

## ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ КОНФОРМАЦИИ ГБ-115, ДИПЕПТИДНОГО АНАЛОГА ХОЛЕЦИСТОКИНИНА-4

© 2013 г. Т. А. Гудашева<sup>#</sup>, В. П. Лезина, Е. П. Кирьянова, О. А. Деева, Л. Г. Колик, С. Б. Середенин

ФГБУ "НИИ фармакологии имени В.В. Закусова" РАМН, 125315, Москва, Балтийская ул., д.8

Поступила в редакцию 29.06.2012 г. Принята к печати 30.10.2012 г.

С использованием конформационного анализа методом <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии в растворе и метода пространственно ограниченных аналогов исследована биологически активная конформация амида *N*-(6-фенилгексаноил)глицил-триптофана (ГБ-115), высокоактивного ретродицептидного аналога холецистокинина-4 с анксиолитической активностью. Изучение связи предпочтительной конформации в растворе и анксиолитической активности в ряду производных ГБ-115 показало, что биологически активной конформацией этого соединения является бета-изгиб. Данные <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии по ядерному эффекту Оверхаузера позволили уточнить, что это β-изгиб типа II. Последующий синтез и изучение фармакологической активности новых пространственно ограниченных аналогов дипептида ГБ-115: этилового эфира (2*S*)-2-[(3*R*)-3-[(6-фенилгексаноил)амино]-2-окспирролидин-1-ил]-3-(1*H*-индол-3-ил)пропионовой кислоты, этилового эфира *N*-(6-фенилгексаноил)глицил-*N*<sup>α</sup>-метилтриптофана, метилового эфира (2*S*)-2-[(10,11-дигидро-5*H*-добензо[*b,f*]азепин-5-илкарбонил)амино]-3-(1*H*-индол-3-ил)пропионовой кислоты и метилового эфира (2*S*)-2-[(3-[(этоксикарбонил)амино]-10,11-дигидро-5*H*-добензо[*b,f*]азепин-5-ил)карбонил)амино]-3-(1*H*-индол-3-ил)пропионовой кислоты свидетельствовали в пользу активной конформации ГБ-115 как изгиба βII-типа.

*Ключевые слова:* холецистокинин-4, дипептидный аналог; ГБ-115, <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопия, биологически активная конформация, пространственно ограниченные аналоги, конформационный анализ.

### ВВЕДЕНИЕ

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН на основе структуры природного анксиогенного тетрапептида холецистокинина-4 (Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>) с использованием топохимического принципа Шемякина-Овчинникова-Иванова [1] сконструирован его ретродицептидный аналог амид *N*-(6-фенилгексаноил)глицил-триптофана (ГБ-115) [2]. Этот дипептид на животных моделях проявляет анксиолитическую активность в дозах 0.0025-0.25 мг/кг внутривнутрибрюшинно и 0.1-0.8 мг/кг перорально, свободен от побочных эффектов, характерных для транквилизаторов бензодиазепинового ряда, и практически нетоксичен (LD<sub>50</sub> > 6 г/кг для крыс, перорально) [3, 4]. ГБ-115 может стать родоначальником новой группы анксиолитиков с холецистокининовым механизмом действия. В связи с этим актуален вопрос о биологически активной конформации ГБ-115.

Сокращения: ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт; ВМВС – внутримолекулярная водородная связь; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера; конфигурационный символ у аминокислот *L*-ряда опущен; MeTrp - *N*<sup>α</sup>-метилтриптофан.

<sup>#</sup>Автор для связи (тел: (495)601-2246; факс: (499)-151-1261, e-mail: tata-sosnovka@mail.ru).

В настоящей работе биологически активная конформация ГБ-115 исследована с использованием конформационного анализа методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии в растворе и метода пространственно ограниченных аналогов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления биологически активной конформации дипептида ГБ-115 была изучена связь структуры и анксиолитической активности в ряду аналогов ГБ-115 как ранее описанных амида *N*-(6-фенилгексаноил)пролил-триптофана (**I**) и этилового эфира *N*-(6-фенилгексаноил)пролил-триптофана (**II**) [2, 5], так и новых конформационно-подвижных (метиламид *N*-(4-фенилбутирил)глицил-триптофана (**III**), метиламид *N*-(5-фенилпентаноил)глицил-триптофана (**IV**), метиламид *N*-(6-фенилгексаноил)пролил-триптофана (**V**)) и конформационно-ограниченных аналогов: этилового эфира (2*S*)-2-((3*R*)-3-[(6-фенилгексаноил)амино]-2-оксопирролидин-1-ил)-3-(1*H*-индол-3-ил)пропионовой кислоты (**VI**), этилового эфира *N*-(6-фенилгексаноил)глицил-*N*<sup>α</sup>-метилтриптофана (**VII**), метилового эфира (2*S*)-2-[(10,11-дигидро-5*H*-добензо[*b,f*]азепин-5-илкарбонил)амино]-3-(1*H*-индол-3-ил)пропионовой кислоты (**VIII**) и метилового эфира (2*S*)-2-[(3-[(этоксикарбонил)амино]-10,11-дигидро-5*H*-добензо[*b,f*]азепин-5-ил} карбонил)амино]-3-(1*H*-индол-3-ил)пропионовой кислоты (**IX**).

Замещенные пептиды получали методом смешанных ангидридов, как описано ранее [2, 3, 5]. Соединение (**VI**), содержащее аминалактамный фрагмент, было синтезировано по методу Фрейдингера (Freidinger R.M.) [6, 7] из этилового эфира *N*-(6-фенилгексаноил)-*D*-метионил-триптофана (**VIa**), который с помощью йодистого метила переводили в соль сульфония и далее циклизовали в лактам в присутствии гидрида натрия. Так как в условиях циклизации этиловый эфир полностью гидролизовался, образующуюся кислоту вновь этерифицировали этанолом в присутствии хлористого тионила (схема 1).

Оба добензоазепиновых аналога (**VIII**), (**IX**) синтезировали путем ацилирования метилового эфира триптофана соответствующим *N*-хлоркарбонилдобензоазепиновым производным (схема 2).

Фармакологическая активность синтезированных соединений (табл. 1) была изучена с использованием теста "приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ), являющегося основной моделью для выявления анксиолитической и анксиогенной активностей [8].

Известно, что остаток пролина способствует образованию поворотной конформации пептидной цепи в большей степени, чем остаток глицина [9-11]. Поскольку, как видно из табл.1, переход от глицинсодержащего ГБ-115 к его пролинсодержащему аналогу, соединению (**I**), сопровождается увеличением активности, мы сделали вывод о поворотной биологически активной конформации ГБ-115.

Для выявления типа поворотной структуры был проведён конформационный анализ соединений ГБ-115 и (I) в растворе методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии. Проводилась съемка одномерных  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров и спектров двойного гомоядерного резонанса  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  в растворах  $\text{DMSO-}d_6$  и  $\text{CDCl}_3$ .

Наиболее часто в биологически активных пептидах встречается  $\beta$ -поворотная и  $\gamma$ -поворотная структуры [12, 13].  $\beta$ -Поворотная структура ( $\beta$ -изгиб) формируется четырьмя аминокислотными остатками ( $i$ ,  $i+1$ ,  $i+2$ ,  $i+3$ ) и стабилизируется внутримолекулярной водородной связью (ВМВС) между карбонильной группой остатка ( $i$ ) (в нашем случае карбонил фенилгексаноильной группы) и  $\text{N}^\alpha\text{H}$ -протоном остатка ( $i+3$ ) (в нашем случае  $\text{C}$ -концевая амидная группа). В случае  $\gamma$ -изгиба ВМВС образуется между карбонильной группой остатка ( $i$ ) и  $\text{N}^\alpha\text{H}$ -протоном остатка ( $i+2$ ) (в нашем случае триптофан). Таким образом, для решения вопроса о возможном типе поворотной структуры в растворе может оказаться достаточным выявление участия того или иного протона в образовании ВМВС.

