

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.12.002

新型 M5 胆碱受体选择性拮抗剂的发现及药理活性研究 *

李苗苗¹ 黄 辰² 李培逸¹ 赵兰雪¹ 徐见容¹ 唐德伟^{3Δ} 王 昊^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025;

2 上海健康医学院 上海 201318; 3 上海交通大学医学院附属仁济医院核医学科 上海 200127)

摘要 目的:选择性拮抗 M5 胆碱受体可成为治疗药物成瘾的新途径,本文旨在利用虚拟筛选、结构优化、分子与细胞水平的药理活性评价,以期获得新型 M5 胆碱受体选择性拮抗剂。**方法:**通过虚拟筛选获得具有新型骨架的候选化合物,以该结构为基础进行结构优化;利用放射配基实验对系列化合物进行活性测定;进一步评价其亲和力对各胆碱受体亚型的选择性,并利用细胞内钙离子释放实验评价其拮抗活性。**结果:**通过虚拟筛选得到具有新型骨架的 M5 胆碱受体拮抗剂 WXY-1-1,对其进行三轮结构优化共合成 20 个化合物;放射配基实验表明,其中化合物 WXY-3-5 对 M5 胆碱受体亚型具有亚微摩尔级亲和力($K_i=0.7 \mu\text{M}$)且具有亚型选择性(高出其他 4 个亚型 9-35 倍);钙流实验表明,化合物 WXY-3-5 对 M5 胆碱受体亚型具有拮抗活性($\text{IC}_{50}=6.1 \mu\text{M}$)。**结论:**通过虚拟筛选、结构优化以及药理活性评价,获得具有新骨架的 M5 胆碱受体选择性拮抗剂,为后续药物开发提供了新的先导结构。

关键词:M5 胆碱受体;拮抗剂;药理活性;亚型选择性;虚拟筛选

中图分类号:R-33;Q73;R965.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)12-2207-07

Discovery of Novel Subtype-selective M5 Acetylcholine Receptor Antagonists and Evaluation of Pharmacological Activities*

LI Miao-miao¹, HUANG Chen², LI Pei-yi¹, ZHAO Lan-xue¹, XU Jian-rong¹, TANG De-wei^{3Δ}, WANG Hao^{1Δ}

(1 Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China;

2 Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai, 201318, China;

3 Department of Nuclear Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200127, China)

ABSTRACT Objective: M5 muscarinic acetylcholine receptor (M5R) selective antagonists provide a new approach for the treatment of drug addiction. By using virtual screening, structural optimization, and molecular/cell-based pharmacological activity evaluation, we aimed to obtain novel M5R-selective antagonists. **Methods:** Virtual screening was used to obtain hits with new scaffolds and structural modification was carried out to optimize the hit structure. By using radioligand binding assay, the binding affinities were measured and the subtype-selectivities were evaluated on all five muscarinic receptor subtypes. Then, cell-based calcium mobilization assay was performed to characterize the antagonistic activity. **Results:** Through virtual screening, WXY-1-1 was identified to be an M5R antagonist with a new scaffold. Twenty new structures were synthesized during three rounds optimization. According to radioligand binding assay, WXY-3-5 displayed submicromolar affinity ($K_i=0.7 \mu\text{M}$) to M5R and relative subtype-selectivity, which was 9-35 folds higher than other 4 subtypes. By using calcium mobilization assay, WXY-3-5 was identified as an antagonist ($\text{IC}_{50}=6.1 \mu\text{M}$). **Conclusions:** Through virtual screening, structural optimization, and pharmacological activity evaluation, an M5R selective antagonist was discovered with a new scaffold and well characterized, which provided a promising novel lead structure for further drug development.

Key words: M5 muscarinic acetylcholine receptor; Antagonist; Pharmacological activity; Subtype-selectivity; Virtual screening

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q73; R965.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)12-2207-07

前言

毒蕈碱型乙酰胆碱受体 (Muscarinic Acetylcholine Receptors, mAChRs) 属于 A 类 G 蛋白偶联受体, 包括 M1-M5 共五

种亚型, 在中枢和外周神经系统中发挥重要的调节作用^[1]。其中, M5 胆碱受体在中枢神经中的表达量不足胆碱受体表达总量的 2%, 但主要位于黑质致密部 (Substantia Nigra pars compacta, SNc) 和腹侧被盖区 (Ventral Tegmental Area, VTA) 的多

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81973297; 81601536)

作者简介: 李苗苗 (1992-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 受体药理学, 电话: 18621823306, E-mail: limiamiao@sjtu.edu.cn

Δ 通讯作者: 唐德伟 (1983-), 男, 硕士生导师, 副研究员, 主要研究方向: 药物与诊断探针的研发, E-mail: acetdw@126.com, 电话: 18521705300;

王昊 (1975-), 女, 硕士生导师, 教授, 主要研究方向: 胆碱能药物的药理学研究, E-mail: angela_wanghao@hotmail.com,

电话: 13641923768

(收稿日期: 2020-02-28 接受日期: 2020-03-25)

巴胺能神经元中,可通过影响多巴胺能神经传递在成瘾/奖励调控中发挥重要作用,M5 胆碱受体选择性拮抗剂可能成为治疗药物成瘾的新途径^[2-6]。然而,M 胆碱受体各亚型之间高度同源,使得亚型选择性拮抗剂的开发充满挑战^[7-9]。本研究基于最新发表的 M5 胆碱受体晶体结构^[7],利用虚拟筛选和生物活性验证得到具有新骨架的候选化合物 WXY-1-1(图 1A),对其进行三轮结构优化共合成 20 个化合物。针对所有的五种受体亚型,通过放射配基结合实验以及细胞内钙离子释放实验对上述化合物的药理活性进行表征,发现其中的 WXY-3-5(图 1B)具有较高的结合亲和力以及亚型选择性,为发现可用于药物成瘾治疗的新型 M5 胆碱受体选择性拮抗剂提供了新的先导结构。

1 材料与方法

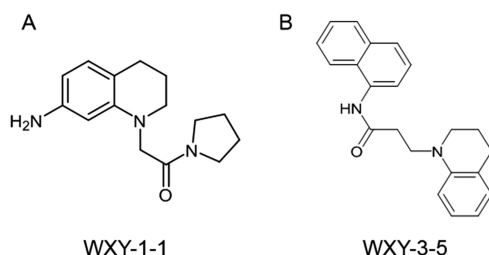


图 1 新型 M5 胆碱受体拮抗剂 WXY-1-1 (A) 以及 WXY-3-5 (B) 的结构

Fig.1 The structures of novel M5 acetylcholine receptor antagonists WXY-1-1 (A) and WXY-3-5 (B)

1.1 材料

1.1.1 软件及数据库 Glide 虚拟筛选软件 (Schrodinger 公司),分子结构绘画软件 Chem Office(Perkin Elmer 公司)。M5 胆碱受体的晶体结构来自 PDB 数据库 (Protein Data Bank); Chemdiv (<http://www.chemdiv.com>) 数据库。

