



УДК 547.964.4 : 577.175.82'17

СИНТЕЗ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
И КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АНАЛОГОВ
ЭНКЕФАЛИНА, СТРУКТУРНО РОДСТВЕННЫХ КИОТОРФИНАБоброва И. В., Абиссова Н. А., Подиный Л. У.,
Вестерман Б. Г., Никифорович Г. В., Чипенс Г. Ш.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Классическими и твердофазным методами пептидной химии получены [D-Arg², Leu⁶]энкефалин и две серии его N-концевых укороченных аналогов со свободной и модифицированной C-концевой карбоксильной группой — амиды и этиловые эфиры три- и тетрапептидов. Изучена их анальгетическая активность (метод «tail pinch») при интракостеральном и внутривенном введении мышам в сравнении с природными энкефалинами и морфином. Для изучения пространственной структуры проведены конформационные расчеты синтезированных соединений и с помощью флуоресцентной спектроскопии измерены расстояния между ароматическими ядрами аминокислотных остатков тирозина и фенилаланина в двух тетрапептидах.

Показано, что этиловые эфиры три- и тетрапептидов обладают анальгетической активностью, на порядок более высокой, чем соответствующие пептиды со свободным карбоксилем или с C-концевой амидной группой. Тетрапептидные аналоги в отличие от пентапептида активны при внутривенном введении. Подробно обсуждаются конформационные возможности этой серии аналогов: показано, что резкое повышение активности при переходе от три- к тетрапептидам не связано с конформационными изменениями.

Киоторфин — дипептид Tyr-Arg, выделенный из мозга быка [1], и его аналог — Tyr-D-Arg (D-киоторфин) проявляют при центральном введении обратимый налоксоном анальгетический эффект, более сильный, чем эффект, вызываемый энкефалинами [1—3]. В то же время киоторфин в отличие от энкефалинов и ряда других опиоидных пептидов не связывается со специфическими опиоидными рецепторами, на что указывают данные биологического тестирования, проводимого на изолированных органах [4], и радиорецепторного анализа [2, 4]. Кубота и соавт. [5] синтезировали несколько аналогов, содержащих последовательность киоторфина и D-киоторфина в своей N-концевой части. Такаги с соавт. [6] изучили анальгетический эффект аналогов [Arg²]энкефалина, полученных последовательным элиминированием C-концевых аминокислотных остатков. Было показано, что анальгетическая активность резко падает при переходе от тетра- к трипептидному фрагменту, т. е. при удалении остатка фенилаланина, причем как тетра-, так и пентапептиды обладают выраженным сродством к опиоидному рецептору.

Для дальнейшего изучения структурно-функциональной организации D-Arg²-содержащих аналогов опиоидных пептидов с целью увеличения фармакологического эффекта аналогов *in vivo* мы синтезировали две серии N-концевых укороченных аналогов [D-Arg², Leu⁵]энкефалина (II) — (VIII) со свободной и модифицированной C-концевой группой (серия трипептидов и тетрапептидов) (табл. 1).

С помощью методов теоретического конформационного анализа были тщательно рассмотрены конформационные особенности пептидов со свободной C-концевой карбоксильной группой и их амидов; это рассмотрение помогло ответить на вопрос, не является ли наблюдавшееся в работе [6] резкое падение сродства к опиоидному рецептору следствием измене-

Принятые сокращения: DMF — диметилформамид, DCC — N,N'-дихлорогексилкарбодимид, Np — *n*-нитрофенил, Pfp — пентафторфенил, HOEt — 1-гидроксибензотриазол, TFA — трифторуксусная кислота, TosOH — *n*-толуолсульфокислота, DIEA — N,N-диизопропилэтиламин.

Физико-химические свойства синтезированных аналогов энкефалина

Таблица 1

Номер соединения	Структура соединений	R _f в системах				Аминокислотный состав					ВЭЖХ**				
		[α] _D ²⁵ в 0,2 М СCl ₃ SOH (концентрация)				B	Г	другие системы	Tyr	Gly	Phe	Arg	Leu	состав подвижной фазы 4*	коэффициент емкости (k')
		+	-	0,22	0,51										
I	Tyr-D-Arg	+63,8 (0,3)	-	0,56 2*	-	-	0,1 E 2*	0,87	-	-	1,00	-	5*	1,5	
II	Tyr-D-Arg-Gly	+54,8 (1)	0,22	-	-	-	0,05 E	0,78	4,90	-	1,24	-	5 : 95**	4,3	
III	Tyr-D-Arg-Gly-NH ₂	+53,0 (1)	0,51	-	-	-	0,28 E	0,87	1,00	-	4,10	-	6 : 94	4	
IV	Tyr-D-Arg-Gly-OEt	+100,6 (0,53)	-	-	0,63	-	0,55 D	0,92	1,00	-	4,13	-	3 : 97	6,7	
V	Tyr-D-Arg-Gly-Phe	+46,6 (1)	-	0,50	0,40	-	-	0,93	1,90	1,10	0,86	-	10 : 90	3,2	
VI	Tyr-D-Arg-Gly-Phe-NH ₂	+43,3 (1)	-	0,62	0,75	-	-	0,87	1,90	1,04	0,97	-	10 : 90	7,3	
VII	Tyr-D-Arg-Gly-Phe-OEt	+23,7 (1) *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VIII	Tyr-D-Arg-Gly-Phe-Leu	+64 (0,4)	0,63	0,63	0,81	-	0,28 E	0,85	1,00	0,93	0,95	-	20 : 80 7*	3,8	
		+25,2 (0,5)	0,84 2*	-	0,35	-	-	0,69	1,00	0,72	0,87	-	25 : 75	2,3	

* Раствор в метаноле. ** Хроматография выполнена из пластинок Siufof, в о-стальных случаях — на пластинках Merck. *** Для анализа пептидов использовали жидкостный хроматограф фирмы Du Pont 8800 с УФ-спектрофотометром (λ=220 нм), колонка Zorbax ODS (для соединений III и IV), в остальных случаях колонка Zorbax Sa. * Где не отмечено особо — ацетонитрил — 0,1 М ацетат аммония, pH 5. ** Ацетонитрил — 0,1 М ацетат аммония, pH 5. *** Этанол — 0,1 М ацетат аммония, pH 5.

