

## 点击化学制备 AChE/MAO-B 双抑制剂及活性评价

贾朝<sup>\*1</sup>, 梁旭华<sup>1</sup>, 周伟<sup>2</sup>, 潘婷婷<sup>1</sup>, 李世奎<sup>1</sup>

(1.商洛学院 生物医药与食品工程学院,陕西 商洛 726000;2.陕西香菊药业集团有限公司,陕西 商洛 726000)

**摘要:**通过点击化学(Click)设计、合成了 22 个香豆素衍生物。多数化合物在微摩尔范围内表现出良好的 AChE 和 MAO-B 双抑制活性,具有良好的生物相容性。尤其是一种名为 A2B5 的化合物,对 AChE 和 MAO-B 的  $IC_{50}$  分别为  $(0.23 \pm 0.02)$ 、 $(0.31 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$ ,是最佳的 AChE/MAO-B 双抑制剂。实验结果表明香豆素基团是一类有效的 AChE 和 MAO-B 双抑制活性基团,羟基取代苯环的存在能够增强抑制活性。分子对接研究发现 A2B5 是双位点抑制剂,苯基部分结合到 AChE 的 CAS 位点,香豆素结合到 PAS 位点,三氮唑环占据两个活性位点的中间峡谷。A2B5 的香豆素部分结合到 MAO-B 的入口空腔,苯基部分结合到底物空腔,并嵌入到 Tyr435、Tyr398 和 FAD 形成的“芳香笼”。总之,香豆素 C7 位置取代衍生物可以被开发为 AChE/MAO-B 双抑制剂,为进一步开发抗阿尔茨海默病的双靶点药物提供一个新的起点。

**关键词:**阿尔茨海默病(AD);点击化学;香豆素;AChE/MAO-B 双抑制剂;分子对接;生物相容性

**中图分类号:**TQ46 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)05-0112-09

**DOI:**10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0818

**Preparation and the Activity Evaluation of AChE/MAO-B Dual Inhibitors Using Click** JIA Zhao<sup>\*1</sup>, LIANG Xu-hua<sup>1</sup>, ZHOU Wei<sup>2</sup>, PAN Ting-ting<sup>1</sup>, LI Shi-xi<sup>1</sup> (1.College of Biology Pharmacy and Food Engineering, Shangluo University, Shangluo 726000, China; 2.Shaanxi Xiangju Pharmaceutical Group Real Estate Co., Ltd., Shangluo 726000, China)

**Abstract:** The Click was utilized to design and manufacture 22 coumarin derivatives. In the micromolar range, the majority of these compounds exhibit potent dual inhibitory activity against AChE and MAO-B, suggesting favorable biocompatibility. Among these derivatives, A2B5 emerged as the most effective AChE/MAO-B dual inhibitor, with  $IC_{50}$  values of  $(0.23 \pm 0.02) \mu\text{mol/L}$  for AChE and  $(0.31 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$  for MAO-B, respectively. Experimental results highlight, coumarin groups as robust dual inhibitory functional groups for MAO-B and AChE, with enhanced inhibitory activity observed in the presence of hydroxyl substituted benzene rings. Molecular docking studies revealed that A2B5 functions as a dual-site inhibitor, with the triazole moiety binding to the center canyon of the active sites and the phenyl and the coumarin units attaching to the CAS site of AChE and the the PAS site of MAO-B, respectively. Specially, the phenyl component of A2B5 links to the substrate cavity, forming interactions within the “aromatic cage” created by Tyr435, Tyr398, and FAD, while the coumarin portion binds to the entrance cavity of MAO-B. In conclusion, the development of coumarin C7 substituted compounds as AChE/MAO-B dual inhibitors presents a promising approach for advancing research and development efforts focused on dual-target medications for Alzheimer's disease.

**Key words:** Alzheimer's disease; Click; coumarin; AChE/MAO-B dual inhibitors; molecular docking; biocompatibility

阿尔茨海默病(AD)<sup>[1]</sup>是一种多因素神经系统疾病,以记忆丧失和认知障碍为主要病症。AD 的致病机理十分复杂,与多种因素有关,如过度表达的单胺氧化酶(MAOs)、乙酰胆碱(ACh)水平下降、tau 蛋白的过度磷酸化、淀粉样蛋白(A $\beta$ )聚集和氧化应激等<sup>[2]</sup>。随着 AD 致病机理的不断阐明,发现 AD 的发生和发展是细胞内及生物体内复杂的调控网络和调控因子的多重作用结果,涉及多基因之间的关联。而单靶标药物分子针对单一靶点的作用可能是导致其临床疗效不够理想且相对毒副作用较大的主要原因。因此,寻求针对多靶点治疗的化合物成了 AD 治疗药物

研发的趋向<sup>[3]</sup>。

MAOs 与体内胺的氧化代谢有关,具有调节中枢神经系统(CNS)神经递质的功能<sup>[4]</sup>。如果

收稿日期:2023-12-08;网络首发日期:2024-02-09

基金项目:陕西省教育厅项目(20JK0610);张生勇院士项目(18YSZX003)。

作者简介:贾朝(1985-),男,陕西商洛人,博士,讲师,主要研究方向为抗 AD 药物构建与筛选, E-mail: chunjia\_111@163.com。

引用本文:贾朝,梁旭华,周伟,等.点击化学制备 AChE/MAO-B 双抑制剂及活性评价[J].化学试剂,2024,46(5):112-120。

MAOs 的代谢途径出现障碍会造成多种神经递质出现紊乱,导致多种神经退行性疾病,如阿尔茨海默病(AD)和帕金森病(PD)等<sup>[5]</sup>。MAOs 具有两个亚型,即 MAO-A 和 MAO-B,MAOs 抑制剂可以作为抗抑郁药。30%~50%的 AD 患者同时伴有不同程度的抑郁症状,而且随着 AD 的发展,抑郁发病率逐渐升高,所以 MAOs 抑制剂可以用于 AD 的治疗<sup>[6]</sup>。

