



УДК 591.145.3

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
7,8-ДИГИДРОПРОИЗВОДНЫХ БАТРАХОТОКСИНИНА,  
ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С БЫСТРЫМИ НАТРИЕВЫМИ КАНАЛАМИ

*Елин Э. А., Гринин Е. В., Леонов В. Н.,  
Просолова Т. К., Солдатов Н. М., Торгов И. В.*

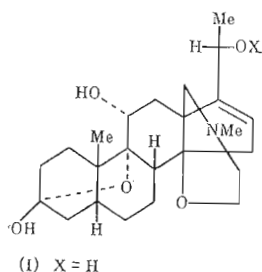
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

*Мясоедов Н. Ф., Шевченко В. П.*

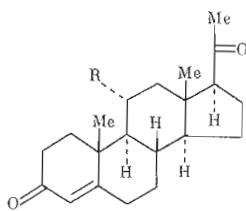
*Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва*

Среди природных нейротоксинов, взаимодействующих с быстрыми натриевыми каналами электровозбудимых мембран, большой интерес вызывают так называемые токсины-активаторы: батрахотоксин, аконитин, вератридин и т. д. [1]. Эти нейротоксины влияют практически на все параметры функционирования натриевых каналов, и, по-видимому, их рецепторы непосредственно входят в состав ионопроводящей части мембранной системы, осуществляющей потенциалзависимый транспорт ионов натрия [2]. Наибольшей активностью по отношению к большинству препаратов электровозбудимых мембран обладает батрахотоксин. Однако малая доступность и высокая лабильность этого соединения в значительной мере затрудняют прямое изучение его рецепторов методами радиолитического анализа. Недавно появились сообщения о получении [3] и исследовании биологической активности [4] радиоактивного аналога природного батрахотоксина. Настоящая работа посвящена синтезу и изучению свойств пяти производных батрахотоксинина А(I), не содержащих 7,8-двойной связи в кольце В.

Для синтеза 7,8-дигидробатрахотоксинина А(I) в качестве исходного соединения был выбран сравнительно доступный 11 $\alpha$ -оксипрогестерон (III), полученный микробиологическим гидроксированием прогестерона (II). Последовательное каталитическое гидрирование  $\Delta^4$ -связи и окисление 11 $\alpha$ -оксигруппы оксипрогестерона (III), избирательная защита 3- и 20-кетогрупп и стереонаправленное восстановление 11-кетогруппы боргидридом натрия привели к бисэтиленкеталю 5 $\beta$ -прегнан-11 $\beta$ -ол-3,20-диона (IV). При фотолизе его нитрита (V) в ксилале образовалась смесь продуктов, из которой с выходом 36% был выделен оксим (VI), превращенный далее действием нитрита натрия в уксусной кислоте в циклический полуацеталь (VII). Последний был окислен до дикетолактона (VIII), кетализация которого и последующее восстановление алюмогидридом лития в тетрагидрофуране привели к 11 $\beta$ ,18-диолу (IX). 18-Моносилильное производное этого продукта (X), приготовленное действием триметилсилилдиэтиламина в ацетоне (ср. [5]), после дегидратации, гидролиза триметилсилильной защитной группы гидроокисью калия, ацетилирования и снятия кетальных группировок образовало ацетоксидикетон (XI). Это соединение было превращено в 7,8-дигидробатрахотоксинин А(I) по схеме Верли [6–8]. Для синтеза 20-О-ацильных производных (Ia–d) мы использовали метод смешанных ангидридов [3, 9]. При этом необходимые для получения меченных тритием производных (Iв) и (Iд)  $^3\text{H}$ -замещенные кислоты были получены каталитическим тритированием по методу [3] *n*-бромбензойной и 5-иодантраниловой кислот с последующим превращением 5- $^3\text{H}$ антраниловой кислоты в соответствующий азид.