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

Таблица 2

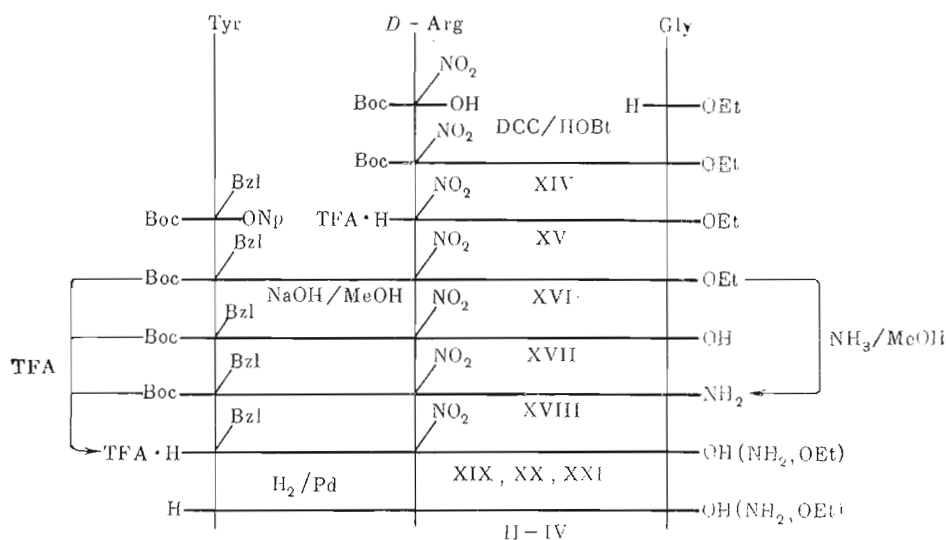
Номер соединения	Соединение	ED ₅₀ , нмоль/животное *	Время максимального эффекта, мин	Продолжительность аналгезии ED ₅₀ -95, мин	Относительная аналгетическая активность**			Анальгетическая активность при внутривенном введении***
					А	Б	В	
I	Tyr-D-Arg	31 (20-49)	5	30	6	0,09	0,04	-
II	Tyr-D-Arg-Gly	103 (76-150)	5-15	15	1,7	0,03	0,02	×
III	Tyr-D-Arg-Gly-NH ₂	66 (25-171)	5	15	2,6	0,04	0,02	×
IV	Tyr-D-Arg-Gly-OEt	8,6 (4,5-16,4)	15	30	20	0,32	0,1	-
V	Tyr-D-Arg-Gly-Phe	0,4 (0,1-1,6)	5-15	90	435	7	3	+
VI	Tyr-D-Arg-Gly-Phe-NH ₂	2,5 (0,9-7,2)	15	120	70	1,12	0,5	+
VII	Tyr-D-Arg-Gly-Phe-OEt	0,99 (0,07-0,12)	15	60	1933	31	13	+
VIII	Tyr-D-Arg-Gly-Phe-Leu	2,8 (1,1-6,7)	5	30	62	1	0,4	-
IX	Tyr-Gly-Phe-Phe-Met	154 (90-261)	5-15	15	1,1	0,018	0,008	-
X	Tyr-Gly-Phe-Phe-Leu	174 (102-281)	5	15	1	0,02	0,007	-
XI	Морфин	1,2 (0,6-2,2)	5-15	60	145	2,3	1	+
XII	β-Эндорфин [9]	0,096 (0,058-0,157)	15-30	90	-	-	12,5	+
XIII	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-NH ₂ [9]	0,58 (0,39-0,92)	5	30	300	-	2	+

* В скобках указаны пределы доверительного интервала по уровню 0,95. ** Анальгетическая активность подсчитана по отношению к [Leu⁵]энкефалину (X). (A), [D-Arg², Leu⁵]энкефалину (VIII) (B), морфину (V), активность которых принята за единицу. *** Соединение не обладает активностью (-), обладает аналгетической активностью (+), не проверялось (X).

ния конформации фрагмента Тyр-*D*-Arg при удалении остатка фенилаланина. Были получены также сведения о пространственном строении молекулы тетрапептида (V) и его амида (VI) в водном растворе: с помощью методов флуоресцентной спектроскопии измерялись расстояния между хромофорами остатков Тyр¹ и Phe⁴.

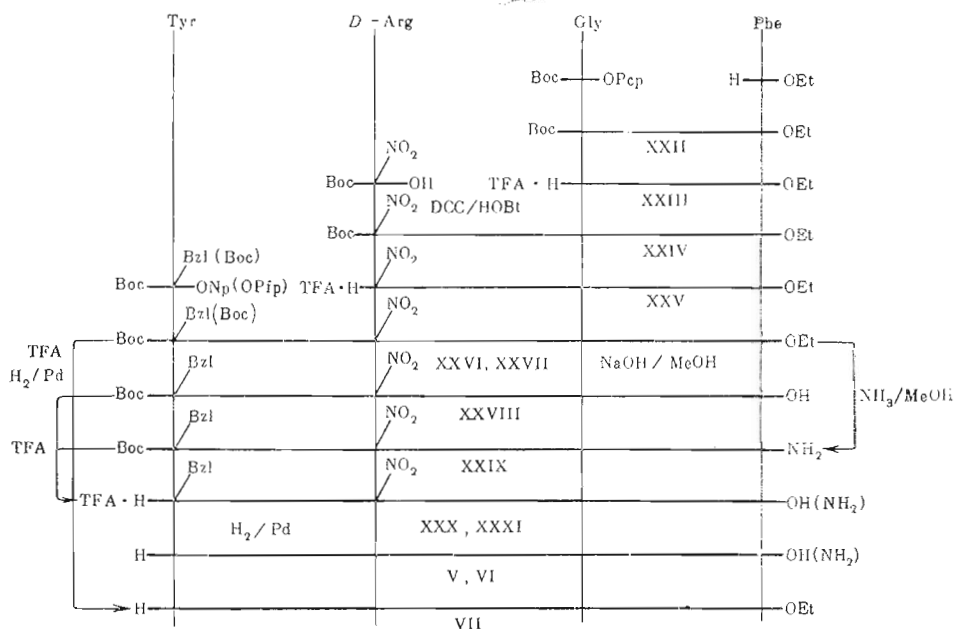
Синтез аналогов энкефалина (I)–(VII) проводили классическими методами пептидной химии в растворе (схемы 1, 2), аналога (VIII) — модифицированным твердофазным методом.

Схема 1



Синтез *D*-Arg²-содержащих трипептидных аналогов энкефалина

Схема 2



Синтез *D*-Arg²-содержащих тетрапептидных аналогов энкефалина

D-Киоторфин (I) синтезировали по методу, предложенному в работе [7].

Три- и тетрапептиды (II) — (VII) получали последовательным наращиванием пептидной цепи по одной аминокислоте, используя *n*-нитро-

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

Номер соединения	Соединение	ED_{50} , мкмоль/кг	Время максимального эффекта, мин	Продолжительность анальгезии при ED_{50-80} , мин	Относительная анальгетическая активность, %
V	Tyr-D-Arg-Gly-Phe	28(16-50)	15	30	64
VI	Tyr-D-Arg-Gly-Phe-NH ₂	41(26-64)	5-15	60	44
VII	Tyr-D-Arg-Gly-Phe-OEt	29(20-37)	5-15	60	60
XI	Морфин	18(15-22)	5-15	60	100

Таблица 4

Низкоэнергетические конформации пептидного остова дипептидов Tyr-Arg (киоторфин) и Tyr-D-Arg (D-киоторфин)

Киоторфин		D-Киоторфин	
Структура	ΔU , квал/моль	Структура	ΔU , квал/моль
<i>BB</i>	0,0	<i>BH</i>	0,0
		<i>BR</i>	7,2
		<i>RH</i>	6,6

пентахлор- и пентафторфениловые эфиры Вос-аминокислот и DCC/NOBt-метод в случае аминокислотного остатка D-аргинина. В качестве C-концевой защиты использовали этилоксигруппы.