ACh 是一种神经递质,与认知功能和意识有关<sup>[7]</sup>。AChE 能降解 ACh,终止神经递质对突触后膜的兴奋作用,保证神经信号在生物体内的正常传递。病理学发现与健康人相比,AD 患者的 ACh 浓度极低。而且 AChE 的阴离子位点(PAS)会促进 A $\beta$  聚集,引起大脑中形成老年斑,导致神经退行性疾病<sup>[8]</sup>。因此,AChE 抑制剂可以增加突触间隙 ACh 含量,改善 AD 患者的症状。目前,临床中用于治疗 AD 主要有以下几种 AChE 抑制剂(图 1):多奈哌齐(Donepezil)、加兰他敏(Galantamine)、利凡斯的明(Rivastigmine)和石杉碱甲(Huperzine A)等。这些胆碱类药物能够使 AD 症状得到缓解,但不能彻底治愈。因此现在许多研究小组的注意力都集中在开发多靶向药物(MTA)用于治疗 AD<sup>[9-12]</sup>。具有 MAO-B 抑制活性的化合物同时具有 AChE 抑制活性就可以在 AD 治疗中显示更好的治疗效果。许多此类型的多靶点抑制剂已经被开发。Ladostigil(图 1)是一种有效的 AChE 和 MAO-B 的双抑制剂,抑制 MAO-B 和 AChE 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 37.1、31.8  $\mu$ mol/L,目前处于 II 期临床试验<sup>[13-15]</sup>。

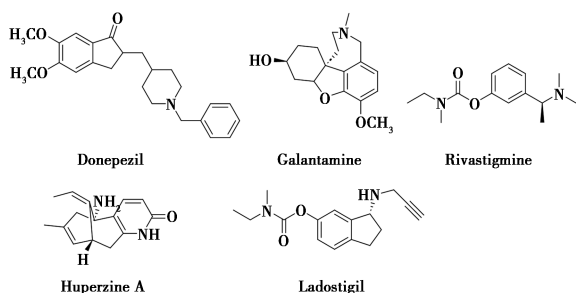


图 1 已上市和正在进行临床试验的 AD 药物

Fig.1 AD drugs that have been marketed and are currently undergoing clinical trials

香豆素(又名苯并吡喃酮)是一大类化合物,有天然和人工合成两个来源,具有多种药理活性,如抗抑郁、抑菌、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗病毒等。最新的研究发现香豆素类化合物具有 MAOs 和

AChE 双重抑制活性,可以开发为双靶点 AD 药物,受到人们的重视<sup>[16]</sup>。Lee 团队从艾蒿的乙醇水提取液中分离出 7-羟基香豆素(7-Hydroxycoumarin,对 MAO-B、AChE 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 31.1、29.0 mmol/L)、7-甲氧基香豆素(7-Methoxycoumarin,对 MAO-B 的 IC<sub>50</sub> 值为 32.2 mmol/L,对 AChE 的 IC<sub>50</sub> 值未测出)和东莨菪内酯(Scopoletin,对 MAO-B、AChE 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 45.0、168.0 mmol/L),3 种香豆素类化合物表现出对 MAOs 和 AChE 双重抑制活性<sup>[17,18]</sup>。Lan 等<sup>[19]</sup>将 N-苄基吡啶鎓基团和香豆素结合在一个分子中合成了香豆素衍生物 7f,是有效的 MAO-B(IC<sub>50</sub> 值为 1.57 mmol/L)和 AChE(IC<sub>50</sub> 值为 0.037 3 mmol/L)双抑制剂。Pisani 等<sup>[20]</sup>制备的香豆素类化合物 7-[(3-氯苄基)氧基]-4-[(甲氨基)甲基]-2H-氯-2-酮(22b)是一种强效的 MAO-B 抑制剂(IC<sub>50</sub> 值为 13 nmol/L),同时该化合物表现出对 AChE 的抑制活性。He 等<sup>[21]</sup>设计并合成了一系列新的香豆素-二硫代氨基甲酸酯杂化物。它们中的大多数对 AChE 和 MAO-B 具有有效和明显的选择性抑制作用。其中化合物 8g 是最有效且平衡的 AChE 和 MAO-B 抑制剂(对 AChE、MAO-B 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.114、

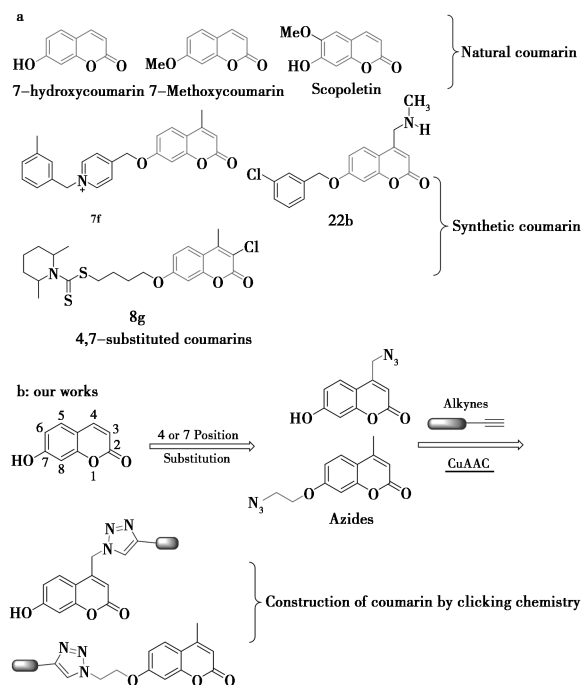


图 2 a.已知的香豆素类 MAO-B 和 AChE 双抑制剂; b.通过点击化学构建的双抑制剂

Fig.2 a.Known coumarin based MAO-B and AChE dual inhibitors;b.Double inhibitors constructed by clicking on chemistry

0.101  $\mu\text{mol/L}$  (图 2a)。可见香豆素类化合物是一种潜在的多靶点 AD 药物,以香豆素为起点,设计合成新型的 AChE 和 MAO-B 双抑制剂具有良好的前景。在之前的研究中,开发了新型吡哆醇衍生物作为 MAO-B 和 AChE 双重抑制剂<sup>[22]</sup>。在这项研究中,Cu(I) 催化炔烃-叠氮化合物环加成反应(CuAAC)因其反应的高度模块化和高效率,被成功应用于 AChE 和 MAO-B 双抑制剂的构建。

本文旨在以香豆素替代吡哆醇,遵循相同的策略,通过点击化学的方法,引入药效团,合成香豆素类化合物,对所有化合物进行结构表征。使用 AChE、BChE 和 MAO-A/B 酶进行体外抑制活性分析。并利用分子对接方法研究所设计化合物与靶蛋白的结合特性。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Frontier 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR, 美国 Perkin Elmer 公司); Infinite 200 PRO 型多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); PERSEE-T6 型紫外-可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司)。