1.1.2 试剂与仪器 高表达 M 胆碱受体各亚型的 CHO-M1、CHO-M2、CHO-M3、CHO-M4 细胞购买自南京金斯瑞生物科技有限公司;CHO-M5 细胞获赠于澳大利亚莫纳什大学 David M. Thal 实验室;20 个化合物皆由合作单位上海健康医学院与仁济医院核医学科合成;DMEM: F12 (1:1) 培养基、DMEM 培养基和胎牛血清 (Gibco);谷氨酰胺 (L-glutamine) 和 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (Invitrogen 公司);Zeocin (Thermo Fisher);Hygromycin B (Roche);G418 (Sigma);³H]-NMS、闪烁液 Microscint-O、96 孔板抽滤滤膜 Printed filtermate A 以及封膜袋 Microbeta Samplebag (PE 公司);钙流检测试剂盒 Fura 2-AM (Dojindo, Kumamoto, 日本);二氧化碳培养箱 (Steri-Cycle, Thermo, 美国);低温高速离心机 (Centrifuge 5810R, Eppendorf, 德国);多功能酶标仪 (Flexstation III, MD, 美国);96 孔板抽滤器 (Filtermate Harvester, PE, 美国);液闪仪 (2450 Microplate Counter, PE, 美国)。

CHO-M1 细胞培养基:DMEM:F12 (1:1), 10% FBS, 200 μ g/mL Zeocin;CHO-M2 细胞培养基:DMEM:F12 (1:1), 10% FBS, 200 μ g/mL Zeocin, 100 μ g/mL Hygromycin B; CHO-M3 细胞培养基:DMEM:F12 (1:1), 10% FBS, 400 μ g/mL G418; CHO-M4 细胞培养基:DMEM:F12 (1:1), 10% FBS,

200 μ g/mL Zeocin, 100 μ g/mL Hygromycin B;CHO-M5 细胞培养基:DMEM, 10% FBS。

1.2 方法

1.2.1 M5 胆碱受体拮抗剂的虚拟筛选 首先从蛋白数据库中检索到 M5 胆碱受体亚型的结构文件 (PDB ID: 6OL9), 框定 M5 胆碱受体与拮抗剂 Tiotropium 共晶结构中的活性区域, 确定 M5 胆碱受体活性位点的位置和筛选参数。以此活性区域作为对接的结合口袋, 运用 Maestro 软件中的 "Receptor Grid Generation" 程序生成口袋格点文件。从 Chemdiv 化合物数据库中下载待筛选化合物的 2D 结构, 进一步利用 "LigPrep" 模块生成化合物的 3D 结构。进一步运用 "Ligand Docking" 模块将化合物放置于活性区域格点中与 M5 胆碱受体进行对接, 利用 Gscore 以及 XP 模式依次进行筛选打分排序, 从中选出具有新骨架的化合物进行活性验证。

1.2.2 实验化合物的合成与配制 通过分析 WXY-1-1、Tiotropium 与 M5 胆碱受体的相互作用, 考虑 M5 胆碱受体与其他亚型在结合位点上的异同, 对 WXY-1-1 进行结构优化并合成 20 个化合物, 化合物由合作单位上海健康医学院与仁济医院核医学科合成。化合物称重后皆用 DMSO 溶解配制成为 10 mM 储备液, 4℃ 保存。细胞内钙离子释放实验中, 化合物用 HBSS 缓冲液稀释至相应的工作液浓度;放射配基实验中, 需用 KHB 缓冲液将化合物稀释使用。

1.2.3 M1-M5 受体高表达细胞的培养 用 T25 瓶培养细胞, 1:5 传代, 48 h 长满。弃去培养基, 吸取 2 mL PBS 缓冲液洗涤细胞表面, 轻轻摇晃保证 PBS 浸润细胞各处, 弃去 PBS 缓冲液, 加入 0.5 mL Trypsin-EDTA。约消化 1 min 后, 显微镜下观察细胞, 可见细胞间连接破裂, 大部分细胞变成圆形, 随即加入 2 mL 新鲜培养液, 将细胞混合液转移至 15 mL 离心管, 800 rpm, 25℃ 条件下离心 5 min, 弃去上清, 用 3 mL 新鲜培养液重悬细胞。每瓶传 1 mL 细胞悬液, 补 4 mL 新鲜培养液, 十字摇匀后 CO₂ 培养箱中 37℃ 培养。提取膜蛋白时, 将细胞逐步扩增至 10 cm 皿中待用;细胞内钙离子释放检测中, 可利用细胞计数器将细胞密度调节至 4×10^5 cell/mL。将上述密度的细胞 100 μ L / 孔铺在黑色 96 孔细胞培养板中, CO₂ 培养箱中培养约 24 h 后进行检测。

1.2.4 膜蛋白提取 将细胞扩增至若干 10 cm 皿中, 细胞用冰冷 KHB 缓冲液洗两遍, 加入 KHB 缓冲液 2 mL, 冰面上轻轻刮下细胞, 收集细胞于 15 mL 离心管中, 4℃ 条件下 3000 rpm 离心 5 min, 重悬细胞。冰水浴中利用玻璃研磨器破碎, 研磨 10-20 次后, 同样 4℃ 条件下, 12000 rpm 离心 20 min, 重悬于适量 KHB 缓冲液中 (以每皿 200 μ L 计), 得到膜蛋白后, 每管 1 mL 分装, 液氮冷冻后 -80℃ 冻存。蛋白浓度采用 BCA 法定量。

1.2.5 放射配基饱和结合实验 在饱和结合实验中, 每孔依次加入 KHB 缓冲液, 体积为 110、100、80、60、40、20、0 μ L, 再依次加入 10、20、40、60、80、100、120 μ L 的 [³H]-NMS 放射配基工作液。所设置的 [³H]-NMS 放射配基浓度在 0.24-2.88 nM 的范围内递增;在非特异性结合实验中, 首先每孔加入 100 μ M Atropine 溶液 20 μ L, 再在每孔中依次加入 KHB 缓冲液 80、60、40、20、0 μ L, 再依次加入 20、40、60、80、100 μ L [³H]-NMS 放射配基工作液, 共设置 5 个非特异性结合浓度梯度, [³H]-NMS

放射配基浓度在 0.48-2.40 nM 的范围内递增。从冰箱取出冻存的膜蛋白,待融化后用冰冷的 KHB 缓冲液按 1:8 稀释,将上述所有孔按每孔 80 μ L 加入膜蛋白稀释液(10 μ g/孔),反应体系每孔体积皆为 200 μ L。随后将配置好的 96 孔板于 37 $^{\circ}$ C 水浴中震荡孵育 60 min 后,放置于 96 孔板真空抽滤装置上抽滤去除上清液,使膜蛋白过滤到 96 孔板膜上,用超纯水快速冲洗滤膜三次去除游离的放射配基,取下滤膜置于 55 $^{\circ}$ C 烘箱中烘烤 60-90 min,待完全烘干变脆后取出滤膜,加入 1-2 mL 闪烁液,封膜,在液体闪烁计数仪上检测 cpm 读数。