Щелочным гидролизом и аммонолизом этиловых эфиров три- и тетрапептидов (XII, XXVI) получали защищенные три- (XVII, XVIII) и тетрапептиды (XXVIII, XXIX). Вос-группу удаляли обработкой раствором TFA в хлористом метиле в течение 20—30 мин при комнатной температуре, бензильную и NO₂-группу — каталитическим гидрогенолизом.

Для получения [D-Arg², Leu⁵]энкефалина (VIII) применяли твердофазный метод синтеза на сефадексе LH-20 в качестве носителя [8, 9]. Присоединение первой аминокислоты к носителю проводили 1,1'-карбонилдимидазолом. Цепь наращивали, используя пентафторфениловые эфиры Вос-аминокислот и DCC/NOBt-метод при присоединении Вос-D-Arg(NO₂)-ОН. Удаление Вос-группы производили 1 н. *n*-толуолсульфокислотой в ледяной уксусной кислоте с одновременным определением емкости аминоацилсефадекса на каждой стадии [9]. Для этого методом, основанным на спектрофотометрическом определении *n*-толуолсульфокислоты, выделяющейся при депротонировании аминогрупп, определяли количество свободных аминогрупп в каждом образце. Синтезированный пептид снимали с носителя-полимера действием 0,1 н. раствора едкого натра в метаноле и очищали распределительной хроматографией на колонке с силикагелем.

Анальгетическая активность синтезированных аналогов энкефалина оценивалась по методу «tail-pinch» (прижатия хвоста) при интрацестернальном и внутривенном введении мышам [10, 11]. Результаты исследования биологической активности приведены в табл. 2, 3.

Видно, что все рассмотренные аналоги обладают анальгетической активностью, превышающей активность природного [Leu⁵]энкефалина (X). Более того, активность тетрапептидных аналогов (V)—(VII) при интрацестернальном введении сравнима или даже превышает активность морфина. Эти аналоги обладают особой продолжительностью действия в данном тесте, также сопоставимой с аналогичной величиной для морфина (60 мин). В дозе 50 мг/мышь тетрапептид (VI) вызывал анальгезию в течение 4 ч, а аналог (V) в дозе 25 мкг/мышь обладал анальгетической реакцией на уровне 88% в течение 5 ч.

Тетрапептиды (V)—(VII) оказались единственными из исследованных аналогов, которые обладали активностью при внутривенном введении.

Низкоэнергетические конформации пептидного остова трипептидов
 Tyr-*D*-Arg-Gly-OH (II) и Tyr-*D*-Arg-Gly-NH₂ (III) (ΔU , ккал/моль)

Структура	(II)	(III)	Структура	(II)	(III)
<i>BHH</i>	0,0	0,0	<i>BRH</i>	5,1	5,4
<i>BHL</i>	0,0*	1,5	<i>BRL</i>	5,1	6,0
<i>BHR</i>	-**	1,2	<i>BRR</i>	-	6,0
<i>BHB</i>	-	1,0	<i>BRB</i>	-	5,8
<i>BLH</i>	-	3,4	<i>RHH</i>	6,9	7,5
<i>BLL</i>	-	4,3	<i>RHL</i>	6,9	-
<i>BLR</i>	2,4	5,3	<i>RLR</i>	6,8	-
<i>BLB</i>	2,4	1,4	<i>RLB</i>	6,8	-

* Для C-концевого остатка со свободной карбоксильной группой конформация *H* эквивалентна конформации *L*, а *B* — *R*.

** Здесь и далее прочерки соответствуют величинам $\Delta U > 8$ ккал/моль.

Таблица 6

Низкоэнергетические конформации пептидного остова
 тетрапептидов Tyr-*D*-Arg-Gly-Phe (V) и Tyr-*D*-Arg-Gly-Phe-NH₂ (VI)
 (ΔU , ккал/моль) при различных значениях диэлектрической
 постоянной среды (ϵ)

Структура	(V)		(VI)	
	$\epsilon=3,5$	$\epsilon=81$	$\epsilon=3,5$	$\epsilon=81$
<i>BHHB</i>	1,0	0,0	1,5	0,8
<i>BHHR</i>	1,0*	0,0*	2,6	0,4
<i>BHHL</i>	-	-	4,7	-
<i>BHLB</i>	-	-	3,0	6,1
<i>BHLR</i>	-	-	6,5	7,0
<i>BHRB</i>	0,0	5,5	-	4,6
<i>BHRR</i>	0,0	5,5	6,8	4,0
<i>BHBB</i>	0,6	3,5	0,0	2,2
<i>BHBR</i>	0,6	3,5	-	0,5
<i>BLHB</i>	3,8	5,8	2,3	5,0
<i>BLHR</i>	3,8	5,8	3,7	-
<i>BLHL</i>	1,4	-	-	-
<i>BLLB</i>	4,8	2,8	3,5	1,6
<i>BLLR</i>	4,8	2,8	-	0,0
<i>BLRB</i>	2,7	4,1	5,3	-
<i>BLRR</i>	2,7	4,1	-	-
<i>BLBB</i>	-	4,9	-	0,8
<i>BLBR</i>	-	4,9	7,0	3,5
<i>BRHB</i>	4,4	-	-	-
<i>BRHR</i>	4,4	-	2,5	-
<i>BRHL</i>	-	-	5,7	-
<i>BRLB</i>	-	-	5,3	-
<i>BRRB</i>	-	-	0,2	-
<i>BRRR</i>	-	-	-	6,6
<i>BRBB</i>	-	-	5,7	6,9
<i>BRBR</i>	-	-	6,4	5,8
<i>BHHB</i>	2,2	4,7	3,3	3,4
<i>RHHR</i>	2,2	4,7	4,3	3,1
<i>RHLB</i>	-	4,8	-	5,8
<i>RHLR</i>	-	4,8	-	4,1
<i>RHRB</i>	-	-	-	6,5
<i>RHRR</i>	-	-	-	6,6
<i>RHBB</i>	6,8	2,9	5,4	1,4
<i>RHBR</i>	6,8	2,9	1,3	2,0
<i>RLBB</i>	-	6,1	-	5,0
<i>RLBR</i>	-	6,1	-	-

* См. примечание к табл. 5.

Низкоэнергетические конформации пептидного остова пентапептида
Tyr-D-Arg-Gly-Phe-Leu (VII) (ΔU , ккал/моль)

Структура	$\epsilon=3,5$	$\epsilon=81$ *	Структура	$\epsilon=3,5$	$\epsilon=81$ *
<i>BHBB</i>	2,7	0,0	<i>BLRBB</i>	—	5,1
<i>BHRRB</i>	1,7	—	<i>BLBBB</i>	—	6,7
<i>BHLBB</i>	—	6,9	<i>BRBRB</i>	5,7	—
<i>BHRBB</i>	—	2,3	<i>RHRRB</i>	0,0	—
<i>BHBBB</i>	—	5,3			

* Данные [14].

