

## Acetylcholinesterase에 대한 (1,3-Dioxolan-2-yl 및 Dioxan-2-yl)methylaminium 유도체의 저해 작용

파택산 · 김윤배 · 김지천 · 조영 · 석대은 · 차승희 · 서원준\*

국방과학연구소

(Received July 5, 1994)

### Inhibitory Activity of (1,3-Dioxolan-2-yl and Dioxan-2-yl)methylaminium Derivatives against Acetylcholinesterase

Taek-San Phi, Yun-Bae Kim, Jee-Cheon Kim, Young Cho, Dai-Eun Sok,  
Seung-Hee Cha and Won-Jun Seo\*

Agency for Defense Development, P.O. Box 35, Yusung, Taejon 305-600, Korea

**Abstract**—We examined the inhibitory activity of (1,3-dioxolan-2-yl and 1,3-dioxan-2-yl)methylaminium derivatives(A; 1-8) against acetylcholinesterase. Derivatives of six-membered 1,3-dioxane exhibited more potent inhibitory effect than corresponding 5-membered 1,3-dioxolanes. The presence of methyl group at C4 position of dioxane ring was effective to increase the inhibitory potency of heterocyclic analogues. The activity of *N*-phenacyl-aminiums was greater than that of *N,N,N*-trimethyl-aminiums. In general, the terminal methyl group on 1,3-dioxane ring and the phenacyl group in ammonium compound A were assumed to be important factors to enhance the inhibitory action.

**Keywords** □ (4-Methyl-1,3-dioxan-2-yl)methylaminium, terminal methyl group, anisotropy, acetylcholinesterase.

신경전달물질인 acetylcholine(ACh) 및 그 계열의 화합물에 대한 구조-활성 관계는 의약품 개발에 있어서 상당히 많이 연구되어 있는 분야 중의 하나이다.<sup>1-4)</sup> 저자들은 신경계에 작용하는 화합물 연구의 일환으로, Fig. 1과 같이 합성한 1,3-dioxolane 및 1,3-dioxane 계열의 methanaminium 화합물 A(Table I의 1-8)가 ACh 분해 효소인 acetylcholinesterase (AChE)<sup>3-4)</sup>와의 구조-활성 사이에 체계적인 억제 양상을 나타내었기에 보고하고자 한다.

#### 실험방법

**시약 및 기기**—본 실험에 사용한 시약은 Aldrich사 및 Sigma사의 시판 특급 또는 일급품이었다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼은 TMS(CDCl<sub>3</sub>) 또는 4급 ammonium염의

경우에는 DSS(D<sub>2</sub>O)를 표준물질로 하여 Burker FT-NMR(200 MHz) Spectrometer로, 효소 저해력의 흡광도는 Gilford UV-VIS Spectrophotometer Model 250 M을 사용하여 측정하였다.

**화합물의 합성**—(*N,N*-dimethylamino)acetaldehyde diethylacetal(C, 16.1 g, 0.1 mol)과 diol체 D(n = 0, R = Me, 8.36 g, 0.11 mol)의 혼합액에 진한 염산 12 mL를 넣어 가열하면서, 당량의 ethanol이 나올 때 까지 서서히 중류하였다. 반응액을 식힌 다음, 탄산나트륨으로 처리한 액을 ethyl acetate(50 mL × 3)로 추출, 포화 식염수로 세척, 무수 황산 나트륨으로 건조, 용매 유거 후, 감압 중류(40°/2.5 mmHg)하여 10.1 g (70%)의 무색 투명한 액 B(n = 0, R = Me)를 얻었다. 상온에서 B(1.5 g, 10.3 mmol)의 benzene 용액에 phenacyl bromide(2.4 g, 12.1 mmol)를 서서히 적가한 다음, 하룻밤 교반하고, 생성된 백색 결정 A(n = 0, R = Me; 4)를 isopropanol로 부터 재결정(2.6 g)하였

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

다. M.p.  $129.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . 총 수득율 51%.

**B** 및 **A**의 다른 화합물도 같은 방법으로 합성하였다. 다만, **1**,<sup>5-6)</sup> **2**,<sup>7-8)</sup> **5**,<sup>9-10)</sup> **6**,<sup>10-11)</sup> 및 **9**<sup>5)</sup>의 경우에는 alkyl화제로 methyl iodide를 2 당량 사용하였다.

