



УДК 577.175.82+612.82.015

© 1994 И. Е. Кашеверов, Д. А. Зайцев,
Ю. Н. Уткин, В. И. Цетлин

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ТРИТИРОВАННОГО
ПРОИЗВОДНОГО СР-96.345 — НЕПЕПТИДНОГО АНТАГОНИСТА
РЕЦЕПТОРА ВЕЩЕСТВА P — С ВЫСОКОЙ УДЕЛЬНОЙ
РАДИОАКТИВНОСТЬЮ

*Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;
* Институт молекулярной генетики РАН, Москва*

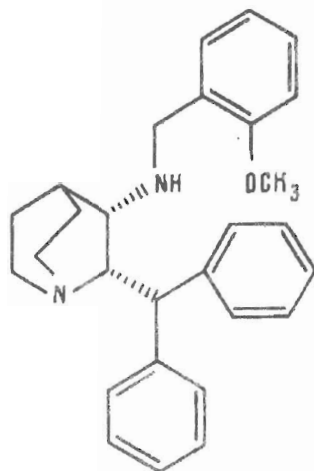
Ключевые слова: антагонист непептидный тахикининовых рецепторов, тритированное производное СР-96.345, рецепторы тахикининовые.

Получено тритированное производное СР-96.345 с удельной активностью 84 Ки/ммоль. Радиоактивное соединение охарактеризовано в сравнении с немеченым аналогом по его способности ингибировать связывание [125 I]йодированного производного вещества P с мембранными препаратами мозга из различных источников. Методом радиолигандного анализа была исследована также способность [3 H]СР-96.345 непосредственно специфически взаимодействовать с мембранами тех же источников.

Вещество P (SP) — один из наиболее изученных на сегодняшний день представителей пептидного семейства тахикининов. Установлены аминокислотные последовательности его рецептора из разных источников [1, 2] (относительно обычно к NK-1-типу нейрокининовых рецепторов), делаются первые попытки его выделения и очистки [3, 4]. Собрано большое количество данных по физиологическим свойствам самого вещества P (спектр действия пептида здесь весьма широк). Наряду с его наиболее известной нейромедиаторной функцией в передаче болевых ощущений и способностью вызывать сокращение гладкой мускулатуры установлено влияние вещества P на активацию клеток иммунной системы, процессы воспаления, слюноотделения, расширение сосудов, а также его гипотензивное действие [5—10]. Однако выяснение механизмов столь разнообразных действий вещества P, поиски связанных с ними возможных различных подтипов NK-1-рецепторов и получение на основе этих знаний эффективных терапевтических средств до недавнего времени наталкивалось на отсутствие высокоактивных антагонистов рецептора вещества P. Немногие известные пептидные антагонисты [11] были недостаточно селективны и не могли быть успешно использованы в тестах *in vivo* из-за быстрого метаболизма.

Сокращения: SP — вещество P, [125 I]ВН-SP — модифицированное реагентом Болтона — Хантера [125 I]йодированное производное вещества P, СР-96.345 — [(2S,3S)-цис-2-(дифенилметил)-N-[2-метоксифенил)метил]-1-азабидило [2.2.2]октил-3-амин], [3 H]СР-96.345 — тритированный аналог СР-96.345.

Недавно появилось сообщение о химическом синтезе первого непептидного блокатора тахикининовых рецепторов NK-1-типа, CP-96.345 [(2*S*, 3*S*)-*цис*-2-(дифенилметил)-*N*-[(2-метоксифенил)метил]-1-азабицикло[2.2.2]октил-3-амин] [12]. С его помощью уже удалось охарактеризовать роль вещества P при остром нейrogenном воспалении [13, 14] и понижении кровяного давления [15].



