

·成果简介·

羟甲芬太尼——一种新的高选择性 性 μ 阿片受体激动剂

池志强 朱友成 金文桥 徐珩 周德和 叶淑珍

(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

[关键词] 羟甲芬太尼, μ 阿片受体, 镇痛, 受体结合实验, 选择性, 亲和力

阿片肽与阿片受体研究是神经生物学的一个热点课题, 这一研究推动了整个神经肽领域的研究和发展。自从内阿片肽受体亚型发现以来, 国际上十分重视阿片受体亚型功能结构的研究。因为高选择性配体是研究受体亚型功能结构的必要工具, 因此在对阿片受体亚型 (μ , δ , κ) 结构功能的研究中, 高选择性和高亲和力阿片受体亚型配体研究是一个十分重要的课题。虽然国际上已在该领域取得不少成就, 但已获得的配体尚存在不少缺点。如, μ 受体的激动剂 DAGO 亲和力仍欠强, 不易透过血脑屏障, 且价格较高等, 因此尚待发现新的更好的高选择性配体。我们在长期对强效镇痛剂研究的基础上, 从自行设计合成的新的有效化合物中找到一个镇痛强度比吗啡高 6 000 至 10 000 倍的强效镇痛剂——羟甲芬太尼 (Ohmefentanyl, OMF)。经过系统研究其作用机理, 从受体水平分析它与阿片受体的相互作用特性, 证明羟甲芬太尼是一个高选择性, 强亲和力的 μ 阿片受体激动剂。

1 OMF 的合成^[1]

根据我们曾在哌啶环三位引入甲基可以提高芬太尼镇痛强度的工作结果, 合成了大量甲基芬太尼衍生物, 从中找到 OMF, 其化学名为 *cis-N*-[1-(2-hydroxy-phenyl-ethyl)-3-methyl-4-piperidyl]-N-phenyl propionamide (图 1)。该化合物具有三个手性中心, 因而有 4 对非对映异构体, 通过分步结晶得四对异构体, 证明其中 *cis-A*-OMF 镇痛作用最强, 与受体结合亲和力最高, 因而便对 *cis-A*-OMF 进行了深入研究。此外, 还合成了受体配体结合所必须的标记配体 [³H]OMF, 其放射比活性较高, 化学稳定, 与受体结合的特异性结合与非特异性结合之比大, 为进一步深入研究提供了条件。

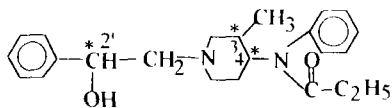


图 1 羟甲芬太尼 (Ohmefentanyl, OMF)

本文于 1996 年 10 月 21 日收到。

2 OMF 的镇痛作用^[5]

采用4种动物模型测定OMF的镇痛强度(ED_{50}):小鼠热板法 ED_{50} 为 $1.15 \mu\text{g}/\text{kg}$,小鼠扭体法 ED_{50} 为 $0.25 \mu\text{g}/\text{kg}$,大鼠甩尾法 ED_{50} 为 $0.85 \mu\text{g}/\text{kg}$,家兔钾离子渗透法为 $0.12 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。以上表明,其强度为吗啡作用的0.6万—1万倍。镇痛作用时间,小鼠为 (73 ± 38) min,大鼠为 (123 ± 38) min。其镇痛作用可被纳洛酮拮抗。

3 OMF 与阿片受体的结合特征^[2,8]

采用 $[^3\text{H}]$ OMF研究了OMF与受体结合的亲和力与不同亚型的选择性,结果证明:OMF与受体结合呈饱和性、可逆性及特异性,其结合 K_d 值为 $0.32 \text{ nmol}/\text{L}$, B_{max} 为 $19.93 \text{ pmol}/\text{g}$ 蛋白;与受体结合快,5分钟可达峰值,解离也快, $t_{1/2}$ 为15分钟。 $[^3\text{H}]$ OMF结合只能被阿片配体竞争抑制,非阿片类配体无竞争抑制作用,说明OMF与受体结合作用的特异性。与三种阿片受体亚型的结合选择性研究表明:OMF抑制 $[^3\text{H}]$ -DAGO(μ)及 $[^3\text{H}]$ -DPDPE(δ)的 IC_{50} 之比在小鼠为363,大鼠为481,这说明OMF对 μ 阿片受体有高选择性;钠离子反应比为23.3,GTP反应比为16.3,证明OMF为一激动剂。以上工作证明OMF为一阿片受体 μ 亚型的高选择性激动剂。