причем величина активности и продолжительность действия были сопоставимы с активностью и продолжительностью действия морфина (табл. 3). Можно отметить, что доза 130 мкг/кг соединения (V) вызвала анальгетический эффект в течение 6,5 ч при отсутствии токсических явлений.

Сопоставление величин активности синтезированных пептидов показало, что предложенные модификации С-концевого карбоксила в обеих сериях аналогов приводят к одинаковым изменениям активности *in vivo*. Амидирование практически не изменяет активность, а этерификация увеличивает ее на один порядок как в ряду трипептидов (соединение (II) по сравнению с соединениями (III), (IV)), так и в ряду тетрапептидов (соединения (V)–(VII)). Важно отметить, что при переходе от трипептида (соединение (II)) к тетрапептиду (соединение (V)) наблюдается увеличение активности на два порядка, причем такая же закономерность сохраняется как в ряду амидов (соединения (III) и (VI)), так и в ряду эфиров (соединения (IV) и (VII)).

Теоретический конформационный анализ в попарно-аддитивном приближении, проведенный для киоторфина и *D*-киоторфина (I), трипептидов (II) и (III), тетрапептидов (V) и (VI) и пентапептида (VIII) позволил выделить все низкоэнергетические структуры пептидного остова указанных соединений, понимаемые как сочетания значений углов внутреннего вращения, соответствующие различным квадрантам потенциальной карты аминокислотных остатков ($B - \varphi < 0^\circ$, $\psi > 0^\circ$, $R - \varphi < 0^\circ$, $\psi < 0^\circ$, $L - \varphi > 0^\circ$, $\psi > 0^\circ$, $H - \varphi > 0^\circ$, $\psi < 0^\circ$; см., например, [12]). В табл. 4–7 приведены конформации остова, которые при оптимальном сочетании ротамеров боковых цепей обладали относительной конформационной энергией не свыше 8 ккал/моль. Большинство результатов в табл. 4–7 относятся к расчетам, проведенным в предположении, что макроскопическое значение диэлектрической постоянной среды (ϵ) равно 3,5, что позволяет до некоторой степени учитывать в расчетах влияние менее полярной, чем вода, биофазы рецептора [13]. Однако поиск низкоэнергетических конформаций остова соединений (V), (VI) и (VIII) был проведен также для случая $\epsilon = 80$, т. е. при имитации условий водного окружения [13]; данные такого расчета для (VIII) заимствованы из работы [14].

Для киоторфина единственной низкоэнергетической конформацией остова оказалась структура типа *BB*. Следует отметить, что найденные нами низкоэнергетические конформации киоторфина и *D*-киоторфина являются таковыми также по данным расчета других авторов [15].

Наборы низкоэнергетических структур три- и тетрапептидов, рассчитанные при различных значениях величины ϵ , оказались не слишком различны между собой: гораздо большие изменения происходят в них при переходе от соединений со свободной карбоксильной группой к амидам (табл. 5, 6), причем амиды проявляют себя как более конформационно подвижные соединения. В то же время набор низкоэнергетических структур пентапептида при изменении величины ϵ перестраивается практически полностью (табл. 7).

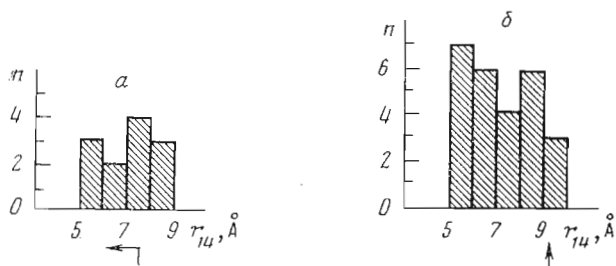


Рис. 1. Гистограмма распределения расстояния r_{14} для аналогов (V) и (VI) (а, б). По оси ординат n — количество низкоэнергетических конформаций остова. Стрелками отмечены экспериментальные оценки r_{14}

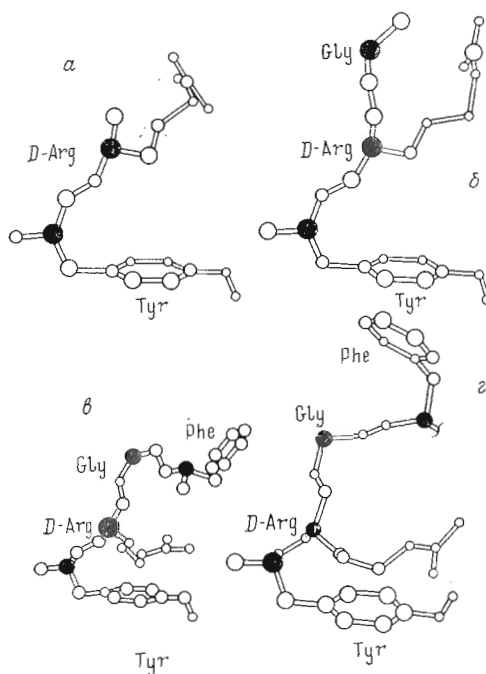


Рис. 2. Сходные пространственные структуры (ВННВ;R, табл. 8) молекул дипептида Tyr-D-Arg (а), трипептида Tyr-D-Arg-Gly (б), тетрапептида Tyr-D-Arg-Gly-Phe (в) и N-концевого тетрапептида пентапептида Tyr-D-Arg-Gly-Phe-Leu (г). Атомы кислорода карбонильных групп и амидные водороды опущены. Углеродные C^α -атомы выделены черным

С помощью флуоресцентной спектроскопии были измерены величины эффективности безызлучательного переноса энергии (T) между ароматическими ядрами остатков Tyr¹ и Phe⁴ тетрапептидов (V) и (VI) в водном растворе. Эти величины оказались равными ~ 1 и $0,80 \pm 0,05$ соответственно, что дало возможность получить экспериментальную оценку средних расстояний r_{14} между хромофорами Tyr¹ и Phe⁴: для соединения (V) $r_{14} < 8$ Å, а для (VI) — $9,4 \pm 0,4$ Å. С другой стороны, на рис. 1 представлены гистограммы расстояний между центрами ароматических колец остатков Tyr и Phe, рассчитанных для низкоэнергетических структур соединений (V) и (VI) в предположении $\epsilon = 80$ (см. табл. 6): видно, что расчетные данные не противоречат экспериментальным. Таким образом, можно констатировать, что в водном растворе для соединения (V) более характерны, по-видимому, свернутые «усредненные» структуры, а для соединения (VI) — вытянутые. Отметим, что для пентапептида (VIII) в водном растворе также характерны вытянутые структуры [14].

Полученные результаты подтверждают прежде всего эффективность замены остатка Gly² в природной последовательности энкефалина на D-

аминокислоту, что связано, по-видимому, как со стабилизацией конформации пептидного остова в районе замещаемого остатка (например, [16]), так и с защитой соответствующей пептидной связи от ферментативного расщепления [17]. Необходимо отметить, что использование остатка $D\text{-Arg}^2$ по сравнению с $D\text{-Ala}^2$ имеет определенные преимущества. Так, относительная анальгетическая активность тетрапептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe при системном введении составляет, по данным разных авторов, $0,09\text{--}0,24$, а Tyr-D-Arg-Gly-Phe — $0,37$ [18]. Такое же преимущество было продемонстрировано и на примере N -концевых тетрапептидов [$D\text{-Arg}^2$]дерморфина [19].

