective concentrations are in the pharmacological range and, therefore, can be proposed for treatment of Alzheimer's disease. *In vitro* and *in vivo* investigations have shown that the presented compounds have a cholinesterase protective action against toxic organophosphorus poisons. The 3D presentations of energy-wise stable conformations of isolated molecules as well as of enzyme-ligand complexes were obtained by the molecular modeling program. The correlation between virtual chemical structure and experimental anticholinesterase activity of presented inhibitors was found.



