



УДК 577.175.8'17.05

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
ЛИЗИНСОДЕРЖАЩЕГО ЦИКЛОАНАЛОГА [Leu⁵]ЭНКЕФАЛИНАБоброва И. В., Абиссова Н. А., Розенталь Г. Ф.,
Никифорович Г. В., Чипенс Г. И.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Классическими методами пептидной химии осуществлен синтез циклического аналога энкефалина — *cyclo*(Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) и двух соответствующих линейных гексапептидов, содержащих аминокислотный остаток лизина в начале и конце молекулы: Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu и Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys. Присоединение аминокислотного остатка лизина к N-концу молекулы энкефалина или циклизация этого гексапептида уменьшают воздействие аналогов на центральные и периферические опиатные рецепторы. Присоединение лизина через ε-аминогруппу к C-концу молекулы энкефалина практически не изменяет взаимодействие аналога с μ-типом опиатного рецептора, но примерно в 10 раз снижает его сродство к δ-типу рецептора. Все три синтезированных аналога обладают анальгетической активностью, сопоставимой по величине с активностью [Leu⁵]энкефалина, определенной методом «tail pinch» (прижатие хвоста) при интрацестеральном введении мышам.

В большом количестве работ, появившихся с момента открытия энкефалинов в 1975 г. [1], достаточно убедительно показано, что активность этих соединений обусловлена их взаимодействием с опиатными рецепторами. Предполагают, что существуют по крайней мере пять различных типов опиатных рецепторов (μ, δ, κ, σ и ε), из которых лучше всего охарактеризованы μ- и δ-рецепторы, причем считается, что δ-рецептор — это рецептор с высоким сродством к энкефалинам и низким — к морфину, а μ-рецептор — предпочтительное место связывания морфина.

Взаимодействие пептидного лиганда с рецептором, как известно, требует его определенной пространственной и структурной организации. Поэтому один из возможных путей целенаправленного поиска эффективных аналогов энкефалина можно определить следующим образом: требуется «конструировать» такие аналоги, конформация которых в свободном состоянии была бы как можно более близка к так называемой биологически активной структуре энкефалина — например, циклические аналоги с фиксированной биологически активной конформацией, но сохранившие необходимые для эффективности действия функциональные группы: ароматические ядра боковых цепей остатков Tyr и Phe и N-концевую α-аминогруппу. Циклические аналоги привлекательны также тем, что они оказываются устойчивыми к ферментативному расщеплению. Однако в условиях отсутствия детальных сведений о биологически активных конформациях энкефалина, соответствующих тому или иному типу рецептора (см. [2]), следует учитывать, что синтезируемые циклические аналоги могут обладать выраженной селективностью по отношению к рецепторам.

Для энкефалина известно несколько типов циклоаналогов. Замыкание пептидной цепи молекулы энкефалина по типу «голова к хвосту» [3], а также замыкание цепи через глициновый мостик или через —CH₂—CH₂—NH— приводит к труднорастворимым веществам [4]. С другой стороны, аналоги, циклизованные по типу 2→5, обладают выраженной опиатной активностью [5–7]. Мы предлагаем другой тип циклических аналогов энкефалина, в которых замыкание пептидной цепи проводится

Принятые сокращения: GPI — сегмент подвздошной кишки морской свинки, MVD — семьявыносящий проток мыши, Nal — налоксон, DMF — диметилформамид, OPpF — пентафторфенил.

между ϵ -аминогруппой остатка лизина, присоединенного дополнительно к N-концу [Leu⁵]энкефалина и C-концевой карбоксильной группой лейцина.

При проектировании структуры данного циклоаналога энкефалина мы руководствовались некоторыми известными сведениями по структурно-функциональным отношениям в ряду аналогов энкефалина: 1) присоединение дополнительного остатка лизина к N-концу молекулы энкефалина по данным одних авторов приводит к незначительному ослаблению активности полученного соединения в исследованиях *in vitro* [8], а по данным других авторов даже увеличивает ее [9]; 2) модификация карбоксильной группы энкефалина (амидирование, этерификация и т. д.) обычно увеличивает активность аналогов; 3) аминогруппа N-концевой аминокислоты должна находиться у α -углеродного атома [8].

Для возможности сопоставления биологической активности наряду с циклоаналогом энкефалина — *cyclo*(Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-) (I) нами синтезированы два линейных гексапептида — Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys (II) и Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (III), содержащие остаток лизина в 6-м (остаток присоединен через ϵ -аминогруппу) и в нулевом положении соответственно.