С помощью метода направленного мутагенеза и конструирования химерных рецепторов показано, что, несмотря на эффективное вытеснение антагонистом CP-96.345 иодированного или тритированного вещества P, участки связывания вещества P и CP-96.345 на рецепторе не перекрываются [16—18]. Для детальной биохимической характеристики участков связывания антагониста необходимо располагать как меченым CP-96.345 с высокой удельной радиоактивностью, так и его радиоактивными производными, несущими специфические группировки для мечения рецептора. Известен способ синтеза тритированного аналога CP-96.345 (уд. акт. 48 Ки/ммоль) путем замещения атомов брома в химически синтезированном бромпроизводном на тритий [19].

Мы применили метод твердофазного высокотемпературного обмена для получения тритированного производного непосредственно из CP-96.345 и изучили его взаимодействие с тахикининовыми рецепторами из нескольких источников. Этот метод позволяет быстро и эффективно получать тритированные соединения различных классов с высокой специфической активностью [20, 21].

Для синтеза тритированного производного нами использован образец CP-96.345 (дигидрохлорид), любезно предоставленный фирмой Pfizer (США), строение и индивидуальность которого были подтверждены данными масс-спектрометрии и ВЭЖХ.

После проведения реакции изотопного обмена радиохимический выход продукта ($[G-^3H]$ CP-96.345 или просто $[^3H]$ CP-96.345 с произвольным расположением атомов трития в молекуле) составил 4,8 мКи с уд. акт. 84,2 Ки/ммоль; концентрация препарата была 1,5 мКи/мл водного 50% этанола.

Радиоактивная чистота полученного после рехроматографии на колонке Vydac C18 тритированного образца составила ~96%. Времена выхода с колонки $[^3H]$ CP-96.345 и исходного CP-96.345 в точности совпадали (рис. 1).

Поскольку при модификации любого оптически чистого соединения в жестких условиях всегда существует вероятность рацемизации, а R-энантиомер CP-96.345 (CP-96.344) обладает по меньшей мере на три порядка худшей SP-ингибирующей активностью [19], мы исследовали биохимические характеристики полученного тритированного антагониста.

Для характеристики радиоактивного производного использовали его ингибирующие свойства в сравнении с нерадиоактивным аналогом. Известно о суще-

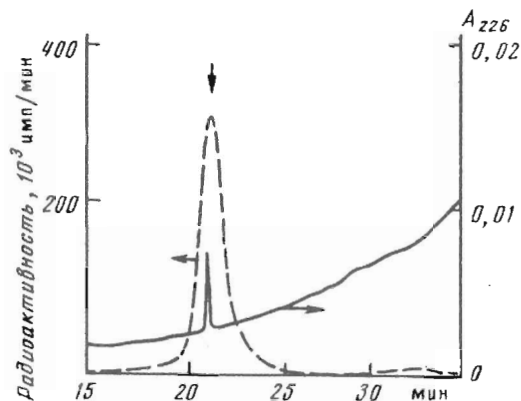


Рис. 1. Хроматографический анализ $[^3\text{H}]$ CP-96.345 (~ 50 пКи в 40 мкл) на колонке Уудас С18 ($4,6 \times 250$ мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (10—100% за 60 мин) в 0,1% TFA. Скорость элюции 1 мл/мин. Вертикальной стрелкой указано время выхода исходного образца CP-96.345 до его тритирования