Хорошо известно, что в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР при переходе от полярного растворителя  $\text{DMSO-}d_6$ , способного участвовать в образовании межмолекулярных водородных связей, к неполярному  $\text{CDCl}_3$  величина химического сдвига протона, участвующего в ВМВС, изменяется незначительно [14]. Было показано (табл. 2), что в соединениях ГБ-115 и (I) разница химических сдвигов  $\Delta\delta$  при смене растворителей мала для одного из протонов  $\text{C}$ -концевой амидной группы, что предположительно говорит об участии данного протона в образовании ВМВС. В случае ГБ-115 это было подтверждено также и тем, что величина  $\Delta\delta$  для данного протона не зависела от концентрации вещества (данные не приводятся). Поскольку для соединений ГБ-115 и (I) значения  $\Delta\delta$  для протонов  $\text{NH}_{\text{Гр}}$  оказались достаточно велики по сравнению с величинами  $\Delta\delta$  для других протонов (табл. 2), было сделано предположение о малой вероятности образования в этих соединениях  $\gamma$ -изгиба, стабилизированного ВМВС.

Расчет по эмпирической формуле Буссарда (G.Boussard) и Маррауда (M.Marraud) [14] показал, что в пуле конформаций дипептида ГБ-115 доля предполагаемого  $\beta$ -изгиба составляет 65%, а в случае его пролинсодержащего аналога (I) – 90% (табл. 2). Таким образом, соединение (I) проявляет большую, чем ГБ-115, активность (табл. 1) и в то же время более склонно к образованию  $\beta$ -изгиба.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что биологически активной конформацией соединения ГБ-115 и его пролинсодержащего аналога (I) является  $\beta$ -изгиб.

Эти результаты согласуются с тем, что соединения с  $\gamma$ -изгибом, стабилизированным ВМВС с участием  $\text{N}^\alpha\text{H}$ -протона остатка триптофана, неактивны (табл. 1 и табл. 3). К ним относятся, по данным  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии в растворе метиламиды глицинсодержащих дипептидов (III) и (IV), а также эфир пролинсодержащего дипептида (II). В то же время метиламид

табл. 2

табл. 3

пролинсодержащего соединения (V), образующий  $\beta$ -изгиб, стабилизированный ВМВС с участием NH-протона C-концевой N-метиламидной группы, активен.

Известны три  $\beta$ -конформации, содержащих ВМВС тип  $(i+3) \rightarrow (i)$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\beta VI$ . Выбор между этими типами  $\beta$ -изгибов был сделан на основе данных ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в спектрах двойного гомоядерного резонанса  $^1H$ - $^1H$  соединений ГБ-115 и (I). Известно, что для структурно близких нашим соединениям N-метиламидов N-ацилзамещённых пролинсодержащих дипептидов (R-Pro-Xaa-NHCH<sub>3</sub>) [18, 19], наличие ЯЭО между C <sup>$\alpha$</sup> H-протоном остатка (i+1) и N <sup>$\alpha$</sup> H-протоном остатка (i+2) свидетельствует в пользу  $\beta$ -изгиба типа II. Для пролинсодержащего соединения (I) в среде CDCl<sub>3</sub> нами был выявлен ЯЭО (7%) между протонами C <sup>$\alpha$</sup> H<sub>Pro</sub> и N <sup>$\alpha$</sup> H<sub>Trp</sub>, а для ГБ-115 выявленный ЯЭО между протонами C <sup>$\alpha$</sup> H<sub>Gly</sub> и N <sup>$\alpha$</sup> H<sub>Trp</sub> составлял 4%. Кроме того, для  $\beta II$  характерна сближенность NH(i+2)-NH(i+3), наличие которой подтверждается также ЯЭО: NH(Trp)-NH(i+3) 3% в ГБ-115 и 5% в (I). В связи с этим есть основания полагать, что в этих дипептидах в растворе также реализуется  $\beta$ -изгиб типа II (рис. 1).

рис. 1

Для подтверждения биологически активной конформации ГБ-115 был использован метод конформационно ограниченных аналогов.

В аналоге (VI) в качестве пространственного ограничителя был использован  $\gamma$ -лактамный фрагмент, способствующий образованию  $\beta$ -изгиба типа II [6, 7]. Для соединения (VI) была выявлена анксиолитическая активность, по действующим дозам не уступающая активности исходного дипептида ГБ-115 (табл. 1), что свидетельствует о том, что биологически активной конформацией последнего является  $\beta$ -изгиб типа II.

С другой стороны, N-метилзамещённый аналог ГБ-115, соединение (VII) (табл. 1), не проявлял анксиолитической активности. Поскольку N-метилзамещение противодействует образованию  $\beta II$ -изгиба у пептидов [18-20], отсутствие активности у (VII) также свидетельствует в пользу  $\beta III$ -поворотной конформации ГБ-115.

Наконец, нами были рассмотрены пространственно ограниченные соединения (VIII) и (IX), имеющие дибензоазепиновую структуру. Фармакологические исследования показали наличие анксиолитической активности у соединения (IX) в дозах, сравнимых с таковыми для ГБ-115, тогда как соединение (VIII) оказалось неактивным (табл. 1).

Два данных дибензоазепиновых производных различаются между собой наличием у соединения (IX) бокового заместителя в положении C3 дибензоазепинового кольца, который, по-видимому, принимает участие во взаимодействии с рецептором и необходим для проявления анксиолитической активности. По данным молекулярного моделирования с использованием моделей Дрейдинга (рис. 2), именно данный фрагмент имитирует гидрофобную фенильную группу соединения ГБ-115 в конформации  $\beta III$ -изгиба. Рассмотренное наложение описывает трехмерную структуру молекул, находящихся в

рис. 2

ненапряжённом состоянии. В модели структура дипептида ГБ-115 была закреплена в конформации  $\beta$ -изгиба II типа.

Суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что биологически активной конформацией ГБ-115 является  $\beta$ -изгиб типа II.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пептид **ГБ-115** и его аналоги **Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Pro-Trp-NH<sub>2</sub> (I)**, **Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Pro-Trp-O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (II)**, а также исходные эфиры **Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO-Gly-Trp-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>**, **Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO-Gly-Trp-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>**, **Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Gly-Trp-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>** были получены ранее [2, 5]. В работе использовали коммерческие аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия; Acros Organics), реагенты и растворители фирм (ЗАО "Экос-1", Химмед, Реахим, Acros Organics, Fluka, Lancaster). Эфиры аминокислот получали по стандартным методикам. *N*-ацилпроизводные аминокислот получали согласно методике, описанной ранее [2]. *N*-хлоркарбонилиминодобензол и *N*-хлоркарбонил-(3-этоксикарбониламино)иминодобензол были любезно предоставлены фирмой "VEB Arzneimittelwerk", Дрезден. Используемые растворители очищали и сушили стандартными методами. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры регистрировали в шкале  $\delta$ , м.д.(J, Гц) на спектрометре Bruker AC-250 (Германия) в растворах DMSO-*d*<sub>6</sub> и CDCl<sub>3</sub>, используя в качестве внутреннего стандарта тетраметилсилан. Температуру плавления определяли в открытых капиллярах и не корректировали. Удельное оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer-241 (Англия). Колоночную хроматографию проводили на Kieselgel 100 (Merck, Германия). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel, Германия) в системах растворителей: хлороформ-этанол, 9:1 (А); петролейный эфир-этилацетат-этанол, 9:9:2 (Б); диоксан-вода, 9:1 (В); бутанол-уксусная кислота-вода, 5:1:2 (Г), изопропанол - аммиак, 7:3 (Д). Соединения обнаруживали с помощью паров йода и УФ-света. Элементный анализ проводили на приборе для определения углерода и водорода с четырьмя электрическими печами (600-900°C, тип МА-Г/6Р, завод ЛЭТО, Россия) в токе кислорода и на аппарате для определения азота с тремя такими же электрическими печами в токе углекислого газа. Данные элементного анализа соединений относительно процентного содержания С, Н и N отклоняются от теоретических данных не более чем на 0.4%.