<sup>1</sup>H-NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : **B**(n=0, R=H); 4.97(1H, t,  $J=5$ ), 2.52(2H, d,  $J=5$ ), 2.33(6H, s). **B**(n=0, R=Me); 5.00(for minor isomer: 5.12)(1H, t,  $J=5$ ), 3.95(1H, dd,  $J=6.6, 7$ ), 3.42(1H, t,  $J=7$ ), 2.31(6H, s), 1.30(for minor isomer: 1.26)(3H, d,  $J=6$ ). **B**(n=1, R=Me); 4.67(1H, t,  $J=5$ ), 4.2~4.0(1H, m), 2.48 and 2.46(2H, diastereotopic AB dd,  $J_{\text{vicinal}}=5$ ), 1.23(3H, d,  $J=6$ ). **8**(A: n=1, R=Me); 8.0~7.5(5H, m), 5.22(1H, t,  $J=4$ ), 3.53(3H, s), 3.51(3H, s), 0.84(3H, d,  $J=6$ ).

**AChE**의 활성도 측정 – **AChE**에 대한 억제력의 활성도는 Ellman법<sup>12)</sup>에 준하여  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 측정하였다. Acetylthiocholine iodide(1.5 mM), 1.0 mM DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)), 염화 나트륨(0.1 M)을 넣은 pH 7.4의 인산염 완충액 2.9 mL에, 억제제(**1-8**, **9**)의 최종 농도가 1 mM이 되도록 조제한 액 50  $\mu\text{l}$  및 50  $\mu\text{l}$ 의 적혈구 **AChE**(Sigma사, bovine, type XII-S, 최종 활성도 10 mUnit/mL) 용액을 넣고 잘 섞은 다음, 412 nm에서 흡광도 변화를 측정하였으며,

효소에 의하지 않은 기질의 가수분해속도는 보정해 주었다.

## 결과 및 고찰

신경전달에 관여하는 **ACh** 계열의 고리형 화합물로는 5원환인 muscarine을 기본 모델 구조로 하여 연구되어 왔는데, 1,3-dioxolane이나 *m*-dioxane에 대해서는 주로 4번위치(C4)에 ammoniomethyl기가 치환된 **E**와 같은 화합물이 많으며, 그것도 muscarine 성 수용체(receptor)에 대한 것이 대부분이다.<sup>1-2)</sup> 2번위치(C2)에 치환된 **A**와 같은 화합물 역시 주로 근육의 수용체에 관한 것으로, **AChE**에 대한 보고<sup>6,9)</sup>는 별로 많지 않다. 이것은, C2 치환체의 muscarine 성 작용이 C4 치환체보다 일반적으로 약하고,<sup>1-2)</sup> **AChE**에 대해서는 두 4급 질소원자 사이가 약 14 Å 정도 떨어져 있는 **Fa**와 같은 이 계열의 bis-onium형 화합물을 중심으로 연구되어 온 점<sup>3,9)</sup> 등 여러가지 요인 때문이라 사료된다.

따라서 본 보고는 우선 이 헤테로 고리 화합물 계열에서, 보다 약한 작용을 가진 이른바 bis형 화합물에 대한 half체<sup>9)</sup> **A**(**1-8**)를 사용하여 화학구조와 활성 사

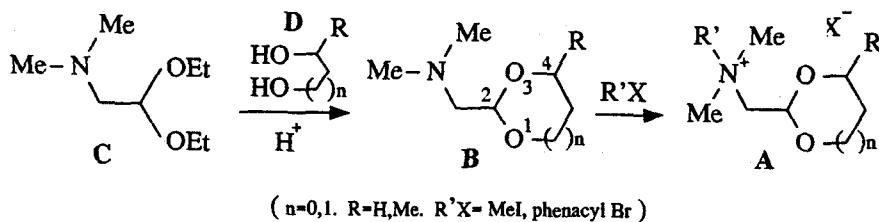
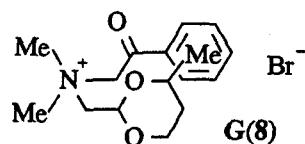
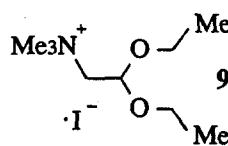
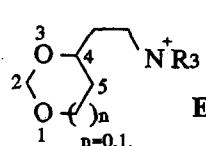
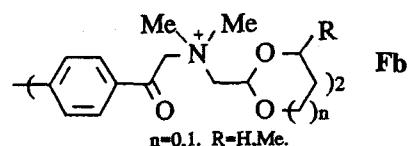
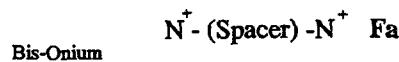
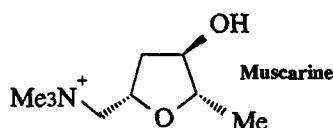
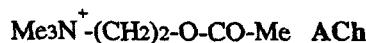


Fig. 1 – Synthetic procedure of methanaminium A.



