

Bindungsassays mit nativen Markern**Kompetitive Bindungsstudien leicht gemacht – mit nativem Marker und massenspektrometrischer Quantifizierung****

Georg Höfner und Klaus Theodor Wanner*

Professor Heinrich Nöth zum 75. Geburtstag gewidmet

Kompetitive Bindungsexperimente sind unverzichtbar in der Pharmaforschung und in vielen anderen Bereichen der Biowissenschaften.^[1] Sie dienen der Charakterisierung der Affinität von Liganden zu einem bestimmten Target, das z.B. ein Rezeptor für einen Wirkstoff sein kann. Ihr Prinzip ist einfach: Man benötigt einen Marker, d.h. einen Liganden, der die gewünschte Bindungsstelle – das „Target“ – mit möglichst hoher Affinität und Selektivität anspricht. Auf die Affinität der zu untersuchenden Verbindungen kann dann aus der kompetitiven Verdrängung des Markers vom Target durch die Testsubstanz geschlossen werden. Wegen der extrem hohen Empfindlichkeit, die zur Quantifizierung des Markers erforderlich ist, beschränkt sich der Anwendungsbereich dieses Prinzips weitgehend auf Bindungsstudien mit fluoreszierenden und radioaktiven Liganden („Radioliganden“). Dazu muss der Marker mit einem geeigneten Radioisotop (z.B. ³H, ³⁵S oder ¹²⁵I)^[2] oder einer passenden fluorophoren Gruppe versehen sein.^[3] Zum zusätzlichen Syntheseaufwand bringt dies weitere Einschränkungen mit sich, wie besondere Sicherheitsvorkehrungen und eine aufwändige Entsorgung beim Umgang mit Radioliganden. Das Einbringen eines Fluoreszenzlabels erfordert zumeist eine Neuoptimierung der Struktur des Markers. Zudem kann Hintergrundfluoreszenz im Bindungsexperiment die Messung stören.^[4]

Die moderne Massenspektrometrie (MS) ist inzwischen bei der Quantifizierung von Analyten in einen Bereich vorgedrungen, der ihre Anwendung als analytische Methode bei Bindungsexperimenten zulässt.^[5] Erste, z.T. sehr ausgeklügelte Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion, die dem Prinzip der Affinitätsselektion folgen, wurden unlängst beschrieben. Allerdings erfordert dieses Prinzip einen hohen analytischen Aufwand, weil alle affinen Testsubstanzen dabei erfasst werden müssen.^[6]

Wir haben nun versucht, kompetitive Bindungsexperimente zu realisieren, die ähnlich wie Radioligandbindungsstudien ablaufen und bei denen naturgemäß nur der Marker

massenspektrometrisch detektiert und quantifiziert werden muss. Bei diesem Typ von Bindungsexperimenten – die wir als kompetitive MS-Bindungsstudien bezeichnen – tritt an die Stelle des Radioliganden ein nativer Marker. Bei dessen Auswahl aus dem Pool der für das zu untersuchende Target bekannten Liganden ist lediglich auf eine hinreichende Affinität und Selektivität zur Zielstruktur zu achten sowie sinnvollerweise auf eine möglichst hohe Nachweisempfindlichkeit bei der massenspektrometrischen Detektion.

In Radioligandbindungsstudien wird gewöhnlich der Anteil an gebundenem Radioliganden bestimmt. Bei MS-Bindungsexperimenten bietet es sich hingegen an, den Anteil an ungebundenem Marker zu quantifizieren, um die Freisetzung des Markers aus dem Marker-Rezeptor-Komplex als zusätzlichen Schritt zu vermeiden. Von der analytischen Seite betrachtet ist es vorteilhaft, die Konzentration des Markers und der Bindungsstellen im Bindungsexperiment etwa so groß wie K_d zu wählen. So kann erreicht werden, dass die Anteile an gebundenem und ungebundenem Marker ungefähr dieselbe Größenordnung einnehmen und im Kompetitionsexperiment – bei der Verdrängung des gebundenen Markers durch die Testsubstanz – der Anteil an ungebundenem Marker besonders markant und analytisch signifikant ansteigt.