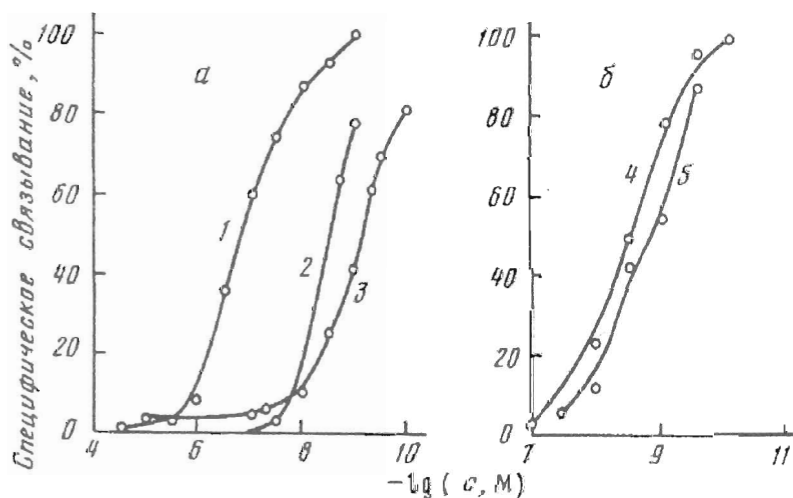


Рис. 2. Кривые ингибирования антагонистом CP-96.345 связывания $[^{125}\text{I}]$ BH-SP (0,35 нМ) на мембранных препаратах мозга крысы (1), свиньи (2) и морской свинки (3), а также CP-96.345 (4) и $[^3\text{H}]$ CP-96.345 (5) на стриатумных мембранах мозга морской свинки. Результаты соответствуют среднему значению 2—4 независимых опытов (а) и двух повторов одного эксперимента (б). с — молярные концентрации антагонистов

ственным различии в сродстве антагониста к рецепторам из разных источников (до двух порядков значений IC_{50} в опытах по ингибированию антагонистом связывания радиоактивного вещества Р с мембранными препаратами или клеточными линиями). При этом высокоаффинное взаимодействие наблюдалось на мозге морской свинки, кролика, быка, некоторых клеточных линиях человека, меньшее — на мозге мыши и крысы, еще более слабое — на мозге дрыпленка [22].

Нами был проведен сравнительный анализ действия CP-96.345 на препараты мембран из мозга крысы и морской свинки, а также на препараты из мозга свиньи. Тахикининовые рецепторы NK-1-типа в мозге свиньи были недавно охарактеризованы [3], однако данные об их чувствительности к CP-96.345 в литературе отсутствуют. Для ингибирования антагонистом CP-96.345 связывания модифицированного реагентом Болтона — Хантера йодированного производного вещества Р ($[^{125}\text{I}]$ BH-SP) с мембранными препаратами мозга морской свинки,

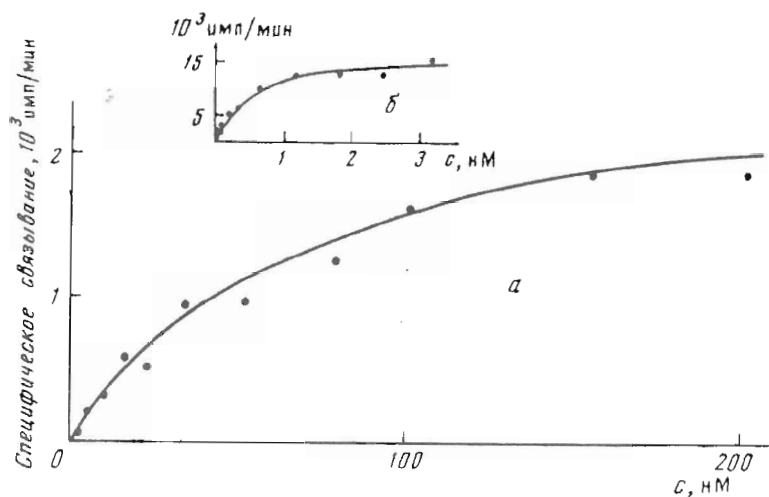


Рис. 3. Кривые специфического связывания $[^3\text{H}]\text{CP-96.345}$ (а) и $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$ (б) со стриатумными мембранами мозга морской свинки. Представлены усредненные значения трех повторов. с — молярная концентрация радиоактивных лигандов

свиньи и крысы (рис. 2а) получены соответствующие значения IC_{50} : $0,6 \pm 0,2$, $4,0 \pm 1,0$, 130 ± 30 нМ. Заметим, что результаты для морской свинки и крысы качественно согласуются с данными работы [22]; по сравнению с ними степень сродства антагониста к рецептору мембран мозга свиньи можно охарактеризовать как промежуточную. (Такой большой диапазон значений IC_{50} для разных источников может объясняться видовыми различиями рецепторов вещества Р.)