이의 상관관계 여부를 검토한 것이다.

백색 결정인 methanaminium체 A는 중간체인 3급 아민 B를 alkyl halide로 4급화하여 쉽게 얻을 수 있었으며, 4급염의 흡습성은 크게 인정되지 아니하였다. C에서 B의 합성은 ether 교환반응으로 보통 산촉매 하에서 행하는데, *p*-TsOH나 BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>를 사용하였을 때<sup>13)</sup>는 반응이 대단히 느려, C와 D의 혼합액에 전한 염산<sup>9)</sup>을 넣고 환류시켜 헤테로 고리 화합물로 만들었다.

Diol체 중 말단(terminal) methyl기가 있는 경우(D, R=Me)에는, B가 거울상 이성질체(enantiomer) 및 부분입체이성질체(diastereomer)의 혼합물로 얻어지며, 이성체의 분리 없이 바로 4급화한 A 역시 이성체 혼합물이고, dioxolane 및 dioxane의 어느 경우에서나 C4-methyl기와 C2-ammoniomethyl 치환기가 cis인 형태가 trans체보다 우선<sup>7-8,13-14)</sup>한다고 사료된다.

적혈구 AChE에 대한 A의 저해력 측정 결과를 Table I에 나타내었다.

먼저 헤테로 고리에 대하여 살펴보면, dioxane의 6원환 유도체 5-8은 각각 대응하는 5원환의 dioxolane계 화합물 1-4에 비하여 모두 강한 효소 저해력을 보였다. 즉, 1보다는 5가 약 8% 정도 더 억제력이 있었으며, 2보다는 6이, 3보다는 7이, 4보다는 8이

Table I—Inhibitory Activity of A(1-8) on Acetylcholinesterase

| Percent(%) | Compound (A) |           |
|------------|--------------|-----------|
|            | Dioxane      | Dioxolane |
| 92         | 8            |           |
| 87         | 7            |           |
| 70         | 6            |           |
| 61         |              | 4         |
| 57         | 5            |           |
| 56         |              | 3         |
| 49         |              | 1         |
| (43)*      | (9)*         |           |
| 35         |              | 2         |

Enzyme; bovine erythrocyte AChE(Type XII-S). Concentration; 10<sup>-5</sup>M in phosphate buffer.

\* For reference compound 9.

각각 약 30% 이상의 증가작용이 있었다.

이 결과는 근육의 ACh 수용체에 대한 효과, 특히 4-ammoniomethyl기가 치환된 5 또는 6원환 유도체의 경우<sup>10-11,14)</sup>와 비교하면 정반대의 현상이 되기 때문에, 효능이 약한 항AChE(antiAChE)제를 동물실험에 응용하였을 때에는 오히려 choline 효능 차단(또는 모방)작용이 더 강하게 나타날 가능성도 있다는 것을 암시한다. 이것은 분자 중 ammonium성 질소원자가 효소나 수용체에 있는 anionic site와 결합한다는 공통 요소는 있지만, 헤테로 원자가 작용하는 부위 및 그 옆의 작용부위가 입체적으로나 거리에 있어서 서로 상당히 다르다는 것을 입증해준다. 즉, AChE에 대한 5원환에 있어서는, C4에 치환기가 있든 없든 또 cis든 trans든 간에, N<sup>+</sup>와 O 원자 사이의 거리가 비록 6원환의 경우와 어느 정도 비슷하다고 하더라도, 나머지 하나의 산소원자나 헤테로 고리의 다른 쪽 탄소원자 C4나 C5가 입체적으로 효소의 작용부위와 반발을 일으키거나 공간 구조적으로 가까이 배치되지 못한다고 해석할 수 있다.

4급 질소 원자에 phenacyl기가 하나 치환된 화합물(3, 4, 7, 8)은 trimethylammonium체(1, 2, 5, 6)보다 모두 강한 억제력을 나타내었다. 이것은 phenacyl기가 4급 ammonium의 전자밀도에 상당히 영향을 끼친 결과 효소와 정전기적으로 더 잘 결합할 수 있었을 것이나, 방향성이 있어서 효소 중 hydrophobic site<sup>15-16)</sup>와의 친화성이 더 관여된 것이라 사료된다.