Als Modell zur Untersuchung der Durchführbarkeit von Bindungsstudien nach diesem Konzept wurde der Dopamin-D₁-Rezeptor, ein für die pharmazeutische Wirkstoffsuche typischer G-Protein-gekoppelter membranständiger Rezeptor, gewählt. Als natürliche Quelle diente eine Membranfraktion des Schweinstriatums (P₂),^[7] die D₁-Rezeptoren in relativ hoher Konzentration enthält. Als nativer Marker wurde SCH 23390 (Abbildung 1) ausgesucht. Die Verbindung vereint hohe Affinität ($K_d = 0.53 \text{ nM}$) und Selektivität für D₁-Rezeptoren in sich^[8] und lässt sich, wie Vorversuche zeigten,

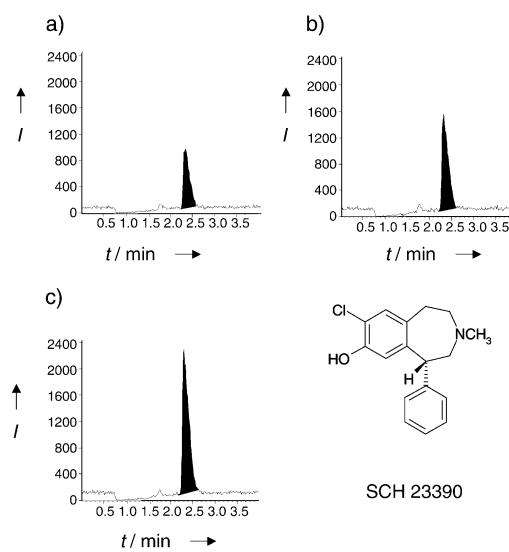


Abbildung 1. Repräsentative MRM-Chromatogramme für SCH 23390 aus Bindungsansätzen ohne und mit (+)-Butaclamol: a) ohne, b) 30 nM, c) 10 μM. Ungebundenes SCH 23390 wurde nach HPLC (Superspher 60 RP select B; Eluent: CH₃CN/0.1% HCOOH in H₂O (1:1)) bei einem Massenübergang von m/z 288.1 (Precursor-Ion) auf m/z 91.2 (Produkt-Ion) gemessen.^[9]

[*] Prof. Dr. K. T. Wanner, Dr. G. Höfner

Department Pharmazie
Zentrum für Pharmaforschung
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 7, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77247
E-mail: klaus.wanner@cup.uni-muenchen.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und vom BMBF gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) im Multiple-Reaction-Monitoring(MRM)-Modus an einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer im Anschluss an eine HPLC (LC-ESI-MS-MS) sehr zuverlässig aus der Probenmatrix quantifizieren.^[9]

Für sieben bekannte Dopaminantagonisten wurde die Affinität zu D₁-Rezeptoren nach dem neuen Verfahren bestimmt (Tabelle 1). Die Bindungsexperimente wurden in enger Anlehnung an Standardmethoden für Radioligandbindungsstudien an Dopaminrezeptoren durchgeführt.^[8–10] Allerdings wurde der übliche 50 mM Tris-Puffer (mit diversen Salzzusätzen) durch eine 50 mM Ammoniumformiat-Lösung (pH 7.4) ersetzt, um Suppressionseffekte bei der LC-ESI-MS-MS-Quantifizierung von SCH 23390 aus der Matrix zu vermeiden. Die D₁-Rezeptoren wurden in einer Konzentration entsprechend dem K_d-Wert (ca. 0.5–0.8 nM) eingesetzt. Anders als bei Radioligandbindungsstudien wurde ungebundener Marker von gebundenem durch Zentrifugation (bei 50000 g) anstelle einer Filtration abgetrennt.^[9]

Die Affinitätsbestimmung soll am Beispiel des Dopaminantagonisten (+)-Butaclamol als Testsubstanz erläutert werden: Die D₁-Rezeptoren wurden mit 1.25 nM SCH 23390 und (+)-Butaclamol (0–10 μM) 40 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Anteil an SCH 23390 wurde aus den bei der Zentrifugation erhaltenen Überständen ohne weitere Probenvorbereitung mit ESI-LC-MS-MS unter Verwendung einer Kalibriergeraden quantifiziert (Abbildungen 1 und 2). Die aus den resultierenden Daten erhaltene Bindungskurve ist in Abbildung 3 gezeigt. Charakteristisch für Bestimmungen aus dem Überstand, spiegelt sie den Konzentrationsverlauf von ungebundenem SCH 23390 als Funktion der Konzentration der Testsubstanz, (+)-Butaclamol, wider. Der IC₅₀-Wert ergibt sich daraus – wie bei konventionellen Bindungskurven – als diejenige Konzentration an Testsubstanz, die die spezifische Bindung des Markers auf 50% absenkt. Der IC₅₀-Wert wurde in drei unabhängigen Versuchen bestimmt, gemittelt und in einen K_i-Wert umgerechnet. Der so für (+)-Butaclamol bestimmte K_i-Wert korreliert gut mit dem K_i-Wert, der in einem analogen, konventionell ausgeführten Radioligandbindungsversuch mit [³H]SCH 23390 erhalten wurde (Tabelle 1). Gleicher trifft für die K_i-Werte der im Weiteren untersuchten sechs Test-