间苯二酚 ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ )、4-氯乙酰乙酸乙酯 ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{ClO}_3$ )、4-甲基-7-羟基香豆素 ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ )、1,2-二溴乙烷 ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{Br}_2$ ) (国药集团化学试剂有限公司); 聚(4-乙烯基吡啶) (P4VP, 北京伊诺凯科技有限公司); 胆碱酯酶、单胺氧化酶 (美国 Sigma Aldrich 公司); 反应过程用薄层色谱法进行检测 (玻璃硅胶板, GF254 作为吸附剂); 混合物使用柱层析分离, 石油醚和乙酸乙酯作为柱层析的洗脱剂。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 叠氮端的制备

##### 1.2.1.1 (叠氮甲基)-7-羟基-2H-色烯-2-酮 (A1)

在 500 mL 圆底烧瓶中加入 8 g (0.072 mol) 间苯二酚、12 mL (0.088 mol) 4-氯乙酰乙酸乙酯。在冰浴条件下,将 60 mL 浓硫酸缓慢滴加到反应液中。滴加完毕后,冰浴条件下继续搅拌 4 h。然后将反应液倒入冰水中,出现大量固体,过滤,滤饼用水洗涤,70  $^{\circ}\text{C}$  真空干燥,得到 4-(氯甲基)-7-羟基-2H-色烯-2-酮 (I)。

将 1.2 g (6 mmol) 化合物 I 溶解在 20 mL 干燥的 DMF 中,加入 0.01 g (0.6 mmol) 碘化钾。然

后分批加入 1.2 g (18 mmol) 叠氮化钠,并将混合物在 80  $^{\circ}\text{C}$  下搅拌 5 h。蒸去溶剂,乙酸乙酯萃取 (30 mL $\times$ 3),水洗,有机层用无水硫酸镁干燥,过滤,蒸去溶剂。柱层析 ( $V$ (乙酸乙酯): $V$ (石油醚)=9.5:0.5) 纯化得到黄色固体 (A1),产率 90%,m. p.123~125  $^{\circ}\text{C}$ ,合成路线见图 3。

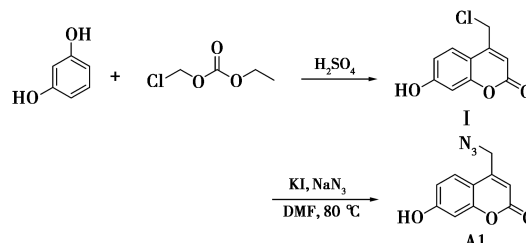


图 3 香豆素叠氮化物 A1 的合成路线

Fig.3 Synthesis route of coumarin azide A1

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$ : 7.37 (d, 1H,  $J$  = 8.0 Hz, —CH); 6.84 (d, 1H,  $J$  = 8.0 Hz, —CH); 6.68 (dd, 1H,  $J$  = 4.0, 4.0 Hz, —CH); 6.07 (s, 1H, —CH); 4.84 (d, 2H,  $J$  = 1.0 Hz, —CH<sub>2</sub>)。IR (KBr),  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 2 112 (—N<sub>3</sub>)。ESI-MS,  $m/z$ : 218.18 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>。

##### 1.2.1.2 (2-叠氮氧基)-4-甲基-2H-色烯-2-酮 (A2)

在 250 mL 圆底烧瓶中加入 1.7 g (10 mmol) 4-甲基-7-羟基香豆素、9.35 g (50 mmol) 1,2-二溴乙烷、4.14 g (30 mmol) 无水碳酸钾和 50 mL 干燥的乙腈。反应液在 80  $^{\circ}\text{C}$  条件下搅拌 6 h。过滤,蒸去溶剂,残留物通过柱层析 (洗脱液石油醚) 纯化得到类白色固体 (II)。

在 100 mL 圆底烧瓶中加入聚(4-乙烯基吡啶)负载的 1.0 g (3.4 mmol) 叠氮化钠 (III)<sup>[23]</sup>, 0.48 g (1.7 mmol) 化合物 II 和 10 mL 二氯甲烷。反应液在室温下搅拌 5 h。反应结束后,过滤,并用 5 mL 二氯甲烷和 5 mL 乙醚洗涤。合并的滤液,蒸去溶剂得到香豆素叠氮化物 (A2),类白色固体,产率 87%,m. p.117~119  $^{\circ}\text{C}$ ,合成路线见图 4。

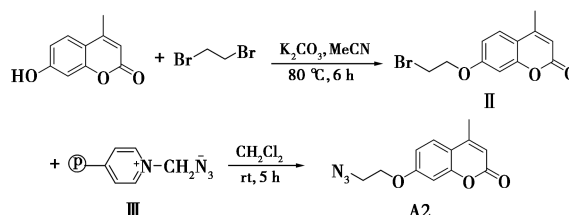


图 4 香豆素叠氮化物 A2 的合成路线

Fig.4 Synthesis route of coumarin azide A2

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$ : 7.45 (d, 1H,

—CH); 6.88 (s, 1H, —CH); 6.78 (dd, 1H,  $J = 4.0, 4.0$  Hz, —CH); 6.08 (s, 1H, —CH); 4.26 (t, 2H,  $J = 4.0$  Hz, —CH<sub>2</sub>); 3.54 (t, 2H,  $J = 4.0$  Hz, —CH<sub>2</sub>); 2.44 (d, 3H,  $J = 4.0$  Hz, —CH<sub>3</sub>)。IR (KBr),  $\nu$ , cm<sup>-1</sup>: 2 103 (—N<sub>3</sub>)。ESI-MS,  $m/z$ : 246.08 [M+H]<sup>+</sup>。

### 1.2.2 炔烃端的制备

炔烃 (B1 ~ B11) 由商业上直接获得, 为了产生多样性, 连接在炔烃上的苯环用各种官能团修饰 (图 5)。

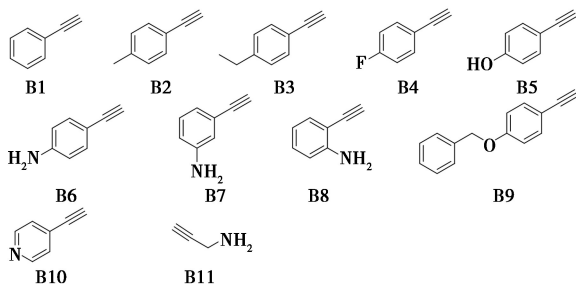


图 5 炔烃端化合物结构

Fig.5 Structure of alkyne end compounds

### 1.2.3 点击化学合成香豆素类衍生物

将炔烃化合物 (1.2 mmol) 和叠氮化合物 (1 mmol) 溶解在 THF/H<sub>2</sub>O 混合溶剂中 ( $V(\text{THF}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1$ )。加入催化量的硫酸铜 (0.01 mmol) 和抗坏血酸钠 (0.1 mmol), 反应液在室温条件下搅拌 24 h。反应结束后, 通过过滤和水洗涤得到香豆素类衍生物 (图 6)。