Препаративную ВЭЖХ проводили с использованием хроматографической системы Wellchrom 2001 (Knauer, Германия) на колонке Диасорб-130-С16Т (15×250 мм, С<sub>16</sub>, 9мкм; ЗАО "БиоХимМак СТ"). Скорость потока 5 мл/мин, детектирование при длине волн 214нм.

**Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO-Gly-Trp-NHCH<sub>3</sub> (III)**. Раствор 0.41 г (0.95 ммоль) Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO-Gly-Trp-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> в 10 мл метанола, предварительно насыщенного газообразным метиламином при температуре 0°C, оставляли в закрытой ёмкости при атмосферном давлении и комнатной температуре на

36 ч (ТСХ-контроль). Растворитель удаляли в вакууме, остаток затирали с сухим эфиром. Выпавшие кристаллы отфильтровывали и высушивали над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Выход 0.28 г (70%). R<sub>f</sub> 0.35 (А), т. пл. 121-122°C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -8.8° (с 0.1; этанол). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.77 (2 Н, м, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.12 (2 Н, т, J 7.1, C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.54 (3 Н, д, J 7.1, -NHCH<sub>3</sub>), 2.56 (2 Н, т, J 7.0, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.92 и 3.11 (2 Н, два дд, J 14.9, J 5.7, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Trp), 3.58 и 3.75 (2 Н, два дд, J 16.6, J 5.6, CH<sub>2</sub>, Gly), 4.44 (1 Н, м, C<sup>α</sup>H Trp), 6.92-7.59 (10 Н, м, ArH, CH индол), 7.88 (1 Н, м, -NHCH<sub>3</sub>), 7.98 (1 Н, д, J 8.3, NH Trp), 8.03 (1 Н, т, J 5.7, NH Gly), 10.80 (1 Н, с, NH индол). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 1.84 (2 Н, м, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.09 (2 Н, т, J 7.2, C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.56 (2 Н, т, J 7.1, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.65 (3 Н, д, J 7.0, -NHCH<sub>3</sub>), 3.13 и 3.30 (2 Н, два дд, J 14.9, J 5.7, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>, Trp), 3.76 и 3.82 (2 Н, два дд, J 16.2, J 5.5, CH<sub>2</sub> Gly), 4.70 (1 Н, м, C<sup>α</sup>H Trp), 6.49 (1 Н, т, J 5.8, NH Gly), 6.58 (1 Н, уш. с., -NHCH<sub>3</sub>), 6.98 (1 Н, с, CH индол), 7.05 (1 Н, д, J 8.1, NH Trp), 7.0-7.61 (9 Н, м, ArH), 8.32 (1 Н, с, NH индол).

**Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C(O)-Gly-Trp-NHCH<sub>3</sub> (IV)** получали аналогично соединению (III) из 0.42 г (0.93 ммоль) Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C(O)-Gly-Trp-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>. Выход 0.25 г (62%). R<sub>f</sub> 0.25 (А), т. пл. 117-118°C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -6.56° (с 0.1; этанол). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.50 (4 Н, м, C<sup>βγ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.12 (2 Н, т, J 7.1, C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.54 (3 Н, д, J 7.1, -NHCH<sub>3</sub>), 2.55 (2 Н, т, J 6.9, C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.90 и 3.10 (2 Н, два дд, J 14.9, J 5.7, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Trp), 3.56 и 3.73 (2 Н, два дд., J 16.5, J 5.6, CH<sub>2</sub>, Gly), 4.42 (1 Н, м, C<sup>α</sup>H Trp), 6.92-7.35 (10 Н, м, ArH, CH индол), 7.87 (1 Н, кв, -NHCH<sub>3</sub>), 7.97 (1 Н, д, J 8.1, NH Trp), 8.01 (1 Н, т, J 6.1, NH Gly), 10.81 (1 Н, с, NH индол). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 1.84 (4 Н, м, C<sup>βγ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.09 (2 Н, т, J 7.0, C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.56 (3 Н, д, J 7.1, -NHCH<sub>3</sub>), 2.65 (2 Н, т, J 6.9, C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.76 и 3.82 (2 Н, два дд, J 14.7, J 5.7, CH<sub>2</sub> Gly), 3.13 и 3.30 (2 Н, два дд, J 14.9, J 5.7, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Trp), 4.70 (1 Н, м, C<sup>α</sup>H Trp), 6.49 (1 Н, уш.с., NH Gly), 6.58 (1 Н, уш.с., -NHCH<sub>3</sub>), 6.90 (1 Н, с, CH индол), 7.05 (1 Н, д, J 8.1, NH, Trp), 7.00-7.61 (9 Н, м, ArH), 8.32 (1 Н, с, NH индол).

**Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Pro-Trp-NHCH<sub>3</sub> (V)** получали аналогично соединению (III) из 0.50 г (0.99 ммоль) соединения (II), растворенного в 10 мл метанола, насыщенного метиламином, выдерживая реакционную смесь в течение 72 ч (ТСХ-контроль). Выход 0.35 г (72%), масло. R<sub>f</sub> 0.53 (А), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -65° (с 0.4; метанол). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (соотношение *транс/цис*-изомеров 7 / 3): 1.18-2.20 (12 Н, м, C<sup>αβγδ</sup>H<sub>2</sub> цепи, 3,4-CH<sub>2</sub> Pro), 2.44 (*цис*) и 2.55 (*транс*) (2 Н, т, J 6.8, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.55 (3 Н, д, J 6.8, -NHCH<sub>3</sub>), 2.94 (*цис*) и 3.05 (*цис*), 2.98 (*транс*) и 3.18 (*транс*) (2 Н, два дд каждый, J 14.9, J 5.7, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Trp), 3.28-3.46 (2 Н, м, 5-CH<sub>2</sub> Pro), 4.18 (*транс*) и 4.29 (*цис*) (1 Н, м, 2-CH Pro), 4.40 (*транс*) и 4.55 (*цис*) (1 Н, м каждый, C<sup>α</sup>H Trp), 6.90-7.60 (10 Н, м, ArH), 7.59 (*транс*) (1 Н, кв, -NHCH<sub>3</sub>), 7.66 (*транс*) (1 Н, д, J 8.2, NH Trp),

8.01 (*цис*) (1 H, м, -NHCH<sub>3</sub>), 8.27 (*цис*) (1 H, д, *J* 8.3, NH Trp), 10.81 (*цис*) и 10.83 (*транс*) (1 H, с, NH индол). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 1.07 (2 H, м, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 1.26 (2 H, м, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> цепи), 1.58 (2 H, м, C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 1.88 (4 H, м, C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> цепи, 4-CH<sub>2</sub> Pro), 2.09 (2 H, м, 3-CH<sub>2</sub>, Pro), 2.62 (2 H, т, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.73 (3 H, д, *J* 7.1, -NHCH<sub>3</sub>), 3.00 и 3.11 (2 H, два дд, 5-CH<sub>2</sub>, Pro), 3.12 и 3.56 (2 H, два дд, *J* 14.8, *J* 5.7, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Trp), 4.29 (1 H, дд, 2-CH Pro), 4.75 (1 H, м, C<sup>α</sup>H Trp), 6.18 (1 H, д, *J* 8.1, NH Trp), 6.79 (1 H, м, -NHCH<sub>3</sub>), 6.97 (1 H, с, CH индол), 7.07-7.59 (9 H, м, ArH), 8.06 (1 H, с, NH индол).

**Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-*D*-Met-Trp-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (VIA)** получали аналогично соединению (VII) (см. ниже) из 1.0 г (3.1 ммоль) *N*-(6-фенилгексаноил)-*D*-метионина. После удаления хлороформа в вакууме получали темное масло, которое выдерживали при +5°C 24 ч, после чего затирали с диэтиловым эфиром, получая белый кристаллический осадок. Кристаллы тщательно и быстро промывали эфиром и высушивали, получая белый кристаллический продукт. Выход 0.38 г (23%). *R<sub>f</sub>* 0.71 (A), т. пл. 104-106 °C, [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> +12.24° (*c* 0.4; метанол). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 1.21 (3 H, т, *J* 7.0, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29 (2 H, м, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 1.57 (4 H, м, C<sup>βδ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 1.86 (2 H, м, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Met), 2.07 (3 H, с, CH<sub>3</sub>S Met), 2.09 (2 H, т, *J* 7.0, C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.19 и 2.32 (2 H, два м, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>, Met), 2.55 (2 H, т, *J* 7.0, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> цепи), 3.24 и 3.34 (2 H, два дд, *J* 14.9, *J* 5.7, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Trp), 4.01 (2 H, кв, *J* 7.2, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.56 (1 H, м, C<sup>α</sup>H Met), 4.81 (1 H, м, C<sup>α</sup>H Trp), 6.37 (1 H, д, *J* 9.1, NH Met), 6.88 (1 H, д, *J* 8.1, NH Trp), 7.02 (1 H, с, CH индол), 7.05-7.56 (9 H, м, ArH), 8.30 (1 H, с, NH индол).

**[Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-*D*-Met(CH<sub>3</sub>)-Trp-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>•Γ (VIB)**. Раствор 0.75 г (1.4 ммоль) Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-*D*-Met-Trp-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (VIA) в 7.5 мл йодистого метила перемешивали 3 ч при комнатной температуре и оставляли на 8 сут. По окончании реакции (ТСХ-контроль) реакционная смесь была двухфазной – раствор и гелеобразная масса, из которой в вакууме удаляли избыток йодистого метила и высушивали над CaCl<sub>2</sub> и парафином в вакууме (15 мм. рт. ст.). Получали 0.825 г (87%) продукта (VIB) в виде масла. *R<sub>f</sub>* 0.1 (A), [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> +3.41° (*c* 0.4; метанол). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.09 (3 H, т, *J* 7.0, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.24 (2 H, м, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 1.50 (4 H, м, C<sup>βδ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 1.8 (2 H, м, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> Met), 2.12 (2 H, т, *J* 6.9, C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.53 (2 H, т, *J* 7.0, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.78 и 2.79 (6 H, два с, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S<sup>+</sup>), 3.03 и 3.07 (2 H, два м, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Met), 3.08 и 3.17 (2 H, два дд, *J* 14.9, *J* 5.7, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Trp), 4.03 (2 H, кв, *J* 7.1, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.45 (1 H, м, C<sup>α</sup>H Met), 4.54 (1 H, м, C<sup>α</sup>H Trp), 6.91-7.54 (10 H, м, ArH), 8.08 (1 H, д, *J* 9.0, NH Met), 8.49 (1 H, д, *J* 8.3, NH Trp), 10.31 (1 H, с, NH индол).

**Этиловый эфир (2S)-2-{{(3R)-3-[(6-фенилгексаноил)амино]-2-оксопирролидин-1-ил}-3-(1H-индол-3-ил)пропионовой кислоты (VI).** К раствору 0.735 г (1.082 ммоль) Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-D-Met(CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>-Trp-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>•I<sup>-</sup> (VIB) в 33.8 мл смеси DMF – CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), охлаждённому до 0°C и помещённому в ток азота, добавляли 0.087 г (2.17 ммоль) гидрида натрия. Смесь перемешивали при 0°C в течение 2.5 ч, после чего добавляли 7.3 мл этилацетата, затем 2.8 мл воды и оставляли реакционную смесь на ночь при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме, к остатку добавляли 5.64 мл воды и 5.64 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Органическую фазу отделяли, растворитель удаляли в вакууме, остаток очищали от примесей с помощью ВЭЖХ в градиенте концентраций ацетонитрила в 0.1% TFA (0-90%, 30 мин). Получали 0.19 г (0.41 ммоль, 38%) производного в виде масла. Затем к раствору полученного масла в 3 мл абсолютного этилового спирта при -10°C прикапывали 0.06 мл (0.861 ммоль) свежеперегнанного SOCl<sub>2</sub>. Реакционную массу перемешивали в течение 2 ч при -10°C, затем выдерживали 48 ч при комнатной температуре, после чего при перемешивании в реакционную массу добавляли 10 мл сухого эфира и 0.5 г активированного угля, затем фильтровали и фильтрат упаривали под вакуумом. Полученный эфир в виде жёлтого масла очищали от примесей с помощью ВЭЖХ в градиенте концентраций ацетонитрила в 0.1% TFA (0-90%, 30 мин). Выход 0.100 г (50%, общий выход 19%) продукта в виде масла. *R*<sub>f</sub> 0.81 (Д), [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> +32.08° (с 4.8, метанол). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.05 (3 H, т, *J* 7.1, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.23 (2 H, м, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 1.50 (4 H, м, C<sup>βδ</sup>H<sub>2</sub> цепи), 1.62 (2 H, м, 4-CH<sub>2</sub> лактам), 2.06 (2 H, т, *J* 7.1, C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> цепи), 2.53 (2 H, т, *J* 6.8, C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> цепи), 3.02 и 3.21 (2 H, два т, *J* 7.1, 5-CH<sub>2</sub> лактам), 3.08 и 3.19 (2 H, два дд, *J* 14.9, *J* 5.7, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Trp), 4.10 (2 H, кв, *J* 7.0, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.23 (1 H, м, 3-CH лактам), 4.70 (1 H, м, C<sup>α</sup>H, Trp), 6.92-7.35 (10 H, м, ArH), 8.12 (1 H, д, *J* 8.6, NH пирролидин), 10.81 (1 H, с, NH индол).