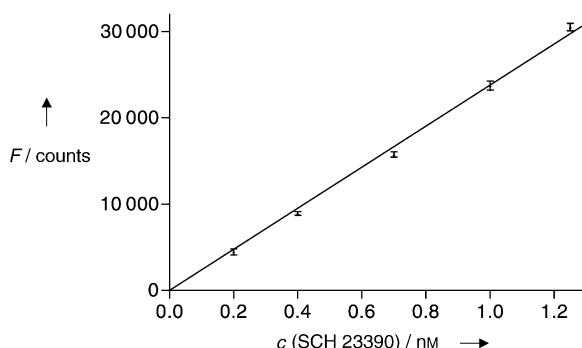


Abbildung 2. Kalibriergerade für SCH 23390. Einer dem Überstand der Bindungsansätze identischen Matrix wurde SCH 23390 zugesetzt. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ($\pm s$) aus einer Vierfachbestimmung.^[9] F = Peakfläche.

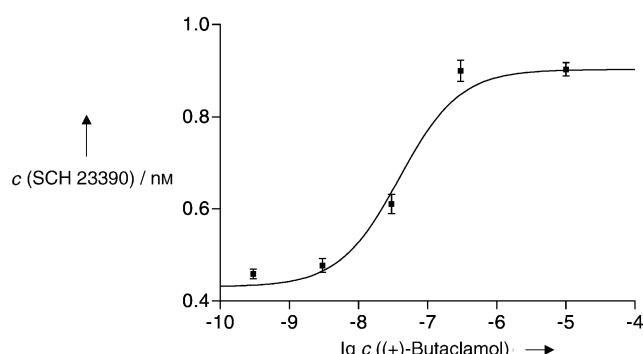


Abbildung 3. Durch nichtlineare Regressionsanalyse erhaltene Bindungskurve für Bindungsansätze, in denen (+)-Butaclamol mit SCH 23390 um die Bindungsstellen konkurriert. Die Datenpunkte entsprechen ungebundenem, mit LC-ESI-MS-MS quantifiziertem SCH 23390 und sind Mittelwerte ($\pm s$) aus Vierfachbestimmungen.^[9]

substanzen zu. Die Ursache dafür, dass die K_i-Werte tendenziell zu hoch sind, bleibt noch zu untersuchen. Weitaus wesentlicher ist es allerdings, dass die gefundene Abstufung der K_i-Werte der in Radioligandbindungsstudien beobachteten entspricht. Kompetitive MS-Bindungsstudien bilden somit eine realistische und attraktive Alternative zu den konventionellen Verfahren. Darüber hinaus erscheinen MS-Bindungsstudien greifbar, bei denen unterschiedliche Bindungsstellen in einer biologischen Probe simultan erfasst werden, indem man einfach mehrere Marker, von denen jeder selektiv eine Bindungsstelle adressiert, parallel einsetzt. MS-Bindungsstudien könnten ferner dahingehend modifiziert werden, dass in einem kompetitiven Bindungsexperiment zunächst untersucht wird, ob eine Substanzbibliothek aktive Substanzen („Hits“) enthält, um diese dann anschließend nach Freisetzung aus ihrer Bindung massenspektrometrisch zu identifizieren.

Wir haben hier eine neue Methode zur Durchführung kompetitiver Bindungsstudien beschrieben, die sich gegenüber kon-

Tabelle 1: Durch Massenspektrometrie und Radioligandbindungsstudien ermittelte IC₅₀- und K_i-Werte für Dopaminantagonisten an D₁-Rezeptoren.

	Marker SCH 23390		Marker [³ H]SCH 23390	
	IC ₅₀ [nM] ^[a,b]	K _i [nM] ^[a,b]	K _i [nM] ^[b,c]	K _i [nM] ^[b,c]
(+)-Butaclamol	36 ± 3	11 ± 1	5.4 ± 1.9	
Chlorpromazin	1700 ± 40	620 ± 10	300 ± 40	
Haloperidol	620 ± 170	220 ± 60	110 ± 2	
Pimozid	13 000 ± 700	4700 ± 200	2500 ± 500	
SKF 83566	5.9 ± 1.0	1.9 ± 0.3	2.7 ± 0.6	
(S)-Sulpirid	> 10 000	> 10 000	> 10 000	
Trifluoperazin	1300 ± 100	460 ± 40	215 ± 20	

