

P-8502 —— 一种新的 μ 亚型选择性阿片受体配体

葛邦伦、张鸿萍、徐永平、郑维君 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 用小鼠热板法及大鼠甩尾法测定 P-8502 镇痛 ED₅₀ 值分别为 55 及 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 但持续时间较短, P-8511 的 ED₅₀ 值分别为 200 及 95 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 而持续时间长达 4 h 以上。受体结合试验结果表明: P-8502 和 P-8511 具有相似的 δ 及 κ 亚型的亲和力, 但 P-8502 对 μ 亚型具有更强的亲和力。可以认为: P-8502 为一种新的 μ 亚型阿片受体的选择性配体。

关键词 P-8502 {3-(β -对氨基苯乙基)-9 β -甲氧基-9 α -(间-甲氧基)-3-氮杂二环[3,3,1]壬烷}; 内啡肽受体; 配位体; 止痛

Ohki⁽¹⁾报道了一类氮杂二环强效镇痛剂, 其代表化合物 P-7521 的化学名为 3-(β -苯乙基)-9 β -甲氧基-9 α -(间-羟苯基)-3-氮杂二环[3,3,1]壬烷。它的镇痛强度为吗啡的 1600 倍。周德和等⁽²⁾对此类化合物又进行了较系统的研究, 发现 P-7521 的丙酸酯 P-7548 较之 P-7521 的镇痛强度更高。徐珩等⁽³⁾对该类化合物中的 P-7548 等研究后, 发现它们对 μ , δ 和 κ 等几种亚型阿片受体均有极高的亲和力, 引起了我们的重视。非可逆标记受体是研究受体的一种手段, 化合物 P-8511 是一个作为阿片受体亲和标记配体设计并合成的(合成工作

另行发表), 本文报道 P-8511 和其前体化合物 P-8502 的某些药理结果及它们与阿片受体结合的特性。

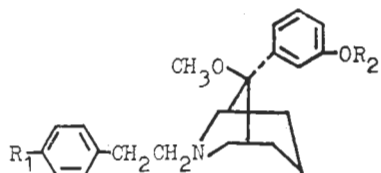
Materials and methods

P-8502 的化学名是 3-[β -(对-氨基)苯乙基]-9 β -甲氧基-9 α -(间-甲氧苯基)-3-氮杂二环[3,3,1]壬烷 (3-[β -(*p*-amino)-phenethyl]-9 β -methoxy-9 α -(*m*-methoxyphenyl)-3-azabicyclo[3,3,1]nonane), P-8502 分子式 C₂₄H₃₂N₂O₂·2(COOH)₂, 微黄色结晶, 分子量 560。P-8511 的化学名为 3-[β -对-(反-丁烯二酸单甲酯酰胺基)-苯乙基]-9 β -甲氧基-9 α -(间-甲氧苯基)-3-氮杂二环[3,3,1]壬烷, 分子式 C₂₉H₃₈N₂O₅·HCl, 微黄色结晶, 分子量 529, 均由本所合成; DTLET(D-thr², leu⁵-enkephalyl threonine) 由法国 BP Roques 教授惠赠; 吗啡硫酸盐为青海制药厂出品; ohmefentanyl, etorphine 均为本室合成; DADLE(D-ala², D-leu⁵ enkephalin) 为张肇康教授赠送; [³H]ohmefentanyl (1.48 TBq/mmol) 由上海原子核研究所标记; [³H]DPDPE(D-pen², D-pen⁵ enkephalin, 2.22 TBq/mmol), [³H]DAGO(D-ala², N-Me-phe⁴, gly⁵-ol enkephalin, 2.22 TBq/mmol) 以及 [³H]DADLE(1.92 TBq/mmol) Amersham 公司产品; [³H]etorphine(1.48 TBq/mmol) 上海医科大学产品。

镇痛强度和作用时间的测定⁽⁴⁾

1 小鼠热板法 ♀小鼠, 体重 19.7 \pm SD 1.2 g, 热板测定其痛觉反应时间, 每组 10 只, ip 后 60 min 内测定其痛阈, 延长痛反应出现时间在 100% 以上者为阳性, 求出镇痛作用 ED₆₀ 值, 测定小鼠热板法持续时间时选用 ED₉₀ 剂量。