**Ph(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Gly-MeTrp-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (VII).** К охлаждённому до -10°C раствору 0.25 г (1.0 ммоль) *N*-(6-фенилгексаноил)глицина в сухом DMF (12 мл) при перемешивании одновременно прикапывали 0.13 мл (1.0 ммоль) изобутилхлорформиата и 0.12 мл (1.0 ммоль) *N*-этилморфолина. После 2-3 мин перемешивания при этой температуре добавляли охлаждённый до -10°C раствор 0.27 г (1.0 ммоль) хлоргидрата этилового эфира *N*<sup>α</sup>-метил-триптофана и 0.13 мл (1.0 ммоль) *N*-этилморфолина в сухом DMF (5.0 мл). Реакционную смесь перемешивали ещё 30 мин при -10°C и 1 ч при комнатной температуре, после чего её выливали в 200 мл холодной воды, через 24 ч при комнатной температуре образовывалось масло, которое промывали водой (2 × 30 мл) и растворяли в 30 мл хлороформа. Раствор высушивали безводным сульфатом магния, осушитель отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме. Полученное масло (выход 93%) очищали с помощью ВЭЖХ в градиенте концентраций



ацетонитрила (0-90%, 30 мин). Выход после очистки с помощью ВЭЖХ составил 0.24 г (50.5%). Масло,  $R_f$  0.78 (А),  $[\alpha]_D^{20}$   $-23.3^\circ$  ( $c$  0.46; метанол). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMSO-}d_6$ ): 1.27 (3 Н, т,  $J$  7.1,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.33 (2 Н, м,  $\text{C}^\gamma\text{H}_2$  цепи), 1.62 (4 Н, м,  $\text{C}^{\beta\delta}\text{H}_2$  цепи), 2.12 (*цис*) и 2.20 (*транс*) (2 Н, м,  $\text{C}^\alpha\text{H}_2$  цепи), 2.57 (*цис*) и 2.59 (*транс*) (2 Н, м,  $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$  цепи), 2.79 (*транс*) и 2.85 (*цис*) (3 Н, с,  $\text{N}^\alpha\text{CH}_3$ ), 3.25 и 3.47 (2 Н, два дд,  $J$  14.6,  $J$  5.8,  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  Trp), 3.88 и 4.0 (2 Н, два дд,  $J$  16.6,  $J$  5.6,  $\text{CH}_2$  Gly), 4.21 (2 Н, кв,  $J$  7.3,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.56 (*цис*) и 5.30 (*транс*) (1 Н, дд каждый,  $J$  14.9,  $J$  8.1 и  $J$  14.9,  $J$  7.6 соответственно,  $\text{C}^\alpha\text{H}$  Trp), 6.37 (*цис*) и 6.48 (*транс*) (1 Н, т,  $J$  5.6 и  $J$  5.7 соответственно, NH Gly), 6.80 (1 Н, д,  $J$  8.3, NH Trp), 6.95-7.60 (10 Н, м, ArH), 8.11 (*транс*) и 8.16 (*цис*) (1 Н, с, NH индол).

**Метилловый эфир (2S)-2-[(10,11-дигидро-5H-добензо[b,f]азепин-5-илкарбонил)амино]-3-(1H-индол-3-ил)пропионовой кислоты (VIII).** К раствору 0.39 г (1.5 ммоль) 10,11-дигидродобензо[b,f]азепин-5-карбонилхлорида (VIIIА) в 5 мл DMF, охлажденному до  $0^\circ\text{C}$ , при перемешивании прибавляли раствор 0.43 г (1.6 ммоль) гидрохлорида метилового эфира триптофана и 0.28 мл (2.2 ммоль) *N*-этилморфолина в 5 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 30 мин при комнатной температуре и 3 ч при нагревании до  $40^\circ\text{C}$ , затем выливали в емкость со 150 мл дистиллированной воды и охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ . Выпавший осадок отфильтровывали, высушивали на воздухе и перекристаллизовывали из толуола. Выход 0.20 г (30.3%).  $R_f$  0.9 (А), т. пл.  $157\text{-}158^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{22}$   $-5.43^\circ$  ( $c$  0.4; метанол). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMSO-}d_6$ ): 2.92 (4 Н, уш.с.,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.12 (2 Н, д,  $J$  5.7,  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  Trp), 3.60 (3Н, с,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.47 (1 Н, м,  $\text{C}^\alpha\text{H}$  Trp), 5.43 (1 Н, д,  $J$  8.1, NH Trp), 6.84-7.42 (13 Н, м, ArH), 10.89 (1 Н, с, NH индол).

**Метилловый эфир (2S)-2-[(3-[(этоксикарбонил)амино]-10,11-дигидро-5H-добензо[b,f]азепин-5-ил)карбонил)амино]-3-(1H-индол-3-ил)пропионовой кислоты (IX).** К раствору 0.52 г (1.5 ммоль) 10,11-дигидродобензо[b,f]азепино-[3-этоксикарбониламино]-5-карбонилхлорида (IXА) в 5 мл DMF при перемешивании прибавляли раствор 0.43 г (1.6 ммоль) гидрохлорида метилового эфира триптофана и 0.28 мл (2.2 ммоль) *N*-этилморфолина в 7 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 30 мин при комнатной температуре и 3 ч при нагревании до  $45\text{-}50^\circ\text{C}$ , после чего оставляли на 15 ч при комнатной температуре. Затем реакционную массу выливали в емкость со 150 мл дистиллированной воды и охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ . Выпавший осадок отфильтровывали, высушивали на воздухе и перекристаллизовывали из этилацетата. Выход 0.4 г (50.7%).  $R_f$  0.75 (А), т. пл.  $155\text{-}157^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{22}$   $+7.03^\circ$  ( $c$  0.4; метанол). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMSO-}d_6$ ): 1.22 (3 Н, т,  $J$  7.0,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.85 (4 Н, м,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.11 (2 Н, д,  $J$  5.7,  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  Trp), 3.60 (3Н, с,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.10 (2 Н, кв,  $J$  7.2,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.47 (1 Н, м,

C<sup>α</sup>H Trp), 5.44 (1 H, д, *J* 8.1, NH Trp), 6.85-7.47 (12 H, м, ArH), 9.61 (1 H, с, NH этоксикарбамоил), 10.85 (1 H, с, NH индол).

### <sup>1</sup>H ЯМР-исследования

<sup>1</sup>H ЯМР-спектры регистрировали при комнатной температуре на спектрометре Bruker AC-250 (Германия) в растворах CDCl<sub>3</sub> и DMSO-*d*<sub>6</sub>, используя в качестве внутреннего стандарта тетраметилсилан. Исследовали растворы с концентрацией 10-20 мг/мл. Отнесение сигналов проводили на основании литературных данных о <sup>1</sup>H ЯМР - спектрах соответствующих аминокислот [21] и метода гомоядерного двойного резонанса, позволяющего выявить связанные спин-спиновым взаимодействием группы протонов. Для установления внутримолекулярных водородных связей изучали зависимость химического сдвига протонов от концентрации вещества в CDCl<sub>3</sub> и от природы растворителя, используя смеси CDCl<sub>3</sub>/DMSO-*d*<sub>6</sub>. Константы спин-спинового взаимодействия <sup>3</sup>J в системе NH-C<sup>α</sup>H измеряли по сигналу протонов NH. Для определения величины ЯЭО в одномерных спектрах ЯМР проводили селективное облучение низкой мощностью на частоте выбранного резонанса. Величину ЯЭО<sub>j</sub>(i) определяли как отношение изменения интегральной интенсивности сигнала *j* в спектре ЯМР в условиях насыщения ядра I (I<sub>j</sub>) к интегральной интенсивности сигнала *j* в отсутствие насыщения (I<sup>0</sup><sub>j</sub>): ЯЭО<sub>j</sub>(i) = (I<sub>j</sub>-I<sup>0</sup><sub>j</sub>)/I<sup>0</sup><sub>j</sub>

**Биологическую активность пептидов *in vivo*** изучали на белых беспородных крысах-самцах весом 200-270 г. Потребление животными стандартного гранулированного корма и воды не ограничивали. Соблюдались этические правила гуманного обращения с животными, изложенные в директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС. Крыс содержали в виварии в стандартных пластиковых клетках (60 × 40 × 20) по восемь особей в каждой. В течение 3 сут, предшествующих эксперименту, с каждой из подопытных крыс проводили процедуру "хендлинга". Животных помещали в экспериментальную комнату за 3-4 ч до начала опыта, который выполняли в интервале 16-20 ч местного времени. Эксперименты проводили в затемненном помещении, источник света (лампа мощностью 60 Вт) был экранирован так, чтобы сама установка освещалась только рассеянным, отраженным светом. Водно-твиновые растворы соединений готовили *ex tempore* и вводили крысам внутрибрюшинно за 15 мин до тестирования в лабиринте. Контрольные животные получали равный объем дистиллированной воды.