С устойчивостью к ферментативному расщеплению связана, по-видимому, и роль C -концевых защитных групп. Такие группы, однако, оказались неравноценными: при сравнении анальгетической активности пар аналогов трипептидов (II)—(III) и (II)—(IV), а также (V)—(VI) и (V)—(VII) можно сделать вывод, что более эффективным в этом смысле является этерификация, а не амидирование C -концевого карбоксила (незначительный эффект амидирования карбоксильной группы пентапептида (VIII) отмечается также в работе [5]). (Хотя для $D\text{-Ala}^2$ - или $D\text{-Met}^2$ -содержащих аналогов энкефалинов амиды обычно более активны, чем соответствующие эфиры [20, 21].) Не исключено, что этильный радикал наряду с осуществлением защиты от протеолитического расщепления способствует проникновению молекулы через гематоэнцефалический барьер или является элементом дополнительной стабилизации лиганд-рецепторного комплекса.

Однако гораздо более важным фактором, влияющим на степень связывания с рецепторами и, следовательно, на анальгетическую активность аналогов, является, как следует из работы [6] и наших данных, наличие в составе молекулы аналога остатка фенилаланина. В том, что существенно само наличие остатка определенного типа, а не конформационная перестройка молекулы при переходе от три- к тетрапептиду, убеждают результаты теоретического конформационного анализа. Из табл. 4—7 видно, что в ряду соединений от ди- к пентапептиду удается проследить существование пространственно сходных низкоэнергетических конформаций двух типов (конформации остова на уровне пентапептида $BHH(B/R)B$ и $RHHRB$). Значения углов внутреннего вращения остова для этих структур приведены в табл. 8, а пространственное сходство демонстрируется на рис. 2. Таким образом, у рассмотренных аналогов есть возможность принять при взаимодействии с рецептором одну и ту же конформацию фрагмента Tyr-D-Arg , однако эта возможность является, очевидно, необходимым, но не достаточным условием связывания: отметим, что аналогичная структура остова N -концевого тетрапептида молекулы энкефалина ($BHHB/R$) предлагается в [16] в качестве «биологически активной» конформации природного пептида. Следовательно, можно полагать, что в успешном связывании лиганда с опиоидными рецепторами большую роль играет как N -концевой остаток тирозина, так и ароматическое ядро фенилаланина, комплементарное, по-видимому, определенному центру рецептора; сходные с нашими выводы получены также в работе [22].

Еще одно предположение может быть высказано в связи с проведенными конформационными исследованиями тетрапептида (V): его повышенная сравнительно с пентапептидом устойчивость к ферментативному расщеплению [6] и, как следствие, обнаруженная повышенная анальгетическая активность, вполне вероятно, связана с большей компактностью «усредненной» структуры тетрапептида, о которой свидетельствует уменьшение расстояния $\text{Tyr}^1 - \text{Phe}^4$, измеренного с помощью флуоресцентной спектроскопии.

В заключение можно констатировать, что проведенные исследования позволили не только получить аналоги энкефалинов, обладающие высокой активностью при внутривенном введении и представляющие, таким образом, практический интерес, но и осветить некоторые детали взаимодействия лигандов с опиоидными рецепторами.

Значения углов внутреннего вращения остова (град) пространственно сходных конформаций в ряду *D*-Arg²-содержащих аналогов энкефалина

Соединение	Тип конформации остова	Tyr		<i>D</i> -Arg		Gly		Phe		Leu	
		φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ
Tyr- <i>D</i> -Arg-Gly-Phe-Leu	ВННВВ	-121	145	136	-144	70	-98	-134	21	-133	128
		-121	143	125	-145	76	-69	-132	-50	-111	128
Tyr- <i>D</i> -Arg-Gly-Phe	ВННВ-	-134	157	141	-143	110	-25	-131	187	-	-
		-135	157	155	-158	104	-22	-126	157	-	-
Tyr- <i>D</i> -Arg-Gly-Phe-NH ₂	ВННВ-	-134	157	139	-138	79	-66	-121	-24	-	-
		-121	141	125	-144	127	53	-	-	-	-
Tyr- <i>D</i> -Arg-Gly	ВНН-	-121	142	127	-141	73	-124	-	-	-	-
		-121	143	136	-133	71	52	-	-	-	-
Tyr- <i>D</i> -Arg	ВН--	-121	140	134	-135	-	-	-	-	-	-
		-106	144	154	-161	67	-75	-115	-45	-143	133
Tyr- <i>D</i> -Arg-Gly-Phe-Leu	РННВВ	-110	-29	130	-141	82	-56	-127	159	-	-
		-109	-30	132	-141	78	-62	-126	159	-	-
Tyr- <i>D</i> -Arg-Gly-Phe-NH ₂	РННВ-	-109	-29	127	-130	76	-69	-119	-25	-	-
		-114	-52	128	-136	113	47	-	-	-	-
Tyr- <i>D</i> -Arg-Gly	РНН--	-115	-53	123	-136	69	-127	-	-	-	-
		-112	-48	142	-133	-	-	-	-	-	-

Экспериментальная часть

Синтез пептидов. Для синтеза *D*-хиоторфина и аналогов энкефалина использовали аминокислоты и их производные фирмы Reanal (Венгрия). Все аминокислоты, если не указано особо, имеют *L*-конфигурацию. Индивидуальность промежуточных соединений контролировали ТСХ на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧССР). Для хроматографии аналогов энкефалина применяли стеклянные пластинки с закрепленным слоем силикагеля 60F-254 (Merck, ФРГ). Использовали следующие системы растворителей: хлороформ — этанол — AcOH, 85 : 10 : 5 (А); *n*-бутанол — пиридин — AcOH · H₂O, 15 : 10 : 3 : 6 (Б); 15 : 12 : 3 : 10 (В); хлороформ — метанол — AcOH — H₂O, 30 : 20 : 4 : 6 (Г); 60 : 18 : 2 : 3 (Д); *n*-бутанол — AcOH — H₂O, 4 : 1 : 1 (Е); этилацетат — пиридин — AcOH — H₂O, 60 : 5 : 1,5 : 3 (F). Хроматограммы проявляли вингидриновым и хлор-бензидиновым реагентами. Удельное оптическое вращение пептидов измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141 M (США), длина кюветы 1 дм. Кислотный гидролиз проводили при 120° С в течение 24 ч. Аминокислотный состав определяли на анализаторе Jeol-3.