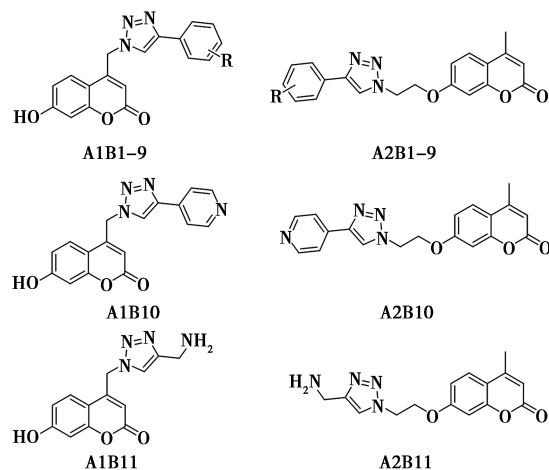


图 6 目标化合物结构

Fig.6 Structure of target compound

典型化合物 7-(2-(4-(4-羟基苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙氧基)-4-甲基-2H-苯并吡喃-2-酮 (A2B5): 类白色固体, 收率 93%,  $m. p. 324 \sim 325$  °C。

<sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz),  $\delta$ : 8.51 (s, 1H, —CH); 7.72 ~ 7.66 (m, 2H, —CH); 7.46 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz, —CH); 6.93 ~ 6.87 (m, 2H, —CH); 6.77 (dd, 1H,  $J = 4.0, 4.0$  Hz, —CH); 6.09 (s, 1H, —CH); 4.57 (t, 2H,  $J = 4.0$  Hz, —CH<sub>2</sub>); 4.39 (t, 2H,  $J = 4.0$  Hz, —CH<sub>2</sub>); 2.44 (s, 3H, —CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>CNMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz),  $\delta$ : 161.99, 161.00, 160.48, 159.13, 151.96, 149.07, 126.81, 126.65, 124.43, 123.82, 117.01, 114.48, 111.76, 108.95, 106.57, 65.94, 49.13, 19.87。ESI-MS,  $m/z$ : 364.13 [M+H]<sup>+</sup>。

### 1.2.4 体外胆碱酯酶 (ChE) 抑制活性检测

为了评价吡哆醇类化合物对胆碱酯酶的体外抑制活性以及对 AChE 的选择性, 测定了化合物的体外 AChE 和 BuChE 抑制活性。

采用 Ellman<sup>[24]</sup> 方法检测 ChE 的抑制活性: 将 0.158 mL (100 mmol/L) 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4)、0.02 mL (0.1 mmol/L) 香豆素类衍生物的二甲基亚砜溶液和 ChE (AChE 和 BuChE, 0.02 mL, 混合物中最终的酶浓度为 50 U/L), 在 37 °C 下孵育 15 min 后, 加入 0.01 mL (0.3 mmol/L) 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 溶液和 0.04 mL (1.5 mmol/L) 碘代乙酰硫胆碱或碘代丁酰硫胆碱溶液, 37 °C 下继续孵育 15 min。采用多功能酶标仪在  $\lambda = 412$  nm 处测量吸光度。以未加衍生物的吸光值为 100%, 添加抑制剂的吸光值与之相比, 降低的百分率即为酶抑制率。Hup A 被用作阳性对照药物, 所有实验平行 3 次, 结果用 IC<sub>50</sub> 和选择性指数 SI ( $SI = IC_{50} [\text{BChE}] / IC_{50} [\text{AChE}]$ ) 表示。

### 1.2.5 体外单胺氧化酶 (MAO) 抑制活性检测

使用犬尿胺荧光法<sup>[25]</sup> 对 MAO (MAO-A 和 MAO-B) 抑制活性进行了测定, 并做了一些小的修改。将 0.14 mL (100 mmol/L) 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4)、0.008 mL (0.75 mmol/L) 犬尿胺和 0.002 mL 香豆素类衍生物溶液在 37 °C 下孵育 10 min。然后添加 0.1 mL MAO (MAO-A 或者 MAO-B, 混合物中最终的酶浓度为 50 U/L)。在 37 °C 下进一步孵育 30 min 后, 加入 0.075 mL (2 mol/L) 氢氧化钠停止反应。多功能酶标仪在  $\lambda_{\text{ex}} = 310$  nm/ $\lambda_{\text{em}} = 400$  nm 处测量荧光强度。以未加衍生物的荧光强度为 100%, 添加抑制剂的荧光强度与之相比, 降低的百分率即为酶抑制率。氯吉兰和司立吉林被用作对照药物。所有实验平

行 3 次。结果用  $IC_{50}$  和选择性指数 SI ( $SI = IC_{50} [MAO-A] / IC_{50} [MAO-B]$ ) 表示。

### 1.2.6 细胞毒性

采用小鼠成纤维细胞株 (L929), 应用 MTT 法<sup>[26]</sup> 评价抑制剂的细胞相容性。实验组为抑制剂处理的细胞组, 对照组为 L929 细胞, 空白组为 DMEM 培养基。

将一定量的抑制剂置于离心管中, 在无菌工作台上紫外灯照射 12 h 以确保材料处于无菌状态, 采用新鲜的不含细胞的 DMEM 培养基将抑制剂配制成不同浓度的溶液, 用新鲜含双抗 DMEM 培养基调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$  个/mL, 分种于 96 孔细胞培养板中, 获得单层细胞后移除 96 孔板原来的培养基, 每孔加入 100  $\mu$ L (1 mg/mL) MTT。随后将培养板置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数为 5%  $CO_2$  培养箱中孵育 24 h。然后, 去除培养基并使用 150  $\mu$ L DMSO 溶解沉淀物, 采用酶标仪于 490 nm 处测定吸光度, 所有数据平行重复 3 次。可通过公式(1)计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} / \% =$$

$$[(OD_{\text{treated}} - OD_{\text{blank}}) / (OD_{\text{control}} - OD_{\text{blank}})] \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $OD_{\text{treated}}$  为样品孔的吸光度值,  $OD_{\text{blank}}$  为空白孔的吸光度值,  $OD_{\text{control}}$  对照孔的吸光度值。