1.2.6 放射配基竞争结合实验 竞争结合实验中,在 96 孔板中每孔加入 KHB 缓冲液 80 μ L、 3 H]-NMS 放射配基工作液 20 μ L、待测配体梯度溶液 20 μ L 以及膜蛋白稀释液 80 μ L,总体积保持 200 μ L(体系中 3 H]-NMS 放射配基浓度为 0.5 nM)。测定总结合时将 20 μ L 配体溶液替换成 20 μ L KHB 缓冲液,其余体积不变;测定非特异性结合时,将 20 μ L 配体溶液替换成 100 μ M Atropine 溶液 20 μ L。

1.2.7 细胞内钙离子释放检测 按 50 μ L/孔的量计算出需要的钙离子染料体积,用 HBSS 缓冲液将 Fura 2-AM 染料溶解,加入丙磺舒储备液(500 mM, 1 M NaOH 溶液配制)使其浓度为 5 mM,并加入 F127(DMSO 溶解至质量体积比为 20%)使其浓度为 0.04%。取出预培养的细胞,除去培养基,使用 HBSS 缓冲液洗涤细胞 3 次后加入 Fura 2-AM 工作液 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱孵育 30 min。再用 HBSS 缓冲液洗涤细胞 3 次,以充分去除残留的 Fura 2-AM 工作液,然后加入 HBSS 缓冲液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育约 20-30 min,以确保 AM 态荧光探针在细胞内达到完全去酯化。利用 Flexstation III 多功能酶标仪将不同浓度的配体溶液加入到 96 孔板中进行细胞内钙离子释放检测,检测时激发波长为 380 nm(Fura 2)和 340 nm(钙离子-Fura 2),发射波长为 510 nm,采取两次加样的方式,第一次加待测化合物溶液,第二次加浓度为 EC80 的 ACh 溶液,加样后均连续测定 100 s,记录其荧光强度变化曲线。

2 结果

2.1 M5 胆碱受体拮抗剂的虚拟筛选

通过分析 Tiotropium 与 M5 胆碱受体的晶体结构,确定拮抗剂与 M5 胆碱受体结合的活性位点主要包括 Y111、N459、Y458、Y481 和 W455 等热点残基(图 2A 和 2C)^[7]。根据上述位点信息,通过虚拟筛选得到多个苗头化合物,其中 WXY-1-1 具有与已知 M 胆碱受体拮抗剂不同的新骨架(图 1A),分析该化合物与 M5 胆碱受体的相互作用(图 2B 和 2D),发现该化合物可与活性口袋高度匹配,与受体活性位点的 Y458 之间形成氢键作用,同时还存在 π - π 相互作用,推测该化合物在 M5 胆碱受体上具有良好的生物活性。进一步通过放射配基实验进行验证,结果表明该化合物在 100 μ M 浓度下对 M5 胆碱受体与放射配基的结合具有显著的抑制作用,使相对结合量降至(70.93 $\pm$ 12.79)%。因此,我们对该化合物骨架进行结构优化,合成后续的系列化合物。

2.2 结构优化及各受体亚型的亲和力筛选

在 M1-M5 胆碱受体亚型的饱和结合实验中, 3 H]-NMS 的非特异性结合都比较低,表明表达纯化的各受体亚型的膜蛋白

纯度较高,并且 PEI 对非特异性结合的抑制效果也较好,仅 M3 受体亚型的表达量偏低。通过对各受体亚型总结合与非特异性结合曲线进行非线性拟合,得出其 Hill 系数皆接近整数比。通过各受体亚型的饱和结合实验,得到 Bmax(最大结合量)以及 Kd(平衡解离常数)等重要参数,为后续竞争结合实验提供实验条件的设置依据(图 3A-3E)。进一步通过放射配基竞争实验,对 20 个化合物的亲和力进行单浓度筛选,评价 100 μ M 浓度下各化合物对放射配基 3 H]-NMS 与五种受体亚型结合的竞争活性(表 1)。结果显示,针对 M5 胆碱受体,化合物 WXY-3-5 几乎可将与受体结合的 3 H]-NMS 完全竞争下来,使得相对结合量下降到(3.96 $\pm$ 0.79)%;针对 M3 和 M4 胆碱受体抑制作用弱,仅能将相对结合量分别降至(66.93 $\pm$ 7.79)%和(69.47 $\pm$ 0.18)%;针对 M1 及 M2 胆碱显示出较弱的抑制作用,可分别降至(21.05 $\pm$ 2.09)%及(22.46 $\pm$ 1.12)%,推测 WXY-3-5 对 M5 胆碱受体具有较好的亚型选择性。

2.3 化合物 WXY-3-5 对胆碱受体的亚型选择性评价

为进一步评价 WXY-3-5 对 M5 胆碱受体的亚型选择性,对 WXY-3-5 在 M1-M5 胆碱受体亚型上的亲和力活性值(Ki)进行测定。WXY-3-5 的浓度梯度设置为:0、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M 以及 100 μ M,针对 5 种受体亚型分别进行竞争结合实验。依据竞争结合曲线,拟合得到 WXY-3-5 在 M1-M5 胆碱受体亚型上的亲和力,依次为:9.6 μ M(M1)、6.2 μ M(M2)、26.0 μ M(M3)、27.0 μ M(M4)以及 0.7 μ M(M5)。结果显示,化合物 WXY-3-5 与 M5 胆碱受体亚型的亲和力最高,分别是与 M1、M2、M3 及 M4 受体亚型的 14 倍、9 倍、35 倍以及 35 倍(图 3C 和 3D)。与其他 4 个受体亚型相比,WXY-3-5 对 M5 胆碱受体显示出较高的亚型选择性。对于虚拟筛选得到的苗头化合物 WXY-1-1,其针对 M1-M5 胆碱受体的亲和力均为 30 μ M 左右,不仅亲和力较低,而且未显示出显著的亚型选择性(图 3A 和 3B)。上述结果表明,通过对 WXY-1-1 进行结构优化,改造后得到的化合物 WXY-3-5 在受体亲和力以及 M5 胆碱受体亚型选择性方面都得到较大的提升。

2.4 化合物 WXY-3-5 在细胞水平上对 M5 胆碱受体的拮抗活性

为得到 ACh 在细胞水平上激动 M5 胆碱受体的剂量效应曲线,ACh 浓度设定为 0 nM、3 nM、10 nM、30 nM、100 nM、1 μ M 共六个梯度,通过非线性拟合得出 ACh 激动 M5 胆碱受体亚型的半数有效浓度(EC50)为 9.07 nM,进一步计算得出 ACh 激动 M5 胆碱受体的 EC80 为 36.29 nM(图 5A 和 5B)。将化合物 WXY-3-5 的测试浓度设定为八个浓度梯度 0 nM、100 nM、300 nM、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M、100 μ M,测定各浓度对 EC80 浓度下的 ACh 激动 M5 胆碱受体的拮抗效应,拟合得到其半数抑制浓度(IC₅₀)为 6.1 μ M。通过细胞内钙离子释放实验,进一步证明化合物 WXY-3-5 不仅可以选择性地抑制 M5 胆碱受体与放射配基的结合,而且对 M5 胆碱受体的激活具有拮抗作用,该化合物可以明确为 M5 胆碱受体选择性拮抗剂(图 5C 和 5D)。