Мы сравнили способность CP-96.345 и его тритированного аналога, взятых в одинаковых концентрациях, ингибировать связывание $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$ со всеми мембранными препаратами. Разница в степени ингибирования между ними для любой концентрации не превышала 10%, что находится в пределах ошибки измерения ингибирующей способности антагониста. На основании этого результата был сделан вывод о том, что получение $[^3\text{H}]\text{CP-96.345}$ методом высокотемпературного изотопного обмена не сопровождается сколько-нибудь заметным переходом антагониста в другую энантиомерную форму.

Дальнейшее изучение $[^3\text{H}]\text{CP-96.345}$ и его мишеней столкнулось с определенными трудностями. Несмотря на высокое сродство антагониста к NK-1-рецептору в опытах по ингибированию, нам не удалось обнаружить его специфического связывания с мембранными препаратами ни одного из источников. Действительно, в литературе имеются данные лишь о связывании $[^3\text{H}]\text{CP-96.345}$ с мембранными препаратами из стриатума мозга морской свинки: параметры этого связывания (насыщаемого, односайтового) равны $K_d \sim 0,22$ нМ; $B_{\text{max}} \sim 166$ фмоль/мг белка [23].

Мы исследовали связывание полученного нами $[^3\text{H}]\text{CP-96.345}$ с препаратами мозга морской свинки, обогащенными мембранами стриатума.

Для получения подобных препаратов из мозга морской свинки удалялись мозжечок, кора, ствол и пристволовая область; оставшаяся «стриатумная» область (примерно 1/7 часть целого мозга по весу) использовалась для получения мембран по стандартной методике (см. «Экспериментальную часть»). Были получены также мембраны из оставшихся после удаления стриатума частей мозга («нестриатумные» мембраны).

Ингибирование связывания $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$ как CP-96.345, так и его радиоактивным производным на «стриатумных» мембранах ($K_i \sim 0,34$ нМ) практически не отличается от ингибирующего эффекта ни на целом мозге морской свинки (рис. 2б; ср. с рис. 2а), ни на «нестриатумной» части мозга (данные не представлены).

В то же время действительно было обнаружено явное различие в способности [^3H]CP-96.345 специфически взаимодействовать с мембранными препаратами стриатума, с одной стороны, и целого мозга или «нестриатумной» его части — с другой.

Для стриатумных мембран мы сравнили параметры связывания [^{125}I]BH-SP и [^3H]CP-96.345 (рис. 3). Полученные для [^{125}I]BH-SP значения (B_{max} 24 ± 3 фмоль/мг и K_d $0,44 \pm 0,06$ нМ) близки к таковым для связывания пептида с мембранами из других источников. Оценка этих величин для CP-96.345 (~84 фмоль/мг, K_d ~23 нМ) была затруднена из-за сравнительно высокого уровня неспецифического связывания (он составлял $80 \pm 5\%$ от общего связывания). Качественно полученные нами результаты согласуются с работой [23], свидетельствующей о том, что мембраны стриатума из морской свинки являются на сегодня единственным известным источником, на котором можно непосредственно изучать связывание непептидного антагониста CP-96.345.

Различия в эффективности взаимодействия CP-96.345, регистрируемые по непосредственному связыванию радиоактивных аналогов или же по ингибированию ими связывания радиоактивных производных вещества P, могут оказаться весьма полезными как для фармакологической характеристики тахикининовых рецепторов, различающихся по чувствительности к антагонистам, так и для выяснения структурно-функциональных взаимоотношений между участками связывания агонистов и антагонистов тахикининовых рецепторов.

Экспериментальная часть

В работе использовались реактивы: вещество P (SP) (НПО «Вектор», Россия); трис(гидроксиметил)аминометан, бычий сывороточный альбумин (фракция 5) (BSA), бацитрацин (Serva, ФРГ); MnCl_2 (Ferak, ФРГ); фенилметилсульфонилфторид (PMSF) (Calbiochem, США); лейпептин (Peptide Institute Inc., Япония); полиэтиленимин (Fluka, Швейцария).