### 1.2.7 分子对接

从蛋白质数据库 (PDB) 网站下载 MAO-B (PDB ID: 2BYB) 和 AChE (PDB ID: 4EY7) X 射线晶体结构。去除参与对接研究酶的 b 链、结合的抑制剂分子以及相关的水分子和其他溶剂或离子并以 .pdbqt 格式保存作为受体。使用 Kingdraw 绘制和优化抑制剂分子并以 .MOL 格式保存作为配体, 使用 Auto dock 4.2 程序进行对接研究。对接结果用 PyMOL 软件实现可视化, 在线转化为 2D 模型 (<https://proteins.plus/>)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 香豆素衍生物的制备

由简单化合物合成了 C4 和 C7 位含有叠氮基团的香豆素 (A1、A2) (图 3、图 4)。炔烃 (B1 ~ B11) (图 5) 由商业获得, 为了产生多样性, 连接在炔烃上的苯环被各种官能团修饰。最终, 叠氮和炔烃以  $V(\text{THF}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1$  为溶剂, 硫酸铜/抗坏血酸钠作为催化剂, 通过三氮唑基团将其其他基团连接到香豆素的 C4 和 C7 位置, 合成了 4 或 7-三氮唑取代的香豆素衍生物 (A1B1 ~ 11、

A2B1 ~ 11) (图 6)。所有香豆素衍生物产率大于 90%, 经过简单的过滤和水洗涤, 得到产品。

### 2.2 体外 ChE/MAO 抑制活性

对制备的香豆素衍生物进行了 ChE/MAO 抑制活性评价, 结果显示大多数化合物是有效的 ChE/MAO 抑制剂,  $IC_{50}$  值在微摩尔范围内。选择性指数 (SI) 显示化合物对 AChE 和 MAO-B 的抑制活性强于 BChE 和 MAO-A (表 1、表 2)。从这些数据中可以得到一些有趣的构效关系。

表 1 香豆素衍生物和对照品对 ChE 的抑制活性<sup>注</sup>

Tab.1 Inhibitory activity of coumarin derivatives and reference substances on ChE

Inhibitors	Alkyne	AChE <sup>1)</sup>	BChE <sup>1)</sup>	SI <sup>3)</sup>
		$IC_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$IC_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	
A1B1	B1	38.9 $\pm$ 1.4	424 $\pm$ 0.5	10.9
A1B2	B2	259.1 $\pm$ 2.6	766.3 $\pm$ 0.2	3.0
A1B3	B3	83.6 $\pm$ 2.1	39.4 $\pm$ 3.2	0.5
A1B4	B4	41.6 $\pm$ 0.2	46.2 $\pm$ 1.9	1.1
A1B5	B5	36.9 $\pm$ 2.7	250 $\pm$ 4.3	6.8
A1B6	B6	14.3 $\pm$ 0.2	24.7 $\pm$ 0.2	1.7
A1B7	B7	12.3 $\pm$ 0.2	63.2 $\pm$ 0.5	5.1
A1B8	B8	25.9 $\pm$ 0.4	24.9 $\pm$ 0.3	1.0
A1B9	B9	n. a. <sup>2)</sup>	n. a. <sup>2)</sup>	—
A1B10	B10	1.6 $\pm$ 0.2	24.9 $\pm$ 0.3	15.6
A1B11	B11	0.48 $\pm$ 0.03	38.3 $\pm$ 0.4	79.8
A2B1	B1	2.7 $\pm$ 0.2	25.3 $\pm$ 0.2	9.4
A2B2	B2	24.7 $\pm$ 0.3	n. a. <sup>2)</sup>	—
A2B3	B3	119.2 $\pm$ 0.3	n. a. <sup>2)</sup>	—
A2B4	B4	45.2 $\pm$ 0.3	69.8 $\pm$ 0.2	1.5
A2B5	B5	0.23 $\pm$ 0.02	50.8 $\pm$ 0.2	220.9
A2B6	B6	13.5 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.1	0.4
A2B7	B7	22.6 $\pm$ 0.3	91.3 $\pm$ 0.3	4.0
A2B8	B8	26.5 $\pm$ 0.2	31.8 $\pm$ 0.4	1.2
A2B9	B9	14.6 $\pm$ 0.2	136.3 $\pm$ 0.4	9.3
A2B10	B10	4.8 $\pm$ 0.3	78.1 $\pm$ 0.2	16.3
A2B11	B11	n. a. <sup>2)</sup>	n. a. <sup>2)</sup>	—
Donepezil	—	0.013 $\pm$ 0.001	23.402 $\pm$ 0.003	1 800.1

注: 1)  $IC_{50}$  值表示将酶活性降低 50% 所需的抑制剂浓度, 每个实验平行进行 3 次, 取平均值, 数据表示为平均值  $\pm$  SD (SD = 标准偏差); 2) n. a. = 无活性; 3)  $SI = IC_{50} [BChE] / IC_{50} [AChE]$ 。

表 2 香豆素衍生物和对照品对 MAO 的抑制活性<sup>注</sup>

Tab.2 Inhibitory activity of coumarin derivatives and reference substances on MAO

Inhibitors	Alkyne	MAO-A <sup>1)</sup>	MAO-B <sup>1)</sup>	SI <sup>2)</sup>
		$IC_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$IC_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	
A1B1	B1	15.4 $\pm$ 0.2	12.8 $\pm$ 0.2	1.2
A1B2	B2	59.4 $\pm$ 0.3	11.3 $\pm$ 0.3	5.3
A1B3	B3	22.6 $\pm$ 0.2	11.2 $\pm$ 0.2	2.0

续表

Inhibitors	Alkyne	MAO-B <sup>1)</sup>		SI <sup>2)</sup>
		IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
A1B4	B4	93.3±0.2	13.6±0.1	6.9
A1B5	B5	74.4±0.3	14.3±0.2	5.2
A1B6	B6	26.5±0.3	12.0±0.4	2.2
A1B7	B7	31.8±0.3	12.5±0.3	2.5
A1B8	B8	62.6±0.3	11.3±0.1	5.5
A1B9	B9	100.9±0.2	10.3±0.3	9.8
A1B10	B10	42.7±0.2	5.0±0.2	8.5
A1B11	B11	14.4±0.2	1.9±0.3	7.6
A2B1	B1	25.3±0.3	3.0±0.3	8.4
A2B2	B2	23.1±0.4	5.3±0.2	4.4
A2B3	B3	26.2±0.3	4.3±0.1	6.1
A2B4	B4	74.8±0.2	2.4±0.3	31.2
A2B5	B5	62.6±0.4	0.31±0.03	201.9
A2B6	B6	26.5±0.3	2.3±0.3	11.5
A2B7	B7	50.8±0.2	2.0±0.2	25.4
A2B8	B8	42.7±0.3	2.4±0.2	17.8
A2B9	B9	54.4±0.2	3.1±0.1	17.5
A2B10	B10	25.8±0.3	6.3±0.4	4.1
A2B11	B11	14.4±0.3	13.3±0.3	1.1
Clorgyline	—	0.004±0.001	—	—
L-Deprenyl	—	—	0.013±0.004	—