3 讨论

长期以来,M 胆碱受体一直是人们寻求中枢神经系统疾病有效治疗途径的重要靶点,开发针对不同亚型的选择性激动剂

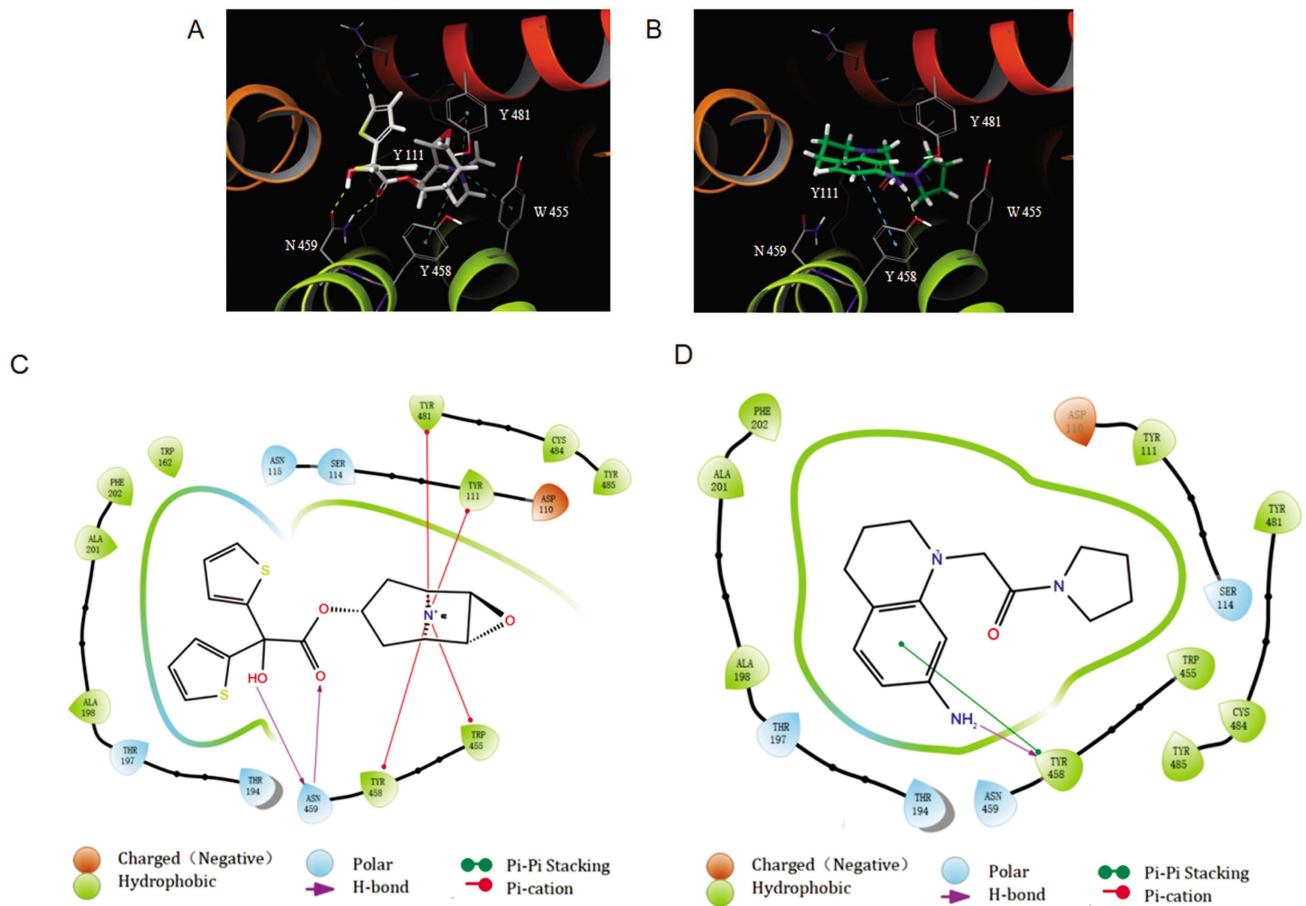


图 2 M5 胆碱受体与拮抗剂 Tiotropium 以及 WXY-1-1 的相互作用模式图

Fig.2 The interactions diagrams between M5 receptor and the antagonists Tiotropium and WXY-1-1

Note: A represents the binding pose of Tiotropium in M5 receptor; B represents the binding pose of WXY-1-1 in M5 receptor; C represents the interaction diagram for Tiotropium in M5 receptor (6OL9); D represents the interaction diagram for WXY-1-1 in M5 receptor (6OL9).

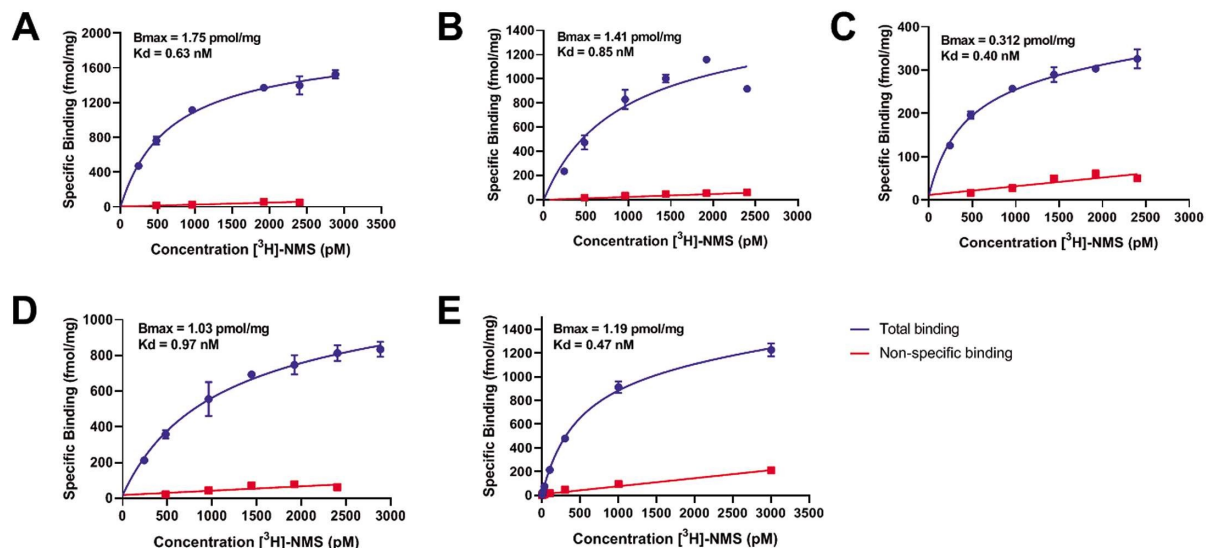


图 3 M1-M5 胆碱受体亚型饱和结合曲线

Fig. 3 Saturation binding for M1-M5 receptor subtypes

Note: A represents the saturation binding curve of M1 receptor; B represents the saturation binding curve of M2 receptor; C represents the saturation binding curve of M3 receptor; D represents the saturation binding curve of M4 receptor; E represents the saturation binding curve of M5 receptor.