Синтез циклоаналога энкефалина (I) и двух его линейных предшественников (II, III) проводили методом блочной конденсации по схемам 1 и 2. Место сшивки блоков выбирали так, чтобы конденсация фрагментов проходила по оптически неактивному остатку глицина для исключения возможности рацемизации на данной стадии. Циклоаналог (I) и гексапептид (II) синтезировали по схеме 3+3, а гексапептид (III) — по схеме 1+(3+2).

Выбор защитных групп определялся условием сведения к минимуму нежелательных побочных реакций при удалении N^α-защитной группировки на промежуточных стадиях синтеза. Для защиты α -аминогруппы использовали *tert*-бутилоксикарбонильную группу, которую удаляли обработкой раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле в течение 20—30 мин при комнатной температуре. Такая обработка является одним из самых мягких методов удаления защитных групп с синтезированного пептида и, кроме того, позволяет не затрагивать Z-группу боковой цепи лизина. При синтезе использовали тактику максимальной защиты боковых функциональных групп с целью предупреждения побочных реакций на стадии циклизации: ϵ -аминогруппу лизина защищали Z-группой, OH-группу тирозина — Bzl-группой. C-Концевые карбоксильные группы отдельных фрагментов защищали солеобразованием. Остаток тирозина вводили в пептидную цепь в виде его нитрофенилового эфира.

N-Концевой трипептид (IV) синтезировали, используя коммерческий дипептид глицилглицин, и очищали кристаллизацией из абсолютного этанола. C-Концевой трипептид (VI) аналогов (I) и (II) синтезировали методом ступенчатого наращивания пептидной цепи на один аминокислотный остаток, поскольку в этом случае удастся полностью реализовать те преимущества, которые дает использование защитных групп уретанового типа для предотвращения рацемизации в ходе синтеза. Дипептид

Woc-Leu-Z-Lys-OH (V) синтезировали конденсацией пентафторфенилового эфира Woc-лейцина с натриевой солью N^α-Z-лизина. Затем к деблокированному дипептиду (Va) присоединяли пентафторфениловый эфир Woc-фенилаланина и получали защищенный трипептид (VI) с высоким выходом (80%). Продукт хорошо кристаллизовался из смеси этилацетата и петролейного эфира. Конденсацией соответствующих N- и C-концевых фрагментов синтезировали защищенные пента- и гексапептиды (X), (VII). К N-концу пентапептида (X) присоединяли аминокислотный остаток лизина. Гексапептид (VIII) обрабатывали трифторуксусной кислотой и циклизовали.

Циклизацию проводили дифенилфосфорилазидом в диметилформамиде в условиях высокого разбавления циклизуемого вещества (менее

Анальгетическая активность аналогов энкефалина при интрацеребральном введении мышам (метод «tail pinch»)

Соединение	Структура	ED ₅₀ , нмоль/животное	Время максимального эффекта, мин	Продолжительность анальгезии при ED ₆₀₋₈₀ *, мин
(I)	Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu- <u>—</u>	65 *	—	5
(II)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys	120 *	5-15	15
(III)	Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	374 (254-500)	5	5
[Leu ⁵]энкефалин	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	174 (102-281)	5	5

* Доза, вызывавшая анальгетический эффект у 50% испытуемых животных; дальнейшее увеличение дозы приводило к появлению токсических эффектов.

** ED₆₀₋₈₀ — эффективная доза исследуемого вещества, которая вызывает анальгетический эффект у 60-80% подопытных животных.

Таблица 2

Ингибиторная способность (IC₅₀) аналогов энкефалина, исследованная на препаратах подвздошной кишки морской свинки (GPI) и семьявыносящем протоке мыши (MVD)

Соединение	GPI		MVD		GPI/MVD
	IC ₅₀ , нмоль	относительная активность, %	IC ₅₀ , нмоль	относительная активность, %	
(I)	8400±800	3	280±50	7	0,43
(II)	810±130	35	603±58	3	11,6
(III)	7200±2200	4	120±13	16	0,25
[Leu ⁵]энкефалин	285±80	100	20±1	100	1

* Активность по отношению к активности [Leu⁵]энкефалина.

дукт [10]. При использовании нами для циклизации комплекса «F» (пентафторфенол — дициклогексилкарбодимид) продукт реакции выделить не удалось. Полученный с помощью дифенилфосфорилазида защищенный циклический гексапептид (VIII) обладал плохой растворимостью, он выпадал в осадок из диметилформамидного раствора уже по мере протекания реакции. После каталитического гидрирования и очистки циклический аналог энкефалина (I) был получен с общим выходом 27%. Циклическая структура синтезированного соединения (I) была подтверждена масс-спектроскопическим определением молекулярной массы вещества.