В качестве экспериментальной модели тревоги использовали тест "приподнятый крестообразный лабиринт" в базовой модификации [8], который имел следующие характеристики: длина каждого из 4 рукавов лабиринта составляла 50 см, их ширина – 15 см, высота бортиков 2 противоположных закрытых рукавов – 15 см, бортики были

светонепроницаемы, центральная площадка  $-15 \times 15$  см, лабиринт был приподнят над полом на высоту 75 см. В начале опыта крыс помещали в центр лабиринта, случайным образом ориентируя их относительно входа в рукав. Поведение животных оценивали в течение 5 мин. Регистрировали следующие показатели: число заходов во все рукава, число заходов в открытые рукава, время пребывания во всех рукавах, время пребывания в открытых рукавах.

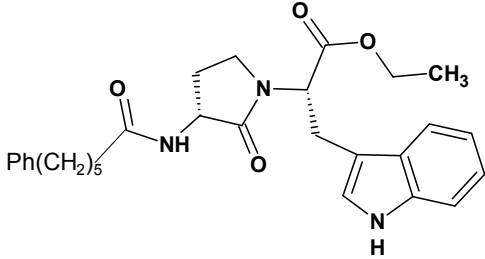
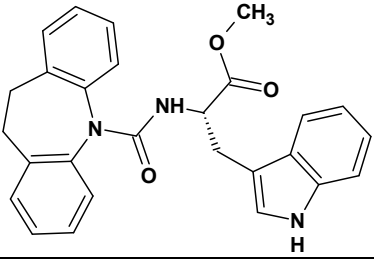
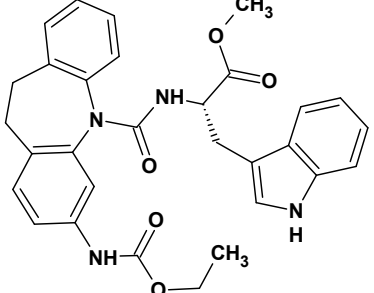
Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия U Манна-Уитни (пакет программ Complete statistical system, версия В640, Statsoft, США). Данные представлены в виде: среднее +/- ошибка среднего.

Результаты оценивались как значимые при величинах  $p < 0.05$ .

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shemyakin M.M., Ovchinnikov Y.A., Ivanov V.T.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1969. V. 8. P. 492-499.
2. *Гудашева Т.А., Курьянова Е.П., Колик Л.Г., Константинопольский М.А., Середенин С.Б.* // *Биоорган. химия.* 2007. Т. 33. № 4. С. 413 – 420. [*T.A. Gudasheva, E.P. Kir'yanova, L.G. Kolik, M.A. Konstantinopol'skii, and S.B. Seredenin* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2007. V. 33. P. 383-389].
3. *Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Зайцева Н.И., Колик Л.Г., Брилинг В.К., Константинопольский М.А.* // Патент РФ 2227144. 2004. Бюлл. 2004. № 11.
4. *Колик Л.Г., Гудашева Т.А., Середенин С.Б.* // *Бюл. Экспер. Биол.* 2003. V. 135. №5. С. 519 – 523.
5. *Гудашева Т.А., Лезина В.П., Курьянова Е.П., Троицкая В.С., Колик Л.Г., Середенин С.Б.* // *Химико-фармацевтический журнал.* 2006. Т. 40. №7. С. 21 – 26.
6. *Freidinger R.M., Veber D.F., Perlow D.S., Brooks J.R., Saperstein R.* // *Science.* 1980. V. 210. № 4470. P. 656 – 658.
7. *Freidinger R.M., Perlow D.S., Veber D.F.* // *J. Org. Chem.* 1982. V. 47. № 1. P. 104 – 109.
8. *Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M.* // *J. Neurosci. Methods.* 1985. V. 14. P. 149 – 167.
9. *Boussard G., Marraud M., Aubry A.* // *Biopolymers.* 1979. V. 18. P. 1297 – 1331.
10. *Stradley S.J., Rizo J., Bruch M.D., Stroup A.N., Gierasch L.M.* // *Biopolymers.* 1990. V. 29. №1. P. 263 – 287.
11. *Davies J.S., Thomas R.J.* // *J. Chemical Society Perkin I.* 1981. №5. P. 1639 – 1646.
12. *Ball J.B., Hughes R.A., Alewood P.F., Andrews P.R.* // *Tetrahedron.* 1993. V. 49. № 17. P. 3467 – 3478.
13. *Gudasheva T.A., Voronina T.A., Ostrovskaya R.U., Zaitseva N.I., Bondarenko N.A., Briling V.K., Asmakova L.S., Rozantsev G.G., Seredenin S.B.* // *J. Med Chem.* 1998. V. 41. № 3. P. 284 – 290.
14. *Boussard G., Marraud M.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1985. V. 107. P. 1825 – 1828.
15. *Aubry A., Cung M. T., Marraud M.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1985. V. 107. P. 7640 – 764.
16. *Narasinga Rao B.N., Anil Kumar, Hemalatha Balaram, Ravi A., Balaram P.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1983. V. 105. P. 7423 – 7428.
17. *Pietrzyński G., Kubica Z., Rzeszotarska B.* // *Peptides 1990/Eds Giralt E., Andrew D., ESCOM Sci. Pub. B.* V. 1991. P. 462 – 464.
18. *Vitoux B., Aubry A., Cung M.T., Boussard G., Marraud M.* // *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1981. V. 17. № 4. P. 469 – 479.
19. *Aubry A., Vitoux B., Boussard G., Marraud M.* // *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1981. V. 18. № 2. P. 195 – 202.
20. *Goudreau N., Weng J.H., Roques B.P.* // *Biopolymers.* 1994. V. 34. № 26. P. 155 – 169.
21. *Бови Ф.А.* ЯМР высокого разрешения макромолекул: Пер. с англ. М.: Химия, 1977 (*Bovey F. A. High Resolution NMR of Macromolecules. New York: Academic Press, 1972.*)

**Таблица 1.** Данные фармакологического исследования конформационно-ограниченных аналогов соединения ГБ-115 в тесте ПКЛ на беспородных крысах