或者拮抗剂备受关注。M5 胆碱受体亚型在中枢神经中表达量相对较少,其表达量不足 M 胆碱受体表达总量的 2%,因此一直未得到研究者的广泛关注^[11-13]。近期通过对 M5^{-/-} 小鼠研究

发现,缺失 M5 胆碱受体的小鼠对可卡因位置偏爱性降低,自我管理能力强,证实 M5 胆碱受体可调节多巴胺能神经递质的传递,并在成瘾/奖励机制中发挥重要作用^[14-18];使用针对

表 1 优化的化合物对放射配基与各受体亚型结合的抑制活性

Table 1 The inhibition of optimized compounds on the binding of radioligand to five receptor subtypes

Compound	Chemical Formula	Molecular Weight(Da)	Specific Binding $\pm$ SD (%)				
			M1AChR	M2AChR	M3AChR	M4AChR	M5AChR
WXY-1-1	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O	259.35	50.56 $\pm$ 0.65	72.94 $\pm$ 0.51	64.66 $\pm$ 0.75	27.18 $\pm$ 1.55	70.93 $\pm$ 12.79
WXY-1-2	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	275.31	116.52 $\pm$ 2.22	100.95 $\pm$ 3.70	90.23 $\pm$ 3.01	81.73 $\pm$ 3.45	79.46 $\pm$ 8.96
WXY-1-3	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322.41	67.07 $\pm$ 3.29	109.60 $\pm$ 1.31	97.94 $\pm$ 4.96	82.34 $\pm$ 0.34	95.49 $\pm$ 15.99
WXY-1-4	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O	300.36	89.55 $\pm$ 1.80	121.12 $\pm$ 0.68	103.37 $\pm$ 1.12	104.54 $\pm$ 3.88	84.43 $\pm$ 0.82
WXY-1-5	C ₁₅ H ₁₉ FN ₂ O	262.33	105.85 $\pm$ 6.78	107.47 $\pm$ 6.43	104.76 $\pm$ 7.67	90.72 $\pm$ 3.85	86.05 $\pm$ 12.41
WXY-1-6	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O	245.33	101.39 $\pm$ 0.09	49.48 $\pm$ 3.97	104.31 $\pm$ 4.54	64.67 $\pm$ 3.97	85.25 $\pm$ 0.03
WXY-2-1	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	308.38	96.85 $\pm$ 3.15	104.80 $\pm$ 4.26	106.37 $\pm$ 1.95	95.25 $\pm$ 1.22	78.28 $\pm$ 3.69
WXY-2-2	C ₁₄ H ₁₇ BrN ₂ O	309.21	93.41 $\pm$ 2.69	71.90 $\pm$ 1.80	84.46 $\pm$ 3.31	72.33 $\pm$ 3.43	70.55 $\pm$ 2.33
WXY-2-3	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O	315.38	82.25 $\pm$ 4.95	125.46 $\pm$ 3.62	130.52 $\pm$ 2.64	96.76 $\pm$ 2.29	79.92 $\pm$ 5.33
WXY-2-4	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O	320.44	70.23 $\pm$ 0.59	84.72 $\pm$ 3.91	88.77 $\pm$ 2.97	84.01 $\pm$ 4.02	65.98 $\pm$ 2.05
WXY-2-5	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂	292.34	90.27 $\pm$ 4.41	129.69 $\pm$ 1.86	104.12 $\pm$ 3.80	102.92 $\pm$ 2.01	83.19 $\pm$ 13.53
WXY-2-6	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O	306.41	67.75 $\pm$ 0.27	112.09 $\pm$ 3.36	119.67 $\pm$ 11.24	91.41 $\pm$ 1.60	71.31 $\pm$ 3.28
WXY-2-7	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O	259.35	98.33 $\pm$ 1.48	59.10 $\pm$ 1.60	82.20 $\pm$ 7.19	73.49 $\pm$ 2.43	77.13 $\pm$ 1.16
WXY-3-1	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O	259.35	82.00 $\pm$ 0.37	62.80 $\pm$ 2.75	81.20 $\pm$ 4.51	58.49 $\pm$ 3.43	72.09 $\pm$ 4.65
WXY-3-2	C ₁₃ H ₁₆ BrN ₃ O	310.20	71.71 $\pm$ 1.58	55.59 $\pm$ 1.59	71.18 $\pm$ 2.82	44.46 $\pm$ 0.96	63.95 $\pm$ 1.17
WXY-3-3	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O	306.41	55.95 $\pm$ 2.25	84.44 $\pm$ 2.69	92.69 $\pm$ 3.09	68.45 $\pm$ 3.75	63.53 $\pm$ 12.71
WXY-3-4	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O	335.45	47.49 $\pm$ 1.49	53.78 $\pm$ 2.47	68.67 $\pm$ 4.76	39.48 $\pm$ 0.59	37.59 $\pm$ 4.27
WXY-3-5	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O	330.43	21.05 $\pm$ 2.09	22.46 $\pm$ 1.12	66.93 $\pm$ 7.79	69.47 $\pm$ 0.18	3.96 $\pm$ 0.79
WXY-3-6	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O	259.35	93.42 $\pm$ 3.62	105.15 $\pm$ 6.96	70.18 $\pm$ 3.61	69.62 $\pm$ 1.64	58.14 $\pm$ 2.33
WXY-3-7	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O	272.39	53.16 $\pm$ 0.47	54.30 $\pm$ 0.82	88.22 $\pm$ 7.40	38.87 $\pm$ 1.54	57.37 $\pm$ 2.32