Исследование анальгетической активности соединений (I) — (III) при интрацеребральном введении мышам (табл. 1) показало, что присоединение аминокислотного остатка лизина к N-концу молекулы энкефалина (соединение (III)) снижает его активность в 2 раза по сравнению с исходным [Leu⁵]энкефалином. В то же время присоединение лизина к C-концу (соединение (II)) привело к некоторому увеличению анальгетического эффекта, однако с одновременным появлением токсичности (доза 120 нмоль/животное вызывала гибель отдельных животных). Максимальной активностью среди синтезированных соединений обладал циклоаналог (I), однако он оказался и наиболее токсичным. Поэтому для соединений (I) и (II) было невозможно выразить величину активности в виде ED₅₀ и в табл. 1 для них приведена доза, вызывающая анальгетический эффект у 50% испытуемых животных.

Специфический антагонист опиатов палоксон в дозе 1 мг/кг при подкожном введении за 5 мин до внутримозгового введения пептидов приводил к устранению анальгетического действия всех синтезированных

Опиоидная активность аналогов энкефалина, определенная радиорецепторным методом по ингибированию связывания [*D*-Ala², *D*-Leu⁵, [³H]Тур¹]энкефалина (DADLE) * и [³H]налоксона *

Соединение	[³ H]налоксон		DADLE		Индекс Nal/DADLE ***
	IC ₅₀ , нмоль	относительная активность, % **	IC ₅₀ , нмоль	относительная активность, % **	
(I)	796±162	1	823±132	1	1
(II)	9,11±1,14	114	101±14	12	9,5
(III)	29,2±6,2	35	39,9±6,5	29	1,2
[Leu ⁵]энкефалин	10,35±1,57	100	11,74±1,65	100	1

* Разброс величин IC₅₀ соответствует 95% доверительным интервалам.

** Специфическое связывание [Leu⁵]энкефалина принято за 100% активности.

*** Отношение активностей в системах с [³H]налоксоном и DADLE.

соединений, подтверждая тем самым, что они являются лигандами опиатного рецептора.

Влияние аналогов (I)–(III) на периферические опиатные рецепторы изолированного сегмента подвздошной кишки морской свинки (преимущественно μ -рецепторы) и семявыносящего протока мыши (преимущественно δ -рецепторы) оказалось меньшим, чем в случае природного [Leu⁵]энкефалина (табл. 2). Присоединение остатка лизина к N-концу [Leu⁵]энкефалина значительно снизило активность полученного соединения (III) в обоих тестах. Активность циклического аналога (I) в обоих тестах практически не отличалась от активности его линейного предшественника (III). Таким образом, можно предполагать, что циклизация соединения (III) не изменила его сродства к опиатным рецепторам, что является косвенным доказательством близости их пространственной структуры.

Присоединение остатка лизина к C-концу [Leu⁵]энкефалина через ϵ -аминогруппу (II) также вызвало снижение активности в исследованиях на изолированных органах, но в разной степени: влияние на δ -тип рецепторов снизилось до 3% (по сравнению с [Leu⁵]энкефалином), а на μ -тип — лишь в 3 раза (35%), т. е. аналог (II) на порядок (индекс GPI/MVD=11,6) более селективен, чем [Leu⁵]энкефалин.

Исследования синтезированных нами соединений радиорецепторным методом по ингибированию связывания ³H-меченых налоксона (Nal, антагонист рецепторов μ -типа) и [*D*-Ala², *D*-Leu⁵]энкефалина (DADLE, стандартный антагонист рецепторов δ -типа) на гомогенатах мозга крыс дополняют результаты экспериментов, описанных выше, и позволяют определить сродство исследуемых пептидов к μ - и δ -типам опиатных рецепторов (табл. 3). Соединение (III) и циклоаналог (I) так же, как и на периферических рецепторах, продемонстрировали общее снижение активности, причем равномерно по обоим типам рецепторов, а аналог (II) показал снижение сродства только к δ -типу рецептора, не изменив при этом сродства к μ -типу, т. е. аналог, образованный присоединением остатка лизина к C-концу [Leu⁵]энкефалина через ϵ -аминогруппу, обладал на порядок большей селективностью к рецепторам μ -типа (индекс Nal/DADLE=9,5), чем природный [Leu⁵]энкефалин. Сопоставление данных табл. 2 и 3 свидетельствует о корреляции результатов, полученных в исследованиях с рецепторами периферических тканей и с рецепторами мозга.