Соединение		Дозы, мг/кг в/б (n)	Показатели	
Формула	шифр или номер		Заходы в открытые рукава, %	Время пребывания в открытых рукавах, %
Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-Gly-Trp-NH <sub>2</sub>	ГБ-115	0 (14) 0.01 (14) <b>0.05</b> (16) <b>0.1</b> (8) <b>0.2</b> (8)	13.0 27.2 34.1* 42.1* 31.0*	4.0 10.9 12.5* 13.0* 11.9*
Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-Pro-Trp-NH <sub>2</sub>	(I)	0 (6) <b>0.01</b> (8) <b>0.05</b> (6) 0.1 (6) 0.5 (5)	25.9 47.7* 42.7* 37.9 40.7	10.6 30.4* 27.2* 20.1 20.5
Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-Pro-Trp-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	(II)	0 (6) 0.01 (6) 0.05 (7)	33.9 38.5 36.9	7.7 10.7 9.3
Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO-Gly-Trp-NHCH <sub>3</sub>	(III)	0 (8) 0.8 (8) 1.6 (8) 3.2 (8)	4.2 7.0 6.3 16.6	0.1 1.2 0.5 5.4
Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CO-Gly-Trp-NHCH <sub>3</sub>	(IV)	0 (12) 0.1 (10)	18.4 6.4	6.7 2.5
Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-Pro-Trp-NHCH <sub>3</sub>	(V)	0 (10) 0.01 (5) <b>0.05</b> (7)	25.3 35.2 39.3*	6.5 12.4 24.3*
	(VI)	0 (6) 0.01 (8) <b>0.05</b> (8)	32.7 35.8 53.5*	22.6 38.9 56.8*
Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-Gly-MeTrp-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	(VII)	0 (12) 0.01 (6) 0.05 (8)	25.8 28.2 36.5	15.1 12.0 23.8
	(VIII)	0 (6) 0.05 (6) 0.5 (6)	44.6 36.6 32.1	15.9 17.4 17.8
	(IX)	0 (6) <b>0.05</b> (6) 0.5 (6)	44.6 48.5* 35.3	15.9 51.5* 24.4

Примечание: n - число животных, \* p < 0.05, статистическая достоверность отличия от контроля по Манн-Уитни (Mann-Whitney U-тест); в/б - внутривенно.

**Таблица 2.** Значения  $\Delta\delta$  и содержание  $\beta$ -поворотной конформации в неполярной среде ( $c$  0.027 M, 25°C)

Соединение	Значение $\Delta\delta^*$ , м.д.					Содержание $\beta$ -изгиба, % <sup>**</sup>
	$\text{NH}_{\text{ind}}$	$\text{NH}_{\text{Trp}}$	$\text{NH}_{\text{Gly}}$	$\text{NH}^{\text{своб}}_{\text{амид}}$	$\text{NH}^{\text{связ}}_{\text{амид}}$	
ГБ-115 <sup>***</sup> (I)	1.59	0.91	1.23	1.76	0.57	65
	2.75	1.35	-	под Arom	0.27	90

\*Значения  $\Delta\delta$  представляют собой разницу химических сдвигов  $\delta$  в DMSO- $d_6$  и  $\text{CDCl}_3$ .

\*\* Содержание  $\beta$ -изгиба (%) в неполярном растворителе рассчитывали по формулам [14]: для соединения ГБ-115 [  $\beta$ -изгиб ] =  $100 - 62\Delta\delta$ ; для соединения (I); [  $\beta$ -изгиб ] =  $100 - 39\Delta\delta$ .

\*\*\* Ввиду плохой растворимости соединения ГБ-115 в чистом  $\text{CDCl}_3$  использовался  $\text{CDCl}_3$ , содержащий 8% DMSO- $d_6$ .

**Таблица 3.** Результаты конформационного исследования методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии в растворе для глицин- и пролинсодержащих дипептидов с различным C-концевым замещением

Соединение		Активность	Значение $\Delta\delta^*$ , м.д.					Тип изгиба
Шифр	Формула		$\text{NH}_{\text{Trp}}$	$\text{NH}_{\text{Gly}}$	$\text{NH}_{\text{NHCH}_3}$	$\text{NH}^{\text{своб}}_{\text{амид}}$ $\text{NH}^{\text{связ}}_{\text{амид}}$	$\text{NH}_{\text{ind}}$	
ГБ-115	$\text{Ph}(\text{CH}_2)_5\text{CO-Gly-Trp-NH}_2$ <sup>**</sup>	+	0.91	1.23	---	1.76 <b>0.57</b>	1.59	$\beta$
(III)	$\text{Ph}(\text{CH}_2)_3\text{CO-Gly-Trp-NHCH}_3$	-	<b>0.93</b>	1.54	1.30	---	2.48	$\gamma$
(IV)	$\text{Ph}(\text{CH}_2)_4\text{CO-Gly-Trp-NHCH}_3$	-	<b>0.92</b>	1.52	1.29	---	2.67	$\gamma$
(I)	$\text{Ph}(\text{CH}_2)_5\text{CO-Pro-Trp-NH}_2$	+	1.35	---	---	под Arom <b>0.27</b>	2.75	$\beta$
(II)	$\text{Ph}(\text{CH}_2)_5\text{CO-Pro-Trp-OC}_2\text{H}_5$	-	<b>0.82</b>	---	---	---	2.77	$\gamma$
(V)	$\text{Ph}(\text{CH}_2)_5\text{CO-Pro-Trp-NHCH}_3$	+	1.48	---	<b>0.80</b>	---	2.77	$\beta$

\*Значения  $\Delta\delta$  представляют собой разницу химических сдвигов  $\delta$  в DMSO- $d_6$  и  $\text{CDCl}_3$ .

\*\* Ввиду плохой растворимости соединения ГБ-115 в среде  $\text{CDCl}_3$  использовали  $\text{CDCl}_3$ , содержащий 8% DMSO- $d_6$ .

**СХЕМЫ**

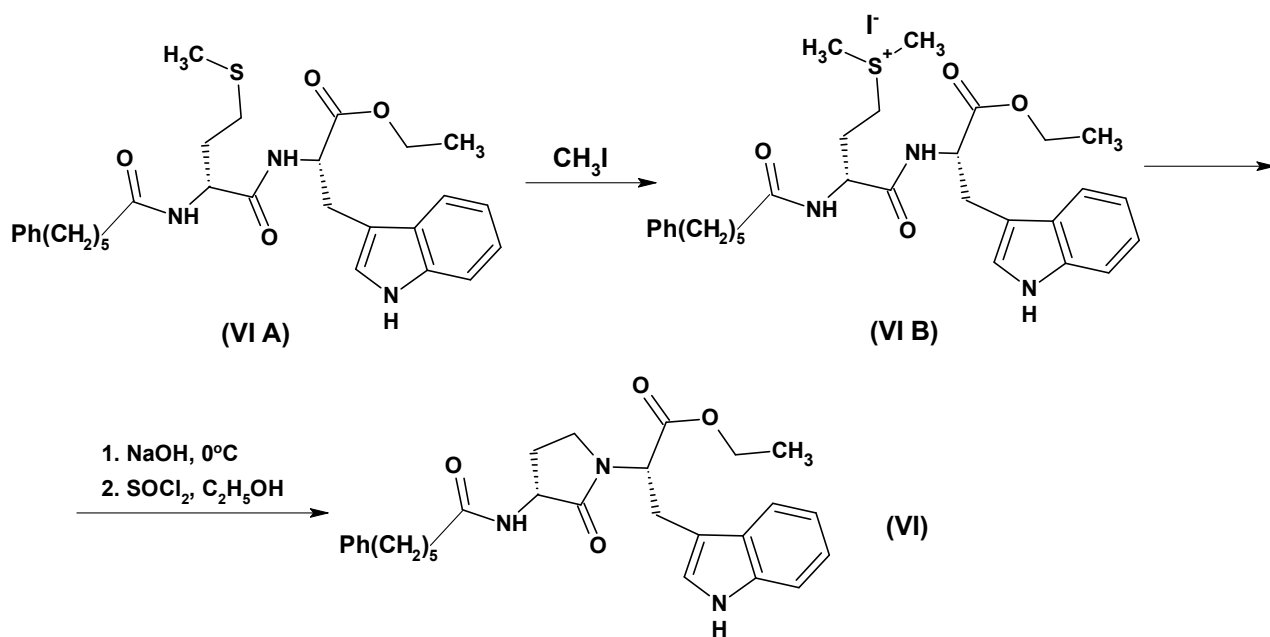


Схема 1. Синтез  $\gamma$ -лактамного аналога (VI).