4 OMF 的离体器官生物检定研究^[3]

采用四种不同离体器官标本研究的结果,在豚鼠回肠标本中,OMF抑制电场刺激触发的收缩的 IC_{50} 值为 $0.15 \text{ nmol}/\text{L}$,为吗啡的 $1/2000$,为DAGO的 $1/80$,纳洛酮拮抗的 K_e 值为 $1.9 \text{ nmol}/\text{L}$,证明为 μ 阿片受体的激动剂。另,在只具 κ 受体的兔输精管标本中,证明与 κ 受体作用极弱。在与 δ 阿片受体为主的小鼠输精管标本中证明,主要作用仍在 μ 受体上,该部分工作确证了在受体结合实验的结论——OMF为一 μ 阿片受体的选择性激动剂。

5 OMF 受体结合位点在脑内的分布特征^[4]

采用Yaung及Kuhar首先应用的体外受体结合放射自显影技术,研究了大鼠脑阿片受体结合位点分布特征。结果证明,结合位点的分布特征与 $[^3\text{H}]$ DHM, $[^3\text{H}]$ DAGO等 μ 选择性配体结合的特征一致,也证明OMF为 μ 受体选择性配体的结论。

根据以上对OMF的受体结合试验,离体标本生物检定及脑内受体结合位点分布特征等研究的结果,证明OMF是一个高选择性、高亲和力的阿片受体激动剂。

美国科学院院士、斯坦福大学教授A. Goldstein,在实验室采用BSS(Binding Site Signature)及LSP(Ligand Selective Profile)比较了47种阿片受体三种亚型配体的亲和力和选择性,发现,OMF的亲和力在所试化合物中最强,其 $\log K_i$ 为11.1,而DAGO只有9.6;而对 μ 阿片受体选择性与DAGO相当,比Sufentanyl高。他认为OMF作为 μ 阿片受体的高选择性配体比DAGO更好。法国INSERM的B. Roque教授在实验室也复证了这一结论。

以上工作成果,获1991年度国家自然科学奖二等奖。

6 以OMF为工具对 μ 阿片受体亚型特性及功能的研究

确认OMF为一个新的选择性 μ 阿片受体激动剂后,我们以OMF为工具开展了以下

工作。采用 $[^3\text{H}]$ OMF作为 μ 阿片受体配体,对三种动物(大鼠、豚鼠和家兔)中枢神经系统阿片受体个体发育的放射自显影研究^[7],发现 μ 阿片受体出现早于 δ 及 κ 阿片受体;纹状体及脊髓中 μ 阿片受体出现早于海马及皮层;小脑中只有家兔存在 μ 阿片受体,胚胎后期已出现。本工作在神经发育生物学研究中有意义,论文发表时,尚未见有类似工作报告。

我们还以OMF为 μ 阿片受体配体的代表,研究了阿片类产生木僵的机理^[6]。研究证明,OMF产生木僵可为纳洛酮对抗,也可为L-Dopa及apomorphine对抗。机理分析证明,OMF产生木僵主要是在其作用于阿片受体后,通过对多巴胺系统的抑制而产生,并非直接作用于多巴胺受体,而其木僵作用与 μ 阿片受体有关,与 δ 受体无关。实验证明,OMF对大鼠纹状体多巴胺受体可能有抑制性调节作用。以6-OHDA损毁神经元末梢,可使 $[^3\text{H}]$ OMF结合损失26%;以海人藻酸损毁神经元胞体,可使其损失63%。 μ 阿片受体存在于多巴胺神经元胞体的意义有待进一步研究。

7 OMF八个立体异构体的定向合成及对阿片受体结合选择性的比较^[9,10]

由于OMF具有三个手性中心,共有8个立体异构体,比较研究这些异构体对 μ 阿片受体的选择性,对研究受体的结合功能很有价值。我们实验室定向合成了8个OMF的立体异构体,并比较了它们对 μ 阿片受体的选择性。结果证明,其中(-)-*cis*-(3R,4S,2'R)-OMF和(+)-*cis*-(3R,4S,2'S)-OMF是两个目前国际上已有的配体中选择性最高的 μ 阿片受体激动剂。它们的 $K_{i\text{DPDPE}(\delta)}/K_{i\text{DAGO}(\mu)}$ 的比值分别为22 800及22 500。两化合物的镇痛作用也是八个异构体中最强的,小鼠热板法 ED_{50} 分别为0.0011mg/kg及0.0047 mg/kg。本工作在海外已引起重视,美国NIDA的Rothman实验室也进行了研究,结果基本一致。这一研究对进一步研究 μ 阿片受体与激动剂间相互作用的分子机理有重要意义。本工作已在国际会议上交流并在国内外学术刊物上发表。