Экспериментальная часть

Для синтеза аналогов энкефалина использовали аминокислоты и их производные фирмы Reanal (Венгрия). Все аминокислоты имели *L*-конфигурацию. Температуру плавления веществ определяли в капилляре (без

Характеристика синтезированных пептидов

Соединение	Структура	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{22}$, град	R_f (система)
(I)	Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	—	+32,2 (с 0,5; 0,2 н. АсОН)	0,62 (Б) [*] М; 0,76 (Г)М
(II)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys	—	+6,5 (с 1,08; 0,2 н. АсОН)	0,56 (Б)М; 0,50 (Г); 0,76 (Б)
(III)	Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	—	+14,2 (с 1; 0,2 н. АсОН)	0,52 (Б)М; 0,65 (Г)
(IV)	Вос-Tyr (Bzl)-Gly-Gly	160–162	–6 (с 1, DMF)	0,60 (А); 0,51 (Д)М; 0,81 (Б)М
(V)	Вос-Leu-Z-Lys	Масло	–12,3 (с 1,68, DMF)	0,82 (А)
(VI)	Вос-Phe-Leu-Z-Lys	173–175	–14,3 (с 1, DMF)	0,78 (А); 0,66 (Д)М; 0,74 (Б)М
(VII)	Вос-Tyr (Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-Z-Lys	Аморф.	–12,7 (с 1, DMF)	0,65 (А); 0,72 (Д)М; 0,70 (Б)М
(IX)	Вос-Phe-Leu	143–145	–8,8 (с 1, DMF)	0,73 (А); 0,78 (Д)М
(X)	Вос-Tyr (Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu	—	+34 (с 0,95, MeOH)	0,72 (А); 0,70 (Д)М; 0,76 (Б)М
(XI)	Вос-Lys (Z)-Tyr (Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu	—	—	0,60 (А); 0,75 (Д)М; 0,82 (Б)М

* 0,62 (Б)М – R_f на пластинках Мерск.

коррекции). Индивидуальность соединений контролировали ТСХ на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧССР) или на стеклянных пластинках с закрепленным слоем силикагеля Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ). Использовали следующие системы растворителей: хлороформ — этанол — уксусная кислота, 85:10:5 (А); *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 15:10:3:6 (Б); 15:12:3:10 (В); хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 30:20:4:6 (Г); 60:18:2:3 (Д), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (Е); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 60:5:1,5:3 (Г). Хроматограммы проявляли нингидриновым и хлор-бензидиновым реагентами. Электрофорез пептидов проводили на бумаге FN-16 (ГДР) в 1 н. уксусной кислоте при напряжении 900 В; электрофоретическая подвижность показана по отношению к гистидину (E_{HIS}).

Удельное оптическое вращение пептидов измеряли на автоматическом цифровом поляриметре Perkin — Elmer 141 М (США), длина кюветы 1 дм. Кислотный гидролиз проводили в 6 н. HCl при 120°С в течение 24 ч. Аминокислотный состав определяли на анализаторе Jeol-3. Молекулярная масса циклопептида определена масс-спектрометрически на приборе CN-5 Varian MAT (США) при 250°С и ионизирующем напряжении 70 эВ.

Защищенные пептиды очищали на хроматографических колонках фирмы Merck: size В (310—25); size С (440—37), заполненных силикагелем с размером частиц 40—63 и 63—125 мкм соответственно. Очистка конечных продуктов проведена ионообменной хроматографией на СМ-целлюлозе (Whatman СМ-32) и/или обращенно-фазовой жидкостной хроматографией на хроматографе Du Pont 830 с использованием колонки Zorbax С₈. Фракции контролировали с помощью детектора Uvicord II (ЛКВ, Швеция) при 254 нм или Uvicord III (ЛКВ) при 206 и 280 нм. Характеристики синтезированных пептидов приведены в табл. 4.

1. *Woc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly* (IV). 2,64 г (20 ммоль) глицилглицина растворяли при перемешивании в 20 мл 1 н. NaOH, затем добавляли 1,68 г (20 ммоль) NaHCO₃, 40 мл DMF и 9,85 г (20 ммоль) *Woc-Tyr(Bzl)-ONp*, растворенного в 40 мл DMF. В загустевшую реакционную массу добавили еще 20 мл DMF и перемешивали 2 ч при 0°С, затем 48 ч при 20°С. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (200 мл) и водой (до разделения слоев), охлаждали до 0°С и подкисляли 5% раствором KHSO₄ до pH 3. Этилацетатный слой отделяли, водную фазу экстрагировали повторно. Объединенный этилацетатный слой промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над безводным Na₂SO₄. Кристаллический осадок, полученный после отгонки этилацетата, растирали с эфиром и перекристаллизовывали из этанола. Выход трипептида (IV) 7,06 г (73%).