2 大鼠甩尾法 ♂大鼠, 体重 230 \pm 18 g,



	R ₁	R ₂
P-7521	H	H
P-7548	H	-C(=O)-CH ₂ CH ₃
P-8502	NH ₂	CH ₃
P-8511	CH ₃ OOC-C-H	CH ₃
	$\text{H}-\text{C}-\text{CONH}-$	

每组 8 只, 测定 sc 后 45 min 内的镇痛 ED_{50} 值, 测定甩尾法的持续时间, 以镇痛 ED_{90} 剂量给药, 给药后 30 及 60 min, 以后每小时测定一次甩尾反应时间。

受体结合试验 大鼠脑膜 P_2 按常规方法制备⁽⁵⁾, 蛋白测定用双缩脲比色法⁽⁶⁾, 以牛血清白蛋白为标准。结合试验及药物稀释均用 Tris 缓冲液 (pH 7.4) 50 mmol/L, 总容量为 1 ml, 受体蛋白每管为 2 mg, 非特异结合通过加入 1 μ mol/L 相应药物 etorphine 或 ohmefentanyl 测得, 30°C 孵育 30 min, 冰浴中冷却 15 min, 用 Millipore 1225 型过滤器经 GF/C 滤纸快速过滤, 用冰冷却的 Tris 缓冲液洗 3 次, 每次 5 ml, 滤纸干燥后, 加闪烁液计数 (效率约 62%)。药物的 IC_{50} 从浓度对数-概率单位作图的线性回归测得, 文中所用数据均为三复管的平均值, 误差小于 10%, 每次实验重复 3 次或 3 次以上, 各个核素配体浓度列于 Tab 2 中。

Results

镇痛强度和镇痛作用持续时间 如 Tab 1 所示, 两种模型均以 P-8502 较 P-8511 为强。小鼠热板法 P-8502 和 P-8511 的 ED_{50} 分别为 55 及 200 μ g/kg, 相当于吗啡的 217 和 60 倍; 而在大鼠甩尾法的 ED_{50} 值分别为 30 和 95 μ g/kg, 其强度分别为吗啡的 222 和 69 倍。但 P-8511 大鼠甩尾法的镇痛作用持续时间

Tab 1. Analgesic activities of P-8502 and P-8511 to mice (ip) and rats (sc).

	Analgesic ED_{50} (μ g/kg) (95% confidence limits)		Analgesic time (min) $\bar{x} \pm SD$	
	Hot plate (mice)	Tail-flick (rats)	Tail-flick (rats)	Latent Duration period
P-8502	55 (32-95)	30 (15-57)	27 \pm 5	84 \pm 42
P-8511	200 (134-299)	95 (60-150)	22 \pm 10	202 \pm 125
Morph- ine ⁽⁵⁾	11.9 (11.5-12.3)	6.6 (6.3-6.8)	8	112

可达 203 \pm 125 min, 较之 P-8502 的 84 \pm 42 min 的持续时间长得多。P-8511 的小鼠热板法持续时间更长, 达 414 \pm 284 min, 而两个化合物给药后的潜伏期几乎相同, 要在给药后约 20 min 才呈现镇痛作用。以上结果可以看出 P-8511 的作用时间确实较长, 比吗啡作用时间约长一倍。

抑制 [3H]标记配体与大鼠脑膜 P_2 阿片受体特异结合试验 分别测定了 P-8502 和 P-8511 抑制 [3H]etorphine (表示为对总的阿片受体亲和力)、[3H]DADLE (存在有吗啡 30 nmol/L 以封闭 μ 亚型, 代表 δ 亚型)、 δ 专一性配体 [3H]DPDPE 以及 [3H]etorphine (存在有吗啡 30 nmol/L 及 DADLE 100 nmol/L 以封闭 μ 及 δ 亚型, 以代表 κ 亚型) 对大鼠脑 P_2 膜特异结合的 IC_{50} 值。结果表明两个化合物对总的阿片受体, δ 及 κ 亚型阿片受体的亲和力具有相似的水平, 但 P-8502 稍强些。抑制 μ 亚型专一性配体 [3H]DAGO 的 IC_{50} 分别为 2.1 \pm 0.4 nmol/L 和 0.07 \pm 0.04 μ mol/L, 有较大的差别。这也可以从抑制另一个 μ 亚型选择性配体 [3H]ohmefentanyl 与大鼠脑 P_2 膜特异结合的 IC_{50} 得到佐证, P-8502 和 P-8511 的 IC_{50} 分别为 6.9 \pm 2.0 nmol/L 和 0.7 \pm 0.4 μ mol/L。