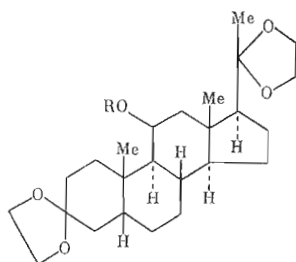


(I) X = H



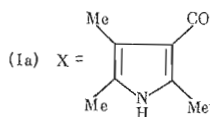
(II) R = H

(III) R = OH

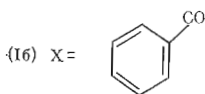


(IV) R = H

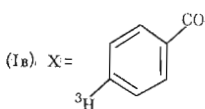
(V) R = NO



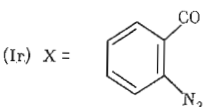
(Ia) X =



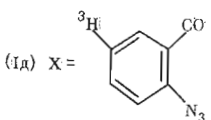
(Ib) X =



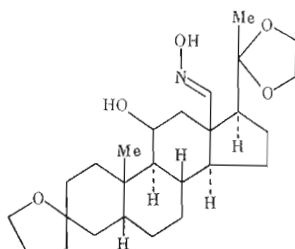
(Iв) X =



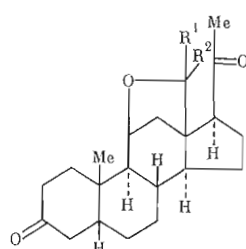
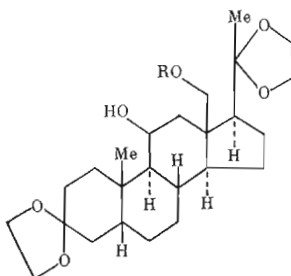
(Iг) X =



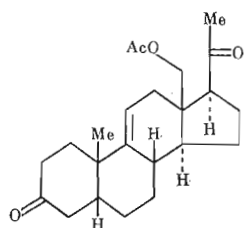
(Iд) X =



(VI)

(VII) R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = OH(VIII) R<sup>1</sup> + R<sup>2</sup> = O

(IX) R = H

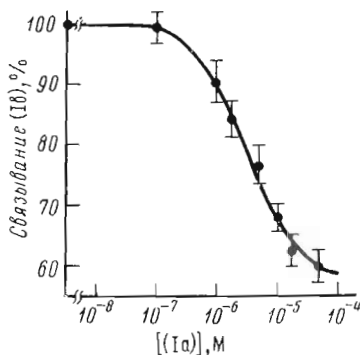
(X) R = Me<sub>3</sub>Si

(XI)

Очистку полученных соединений (Iб)–(Iд) проводили ВЭЖХ на колонке Zorbax С8 в условиях градиентного элюирования (вода → 50% метанол). Молярную радиоактивность меченых образцов определяли анализом соответствующих индивидуальных соединений на сцинтилляционном счетчике Beckman LS 9800 (США). Радиохимическая чистота меченых препаратов была не ниже 95–97%, а молярная радиоактивность производных (Iв) и (Iд) составляла соответственно 27 и 29 Ки/ммоль.

Биологическую активность синтезированных аналогов батрахотоксина исследовали на препаратах электровозбудимых мембран синапсом мозга крыс. Специфичное связывание соединения (Iв) ( $8 \cdot 10^{-8}$  М) с суспензией синапсом (1 мг белка/мл) при 18–20° С достигает равновесия за 30 мин и линейно возрастает с увеличением концентрации белка в пробе. При вытеснении этого радиоактивного аналога токсина производным (Iа) было найдено, что уровень специфичного связывания аналога (Iв) составляет около 40% от общего, а  $K_{0,5}$  для производного (Iа) равняется  $2,5 \cdot 10^{-6}$  М (рисунок). Функциональный аналог батрахотоксина, акошгитин, также конкурирует с аналогом (Iв) за связывание с рецептором ( $K_{0,5}$   $1,3 \cdot 10^{-4}$  М).

Недавно появилось сообщение о том, что полипептидные нейротоксины из яда скорпионов и анемон способны усиливать рецепцию батрахотоксина [4]. Действительно, увеличение концентрации токсина *Anemonia sulcata* до  $10^{-5}$  М вызывает повышение специфичного связывания производного (Iв) в 7,5 раза. При этом плотность рецепторов аналога батрахотоксина достигает 2,5 пмоль/мг белка и константа диссоциации токсин-рецепторного комплекса составляет  $7 \cdot 10^{-7}$  М.



Зависимость связывания производного батрахотоксина (Iв) с синаптосомами из мозга крысы от содержания в инкубационной среде соединения (Iа); количество связанного производного (Iв) определялось фильтрованием через стеклофильтры GF/F (Whatman)

Дополнительным критерием биологической активности синтезированных аналогов батрахотоксина может служить ингибирование их специфического связывания при действии местных анестетиков или антиаритмиков [10]. Согласно полученным результатам, бензокаин и тетракаин подавляют рецепцию производного (Iв) независимо от последовательности добавления к мембранным препаратам и от присутствия токсина *A. sulcata*. Константы ингибирования связывающа аналога (Iв) составляют для тетракаина и бензокаина соответственно  $5,7 \cdot 10^{-7}$  и  $3,1 \cdot 10^{-4}$  М.