Получение мембранных препаратов из мозга разных источников (крыса, свинья, морская свинка, «стриатумная» и «нестриатумная» части мозга морской свинки) проводили по унифицированной методике для выделения мембран из мозга крысы [24].

Определение белка в мембранах и синтез модифицированного реагентом Болтона — Хантера йодированного производного вещества P [^{125}I]BH-SP описаны в той же работе.

Для получения тритированного аналога CP-96.345 лиофилизованная смесь 1 мг CP-96.345, 10 мг RhCl_3 , 10 мг Al_2O_3 и 10 мг катализатора (5% Rh/BaSO_4 , Fluka) выдерживалась в атмосфере газообразного трития 1 ч при 180°C под давлением 300 мм рт. ст. в ампуле объемом 15 мл. После удаления лабильного трития упариванием с 50% водным этанолом (2 раза по 10 мл) проводилась очистка соединения обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Zorbax ODS ($4,6 \times 250$ мм) в водном градиенте ацетонитрила в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты. После лиофилизации собранной радиоактивной фракции, соответствующей по хроматографическим свойствам первоначальному CP-96.345, образец был растворен в 50% водном растворе этанола и хранился при -20°C .

Ингибирование связывания [^{125}I]BH-SP (0,35 нМ) с мембранными препаратами (0,2—0,4 мг белка) CP-96.345 или [^3H]CP-96.345 проводили 20 мин при 20°C в 200 мкл 50 мМ трис-НСI-буфера, рН 7,4, содержащего 3 мМ MnCl_2 , 10 мкг/мл фенилметилсульфонилфторида, 40 мкг/мл бацитрацина, 4 мкг/мл лейпептина и 200 мкг/мл BSA (буфер А), при одновременном добавлении всех компонентов. Промывку осуществляли на фильтрах GF/F 25 мМ трис-НСI-буфером, рН 7,4, содержащим 3 мМ MnCl_2 . Фильтры замачивались в течение 3 ч в 0,25% полиэтиленимине.

Связывание [^{125}I]BH-SP со стриатумными мембранами мозга морской свинки (0,22 мг белка) проводили в 200 мкл буфера А в течение 25 мин при 20°C . Лиганд брали в концентрации от 20 пМ до 3,2 нМ. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 5 мкМ SP.

Связывание [^3H]CP-96.345 со стриатумными мембранами мозга морской свинки осуществляли по несколько измененной методике [23]. К мембранному белку (0,22 мг), суспендированному в 200 мкл 50 мМ трис-НСI-буфера, рН 7,4, содержащего 5 мМ MnCl_2 и 0,02% BSA, добавляли либо немеченый CP-96.345 (до его конечной концентрации 10 мкМ), либо такой же объем воды. После 5-минутной инкубации добавляли [^3H]CP-96.435 и выдерживали 10 мин при 20° С. Промывку проводили на фильтрах GF/F, предварительно замоченных в 0,01% полиэтиленимине. Для получения кривой связывания [^3H]CP-96.345 брали в концентрации от 2 до 200 нМ.