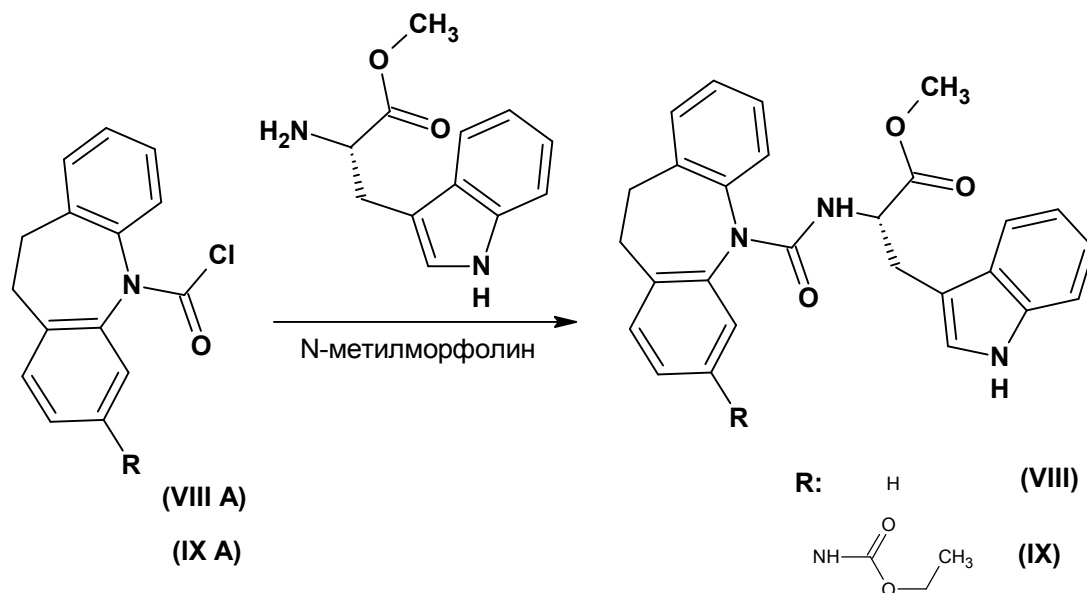
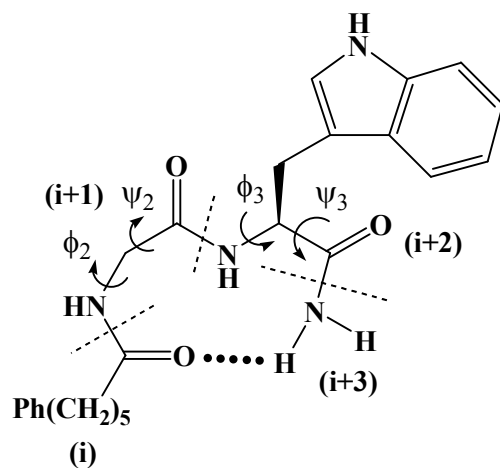
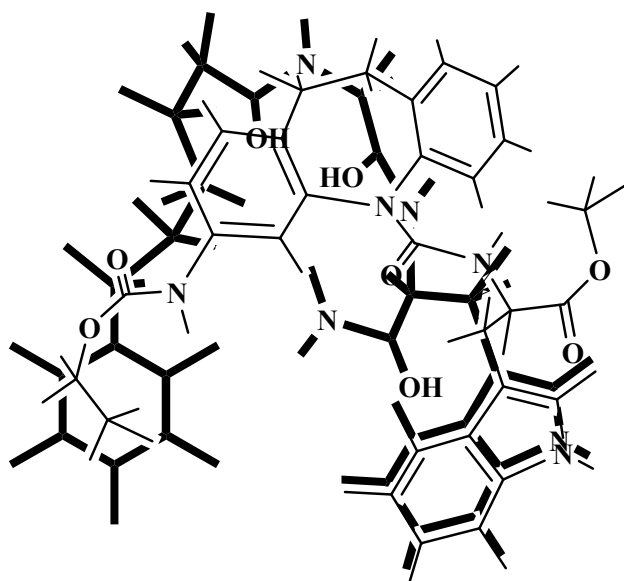


Схема 2. Синтез дибензоазепиновых аналогов (VIII) и (IX).

## РИСУНКИ



**Рис. 1.**  $\beta$ -Изгиб в структуре соединения ГБ-115.



**Рис. 2.** Наложение молекул соединений (IX) и ГБ-115 (жирные линии) в моделях Дрейдинга.



## The Study of Biologically Active Conformation of Cholecystokinin-4 Dipeptide Analog GB-115

© 2013 T. A. Gudasheva<sup>#</sup>, V. P. Lezina, E. P. Kiryanova, O. A. Deeva, L. G. Kolik, S. B. Seredenin

<sup>#</sup> Phone: +7 (495) 601-22-46; fax: +7 (495) 151-12-61; e-mail: [tata-sosnovka@mail.ru](mailto:tata-sosnovka@mail.ru)

Zakusov Institute of Pharmacology Russian Academy of Medical Sciences, Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315, Russia

The conformational analysis with <sup>1</sup>H NMR spectroscopy method in solution and the structure - activity relationship study of a series sterically restricted analogs allowed to detect the possible biologically active conformation of *N*-(6-phenylhexanoyl)glycyl-tryptophan amide (GB-115), a highly active dipeptide cholecystokinin-4 analog with anxiolytic activity. The structure – activity relationship study of GB-115 and the series of its' glycine- and proline-containing analogs with different *C*-terminal substitute detected the anxiolytic activity of compounds with β-turn like conformation and inactivity of compounds with γ-turn like conformation. So, the GB-115 biologically active conformation is β-turn. The results of nuclear Overhauser effect study permitted to qualify the βII-turn conformation as GB-115 biologically active conformation. The following synthesis of sterically restricted GB-115 analogs (2*S*)-2-[(3*R*)-3-[(6-phenylhexanoyl)amino]-2-oxopyrrolidin-1-yl]-3-(1*H*-indol-3-yl)propionic acid ethyl ester, *N*-(6-phenylhexanoyl)glycyl-*N*<sup>α</sup>(methyl)-tryptophan ethyl ester, (2*S*)-2-[10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepin-5-carbonyl)-amino]-3-(1*H*-indol-3-yl)propionic acid methyl ester and (2*S*)-2-[(3-[(ethoxycarbonyl)amino]-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepin-5-yl)carbonyl)amino]-3-(1*H*-indol-3-yl)propionic acid methyl ester confirmed the estimated type of GB-115 biologically active conformation.

**Keywords:** *cholecystokinin-4 dipeptide analog; GB-115; <sup>1</sup>H NMR spectroscopy; biologically active conformation; spatially restricted analogs; conformational analysis*