Очистка защищенных пептидов проводилась на хроматографических колонках фирмы Merck: size B (310—25); size C (440—37), заполненных сорбентом LiChroprep Si60 с размером частиц 40—63 и 63—125 мкм соответственно. Очистка конечных продуктов проведена ионообменной хроматографией на СМ-целлюлозе (Whatman CM-32) и/или обращенно-фазовой жидкостной хроматографией на хроматографе Du Pont 830 с использованием колонки Zorbax C₈ в режимах градиентного элюирования. Фракции контролировали с помощью детектора Uvicord II или Uvicord III (ЛКВ, Швеция) при 206, 254 и 280 нм. Характеристики синтезированных пептидов приведены в табл. 1.

Вос-*D*-Arg(NO₂)-Gly-OEt (XIV). К охлажденному до 0° С раствору 2,78 г (20 ммоль) гидрохлорида этилового эфира глицина в 25 мл DMF прибавляли 2,8 мл (20 ммоль) Et₃N. Реакционную смесь перемешивали 15 мин при 0° С, прибавляли 6,38 г (20 ммоль) Вос-*D*-Arg(NO₂)-OH в 20 мл DMF, 2,7 г (20 ммоль) HOBT и затем по каплям раствор 4,12 г (20 ммоль) DCC в 25 мл DMF. Смесь перемешивали 1 ч при 0—5° С, затем при комнатной температуре до завершения реакции (хроматографический контроль). Выпавшую диглиогексильмоочевину отфильтровывали, фильтрат разбавляли 200 мл этилацетата и водой (до разделения слоев). Этилацетатный слой отделяли и водную фазу экстрагировали повторно. Объединенный этилацетатный слой промывали последовательно 5% раствором KHSO₄, водой, 5% раствором NaHCO₃, вновь водой, насыщенным раствором хлористого натрия и сушили над безводным сульфатом натрия. Остаток, полученный после отгона растворителя, растирали с эфиром и перекристаллизовывали из этилацетата. Выход защищенного дипептида (XIV) 6,24 г (77%), т. пл. 119° С (размягчается при 96° С); $[\alpha]_D^{25} -13,5^\circ$ (*c* 1, DMF); *R_f* 0,68 (Б).

Вос-Tyr(Bzl)-*D*-Arg(NO₂)-Gly-OEt (XVI). 4,04 г (10 ммоль) дипептида (XIV) растворяли в 15 мл 50% раствора TFA в хлористом метиле и выдерживали 30 мин. Растворитель отгоняли, остаток растирали с эфиром и сушили в вакууме-эксикаторе над KOH. Получали 4,01 г (96%) трифторацетата (XV), *R_f* 0,48 (Б).

2,0 г (5 ммоль) трифторацетата дипептида (XV) растворяли в 10 мл DMF, охлаждали до -5° С и при перемешивании добавляли 0,7 мл (5 ммоль) Et₃N в 2 мл DMF и 2,46 г (5 ммоль) Вос-Tyr(Bzl)-ONp, растворенного в 10 мл DMF. Смесь выдерживали 1 ч при -5° С, 24 ч при 0° С и еще 24 ч при комнатной температуре. Затем реакционную массу выливали в 500 мл воды со льдом, выделившееся вещество отфильтровывали. Осадок растворяли в этилацетате и органическую фазу обрабатывали аналогично соединению (XIV). Остаток, полученный после отгона растворителя, перекристаллизовывали из этилацетата. Выход защищенного трипептида (XVI) 1,77 г (54%), т. пл. 162—164° С; $[\alpha]_D^{25} +11,1^\circ$ (*c* 1, DMF), *R_f* 0,65 (А); 0,71 (Е, Merck).

Вос-Tyr(Bzl)-*D*-Arg(NO₂)-Gly-OH (XVII). 0,66 г (1 ммоль) соединения (XVI) растворяли в 15 мл метанола, прибавляли 1 н. NaOH до pH 10—11 и выдерживали ~30 мин до окончания гидролиза (хроматографический контроль). Отгоняли растворитель, добавляли воду и подкисляли 1 н. HCl до pH 3. Выпавший осадок отфильтровывали и хроматографировали на колонке с силикагелем (size B) в системе хлороформ — этанол — этилацетат — AcOH — H₂O (85 : 5 : 8 : 2 : 0,25). Получали 0,32 г (51%) соединения (XVII), т. пл. 86° С; $[\alpha]_D^{25} +5,5^\circ$ (*c* 1, DMF); *R_f* 0,60 (Е, Merck).

Вос-Tyr(Bzl)-*D*-Arg(NO₂)-Gly-NH₂ (XVIII). К 0,860 г (1,30 ммоль) защищенного трипептида (XVI) прибавляли 40 мл насыщенного раствора аммиака в метаноле и выдерживали 1 сут. Растворитель отгоняли, остаток очищали на колонке с силикагелем (размер В) в системе *n*-бутанол — этанол — вода — AcOH (80 : 10 : 30 : 5). Выход амида защищенного трипептида (XVIII) 0,625 г (76%), *R_f* 0,50 (Е, Merck).

Tyr-*D*-Arg-Gly (II). 255 мг (0,40 ммоль) соединения (XVII) растворяли в 4 мл 50% раствора TFA в хлористом метиле и выдерживали 30 мин. Растворитель отгоняли, остаток растирали с эфиром и сушили в вакууме над KOH. Трифторацетат трипептида растворяли в 10 мл метанола, 0,5 мл AcOH 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 KOH. Полученный продукт очищали на СМ-целлюлозе в аммоний-ацетатном буфере с линейным возрастанием градиента от 0,01 н. (pH 4,3) до 0,25 н. (pH 6,2), затем обращенно-фазовой хроматографией на колонке Zorbax C₈, элюируя смесью этанол — 0,1 М ацетат аммония (3 : 97). После многократной лиофилизации получали 16 мг (10%) трипептида (II).

Tyr-D-Arg-Gly-NH₂ (III). 575 мг (0,91 ммоль) соединения (XVIII) деблокировали и очищали аналогично соединению (II). Выход амида трипептида (III) 85 мг (24%).

Tyr-D-Arg-Gly-OEt (IV). 200 мг (0,30 ммоль) трипептида (XVI) деблокировали аналогично соединению (II) и очищали обращенно-фазовой хроматографией в системе ацетонитрил — 0,1 М ацетат аммония (3 : 97). Соответствующие фракции собирали и лиофилизировали. Выход эфира трипептида (IV) 102 мг (80%).

Voc-Gly-Phe-OEt (XXII). Из 12,7 г (30 ммоль) *Voc-Gly-OPeP*, 6,9 г (30 ммоль) *HCl-Phe-OEt* и 4,2 мл (30 ммоль) Et_3N аналогично соединению (XVI) получали дипептид (XXII). По окончании реакции (хроматографический контроль) реакционную массу обрабатывали аналогично соединению (XIV). Выход соединения (XXII) 9,8 г (93%) в виде масла с R_f 0,84 (A), 0,90 (Г, Merck). $[\alpha]_D^{22} = -3,04^\circ$ (с 1,05, DMF).

Voc-D-Arg(NO₂)-Gly-Phe-OEt (XXIV). 9,6 г соединения (XXII) растворяли в 120 мл 50% раствора TFA в хлористом метиле и выдерживали 30 мин. Раствор упаривали, остаток растирали с эфиром, сушили в вакууме над КОН. Получали 8,1 г (81%) трифторацетата дипептида (XXIII), R_f 0,24 (A), 0,74 (Г, Merck).