注:1)IC<sub>50</sub>值表示将酶活性降低 50% 所需的抑制剂浓度,每个实验平行进行 3 次,取平均值,数据表示为平均值±SD (SD=标准偏差);2)SI=IC<sub>50</sub>[MAO-A]/IC<sub>50</sub>[MAO-B]。

C4 位置为苯环(A1B1)、带各种官能团苯环(A1B2-9)或者吡啶基团(A1B10)等大基团的香豆素衍生物的 AChE 和 MAO-B 抑制活性低于 C4 位置为胺基、甲基等小基团的香豆素衍生物(A1B11)。反之,C7 位置为苯环(A2B1)、带各种官能团苯环(A2B2-9)或者吡啶基团(A2B10)等大基团的香豆素衍生物的 AChE 和 MAO-B 抑制活性高于 C7 位置为胺基、甲基等小基团的香豆素衍生物(A2B11)。因此,香豆素 C4 位置为小基团(如胺基)对 AChE 和 MAO-B 抑制活性有利,而 C7 位置为大基团(如苯环)对 AChE 和 MAO-B 抑制活性有利。

A1B1~A1B11 系列化合物对 AChE 抑制活性中,苯环上引入甲基、乙基等烷烃(A1B2、A1B3)降低活性,引入氟(A1B4)、羟基(A1B5)提高活性。苯环上引入胺基显著提高活性,其中间位胺基(A1B7)的活性大于对位(A1B6)和邻位胺基(A1B8)。胺基(A1B11)和吡啶环(A1B10)替代苯环(A1B1)显著提高抑制活性。其中 A1B11 是此系列中最佳的 AChE 抑制剂。A2B1~A2B11 系

列化合物对 AChE 抑制活性中,苯环上引入甲基、乙基等烷烃(A2B2、A2B3)和氟(A2B4)降低活性。苯环上引入羟基(A2B5)极大地提高活性,A2B5 是香豆素衍生物中最优秀的 AChE 抑制剂。苯环上引入胺基(A2B6~A2B8)和苄基(A2B9)降低活性。胺基(A2B11)和吡啶环(A2B10)替代苯环(A2B1)降低活性。

A1B1~A1B11 系列化合物对 MAO-B 抑制活性中,苯环上引入甲基、乙基等烷烃(A1B2、A1B3),引入氟(A1B4)、羟基(A1B5)、胺基(A1B6~A1B8)和苄基(A1B9)对活性影响较小。胺基(A1B11)和吡啶环(A1B10)替代苯环(A1B1)显著提高抑制活性。A2B1~A2B11 系列化合物对 MAO-B 抑制活性中,苯环上引入甲基、乙基等烷烃(A2B2、A2B3)和氟(A2B4)降低活性。苯环上引入羟基(A2B5)极大地提高活性,A2B5 是香豆素衍生物中最优秀的 MAO-B 抑制剂。苯环上引入胺基(A2B6~A2B8)和苄基(A2B9)对活性影响较小。胺基(A2B11)和吡啶环(A2B10)替代苯环(A2B1)降低活性。

因此,A2B5 是香豆素衍生物中最理想的 AChE (IC<sub>50</sub> = (0.23 ± 0.02)  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 MAO-B (IC<sub>50</sub> = (0.31 ± 0.03)  $\mu\text{mol/L}$ ) 双抑制剂。

### 2.3 细胞毒性试验

研究了香豆素衍生物(A1B1~A1B11 和 A2B1~A2B11)对小鼠成纤维细胞株(L929)细胞的细胞毒性。实验结果表明,所有衍生物都显示出较低的细胞毒性(IC<sub>50</sub>>400  $\mu\text{m}$ )。使用最理想的 AChE/MAO-B 双抑制剂 A2B5 (浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ ) 处理时,细胞存活率为 87.1%。因此,所有香豆素衍生物对 L929 细胞都是无毒的,即使在很高的浓度下也不会导致细胞死亡。

### 2.4 分子对接研究

为了进一步探索抑制剂与酶可能的结合模式,使用 Autodock 研究了 A2B5 (本文最佳的 AChE/MAO-B 双抑制剂)与 AChE 和 MAO-B 的分子对接模型。如图 7 所示,A2B5 的香豆素部分占据 AChE 的外周阴离子位点(PAS)并与氨基酸残基 TRP 286 建立“ $\pi-\pi$ ”相互作用(4.4、4.7  $\text{\AA}$ )。中间连接的三氮唑环位于 AChE 两个活性位点连接的峡谷位置,并与氨基酸残基 PHE338 建立了“ $\pi-\pi$ ”相互作用(4.4  $\text{\AA}$ )。说明三唑环不仅起到连接构建基团的作用,而且促进抑制剂与酶的结合,增强活性。苯环部分占据 AChE 底部的酯催

化位点(CAS),与氨基酸残基 TRP 86 建立了“ $\pi$ - $\pi$ ”相互作用(4.9 Å)。此外,苯环上羟基的氧原子与氨基酸残基 GLU202 形成氢键(2.1 Å),进一步增强了对 CAS 位点的结合能力。所有这些结果表明 A2B5 可以占据整个 AChE 活性位点,并且是 AChE 的双结合位点抑制剂。

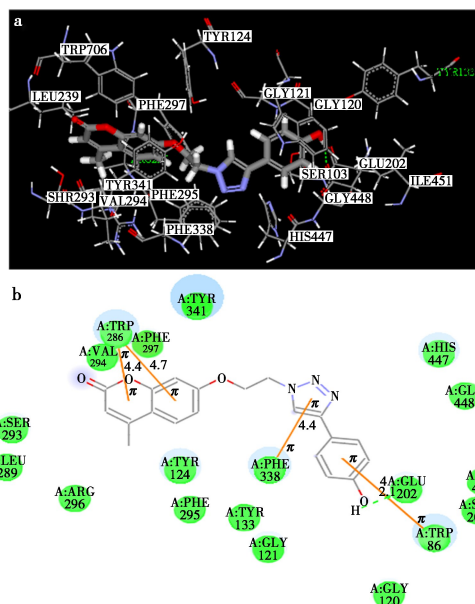


图 7 a.香豆素衍生物 A2B5 与 AChE 的 3D 对接模型(A2B5 显示为棒状,酶的蛋白质残基显示为线状;原子颜色:灰色为碳原子,蓝色为氮原子、红色为氧原子、白色为氢原子。虚线表示蛋白质和配体之间的氢键);b.香豆素衍生物 A2B5 与 AChE 对接模型的 2D 示意图(氨基酸残基为球状,橙色实线为“ $\pi$ - $\pi$ ”相互作用,虚线表示蛋白质和配体之间的氢键,数值表示距离)