또한, C4 위치에 methyl기가 치환되어 있는 4, 6, 8의 경우에는, 이러한 말단(terminal) methyl이 없는 3, 5, 7 보다 모두 강한 작용을 보였다. 5원환 보다는 6원환이 더 친화력이 좋다는 사실은 산소 원자에의 전자 밀도 때문이라기 보다는 효소분자 상의 반응부위<sup>15-16)</sup> 때문이라고 사료된다. 헤테로 고리에 methyl기가 도입된 화합물의 저해력이 더 우수하다는 것 또한, 말단 methyl기가 효소의 anionic site와 적절히 떨어져있는 hydrophobic 부위에도 친화성을 나타내기 때문이라고 추정한다.

그러나, 일반적인 ACh 수용체에 대한 소위 5원자 법칙(five-atom rule)<sup>1,17)</sup>의 말단 탄소 [N<sup>+</sup>-C-C-O-C(O)-C] 즉, 말단 methyl기의 중요성이 여기에서도 강조되는지 또는 다른 어떤 요인, 예를 들면 carbamyl화된 AChE의 탈carbamyl화에 기여하는 *n*-BuCh

의 촉진효과<sup>18)</sup> 등도 복합되어 있는지는 연구가 좀더 진행된 다음 보고하고자 한다.

한편, 가장 약한 활성을 나타낸 trimethylammonium의 5원환 화합물 2의 경우에는 methyl기의 도입으로 화합물 1의 작용에 비해 오히려 저하되었을 뿐만 아니라 자유회전이 가능한 ethoxy기를 가진 ethanaminium 9보다도 작용이 약하였다. 이것은 6 원환 구조보다 견고(rigid)한 5원환에 치환기가 도입되어 있어서 치환기 사이의 각도나 거리가 적어짐에 따라 onium-head가 효소의 anionic site에 결합하더라도 공간구조 상 말단 methyl기는 오히려 효소의 반응부위로부터 멀어졌거나 또는 효소와 억제제 관능기 사이의 입체적 반발 등에 의한 결과가 아닌가 한다.

이 계열에 있어서 가장 강한 억제력을 보인 8의 경우에 있어서, 말단 methyl기의 <sup>1</sup>H-NMR signal이 0.84 ppm에서 doublet로 나타났는데, 4급화시시키기 전인 3급 아민 B(n=1, R=Me)에서의 경우보다 약 0.4 ppm 정도 고자장으로 이동되었다. 이것은, 물론 용매에 따른 화학적 이동의 차이도 있겠지만, 말단 methyl기가 phenyl 평면의 수직 상에 배치되어 있어서 방향환에 의한 이방성(anisotropy) 효과<sup>19-20)</sup>를 받아 나타난 현상이라 사료되므로, 수용액 중에서 8의 공간 배치는 이 두 관능기를 끝점으로 하는 G와 같은 "U"(또는 "C"나 "V")자 모양의 입체 공간구조라는 것을 알 수 있다. 이러한 형태는 bis체인 Fb(R=Me)<sup>21)</sup>의 경우에도 관찰할 수 있었다. 따라서, G와 같은 구조가 이루어지면 자연히 onium-head는 꼭지점 쪽에 돌출되어 있을 것이어서, AChE의 anionic site에 8이 결합하여 활성을 나타내는데 phenacyl이나 4-methyl-1,3-dioxane 부분이 효소의 입체구조와의 사이에 별다른 장애가 될 가능성도 적었을 뿐만 아니라, 두 관능기 모두 효소의 hydrophobic 부위에 친화력을 발휘할 수 있었다고 사료된다.

## 결 론

신경전달에 관여하는 효소인 AChE에 대한 가역적 억제제 계열의 하나로 4급 ammonium 화합물 A(1-8)의 효소 저해력을 측정하였다. 6원환인 1,3-dioxane 유도체가 5원환 1,3-dioxolane류보다 AChE에 대한 저해작용이 더 강하며, phenacyl기가 4급 질소에 치

환되어 있는 쪽이 단순히 trimethyl만인 경우보다 더 효능이 좋고, 헤테로 고리의 C4 탄소 상에 methyl기가 치환되어 있는 편이 더 효과적이라는 이상과 같은 실험 결과는 이 계열의 구조-활성 연구를 통한 의약품 개발에 하나의 좋은 참고 자료가 될 것으로 사료된다.