[a] Ungebundenes SCH 23390 wurde nach Zentrifugation aus Bindungsansätzen in 50 mM Ammoniumformiat (pH 7.4) mit LC-ESI-MS-MS quantifiziert.^[9] [b] IC₅₀- und K_i-Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler des arithmetischen Mittels aus drei Versuchen angegeben. Zur Berechnung der K_i-Werte wurde ein für [³H]SCH 23390 in Ammoniumformiat (pH 7.4) ermittelter K_d-Wert von 0.72 nM verwendet.^[9] [c] Gebundenes [³H]SCH 23390 wurde nach Filtration aus Bindungsansätzen in 50 mM Ammoniumformiat (pH 7.4) quantifiziert.^[9]

ventionellen Verfahren wie den Radioligandbindungsstudien durch die massenspektrometrische Quantifizierung des verwendeten Markers auszeichnet. Solche kompetitiven MS-Bindungsstudien bieten unter anderem den Vorteil, dass Liganden einer Bindungsstelle nicht modifiziert werden müssen, um als Marker zu dienen. Die für sieben Testsubstanzen durchgeführten kompetitiven MS-Bindungsexperimente an Dopamin-D₁-Rezeptoren mit SCH 23390 als nativem Marker führten zu Affinitätswerten, die gut mit jenen aus Radioligandbindungsstudien übereinstimmen. Die an sich einfache Vorgehensweise, die universellen Einsatzmöglichkeiten und der Vorteil, Liganden als Marker nicht modifizieren zu müssen, könnten dazu führen, dass MS-Bindungsstudien schon bald einen festen Platz in der Wirkstoff-Forschung einnehmen.

Eingegangen am 5. Mai 2003 [Z51806]

Stichwörter: Analytische Methoden · Bindungsstudien · Dopamin-Rezeptoren · Massenspektrometrie · Wirkstoff-Forschung

- [1] P. M. Sweetnam, C. H. Price, J. W. Ferkany in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (Hrsg.: M. E. Wolff), Wiley, New York, **1995**, S. 697–731.
- [2] M. Williams, M. A. Sills in *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol. III (Hrsg.: J. C. Emmet), Pergamon, Oxford, **1990**, S. 45–79.
- [3] a) N. Baird, D. J. Triggle, *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 591–664;
b) R. Hovius, P. Vallotton, T. Wohland, H. Vogel, *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 266–273.
- [4] J. C. McGrath, S. Arribas, C. J. Daly, *Trends Pharmacol. Sci.* **1996**, *17*, 393–399.
- [5] a) D. B. Kassel, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 255–267; b) G. R. Lenz, H. M. Nash, S. Jindal, *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 145–156;
c) R. D. Süßmuth, G. Jung, *J. Chromatogr. B* **1999**, *725*, 49–65.
- [6] a) R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, M. A. Siani, S. C. Banville, D. V. Santi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4505–4509; b) J. Gao, X. Cheng, R. Chen, G. B. Sigal, J. E. Bruce, B. L. Schwartz, S. A. Hofstadler, G. A. Anderson, R. D. Smith, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1949–1955; c) S. Kaur, L. McGuire, D. Tang, G. Dollinger, V. Huebner, *J. Protein Chem.* **1997**, *16*, 505–511; d) M. A. Kelly, H. Liang, I. I. Sytwu, I. Vlattas, N. L. Lyons, B. R. Bowen, L. P. Wennogle, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11747–11755; e) D. Nikolic, S. Habibi-Gouarzi, D. G. Corley, S. Gafner, J. M. Pezzuto, R. B. van Breemen, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3853–3859; f) R. Wieboldt, J. Zweigenbaum, J. Henion, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1683–1691; g) D. C. Schriemer, D. R. Bundle, L. Li, O. Hindsgaul, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3625–3628; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3383–3387; kürzlich wurden auch verwandte NMR-Methoden beschrieben: h) W. Jahnke, P. Floersheim, C. Ostermeier, X. Zhang, R. Hemming, K. Hurth, D. P. Uzunov, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3570–3573; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3420–3423; i) A. H. Siriwardena, F. Tian, S. Noble, J. H. Prestegard, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3604–3607; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3454–3457.
- [7] E. C. Hulme, N. J. Buckley in *Receptor-Ligand Interactions* (Hrsg.: E. C. Hulme), Oxford University Press, New York, **1992**, S. 177–212.
- [8] W. Billard, V. Ruperto, G. Crosby, L. C. Iorio, A. Barnett, *Life Sci.* **1984**, *35*, 1885–1893.
- [9] Zu experimentellen Details siehe Hintergrundinformationen.
- [10] D. R. Burt, I. Creese, S. Snyder, *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 800–812.