2. *Woc-Leu-Z-Lys* (V). 3,64 г (13 ммоль) *Z-Lys* растворяли при перемешивании и охлаждении в 26 мл 0,5 н. NaOH, добавляли 1,09 г (13 ммоль) NaHCO₃, 40 мл DMF и 5,16 г (13 ммоль) *Woc-Leu-OPfp*, растворенного в 10 мл DMF. Смесь перемешивали 1 ч, реакционную массу обрабатывали как описано в опыте 1 и выделяли дипептид (V) в виде масла. Защищенный дипептид хроматографировали на колонке с силикагелем (size С) в системе: хлороформ — этанол — этилацетат — уксусная кислота — вода, 185:5:8:2:0,25. Фракции, содержащие дипептид (V), собирали, растворитель отгоняли. После сушки в вакууме получили 4,5 г (70%) защищенного дипептида (V) в виде масла.

3. *Woc-Phe-Leu-Z-Lys* (VI). 4,2 г (8,52 ммоль) дипептида (V) растворяли в 20 мл 50% раствора трифторуксусной кислоты в дихлорметане и выдерживали 20 мин при 18°С. Растворитель отгоняли, остаток растирали с эфиром. Образовавшийся осадок отфильтровывали, вновь промывали эфиром на фильтре и высушивали в вакууме. Получили 4,1 г (95%) трифторацетата дипептида (Va), *R*, 0,05 (A).

3,8 г (7,5 ммоль) трифторацетата дипептида (Va) растворяли при перемешивании в 7,5 мл 1 н. NaOH, охлаждали и добавляли 25 мл DMF, 0,63 г (7,5 ммоль) NaHCO₃ и 3,23 г (7,5 ммоль) *Woc-Phe-OPfp*, растворенного

в 20 мл DMF. Смесь перемешивали 3 ч и затем выделяли трипептид (VI) аналогично выделению соединения (IV). После перекристаллизации из смеси этилацетат — петролейный эфир (2:1) получили 3,84 г (80%) защищенного трипептида (VI).

4. *Woc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-Z-Lys* (VII). 4,85 г (10 ммоль) *Woc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly* (IV) растворяли в 30 мл этилацетата, охлаждали до 0° С и при перемешивании добавляли 2,02 г (11 ммоль) пентафторфенола и 2,26 г (11 ммоль) дициклогексилкарбодимида, растворенных в этилацетате. Через 2 ч реакционную смесь охлаждали до -10° С, выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали, растворитель отгоняли, остаток растирали с гексаном. Полученный осадок отфильтровывали, вновь промывали гексаном и сушили в вакууме. Получали 5,8 г (80%) пентафторфенилового эфира трипептида (IVa), который использовали далее без дополнительной очистки.

6,4 г (10 ммоль) трипептида (VI) деблокировали как описано в опыте 3. Выход трифторацетата трипептида (VIa) 6,0 г (92%), R_f 0,25 (A).

65,9 г (9 ммоль) трифторацетата трипептида (VIa) растворяли в 25 мл DMF и при перемешивании и охлаждении до 0° С добавляли 2 мл (18 ммоль) *N*-метилморфолина в 5 мл DMF и 5,8 г (9 ммоль) пентафторфенилового эфира (IVa), растворенного в 20 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 4 ч и после завершения реакции (хроматографический контроль) обрабатывали аналогично соединению (IV). Продукт после отгонки растворителя переосаждали из спирта эфиром, затем очищали на колонке с силикагелем (size C) аналогично соединению (V). Выход защищенного гексапептида (VII) 3,4 г (34%).

5. *Cyclo(-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-Z-Lys-)* (VIII). 180 мг (0,178 ммоль) гексапептида (VII) растворяли в 1 мл 70% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле и выдерживали 30 мин. Растворитель отгоняли, остаток растирали с эфиром и сушили в вакууме. Выход трифторацетата гексапептида (VIIa) 180 мг (99%).