以上结果证实了 P-8502 如以 [3H]DAGO 为 μ 配体, 则 IC_{50} (DADLE)/ IC_{50} (DAGO) 值和 IC_{50} (DPDPE)/ IC_{50} (DAGO) 可达 1498 及 399; 即使以 [3H]ohmefentanyl 作为 μ 亚型选择性配体, P-8502 的 IC_{50} (DPDPE)/ IC_{50} (Ohme) 比值也可达百倍以上, 均达到了选择性配体所要求的百倍以上要求。而 κ 与 μ 的 IC_{50} 值之比, 对 [3H]DAGO 而言可达 159 倍, 而如以 [3H]ohmefentanyl 而言, 则为 50 倍, 较之百倍以上要求稍差。由此可看出 P-8502 为一个较好的 μ 选择性配体, 而 P-8511 则不具这种选择性。

Discussion

在合成的 P-8502 中引入了一个非可逆配

Tab 2. Inhibition effects of [³H]opioid ligand binding by P-8502 and P-8511 in rat brain membrane preparations.

[³ H]ligand	(nmol/L)	IC ₅₀ (μmol/L)	
		P-8502	P-8511
DAGO	0.60-0.65	(2.1±0.4) × 10 ⁻³	(7.1±4.0) × 10 ⁻²
Ohmefentanyl	0.45-0.50	(6.9±2.0) × 10 ⁻³	(6.7±3.8) × 10 ⁻¹
DADLE*	1.20-1.40	(3.2±0.8)	(7.0±0.6)
DPDPE	2.20-2.40	(8.4±0.5) × 10 ⁻¹	(1.1±0.3)
Etorphine†	0.80-0.85	(3.4±0.6) × 10 ⁻¹	(6.4±2.7) × 10 ⁻¹
Etorphine	0.80-0.85	(1.5±0.5) × 10 ⁻¹	(5.9±1.8) × 10 ⁻¹

DAGO = [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]enkephalin, DADLE = [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin, DPDPE = [D-Pen², D-Pen⁵]enkephalin. *In the presence of morphine 30 nmol/L.

† In the presence of morphine 30 nmol/L and DADLE 100 nmol/L.

Values for IC₅₀ were determined by analysis based upon 3 or 4 independent experiments carried out in triplicate.

Tab 3. Ratio of IC₅₀ values of P-8502 and P-8511

	P-8502	P-8511
IC ₅₀ (DADLE) IC ₅₀ (DAGO)	1498	98
IC ₅₀ (DPDPE) IC ₅₀ (DAGO)	399	15
IC ₅₀ (DADLE) IC ₅₀ (Ohme)	473	11
IC ₅₀ (DPDPE) IC ₅₀ (Ohme)	126	1.6
IC ₅₀ (k) IC ₅₀ (DAGO)	159	8.9
IC ₅₀ (k) IC ₅₀ (Ohme)	50	1

Ohme = ohmefentanyl; k = [³H]etorphine + morphine 30 nmol/L + DADLE 100 nmol/L

体β-FNA(β-funaltrexamine)中相似的反-丁烯二酸酯基团而得到的P-8511经镇痛作用的持续时间测定表明它确具有较长的镇痛作用持续时间,而P-8502的作用时间相对较短。但P-8511是否是一个非可逆结合化合物有待于进一步深入的工作。