**Fig.7** a.3D docking model of coumarin derivative A2B5 with AChE (A2B5 is displayed as rod-shaped, and the protein residues of the enzyme are displayed as linear; Atomic colors: Gray represents carbon atoms, blue represents nitrogen atoms, red represents oxygen atoms, and white represents hydrogen atoms. The dashed line represents the hydrogen bonding between proteins and ligands); b.2D schematic diagram of the docking model between coumarin derivative A2B5 and AChE(The amino acid residues are spherical, with orange solid lines representing  $\pi$ - $\pi$  interactions, dashed lines representing hydrogen bonds between proteins and ligands, and numerical values representing distances)

图 8 显示了 A2B5 与 MAO-B 的分子对接模型。A2B5 的香豆素部分占据了由氨基酸残基 PRO102、PHE103、PRO104、TRP119 和 PHE168 组成的 MAO-B 的入口空腔(Entrance Cavity),中

间连接的三氮唑环位于 MAO-B 两个活性空腔连接的峡谷位置,并与氨基酸残基 TRP398 建立了“ $\pi$ - $\pi$ ”相互作用(5.7 Å)。A2B5 中间连接的碳链靠近 ILE199 的一侧,横穿 MAO-B 两个活性空腔连接的狭窄通道。苯环部分占据 MAO-B 的底物空腔(Substrate Cavity),嵌入到由辅酶 FAD、TYR398 和 TYR435 组成的“芳香笼”中(3.9 Å)。由 FAD、Tyr407 和 MAO-A 和 FAD 中的 Tyr444, MAO-B 中的 Tyr335 和 Tyr398。此外,苯环上羟基的氧原子与氨基酸残基 GLY434 形成氢键

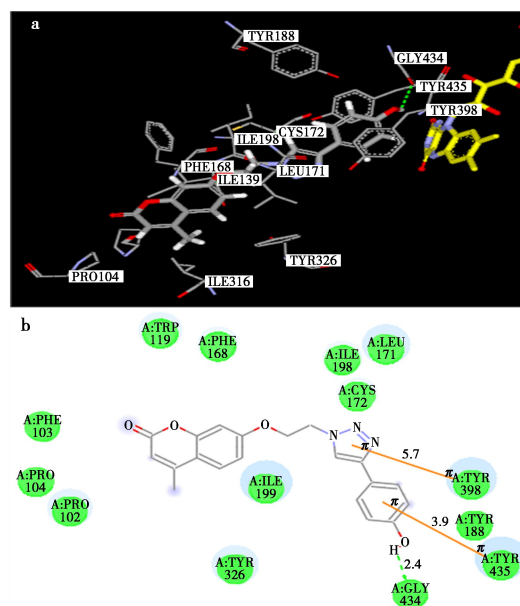


图 8 a.香豆素衍生物 A2B5 与 MAO-B 的 3D 对接模型(A2B5 显示为棒状,酶的蛋白质残基显示为线状, FAD 显示为黄色棒状;原子颜色:灰色为碳原子,蓝色为氮原子、红色为氧原子、白色为氢原子。虚线表示蛋白质和配体之间的氢键);b.香豆素衍生物 A2B5 与 MAO-B 对接模型的 2D 示意图(氨基酸残基为球状,橙色实线为“ $\pi$ - $\pi$ ”相互作用,虚线表示蛋白质和配体之间的氢键,数值表示距离)

**Fig.8** a.3D docking model of coumarin derivative A2B5 with MAO-B(A2B5 is displayed as rod shaped, the protein residues of the enzyme are displayed as linear, and FAD is displayed as yellow rod shaped; Atomic colors: Gray represents carbon atoms, blue represents nitrogen atoms, red represents oxygen atoms, and white represents hydrogen atoms. The dashed line represents the hydrogen bonding between proteins and ligands); b.2D schematic diagram of the docking model between coumarin derivative A2B5 and MAO-B(The amino acid residues are spherical, with orange solid lines representing  $\pi$ - $\pi$  interactions, dashed lines representing hydrogen bonds between proteins and ligands, and numerical values representing distances)

(2.4 Å),进一步增强了对底物空腔的结合能力。综上所述,所有对接结果与抑制活性实验数据一致,进一步解释了 A2B5 是 AChE/MAO-B 最佳的双抑制活性。

### 3 结论

以香豆素为起点,在其 C4 和 C7 位置进行结构修饰,通过点击化学策略构建了 22 个香豆素衍生物,产率大于 90%。检测香豆素衍生物对 ChE 和 MAO 双抑制活性。其中大多数化合物在微摩尔范围内表现出良好的 AChE 和 MAO-B 双抑制活性。尤其是一种名为 A2B5 的化合物,对 AChE、MAO-B 的  $IC_{50}$  值分别为  $(0.23 \pm 0.02)$ 、 $(0.31 \pm 0.03)$   $\mu\text{mol/L}$ ,是最佳的 AChE/MAO-B 双抑制剂。细胞毒性实验表明所有香豆素衍生物对 L929 细胞都是无毒的,具有良好的生物相容性。构效关系分析显示香豆素基团是一类有效的 AChE 和 MAO-B 双抑制活性基团,C4 位置容纳小基团,C7 位置容纳大基团。苯环的存在能够增强抑制活性,其羟基取代基能进一步增强抑制活性。分子对接研究发现 A2B5 的苯基部分结合到 AChE 的 CAS 位点,香豆素结合到 PAS 位点,三氮唑环占据两个活性位点的中间峡谷。A2B5 的香豆素部分结合到 MAO-B 的入口空腔,苯基部分结合到底物空腔,并嵌入到 Tyr435、Tyr398 和 FAD 形成的“芳香笼”。此外,A2B5 与氨基酸残基之间的  $\pi$ - $\pi$  相互作用和氢键进一步增强了活性。总之,香豆素 C7 位置取代衍生物可以被开发为 AChE 和 MAO-B 双抑制剂,为进一步开发抗 AD 的双靶点药物提供一个新的起点。