180 мг (0,176 ммоль) трифторацетата (VIIa) растворяли в 200 мл очищенного DMF, охлаждали до -20° С, прибавляли триэтиламин до pH 7,2 и медленно, по каплям приливали 0,08 мл (0,4 ммоль) дифенилфосфорилазида в 40 мл DMF. Раствор перемешивали 7 сут, поддерживая pH реакционной массы ~7 периодическим добавлением триэтиламина. По мере протекания реакции циклический продукт выпадал в осадок. Растворитель отгоняли при 40° С, к остатку приливали 1–1,5 мл этилацетата. Нерастворившуюся часть отфильтровывали, сушили в вакууме, получали 130 мг белого порошка защищенного циклического гексапептида (VIII). Ввиду плохой растворимости (VIII) хроматографическую очистку не проводили.

6. *Cyclo(-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-)* (I). К суспензии 100 мг (0,112 ммоль) циклоаналога (VIII) в 5 мл DMF и 15 мл уксусной кислоты добавляли палладиевую чернь и гидрировали в течение 5 сут. По мере гидрирования пептид (VIII) растворялся. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растирали с эфиром, отфильтровывали, промывали эфиром на фильтре и сушили в вакууме над гидроокисью калия. Полученный продукт очищали на CM-целлюлозе (CM-32) в линейном градиенте аммоний-ацетатного буфера (0,01 M, pH 4,4→0,25 M, pH 7,3). Соответствующие фракции (контроль ТСХ) собирали и лиофилизировали. Выход циклогексапептида (I) 25 мг (33%), Масс-спектр, m/z : 666 ($[M+H]^+$, 2%), 688 ($[M+Na]^+$, 100%), 704 ($[M+K]^+$, 63%). Аминокислотный анализ: Tyr 0,75; Gly 2,13; Phe 0,82; Leu 1,00; Lys 0,89.

7. *Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys* (II). К 250 мг (0,24 ммоль) гексапептида (VIIa) в 15 мл метанола, 1 мл уксусной кислоты и 0,5 мл воды добавляли палладиевую чернь и гидрировали несколько часов (хроматографический

контроль). Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток растирали с эфиром и сушили в вакууме над КОН. Полученный продукт очищали на СМ-целлюлозе в линейном градиенте аммоний-ацетатного буфера 0,01 М, рН 4,4→0,05 М, рН 7,1. Соответствующие фракции (контроль ТСХ) собирали и лиофилизировали. Выход аналога (II) 130 мг (79%). Аминокислотный анализ: Tyr 0,95; Gly 2,18; Phe 1,02; Leu 1,00; Lys 0,98.

8. *Woc-Phe-Leu (IX)*. К 3,28 г (25 ммоль) лейцина прибавляли 25 мл 1 н. NaOH, перемешивали, затем прибавляли 2,1 г (25 ммоль) NaHCO₃, 20 мл DMF и 10,80 г (25 ммоль) *Woc-Phe-OPfp*, растворенного в 25 мл DMF. После завершения реакции (~1 ч) реакционную смесь обрабатывали и выделяли продукт (IX) аналогично соединению (IV). Осадок перекристаллизовывали из смеси этилацетата, петролейного эфира и диэтилового эфира и получили 7,40 г (78%) дипептида (IX).

9. *Woc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu (X)*. 4 г (10,6 ммоль) дипептида (IX) растворяли в 8 мл 70% раствора трифторуксусной кислоты в CH₂Cl₂ и выдерживали 20 мин при 18° С. Растворитель отгоняли, остаток растирали с эфиром и сушили в вакуум-эксикаторе над КОН. Получили 3,9 г (94%) трифторацетата (IXa).

Этилацетатный раствор, содержащий 5,8 г (12 ммоль) *Woc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly*, охлаждали до 0° С и при перемешивании добавляли раствор 2,3 г (14 ммоль) пентафторфенола и 2,9 г (14 ммоль) дициклогексилкарбодимида в этилацетате. Через 1,5–2 ч смесь охлаждали до –10° С, отфильтровывали выпавшую дициклогексилмочевину, растворитель отгоняли. Остаток растирали с гексаном и высушивали в вакуум-эксикаторе. Выход соединения (IVa) 6,5 г (83%).

3,9 г (10 ммоль) трифторацетата дипептида (IXa) растворяли в 50 мл DMF, охлаждали до 0° С, добавляли при перемешивании 1,7 мл (10 ммоль) диизопропилэтиламина в 7 мл DMF и 6,5 г (10 ммоль) пентафторфенилового эфира (IVa). Реакционную массу перемешивали 4 ч и после завершения реакции обрабатывали аналогично соединению (IV). Продукт выпал в осадок из частично упаренного этилацетатного раствора. Получено 3,87 г (52%) пентапептида (X).