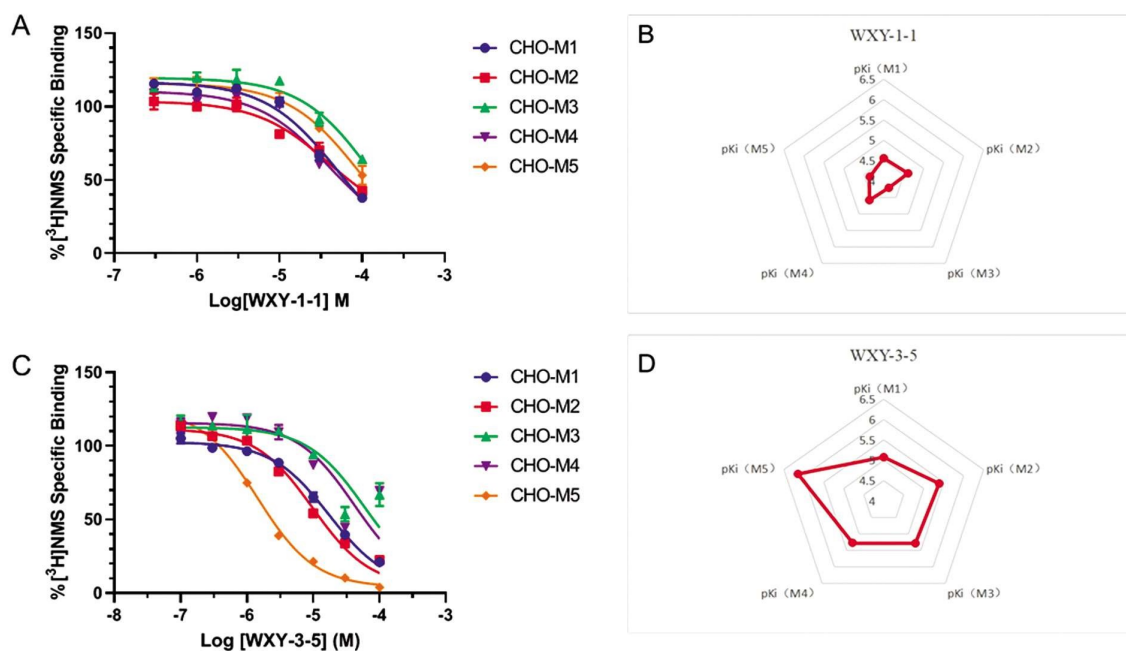


图 4 WXY-1-1 与 WXY-3-5 亚型选择性的比较

Fig. 4 The comparison of subtype selectivity between WXY-1-1 and WXY-3-5

Note: A represents the dose-dependent inhibition of WXY-1-1 on [3H]-NMS specific binding;

B represents the affinity and the subtype selectivity of WXY-1-1; C represents the dose-dependent inhibition of WXY-3-5 on [3H]-NMS specific binding;

D represents the affinity and the subtype selectivity of WXY-3-5.

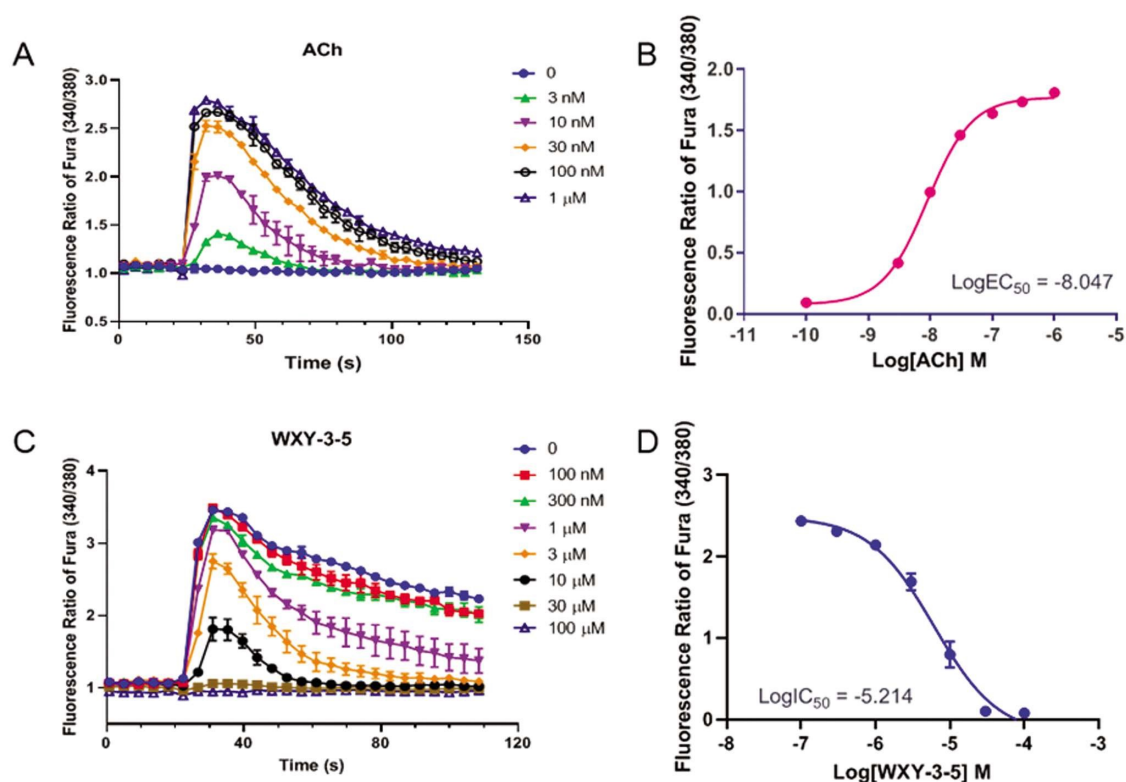


图 5 化合物 WXY-3-5 对 CHO-M5 细胞内钙离子释放的拮抗作用

Fig. 5 The antagonism of WXY-3-5 on intracellular calcium release in CHO-M5 cells

Note: A represents the dose-dependent intracellular calcium release induced by ACh on CHO-M5 cells; B represents the regression of EC₅₀ of ACh; C represents the dose-dependent inhibition of WXY-3-5 on ACh-induced intracellular calcium release; D represents the regression of IC₅₀ of WXY-3-5.

M5 胆碱受体的反义寡核苷酸或者将东莨菪碱注入 VTA 区域的进一步研究表明,选择性抑制 M5 胆碱受体活性可能为药物成瘾提供新的治疗方法^[19,22]。随着研究的不断深入,越来越多证据显示 M5 胆碱受体亚型可作为治疗药物成瘾的新靶标。

近期 M5 胆碱受体拮抗剂在不断地被挖掘,但克服亚型选择性差的问题成为该方向药物研发的瓶颈^[23-27]。Dwoskin 团队发表了首个 M5 胆碱受体选择性拮抗剂^[28],其 K_i 为 2.2 μM,该拮抗剂对 M5 胆碱受体的亲和力是 M1 胆碱受体的 11 倍,是其他三个受体亚型的 50 倍以上,但尚无证据显示其在细胞水平同样具有较好的拮抗活性。Lindsley 课题组通过三步加样的钙流实验对化合物库进行高通量筛选,发现化合物 VU0480131 对 M5 受体亚型显示出较好的拮抗活性与亚型选择性,其 IC₅₀ 为 1.12 μM,远高于 M2 及 M4 受体亚型^[29]。在此化合物基础上进行结构优化,随后发现拮抗活性及选择性更高的 M5 胆碱受体拮抗剂 ML381(VU0488130),其 IC₅₀ 提升到 0.45 μM,且高于其他 4 个受体亚型 20 倍以上。针对 ML381 的进一步研究结果表明,尽管该化合物显示出较好的药代动力学特性且能够进入中枢神经系统,但其在大鼠血浆中不稳定,半衰期短,使后续应用开发严重受限^[30]。