Обсчет кривых связывания был проведен с использованием McPherson EBDA Program 1983 (V. 2.0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yokota Y., Sasai Y., Tanaka K., Fujiwara T., Tsuchida K., Shigemoto R., Kakizuka A., Ohkubo H., Nakanishi S.//J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 30. P. 17649—17652.
2. Takeda Y., Chou K. B., Takeda J., Sachais B. S., Krause J. E.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1991. V. 179. № 3. P. 1232—1240.
3. Liu Y. F., Quirion R.//J. Neurochem. 1991. V. 57. № 6. P. 1944—1950.
4. Nakata Y., Takamatsu H., Kuroyanagi N., Nishio H., Segawa T., Akizawa T., Hirai Y., Akiyama M.//Jap. J. Pharmacol. 1992. V. 59. P. 313—319.
5. Maggio J. E.//Ann. Rev. Neurosci. 1988. V. 11. P. 13—28.
6. McGillis J. P., Organist M. L., Payan D. G.//Fed. Proc. 1987. V. 46. P. 196—199.
7. Iversen L. L.//J. Psychopharmacol. 1989. V. 3. № 1. P. 1—6.
8. Guard S., Watson S. P.//Neurochem. Int. 1991. V. 18. № 2. P. 149—165.
9. Frossard N., Advenier Ch.//Life Sci. 1991. V. 49. № 26. P. 1941—1953.
10. Otsuka M., Yoshioka K.//Physiol. Rev. 1993. V. 73. № 2. P. 229—308.
11. Jukic D., Rouissi N., Laprise R., Boussougou M., Regoli D.//Life Sci. 1991. V. 49. № 20. P. 1463—1469.
12. Snider R. M., Constantine J. W., Lowe III J. A., Longo K. P., Lebel W. S., Woody H. A., Drozda S. E., Desai M. S., Vinick F. J., Spencer R. W., Hess H.-J.//Science. 1991. V. 251. P. 435—437.
13. Nagahisa A., Kanai Y., Suga O., Taniguchi K., Tsuchiya M., Lowe III J. A., Hess H.-J.//Eur. J. Pharmacol. 1992. V. 217. P. 191—195.
14. Lembeck F., Donnerer J., Tsuchiya M., Nagahisa A.//Brit. J. Pharmacol. 1992. V. 105. P. 527—530.
15. Constantine J. W., Lebel W. S., Woody H. A.//Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1991. V. 344. P. 471—477.
16. Gether U., Johansen T. E., Snider R. M., Lowe III J. A., Nakanishi S., Schwartz T. W.//Nature. 1993. V. 362. № 6418. P. 345—348.
17. Fong T. M., Cascieri M. A., Yu H., Bansal A., Swain C., Strader C. D.//Nature. 1993. V. 362. № 6418. P. 350—353.
18. Yokota Y., Akazawa C., Ohkubo H., Nakanishi S.//EMBO J. 1992. V. 11. № 10. P. 3585—3591.
19. Lowe III J. A., Drozda S. E., Snider R. M., Longo K. P., Bordner J.//Bioorgan. and Med. Chem. Lett. 1991. V. 1. № 2. P. 129—132.
20. Zolotarev Yu. A., Zaitsev D., Myasoedov N. F., Tatur V.//UK Patent 2 229 718 B.
21. Eller M., Zaitsev D., Fransson B., Jarv J., Myasoedov N., Ragnarsson U.//Bioorgan. Chem. 1992. V. 20. № 3. P. 245—250.
22. Gitter B. D., Waters D. C., Bruns R. F., Mason N. R., Nixon J. A., Howbert J. J.//Eur. J. Pharmacol. 1991. V. 197. P. 237—238.
23. McLean S., Ganong A. H., Seeger T. F., Bryce D. K., Pratt K. G., Reynolds L. S., Siok C. J., Lowe III J. A., Heym J.//Science. 1991. V. 251. P. 437—439.
24. Лазакович Е. М., Мутуле И. Э., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И.//Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 313—317.

Поступила в редакцию
23.XI.1993

После доработки
27.IV.1994

I. E. Kasheverov, D. A. Zaitsev, Yu. N. Utkin, V. I. Tsetlin*

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF THE TRITIATED
NK-1 RECEPTOR ANTAGONIST CP-96.345 OF A HIGH
SPECIFIC RADIOACTIVITY**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;
Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

Key words: nonpeptide antagonist of tachykinin receptors, tritiated CP-96.345.

[³H]CP-96.345 with the specific radioactivity of 84,2 Ci/mmol has been prepared from CP-96.345 by the high-temperature solid state isotopic exchange. The tritiated compound was equipotent with the parent antagonist in inhibiting the iodinated substance P binding to brain membranes from various species. Direct binding of [³H]CP-96.345 was detected by radioligand analysis using the striatum-enriched membranes from the guinea-pig brain.