### 参考文献:

- [1] BOTTO R, CALLAI N, CERMELLI A, et al. Anxiety and depression in alzheimer's disease: A systematic review of pathogenetic mechanisms and relation to cognitive decline [J]. *Neurol.Sci.*, 2022, **43**(7): 1-18.
- [2] CLARK C, LEWCZUK P, KORNHUBER J, et al. Plasma neurofilament light and phosphorylated tau 181 as biomarkers of alzheimer's disease pathology and clinical disease progression [J]. *Alzheimer's Res.Ther.*, 2021, **13**(1): 1-11.
- [3] RITACCA A G, RITACCO I, DABBISH E, et al. A boron-containing compound acting on multiple targets against alzheimer's disease. insights from ab initio and molecular dynamics simulations [J]. *J. Chem. Inf. Model.*, 2021, **61**(7): 3 397-3 410.
- [4] VISHAL P K, OH J M, KHAMES A, et al. Trimethoxylated halogenated chalcones as dual inhibitors of MAO-B and BACE-1 for the treatment of neurodegenerative disorders [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(850): 1-16.
- [5] VISHNU M S, PAVANKUMAR V, KUMAR S, et al. Experimental and computational evaluation of piperonylic acid derived hydrazones bearing isatin moieties as dual inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidases [J]. *Chem.Mde.Chem.*, 2019, **14**: 1 359-1 376.
- [6] KUMAR B, KUMAR V, PRASHAR V, et al. Dipropargyl substituted diphenylpyrimidines as dual inhibitors of monoamine oxidase and acetylcholin-esterase [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **177**: 221-234.
- [7] 李昌兴, 刘东东, 高一星, 等. 新烟碱类杀虫剂的研究与开发进展 [J]. *化学试剂*, 2023, **45**(3): 29-36.
- [8] KRISHNANGSU P, GAURAV D, PRASENJIT M, et al. Genesis of neuroprotective peptoid from A $\beta$ 30-34 Inhibits A $\beta$  Aggregation and AChE Activity [J]. *ACS Chem. Neurosci.*, 2018, **9**(12): 2 929-2 940.
- [9] 谭任娴, 梁国鹏, 朱德林, 等. 基于 8-羟基喹啉多靶点抗阿尔茨海默症药物的研究进展 [J]. *华西药学期刊*, 2023, **38**(2): 222-226.
- [10] POLINSKY R J. Clinical pharmacology of rivastigmine: A new generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of alzheimer's disease [J]. *Clin. Ther.*, 1998, **20**(4): 634-647.
- [11] REHUMAN N A, OH J M, NATH L R, et al. Halogenated coumarinchalcones as multifunctional monoamine oxidase B and butyrylcholinesterase inhibitors [J]. *ACS Omega*, 2021, **6**(42): 28 182-28 193.
- [12] XIE S S, WANG X B, LI J Y, et al. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against alzheimer's disease [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **64**: 540-553.
- [13] YODIM M B H. Multi target neuroprotective and neurorestorative anti-parkinson and anti-alzheimer drugs lisdostigil and m30 derived from rasagiline [J]. *Exp. Neurobiol.*, 2020, **22**(1): 1-10.
- [14] SANG Z, WANG K, SHI J, et al. The development of advanced structural framework as multi-target-directed ligands for the treatment of alzheimer's disease [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2020, **192**: 112 180.
- [15] BENEK O, KORABECNY J, SOUKUP O. A perspective on multi-target drugs for alzheimer's disease [J]. *Trends Pharmacol.Sci.*, 2020, **41**(7): 434-445.
- [16] CAROTTI A, BRUHLMANN C, OOMS F, et al. Couma-

- rins derivatives as dual inhibitors of acetyl-cholinesterase and monoamine oxidase [ J ]. *J. Med. Chem.*, 2001, **44**(19) :3 195-3 198.
- [ 17 ] FALLARERO A, OINONEN P, GUPTA S, et al. Inhibition of acetylcholinesterase by coumarins: The case of coumarin 106 [ J ]. *Pharmacological Res.*, 2008, **58**(3/4) :215-221.
- [ 18 ] PATIL P O, BARI S B, FIRKE S D, et al. A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease [ J ]. *Bio. Med. Chem.*, 2013, **21**(9) :2 434-2 450.
- [ 19 ] LAN J S, DING Y, LIU Y, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin-N-benzyl pyridinium hybrids as multi-target agents for the treatment of Alzheimer's disease [ J ]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **20**(139) :48-59.
- [ 20 ] PISANI L, MUNCIPINTO G, MISCIOSCIA T F, et al. Discovery of a novel class of potent coumarin monoamine oxidase B inhibitors: Development and biopharmacological profiling of 7-[(3-Chlorobenzyl)oxy]-4-[(methylamino)methyl]-2H-chromen-2-one Methanesulfonate as a highly potent, selective, reversible, and orally active monoamine oxidase B inhibitor [ J ]. *J. Med. Chem.*, 2009, **52**(21) :6 685-6 706.
- [ 21 ] HE Q, LIU J, LAN J S, et al. Coumarin-dithiocarbamate hybrids as novel multitarget AChE and MAO-B inhibitors against Alzheimer's disease: Design, synthesis and biological evaluation [ J ]. *Bioorg. Chem.*, 2018, **10**(81) : 512-528.
- [ 22 ] ZHAO J, HUIYUN W, SAIPENG H, et al. "Click" assembly of novel dual inhibitors of AChE and MAO-B from pyridoxine derivatives for the treatment of Alzheimer's disease [ J ]. *Heterocycl. Commun.*, 2022, **28**(1) : 18-25.
- [ 23 ] ZARCHI M A K, ESCANDARI Z. A mild and clean synthesis of alkyl azides from alkyl halides mediated by poly(4-vinylpyridine)-supported sodium azide under non-aqueous conditions [ J ]. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2011, **121**(4) :1 916-1 920.
- [ 24 ] POHANKA M, HRABINOVA M, KUCA K, et al. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method [ J ]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, **12**(4) :2 631-2 640.
- [ 25 ] LI Y, QIANG X, LUO L, et al. Synthesis and evaluation of 4-hydroxyl aurone derivatives as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease [ J ]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, **24**(10) :2 342-2 351.
- [ 26 ] SOFAN M A, EL-MEKABATY A, HASEL A M, et al. Synthesis, cytotoxicity assessment and antioxidant activity of some new thiazol carboxamides [ J ]. *J. Heterocyclic Chem.*, 2021, **58**(81) :1 645-1 655.