Из 8,0 г (22 ммоль) трифторацетата дипептида (XXIII), 7,0 г (22 ммоль) *Voc-D-Arg(NO₂)-OH*, 3,08 мл (22 ммоль) Et_3N , 2,97 г (22 ммоль) *HOEt* и 4,53 г (22 ммоль) DCC в растворе DMF аналогично соединению (XIV) получили 7,77 г (64%) защищенного трипептида (XXIV), R_f 0,45 (A), $[\alpha]_D^{22} = +3,4^\circ$ (с 1, DMF).

Voc-Tyr(Bzl)-D-Arg(NO₂)-Gly-Phe-OEt (XXVI), *Voc-Tyr(Voc)-D-Arg(NO₂)-Gly-Phe-OEt* (XXVII). 5 г (9,07 ммоль) соединения (XXIV) обрабатывали раствором TFA в хлористом метиле аналогично соединению (XXIII). Выход трифторацетата трипептида (XXV) 4,9 г (95%), R_f 0,20 (A).

Из 4,52 г (8 ммоль) трифторацетата трипептида (XXV), 1,36 мл (8 ммоль) DIEA и 3,94 г (8 ммоль) *Voc-Tyr(Bzl)-ONp* или 4,29 г (8 ммоль) *Voc-Tyr(Voc)-OPiP* в растворе DMF аналогично соединению (XVI) получали защищенные тетрапептиды (XXVI, XXVII). Остаток, полученный после отгона растворителя, растирали с эфиром, сушили в эксикаторе и очищали обращенно-фазовой хроматографией на колонке Zorbax *C₈*, элюируя смесью CH_3CN — вода — AcOH (40 : 59,9 : 0,1). Соответствующие фракции собирали и лиофилизировали. Выход соединения (XXVI) 3,28 г (51%), R_f 0,63 (Г). Выход соединения (XXVII) 3,88 г (53%), R_f 0,60 (A); $[\alpha]_D^{22} = +2,3^\circ$ (с 0,6, DMF).

Voc-Tyr(Bzl)-D-Arg(NO₂)-Gly-Phe-OH (XXVIII). Из 3,58 г (4,45 ммоль) соединения (XXVI) аналогично соединению (XVII) получали 1,43 г (41,5%) соединения (XXVIII), R_f 0,27 (A, Merck), $[\alpha]_D^{22} = +4,8^\circ$ (с 0,52, DMF).

Voc-Tyr(Bzl)-D-Arg(NO₂)-Gly-Phe-NH₂ (XXIX). Из 3,58 г (4,45 ммоль) соединения (XXVI) аналогично соединению (XVIII) получали 1,44 г (42%) защищенного амида тетрапептида (XXIX), т. п. 173—175° С; $[\alpha]_D^{24} = -6,3^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,43 (A), 0,74 (Б).

H-Tyr-D-Arg-Gly-Phe-OH (V). 0,320 г (0,412 ммоль) соединения (XXVIII) растворяли в 6 мл 50% раствора TFA в хлористом метиле и выдерживали 30 мин. Раствор упаривали, остаток растирали с эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе над КОН. Получали 0,300 г трифторацетата тетрапептида (XXX) с R_f 0,61 (Г).

К раствору 0,300 г (0,380 ммоль) соединения (XXX) в 5 мл метанола добавляли палладиевую чернь, 0,2 мл уксусной кислоты, 1 мл воды и гидрировали 6 ч при 20° С. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха, остаток растирали с эфиром, отфильтровывали, промывали эфиром на фильтре, сушили над КОН в вакууме. Полученный продукт (0,250 г) очищали на СМ-целлюлозе в аммоний-ацетатном буфере (градиентное элюирование от 0,01 н. (рН 4,2) до 0,25 н. (рН 6,7)). Соответствующие фракции собирали и лиофилизировали. Выход тетрапептида (V) 0,135 г (52%).

H-Tyr-D-Arg-Gly-Phe-NH₂ (VI). 0,5 г (0,64 ммоль) соединения (XXIX) растворяли в 7 мл 50% раствора TFA в хлористом метиле и выдерживали 30 мин. Раствор упаривали, остаток растирали с эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе над КОН. Получали 0,46 г трифторацетата амида тетрапептида (XXXI), R_f 0,85 (Г).

К раствору 0,46 г (0,58 ммоль) соединения (XXXI) в 7 мл метанола добавляли палладиевую чернь, 0,2 мл уксусной кислоты, 1 мл воды и гидрировали 6 ч при 20° С. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха, остаток растирали с эфиром, отфильтровывали, промывали эфиром на фильтре, сушили над КОН в вакууме. Полученный продукт (0,42 г) очищали на СМ-целлюлозе аналогично соединению (V). Соответствующие фракции собирали и лиофилизировали. Выход амида тетрапептида (VI) 0,20 г (57%).

H-Tyr-D-Arg-Gly-Phe-OEt (VII). 0,50 г (0,54 ммоль) защищенного тетрапептида (XXVII) деблокировали аналогично соединению (V) и очищали обращенно-фазовой хроматографией в системе CH_3CN — 0,2 М ацетат аммония (18 : 82). После многократной лиофилизации получили 0,20 г (51%) тетрапептида (VII).

H-Tyr-D-Arg-Gly-Phe-Leu-OH (VIII). а) Присоединение *Voc-Leu-OH* к сефадексу LH-20. Сефадекс LH-20 (10 г) суспендировали в 90 мл DMF, содержащего 3,74 г (15 ммоль) *Voc-Leu-OH*, прибавляли 2,43 г (15 ммоль) 1,1'-карбонилдипиридазола и оставляли, периодически помешивая суспензию стеклянной палочкой. Через 40 ч продукт отфильтровывали, промывали DMF, метанолом, эфиром и сушили в вакууме.

б) Омыление *Voc-группы*. *Voc-Leu-сефадекс* заливали 100 мл 1 н. раствора *n*-толуолсульфокислоты в ледяной уксусной кислоте и оставляли на 1 ч. Затем продукт отфильтровывали, промывали уксусной кислотой, метанолом и эфиром. После этого, собирая фильтрат, промывали его 150 мл 10% раствора Et_3N в хлористом метиле и метанолом; лейцид-сефадекс промывали эфиром и сушили в вакууме, а в фильтрате

спектрофотометрическим способом определяли содержание *n*-толуолсульфокислоты. Оно было равно 6,3% ммоль, что соответствует емкости смолы 0,63 ммоль/г.

в) *Ацилирование*. К Leu-сефадексу прибавляли 4,31 г (10 ммоль) Вос-Phe-OPr, растворенного в DMF, и оставляли на 36 ч. Продукт отфильтровывали, промывали DMF, метанолом, эфиром и сушили в вакууме. Вос-Пептидил-сефадекс деблокировали и присоединяли следующие аминокислоты, повторяя описанные процедуры (пункты б, в).