## 문 현

- 1) Blimblecombe, R. W.: *Drug Actions on Cholinergic Systems*, University Park Press, Baltimore, pp. 1-217 (1974).
- 2) Wess, J., Buhl, T., Lamrecht, G. and Mutschler, E.: Cholinergic Receptors, In *Comprehensive Medicinal Chemistry*, ed. by Hansch, C., vol. 3, Pergamon Press, Oxford, pp. 423-491 (1990).
- 3) Koelle, G. B.: *Cholinesterase and Anticholinesterase Agents*, *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, Vol. 15, Springer-Verlag, Berlin (1963).
- 4) Karczmar, A. G.: *Anticholinestrase Agents*, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, ed. by Radouco-Thomas, C., Section 13, Pergamon Press, Oxford, pp. 1-354 (1970).
- 5) Fourneau, E. and Bovet, D.: Parasympathomimetic properties of acetals of betaine aldehyde. *Compt. rend. soc. biol.* **138**, 469-472 (1944) [*Chem. Abstr.* **40**, 400<sup>9</sup> (1946)].
- 6) Belleau, B. and Lavoie, J. L.: A biophysical basis of ligand-induced activation of excitable membranes and associated enzymes. A thermodynamic study using acetylcholinesterase as a model receptor. *Can. J. Biochem.* **46**(11), 1397-1409 (1968) [*Chem. Abstr.* **70**, 422j (1969)].
- 7) Bardi, R., Piazzesi, A. M., Del Pra, A. and Villa, L.: Structure of trimethyl[(cis-4-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)methyl]ammonium iodide, C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>.I<sup>-</sup>. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **C39**(4), 505-507 (1983) [*Chem. Abstr.* **98**, 170748r (1983)].
- 8) Benassi, R., Schenetti, L., Taddei, F., Ferri, V. and Villa, L.: Conformational analysis of 5-membered ring compounds having cholinergic activity. *Tetrahedron* **39**(19), 3171-3180 (1983); *Chem. Abstr.* **100**, 208701v (1984).
- 9) Cannon, J. G., Sahin, M. F., Bhatnagar, R. K., Flynn, J. R. and Long, J. P.: Structure-Activity Studies on

- a Potent Antagonist to Organophosphate-Induced Toxicity. *J. Med. Chem.* **34**(5), 1582-1584 (1991).
- 10) Anteunis, M. J. O., Van Cauwenberghe, R., Valckx, L., Van Bever, W. F. M. and Van Nueten, J. M.: Activity-structure relations. 1. Muscarinic activity and conformational features in ammonium-substituted 1,3-dioxolanes and 1,3-dioxanes. *Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther.* **10**(4), 360-363 (1975) [Chem. Abstr. **84**, 83998q (1976)].
- 11) Van Cauwenberghe, R., Anteunis, M. and Valckx, L.: NMR experiments on acetals. 51. Origin of the conformational behavior of the trimethylammonium substituent. Trimethylammonium-substituted 1,3-dioxolanes and trimethylammoniomethyl substituted 1,3-dioxolanes and 1,3-dioxanes. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **83**(7-8), 285-294 (1974) [Chem. Abstr. **82**, 16 218f (1975)].
- 12) Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95 (1961).
- 13) Suemune, H., Tanaka, N. and Sakai, K.: Diastereoselective Synthesis of Chiral 2,2,4-Trisubstituted 1,3-Dioxanes. *Chem. Pharm. Bull.* **38**(11), 3155-3157 (1990).
- 14) Casy, A. F.: Stereochemical Aspects of Parasympathomimetics and their Antagonists: Recent Developments. In *Progress in Medicinal Chemistry*, eds. by Ellis, G. P. and West, G. B. vol. **11**, North-Holland Publishing Co., pp. 1-65 (1975).
- 15) Sussman, J. L., Marel, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. and Silman, I.: Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**, 872-879 (1991).
- 16) Quinn, D. M.: Acetylcholinesterase; Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States. *Chem. Rev.* **87**(5), 955-979 (1987).
- 17) Ing, H. R.: The structure-action relations of the choline group, *Science* **109**, 254-266 (1949) [Chem. Abstr. **43**, 4385h (1949)].
- 18) Kim, Y. B., Jung, C. H., Choi, S. J., Seo, W. J., Cha, S. H. and Sok, D. E.: Potentiation effect of choline esters on choline-catalysed decarbamoylation of dimethylcarbamoyl-acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **284**, 153-160 (1992).
- 19) 박만기: *분광학적 분석입문, 자유아카데미*, 서울 pp. 100-102 (1987).
- 20) 권순경, 신관석, 안병준, 유충규, 임철부, 정병호: *유기분광학, 자유아카데미*, 서울 pp. 141-147 (1989).
- 21) For **Fb**(R=H), see ref. 9. For **Fb**(R=Me), each doublet signal of the terminal methyl group appeared at 0.85 ppm( $J=6$  Hz: n=0; 0.83 ppm for minor isomer) and 0.55 ppm( $J=6$  Hz: n=1) on <sup>1</sup>H-NMR spectrum.