高选择性的正位拮抗剂的开发困难重重,主要是由于正构位点在 M 胆碱受体各亚型之间高度同源,而别构位点间氨基酸序列保守程度相对较低,因此寻找 M5 胆碱受体负性别构调控剂(Negative Allosteric Modulators, NAMs)成为实现 M5 胆碱受体功能选择性下调的另一可能途径。基于该策略, Lindsley 课题组开发出首个 M5 胆碱受体 NAM, 对人源及大鼠的 M5

胆碱受体拮抗活性均达到 500 nM 左右,同时对其他亚型的拮抗活性均弱于 30 μM,显示出 M5 胆碱受体高亚型选择性^[31]。进一步的动物实验显示 ML375 可以通过选择性拮抗 M5 胆碱受体功能,产生抑制药物成瘾的作用,同时并不对痛觉产生影响,可为药物成瘾治疗提供另外的选择^[32]。

本研究通过对 M5 胆碱受体进行虚拟筛选,得到具有新骨架的候选化合物,经过 3 轮结构优化获得系列新化合物,并进一步开展分子以及细胞水平的药理活性评价,获得具有新骨架的 M5 胆碱受体选择性拮抗剂。实验结果表明,在分子水平的结合实验上,化合物 WXY-3-5 显示出对 M5 胆碱受体亚型达到亚微摩尔亲和力 ($K_i = 700$ nM),高出其他 4 个受体亚型 9-35 倍,具有亚型选择性;在细胞水平的细胞内钙离子释放的实验中,该化合物对 M5 胆碱受体的拮抗活性 IC₅₀ 为 6.1 μM,证实该化合物为 M5 胆碱受体的高活性选择性拮抗剂。与已经报道的其他 M5 胆碱受体拮抗剂相比,化合物 WXY-3-5 具有相当的拮抗活性和选择性,更重要的是,该化合物具有新的母核,且该母核分子量较小,具有更大的优化空间,后续将针对该母核进行系统的构效关系研究,优化得到选择性和拮抗活性均更佳的 M5 胆碱受体拮抗剂。

综上所述,本研究发现一个具有新型骨架的 M5 胆碱受体配体 WXY-3-5,其对 M5 胆碱受体的具有较高亲和力和亚型选择性,并发现该化合物在细胞水平上表现出显著的拮抗活性,证实该化合物为 M5 胆碱受体选择性拮抗剂。在此基础上,我们将进一步对该化合物进行结构优化,力求获得具有更高亲和力及亚型选择性的 M5 胆碱受体拮抗剂,为药物成瘾干预提供

新的手段。

参考文献(References)

- [1] Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors [J]. Pharmacol Rev, 1998, 50(2): 279-290
- [2] 熊彩虹, 陆绍永, 赵娜, 等. M1 胆碱受体选择性别构激动剂的虚拟筛选和体外活性研究 [J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(9): 1601-1606
- [3] Radu BM, Osculati AM, Suku E, et al. All muscarinic acetylcholine receptors (M1-M5) are expressed in murine brain microvascular endothelium[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5083
- [4] Bender AM, Weiner RL, Luscombe VB, et al. Discovery and optimization of 3- (4-aryl/heteroarylsulfonyl) piperazin-1-yl)-6- (piperidin-1-yl)pyridazines as novel, CNS penetrant, pan -muscarinic antagonists[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27(15): 3576-3581
- [5] Padberg F, Tamow P, Luch A, et al. Minor structural modifications of bisphenol A strongly affect physiological responses of HepG2 cells [J]. Archive für Toxikologie, 2019, 93(10): 1-13
- [6] Kurata H, Gentry PR, Kokubo M, et al. Further optimization of the M5 NAM MLPCN probe ML375: Tactics and challenges[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(3): 690-694
- [7] Vuckovi Z, Gentry PR, Berizzi AE, et al. Crystal structure of the M5 muscarinic acetylcholine receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA , 2019, 116(51): 26001-26007
- [8] Andrew CK, Hu JX, Brian KK, et al. Muscarinic acetylcholine receptor X-ray structures: potential implications for drug development [J]. Curr Opin Pharmacol, 2014, 16: 24-30
- [9] Moran SP, Maksymetz J, Conn PJ, et al. Targeting Muscarinic Acetylcholine Receptors for the Treatment of Psychiatric and Neurological Disorders [J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40 (12): 1006-1020
- [10] Eduardo CT, Pedro JS, Sergio RR, et al. Structural basis for the modulation of plant cytosolic triosephosphate isomerase activity by mimicry of redox based modifications[J]. The Plant Journal, 2019, 99 (5): 950-964
- [11] Gentry PR , Kokubo M , Bridges TM, et al. Discovery of the First M5-Selective and CNS Penetrant Negative Allosteric Modulator (NAM) of a Muscarinic Acetylcholine Receptor: (S)-9b-(4-chlorophenyl)-1- (3,4-difluorobenzoyl)-2,3-dihydro-1H-imidazo [2,1-a]isoindol-5(9bH)-one (ML375)[J]. J Med Chem, 2013, 56(22): 9351
- [12] Wold EA, Chen JP, Cunningham KA, et al. Allosteric Modulation of Class A GPCRs: Targets, Agents, and Emerging Concepts [J]. J Med Chem, 2019, 62(1): 88-127
- [13] Melancon BJ, Hopkins CR, Wood MR, et al. Allosteric Modulation of Seven Transmembrane Spanning Receptors: Theory, Practice, and Opportunities for Central Nervous System Drug Discovery [J]. J Med Chem, 2012, 55(4): 1445-1464
- [14] Gunter BW, Gould RW, Bubser M, et al. Selective inhibition of M5 muscarinic acetylcholine receptors attenuates cocaine self-administration in rats[J]. Addict Biol, 2017, 23(5): 1106-1116
- [15] Dencker D, Thomsen M, Wortwein G, et al. Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes as Potential Drug Targets for the Treatment of Schizophrenia, Drug Abuse, and Parkinson's Disease[J]. ACS Chem Neurosci, 2012, 3(2): 80-89
- [16] Nunes EJ, Bitner L, Hughley SM, et al. Cholinergic Receptor Blockade in the VTA Attenuates Cue-Induced Cocaine-Seeking and Reverses the Anxiogenic Effects of Forced Abstinence [J]. Neurosci, 2019, 413(10): 252-263
- [17] Bender AM, Garrison AT, Lindsley CW, et al. The Muscarinic Acetylcholine Receptor M5: Therapeutic Implications and Allosteric Modulation[J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10(3): 1025-1034
- [18] Bender AM, Cho HP, Nance KD, et al. Discovery and Optimization of Potent and CNS Penetrant M5-Preferring Positive Allosteric Modulators Derived from a Novel, Chiral N- (Indanyl)piperidine Amide Scaffold[J]. ACS Chem Neurosci, 2018, 9 (7): 1572-1581
- [19] Lester DB, Miller AD, Blaha CD, et al. Muscarinic receptor blockade in the ventral tegmental area attenuates cocaine enhancement of laterodorsal tegmentum stimulation-evoked accumbens dopamine efflux in the mouse[J]. Synapse, 2010, 64(3): 216-223
- [20] Shabani S, Foster R, Gubner N, et al. Muscarinic type 2 receptors in the lateral dorsal tegmental area modulate cocaine and food seeking behavior in rats[J]. Neurosci, 2010, 170(2): 559-569
- [21] Kaneda K. Neuroplasticity in cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus contributes to the development of cocaine addiction[J]. Eur J Neurosci, 2018, 50(3): 2239-2246
- [22] Goldstein RZ, Barrot M, Everitt BJ, et al. Addiction in focus: molecular mechanisms, model systems, circuit maps, risk prediction and the quest for effective interventions [J]. Eur J Neurosci, 2019, 50 (3): 2007-2013
- [23] Laadraoui J, Bezza K, Gabbas ZE, et al. Intracerebroventricular administration of cigarette smoke condensate induced generalized seizures reduced by muscarinic receptor antagonist in rats[J]. Epilepsy & Behav, 2017, 79: 154-161
- [24] Lee NR, Gujarathi S, Bommagani S, et al. Muscarinic agonist, (±) -quinuclidin-3-yl- (4-fluorophenethyl) (phenyl)carbamate: High affinity, but low subtype selectivity for human M1 - M5 muscarinic acetylcholine receptors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2018, 29(3): 471-476
- [25] Lebois EP, Thorn C, Edgerton JR, et al. Muscarinic receptor subtype distribution in the central nervous system and relevance to aging and Alzheimer's disease[J]. Neuropharmacology, 2017, 136(Pt C): 362-373
- [26] Digby GJ, Utley TJ, Lamsal A, et al. Chemical modification of the M (1) agonist VU0364572 reveals molecular switches in pharmacology and a bitopic binding mode [J]. ACS Chem Neurosci, 2012, 3 (12): 1025-1036
- [27] Kruse AC, Kobilka BK, Gautam D, et al. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development [J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(7): 549-560
- [28] Zheng J, Smith AM, Huang X, et al. Structural Modifications to Tetrahydropyridine-3- carboxylate Esters en Route to the Discovery of M5-preferring Muscarinic Receptor Orthosteric Antagonists [J]. J Med Chem, 2013, 56(4): 1693-1703