10. *Woc-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu (XI)*. 1 г (1,34 ммоль) пентапептида (X) обрабатывали раствором трифторуксусной кислоты как описано для соединения (V). Получили 1 г (98%) трифторацетата (Xa) с R_f 0,42 (A).

1 г (1,3 ммоль) трифторацетата пентапептида (Xa) растворяли в 45 мл DMF, прибавляли 0,22 мл (1,3 ммоль) диизопропилэтиламина и 0,7 г (1,3 ммоль) *Woc-Lys(Z)-OPfp* в 10 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 4 ч и после завершения реакции (хроматографический контроль) обрабатывали аналогично соединению (IV). Полученный в виде масла гексапептид (XI) очищали на колонке с силикагелем (size B) аналогично соединению (V).

11. *Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (III)*. 1,1 г (1,1 ммоль) гексапептида (XI) растворяли в смеси 50 мл метанола, 5 мл уксусной кислоты и 1 мл воды, добавляли палладиевую чернь и гидрировали 6 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток растирали с эфиром и сушили в вакууме. Полученный осадок растворяли в 20 мл 70% раствора трифторуксусной кислоты в дихлорметане и выдерживали 30 мин. Растворитель отгоняли, остаток растирали с эфиром и сушили в вакууме. Продукт (1035 мг) очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией на колонке Zorbax C₈ с элюированием смесью этанол–0,1 М ацетат аммония, 20:80. Соответствующие фракции (контроль ТСХ) собирали и лиофилизировали. Выход 450 мг (58%) гексапептида (III). Аминокислотный анализ: Tyr 0,93; Gly 2,47; Phe 1,10; Leu 1,00; Lys 0,92.

Биологическую активность аналогов энкефалина исследовали в опытах *in vivo* и *in vitro*.

Анальгетическую активность определяли по методу Уеда и сотр. [41]. Опыты проводились на беспородных мышках-самцах массой 18–22 г. Исследуемые вещества, растворенные в стерильном физиологическом растворе, вводили при помощи J-образной иглы в *cisterna magna* мозга неанесте-

зированных мышей в количестве 10 мкл. Контрольным животным вводили 10 мкл стерильного физиологического раствора. Каждая экспериментальная группа состояла из 10 мышей. Анальгетический эффект соединений оценивали по тесту «прижатие хвоста» при помощи артериального зажима, который накладывали на основание хвоста. Определение болевой реакции проводилось через 5, 15, 30, 60 и 90 мин после введения и затем каждые 30 мин до исчезновения анальгетической реакции. При вычислении ED_{50} использовали метод Литчфильда и Уилкоксона [12].

Влияние пептидов на периферические опиатные рецепторы определяли по их способности угнетать вызванные электрической стимуляцией сокращения сегмента продольной мышцы подвздошной кишки (с мезентериальным нервным сплетением) морской свинки и изолированного семявыносящего протока мыши. Продольную мышцу подвздошной кишки морской свинки любого пола (вес 350–500 г) после вскрытия брюшной полости осторожно отделяли от подлежащей циркулярной мышцы и помещали в ванночку с раствором Кребса при 36° С. Раствор постоянно аэрировали. К ткани прилагали постоянную нагрузку 0,2 г. Ткань стимулировали с помощью кольцевых платиновых электродов одиночными импульсами продолжительностью 1 мс, которые подавали с частотой 0,1 Гц. Регистрацию сокращений в изометрическом режиме проводили датчиком ТВ-611Т, соединенным с полиграфом Nihon Kohden (Япония).

Семявыносящий проток безлинейных мышей (вес 27–30 г) помещали в ванночку с модифицированным раствором Кребса (не содержащим сульфата магния) при 31° С. Исследуемые вещества растворяли в дистиллированной воде. Ингибирующую активность соединений определяли путем накопления доз, добавляя нарастающие концентрации исследуемых соединений без отмывки. Активность препаратов выражали показателем IC_{50} в ммоль/л (концентрация, вызывающая 50% ингибирование сокращений органа). Результаты, полученные в 8–10 опытах, обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента t . В табл. 4 IC_{50} представлена с доверительными интервалами при P 0,05.