Соединение (Iг) также эффективно подавляет рецепцию аналога (Iв), что свидетельствует о высокой биологической активности азидного производного 7,8-дигидробатрахотоксинина А. Число участков связывания для радиоактивного азидного аналога (Iд) ( $3 \cdot 10^{-7}$  М) в присутствии нейротоксина скорпиона *Os-4* из яда *Orthochirus scabriculosus* достигает, по видимому, максимального уровня (3 пмоль/мг белка синаптосом). Освещение мембранных препаратов светом с длиной волны больше 360 нм в течение 10 мин при комнатной температуре приводит к образованию ковалентного токсин-рецепторного комплекса. Для удаления несвязанного производного (Iд) модифицированные мембраны обрабатывали буферным раствором, содержащим  $5 \cdot 10^{-4}$  М тетракаин. При этом было найдено, что фотоактивация приводит к необратимой модификации около 35% натриевых каналов синаптосом мозга крыс.

В совокупности полученные данные позволяют сделать вывод о высокой биологической активности синтетических аналогов батрахотоксина. Отсутствие в молекуле токсина 7,8-двойной связи несущественно для проявления его биологического действия, и, следовательно, синтезированные производные батрахотоксина могут служить перспективными молекулярными инструментами исследования быстрых натриевых каналов электровозбудимых мембран.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Narahashi T.* *Physiol. Revs*, 1974, v. 54, № 4, p. 813–889.
2. *Khodorov B. I.* *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1981, v. 37, № 2, p. 49–89.
3. *Brown G. B., Tieszen S. C., Daly J. W., Warnick J. E., Albuquerque E. X.* *Cell. Mol. Neurobiol.*, 1981, v. 1, № 1, p. 19–40.
4. *Catterall W. A., Morrow C. S., Daly J. W., Brown G. B.* *J. Biol. Chem.*, 1981, v. 256, № 17, p. 8922–8927.
5. *Weisz J., Felföld K., Kovacs K.* *Acta chim. Acad. sci. hung.*, 1968, v. 58, № 2, p. 189–194.
6. *Graf W., Berner H., Berner-Fenz L., Gössinger E., Imhof R., Wehrli H.* *Helv. chim. acta*, 1970, v. 53, № 8, p. 2267–2275.
7. *Gössinger E., Graf W., Imhof R., Wehrli H.* *Helv. chim. acta*, 1971, v. 54, № 8, p. 2785–2788.
8. *Graf W., Gössinger E., Imhof R., Wehrli H.* *Helv. chim. acta*, 1972, v. 55, № 5, p. 1545–1560.
9. *Tokuyama T., Daly J. W., Witkop B. J.* *Amer. Chem. Soc.*, 1969, v. 91, № 14, p. 3931–3938.
10. *Willow M., Catterall W. A.* *Mol. Pharmacol.*, 1982, v. 22, № 4, p. 627–635.

Поступило в редакцию  
25.11.1983

# SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF 7,8-DIHYDROBATRACHOTOXININ DERIVATIVES INTERACTING WITH FAST SODIUM CHANNELS

YELIN E. A., GRISHIN E. V., LEONOV V. N., PROSOLOVA T. K.,  
SOLDATOV N. M., TORGOV I. V., MYASOYEDOV N. F., SHEVCHENKO V. P.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry and Institute  
of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

7,8-Dihydrobatrachotoxinin (A) (I) was synthesized from 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (III) by a 37-stage procedure. Trimehtylpyrrolcarboxylate, benzoate as well as 2-azido-benzoate derivatives of (I) were obtained by mixed anhydride technique, the latter two derivatives being prepared also with tritium atoms in aromatic rings (sp. radioactivity about 28 Ci/mmol). Upon interaction with rat brain synaptosomes the apparent  $K_d$  of 7,8-dihydrobatrachotoxinin A 20 $\alpha$ -[4- $^3$ H]benzoate (Ib) was about  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M. The (Ib) specific binding was inhibited by aconitine with  $K_{0,5} = 1,3 \cdot 10^{-4}$  M. *Anemonia sulcata* toxin II (ATX II) enhanced (Ib) affinity for the receptor up to  $7 \cdot 10^{-7}$  M, the maximum binding capacity being 2,5 pmol/mg of protein. Benzocaine and tetracaine competitively displaced specifically bound toxin with  $K_{0,5} = 3,4 \cdot 10^{-4}$  M and  $5,7 \cdot 10^{-7}$  M, respectively, in the presence of  $10^{-5}$  M ATX II. 2-Azido[5- $^3$ H]benzoate derivative (Ic) was shown to be an effective probe for covalent labeling of the alkaloid toxin receptor of the sodium channel.

Технический редактор Кузьмишкина Е. С.

Сдано в набор 20.04.83      Подписано к печати 09.06.83      Т-07679      Формат бумаги 70×108 $\frac{1}{16}$   
Высокая печать      Усл. печ. л. 12,6,      Усл. кр.-отт. 11,3 тыс.      Уч.-изд. л. 13,7      Бум. л. 4,5  
Тираж 877 экз.      Зак. 2718

Издательство «Наука», 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21  
2-я типография издательства «Наука». 121099, Москва, Шубинский пер., 10