- [17] Paschou S A, Stamou M, Vuagnat H, et al. Pain management of chronic wounds: Diabetic ulcers and beyond[J]. *Maturitas*, 2018, 117 (3): 17-21
- [18] Game F. Treatment strategies for neuroischaemic diabetic foot ulcers [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018, 6(3): 159-160
- [19] Hicks C W, Canner J K, Karagozlu H, et al. The Society for Vascular Surgery Wound, Ischemia, and foot Infection (WIFI) classification system correlates with cost of care for diabetic foot ulcers treated in a multidisciplinary setting[J]. *J Vasc Surg*, 2018, 67(5): 1455-1462
- [20] Gao Y, Liang Y, Ran X. Research progress of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors on healing of chronic diabetic foot ulcers[J]. *ZhongguoXiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2018, 32(5): 630-633
- [21] Gomes A, Teixeira C, Ferraz R, et al. Wound-Healing Peptides for Treatment of Chronic Diabetic Foot Ulcers and Other Infected Skin Injuries[J]. *Molecules*, 2017, 22(10): 1743-1749
- [22] Wu Hong-xia. Chronic diabetic rat model of wound healing [D]. Shandong Normal University, 2010
- [23] Lee Y H, Chang J J, Chien C T, et al. Antioxidant Sol-Gel Improves Cutaneous Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 504693.doi: 10.1155/2012/504693
- [24] Heppt M V, Breuninger H, Reinholz M, et al. Current Strategies in the Treatment of Scars and Keloids[J]. *Facial Plast Surg*, 2015, 31(4): 386-395
- [25] Hayes P D, Alzuhir N, Curran G, et al. Topical oxygen therapy promotes the healing of chronic diabetic foot ulcers: a pilot study[J]. *J Wound Care*, 2017, 26(11): 652-660
- [26] Liu M, Wu Y, Liu Y, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Protects Astrocytes Against Ischemia/Reperfusion Injury by Upregulating the Caveolin-1/VEGF Signaling Pathway [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2018, 64(2): 1-13
- [27] Zuo Q, Gao F, Song H, et al. Application of Ilizarov transverse tibial bone transport and microcirculation reconstruction in the treatment of chronic ischemic diseases in lower limbs[J]. 2018,16(2): 1355-1359
- [28] Scharf RE. Von Willebrand factor, hemostasis and inflammation[J]. *Hamostaseologie*, 2015, 35(3): 209-215
- [29] Yu Xin, Dong Hua-jiang, Shan Na-na, et al. Influence of panax notoginsenoside on tumor necrosis factor- α in rats with diabetic skin ulceration [J]. *Journal of Xinxiang Medical College*, 2012, 29(12): 893-895
- [30] Zongguo Sun, Qi Xie, Jie Pan, et al. Cadmium regulates von Willebrand factor and occludin expression in glomerular endothelial cells of mice in a TNF- α -dependent manner [J]. *Renal Failure*, 2019, 41(1): 354-362

(上接第 2213 页)

- [29] Gentry PR, Kokubo M, Bridges TM, et al. Discovery, Synthesis and Characterization of a Highly Muscarinic Acetylcholine Receptor (mAChR)-Selective M5-Orthosteric Antagonist, VU0488130 (ML381): A Novel Molecular Probe[J]. *Chemmedchem*, 2014, 9(8): 1677-1682
- [30] Bender AM, Garrison AT, Lindsley CW. The Muscarinic Acetylcholine Receptor M5: Therapeutic Implications and Allosteric Modulation[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(3): 1025-1034
- [31] Gentry PR, Kokubo M, Bridges TM, et al. Discovery of the First M5 Selective and CNS Penetrant Negative Allosteric Modulator (NAM) of a Muscarinic Acetylcholine Receptor: (S)-9b-(4-Chlorophenyl)-1-(3,4-difluorobenzoyl)-2,3-dihydro-1H-imidazo [2,1-a]isoindol-5(9bH)one (ML375)[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(22): 9351-9355
- [32] Gould RW, Gunter BW, Bubser M, et al. Acute Negative Allosteric Modulation of M5 Muscarinic Acetylcholine Receptors Inhibits Oxycodone Self-Administration and Cue-Induced Reactivity with No Effect on Antinociception[J]. *ACS Chem. Neurosci*, 2019, 10(8): 3740-3750