Специфическое связывание синтезированных соединений с опиатным рецептором. В работе использовали белых крыс весом 150–200 г. Крыс декапировали, быстро извлекали на холоду головной мозг, мозжечок отсекали, а оставшуюся часть помещали в холодный (4° С) 50 мМ трис-НСI-буфер, рН 7,55 (буфер А), из расчета 20 мл буфера на мозг одной крысы, и измельчали в гомогенизаторе типа стекло – тефлон. Суспензию центрифугировали при 49 000g в течение 10 мин при 4° С. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок суспендировали в первоначальном объеме буфера А и повторяли центрифугирование в тех же условиях. Надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспендировали при помощи миксера ВП в буфере А (из расчета 80 мл/мозг одной крысы). Реакцию связывания налоксона и [D -Ala², D -Leu⁵]энкефалина с опиатным рецептором проводили в пластиковых центрифужных пробирках в течение 2 ч в ледяной ванне. Реакционная смесь содержала 1,0 мл мембранной суспензии, 1,0 нМ [³H]налоксон (удельная радиоактивность 58,4 Ки/ммоль, NEN, США) или 1,0 нМ [D -Ala², D -Leu⁵, [³H]Tyr¹]энкефалин (удельная радиоактивность 41 Ки/ммоль, Великобритания) и исследуемый пептид в различных концентрациях.

После инкубации (1 ч) пробирки центрифугировали при 15 000 об/мин на центрифуге К-24 (ГДР) в течение 5 мин при 2–4° С. Надосадочную жидкость сливали, осадок ополаскивали водой и стенки пробирки протирали. Остаток тщательно суспендировали в 200 мкл воды; 150 мкл суспензии переносили во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости по Кинарду и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике Tri-Carb 3380, Packard (США). Специфическое связывание с опиатным рецептором определяли как разницу в связывании метки в отсутствие и в присутствии 1 мкМ опиоидного лиганда налорфина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R. *Nature*, 1975, v. 258, p. 577-579.
2. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. В кн.: Конформации пептидных биорегуляторов. М.: Медицина, 1983.
3. Kessler H., Holzemann G. *Angew. Chem. Int. Eds. Engl.*, 1981, v. 20, № 1, p. 124-125.
4. Hudson D., Sharpe R., Szekle M. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1980, v. 15, p. 122-129.
5. DiMaio J., Schiller P. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 12, p. 7162-7166.
6. DiMaio J., Thi M.-D. Nguyen, Lemieux C., Schiller P. W. *J. Med. Chem.*, 1982, v. 25, p. 1432-1438.
7. Mosberg H. I., Hurst R., Hruby V. J., Gee K., Akiyama K., Yamamura H. I., Galigan J. J., Burks T. F. *Life Sci.*, 1983, v. 33, Sup. 1, p. 447-450.
8. Gacel G., Fournie-Zaluski M.-C., Fellion E., Roques B. P., Senault B., Lecomte J.-M., Maljroy B., Swerts J.-P., Schwartz J.-C. *Life Sci.*, 1979, v. 24, p. 725-732.
9. Dutta A. S., Gormley J. J., Hayward C. F., Morley J. S., Shaw J. S., Stacey G. J., Turnbull M. T. *Acta Pharm. Suec.*, 1977, Suppl. 14, p. 14-15.
10. Brady S. F., Varga S. L., Freidinger R. M., Schwenk D. A., Mendlowsky M., Holby F. M., Veber D. F. *J. Org. Chem.*, 1979, v. 44, p. 3101-3103.
11. Ueda H., Amano H., Shiomi H., Takagi H. *Eur. J. Pharmacol.*, 1979, v. 56, p. 265-268.
12. Litchfield J. T., Wilcoxon J. R. and F. J. *Pharmacol. Exp. Therap.*, 1949, v. 96, p. 99-113.

Поступила в редакцию
26.III.1985

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF A LYSINE-CONTAINING CYCLIC ANALOGUE OF [Leu⁵]ENKEPHALIN

BOBROVA I. V., ABISSOVA N. A., ROSENTHAL G. F.,
NIKIFOROVICH G. V., CHIPENS G. I.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the
Latvian SSR, Riga*

The cyclic analogue of [Leu⁵]enkephalin — *cyclo*(Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) and two corresponding linear hexapeptides with lysine residue attached to the N- or C-terminus of the molecule have been synthesized by classical methods of peptide chemistry. The addition of lysine residue to the N-terminus of cyclization of the molecule reduce the interaction of these analogues with both central and peripheral opiate receptors. The addition of lysine residue to the C-terminus of the molecule through the ε-amino group does not affect the interaction of the analogue with μ-receptors but reduces approximately tenfold its affinity for δ-receptors. All three analogues have analgesic potency similar to that of [Leu⁵]enkephalin as assayed after intracisternal administration to mice.