鉴于ohmefentanyl对大鼠脑膜阿片受体结合的K_d值较之DAGO为小,而我们所用的[³H]DAGO浓度0.60 nmol/L基本上与[³H]ohmefentanyl的浓度0.45 nmol/L大致相当,根据K_i = IC₅₀/[1 + (L)/K_d]公式,如果K_d值

小而所用核素浓度又基本一致,则取代具有较小K_d值配体的IC₅₀值必然比具有较大K_d值配体的IC₅₀值为大,P-8502和P-8511抑制[³H]ohmefentanyl的IC₅₀值较之取代相应的[³H]DAGO的IC₅₀值大了3倍,这似可作为一种解释。

应该指出,一般μ选择性配体对三种亚型的次序为μ>δ>κ,而P-8502和P-8511对κ亚型具有稍强于δ亚型的亲和力。

P-8502和P-8511两个化合物对δ和κ亚型的亲和力虽有差异,但相差无几;但两者的μ亚型的亲和力差别较大,而镇痛强度P-8502较之P-8511约强4倍,再一次说明在不考虑其它因素的前提下,μ亚型较之其它两种亚型与镇痛强度有更大的相关性。

以上结果表明:P-8502作为一个选择性较好的μ亚型阿片受体配体,而P-8511具有镇痛作用持续时间较长的特点,均值得作进一步研究。

References

- Ohki E, Oida Y, Ohashi Y, Yoshida A, Kamoshita K, Tagaki H. 3,5-Propanopiperidine derivatives as potential analgesics. *Chem Pharm Bull* 1974; 22: 1014
- 周德和、方苏南、葛邦轮,等. 氮杂二环类衍生物的合成及其镇痛活性. *药学报* 1982; 17: 503

- 3 Xu H, Chen J, Chi ZQ. Binding of 3-(β -phenylethyl)-9 β -methoxy-9 α -(*m*-propionoxyphenyl)-3-azabicyclo[3,3,1] nonane (7548) to different types of opiate receptors. *Chin J Physiol Sci* 1986; 2 : 55
- 4 Huang ZM, Zhou J, Chen XJ, Zheng WJ, Zhang HP, Chi ZQ. Analgesic activity and toxicity of potent analgesics ohmefentanyl and mefentanyl. *Acta Pharmacol Sin* 1984; 5 : 153
- 5 Wang DY, Chi ZQ. Relationship between analgesic activity and opiate receptor binding affinity for 5 derivatives of 3-azabicyclo [3, 3, 1] nonanes. *Ibid* 1984; 5 : 158
- 6 Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177 : 751

Acta Pharmacologica Sinica 1989 Jan, 10 (1) : 13-16

P-8502 — a new μ selective opioid receptor ligand

GE Bang-Lun, ZHANG Hong-Ping, XU Yong-Ping, ZHENG Wei-Jun

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT The analgesic potencies of 3-[β -(*p*-amino)-phenethyl]-9 β -methoxy-9 α -(*m*-methoxyphenyl) -3-azabicyclo [3,3,1] nonane (P-8502) and 3-[β -(*p*-monoester fumarylamido)-phenethyl]-9 β -methoxy-9 α -(*m*-methoxyphenyl) -3-azabicyclo [3,3,1] nonane (P-8511) were examined. The analgesic ED₅₀ of P-8502 and P-8511 were 55 and 200 μ g/kg (mice, ip, hot plate), and 30 and 95 μ g/kg (rat, sc, tail flick), respectively. The duration of the analgesic action of P-8511 (about 4 h) was longer than that of P-8502 (about 1.5 h, rat, sc,

tail flick). Binding assay showed that P-8502 had a high ratio of δ/μ , κ/μ : IC₅₀ (DPDPE)/IC₅₀ (DAGO) = 399; IC₅₀ (DADLE)/IC₅₀ (DAGO) = 1498; IC₅₀ (κ)/IC₅₀ (DAGO) = 159.

In conclusion, P-8502 appears to be a new μ selective opioid receptor ligand, whereas P-8511 has no such selectivity.

KEY WORDS P-8502; 3-(β -*p*-amino-phenethyl)-9 β -methoxy-9 α -(*m*-methoxyphenyl) -3-azabicyclo[3, 3, 1] nonane; endorphine receptors; ligands; analgesia