8 阿片受体的三维结构计算机模拟及与OMF结合位点的探索

受体与配体相互作用的机理研究,只有在对受体的三维结构了解的基础上,才能根本解决。纵然 μ 阿片受体的一级结构通过受体克隆已得到阐明,但由于膜受体蛋白的三维结构阐明困难很大,无法取得足够的蛋白并得到结晶,以开展X射线衍射来显示三维结构。目前,国际上采用计算机模拟受体的三维结构研究受体与配体结合的位点,有很多工作报告,虽然还存在不少缺点,但仍不失为一条值得探讨的途径。我们已应用计算机模拟技术,根据 μ 阿片受体一级结构、OMF8个立体异构体的合成及与 μ 阿片受体结合高亲和力的特征,以及有关阿片受体与配体结合位点的分子生物学研究的结果,以Rhodopsin三维结构为模板,开展了 μ 阿片受体的计算机模拟及与OMF的结合特性的研究,取得了有意义的探索成果。认为:可能结合点为Asp 147, Tyr 318及His 319,其中以Asp 147及His319作用较重要,已在杂志发表。目前该工作尚在继续研究中。

参 考 文 献

- [1] 朱友成,方苏南,葛邦伦等. 强效镇痛药研究II: 3-甲基芬太尼衍生物的合成及镇痛活性. 药化学报, 1981, 16:

- 97—104.
- [2] Xu H, Chen J, Chi ZQ. Ohmefentanyl—a new agonist for mu opioid receptor. *Scientia Sinica (series B)*, 1984, **8**: 733—739.
- [3] Jin WQ, Chen XJ, Chi ZQ. The choice of opioid receptor subtype in isolated preparations by ohmefentanyl. *Scientia Sinica (series B)*, 1987, **30**: 176—181.
- [4] 叶淑珍, 李桂芬, 池志强. [^3H] 羟甲芬太尼在大鼠脑与阿片受体结合的自体放射造影. *中国药理学报*, 1986, **7**: 193—198.
- [5] 黄忠明, 周杰, 陈新建等. 强效镇痛剂羟甲芬太尼和甲基芬太尼的镇痛作用与毒性. *中国药理学报*, 1984, **5**: 153—158.
- [6] Yao Y H, Xu H, Chi Z. Cataleptic effect of ohmefentanyl in the rat. *Chin. J. Physiol. Sci.*, 1985, **1**: 151—158.
- [7] 王虹, 叶淑贞, 李桂芬, 池志强. 大鼠、豚鼠和兔中枢神经系统阿片受体个体发育的放射自显影. *中国药理学报*, 1988, **9**: 205—212.
- [8] Xu H, Yao Y H, Zhu Y C, et al. Potent 3-methylfentanyl analogs morphine-like catalepsy and receptor binding characteristics. *Acta Pharmacol. Sinica*, 1987, **8**: 289—292.
- [9] Wang ZX, Zhu YC, Chi ZQ, et al. Stereoisomers of N- [1- (2-hydroxy-phenyl-ethyl) -3-methyl-4-piperidyl] -N-phenyl propionamide: Synthesis stereochemistry, analgesic activity and opioid receptor binding characteristic. *J. Med. Chem*, 1995, **38**: 3652—3659.
- [10] Jin WQ, Wang ZX, Chen J, et al. Analgesic activity and selectivity for opioid receptors of enantiomers of ohmefentanyl. *Acta Pharmacol. Sinica*, 1996, **17**: 921—942.

OHMEFENTANYL——A NEW HIGH SELECTIVE AGONIST FOR μ -OPIOID RECEPTOR

Chi Zhiqiang Zhu Youcheng Jin Wenqiao
Xu Heng Zhou Dehe Ye Shuzhen

(*Shanghai Institute of Materia Medica, CAS, Shanghai 200031*)

Key words ohmefentanyl, μ -opioid receptor, analgesia, receptor binding assay, selectivity, affinity