г) *Снятие пептида с сефадекса ГН-20*. Защищенный пентапептид (Вос-Тур(Вос)-D-Arg(NO₂)-Gly-Phe-Leu-OH) снимали с носителя действием 0,1 н. метанольного раствора гидроксида натрия в течение 4 ч. Сефадекс промывали метанолом и объединенный фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в воде, подкисляли 2 н. HCl, отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Синтезированный защищенный пентапептид дважды очищали на колонке с силикагелем (size C, B) в системах: хлороформ — этанол — этилацетат — AcOH — H₂O (185 : 5 : 8 : 2 : 0,25) и хлороформ — гексан — метанол (10 : 4 : 1). Выход защищенного пентапептида 2,23 г (46%), *R_f* 0,86 (B).

0,287 г (0,32 ммоль) защищенного пентапептида деблокировали аналогично соединению (V) и очищали на CM-целлюлозе в аммоний-ацетатном буфере с линейным возрастанием градиента ионной силы раствора от 0,01 н. (pH 4,4) до 0,05 н. (pH 6,2). Соответствующие фракции собирали и лиофилизовали. Выход аналога энкефалина (VIII) 100 мг (48%).

Теоретический конформационный анализ рассмотренных аналогов проводили в предположении жесткой валентной геометрии молекул с помощью системы потенциальных функций, описанной в работе [12]. В качестве стартовых точек для минимизации конформационной энергии в пространстве углов внутреннего вращения пептидного остова аналогов рассматривались все сочетания локальных минимумов остова отдельных аминокислотных остатков: для N-концевого остатка Тур — B и R, для D-Arg — H, I, и R, для Gly — H, L, R и B, для Phe — B, R и L, для C-концевого остатка Leu — B и L (вообще для C-концевых остатков учитывались только минимумы, различающиеся знаком угла φ). Оптимизация пространственного расположения боковых цепей в каждом локальном минимуме остова молекулы проводилась с помощью алгоритма, описанного в работе [23].

Флуоресцентная спектроскопия. Величину эффективности безызлучательного переноса энергии (*T*) и соответственно расстояния r_{14} между ароматическими хромофорами остатков Тур¹ и Phe⁴ в воде определяли сопоставлением скорректированных спектров возбуждения флуоресценции исследуемых пептидов и дипептида Тур-D-Arg по методике, изложенной в работе [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Takagi H., Shiomi H., Ueda H., Amano H. // Eur. J. Pharmacol. 1979. V. 55. № 1. P. 109—111.
2. Takagi H., Shiomi H., Ueda H., Amano H. // Nature. 1979. V. 282. № 5737. P. 410—412.
3. Yajima H., Ogawa H., Ueda H., Takagi H. // Chem. Pharm. Bull. 1980. V. 28. № 6. P. 1935—1938.
4. Rackham A., Wood P. L., Hudgin R. L. // Life Sci. 1982. V. 30. № 16. P. 1337—1342.
5. Kubota M., Nagase O., Amano H., Takagi H., Yajima H. // Chem. Pharm. Bull. 1980. V. 28. № 9. P. 2580—2586.
6. Takagi H., Amano H., Nakamura A., Kubota M., Nagase O., Yajima H. // Life Sci. 1982. V. 31. № 20—21. P. 2245—2248.
7. Sasaki Y., Akutsu Y., Suzuki K., Sakurada S., Kisara K. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. № 11. P. 3403—3406.
8. Библин А. Ю., Кожевникова И. Ю., Власов Г. П. // Журн. общ. химии. 1973. Т. 43. № 9. С. 2046—2049.
9. Библин А. Ю., Власов Г. П. // Журн. общ. химии. 1973. Т. 43. № 8. С. 1844—1848.
10. Ueda H., Amano H., Shiomi H., Takagi H. // Eur. J. Pharmacol. 1979. V. 56. P. 265—268.
11. Боброва И. В., Абиссова Н. А., Розенталь Г. Ф., Никифорович Г. В., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 11. С. 1457—1467.
12. Nikiiforovich G. V., Leonova V. I., Galaktionov S. G., Chipens G. I. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1979. V. 13. P. 363—373.
13. Nikiiforovich G. V., Rozenblit S. A., Chipens G. I. // Chemistry of peptides and proteins. V. 1. / Eds Voelter W., Wunsch E., Ovchinnikov J., Ivanov V. B.; N. Y.: Walter de Gruyter and Co., 1982. P. 407—414.
14. Бетинский Я. Р., Боброва И. В., Вестерман Б. Г., Никифорович Г. В., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 4. С. 447—451.
15. Manavalan P., Motanu F. A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1982. V. 105. № 3. P. 847—854.
16. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. Конформации пептидных биорегуляторов. М.: Медицина, 1983. С. 191.
17. Morley J. S. // Ann. Rev. Pharmacol. and Toxicol. 1980. V. 20. P. 81—110.
18. Розенталь Г. Ф., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 869—897.

19. Sasaki Y., Matsui M., Fujita H., Hosono M., Tagichi M., Suzuki K., Sakurada S., Sato T., Sakurada T., Kisara K. // *Neuropeptides*. 1985. № 5. P. 391—394.
20. Morgan B. A. // *Amino-acids, peptides and proteins*. Spec. Period. Rep., Chem. Soc. V. 10. / Ed. Sheppard R. C. L., 1979. P. 474—489.
21. Shaw J. S., Turnbull M. J. // *Characteristics and functions of opioids* / Eds van Ree J. M., Terenius L. Amsterdam: Elsevier-North-Holland Biomedical Press, 1978. P. 185—195.
22. Vavrek R. J., Cui R.-L., Stewart J. M. // *Life Sci.* 1982. V. 31. № 20—21. P. 2249—2252.
23. Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Валодис Ю. Ю. // *Биоорган. химия*. 1981. Т. 7. № 2. С. 179—188.

Поступила в редакцию
20.VII.1987
После доработки
14.XII.1987

**SYNTHESIS, BIOLOGICAL ACTIVITY
AND CONFORMATIONAL PROPERTIES OF ENKEPHALIN
ANALOGUES STRUCTURALLY RELATED TO KYOTORPHIN**

BOBROVA I. V., ABISSOVA N. A., PODIŅŠ L. U.,
VESTERMAN B. G., NIKIFOROVICH G. V., ČHIPENS G. I.

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

[D-Arg²,Leu⁵]Enkephalin and two series of its N-terminal short-chain analogues with a free and modified C-terminal carboxylic group, viz. amides and ethyl esters of tri- and tetrapeptides, were synthesized in solution and by solid-phase method. Their analgesic activity, assayed by the «tail pinch» method following intracisternal and intravenous administration to mice, was compared with activity of enkephalins and morphine. To study the space structure of the synthesized compounds, conformational calculations and fluorescence spectroscopy were applied to measure distance between aromatic nuclei of tyrosine and phenylalanine residues in the two tetrapeptides. Ethyl esters of the tri- and tetrapeptides exceed in analgesic activity the corresponding carboxylic acids and amides. In contrast to the pentapeptide, the tetrapeptide analogues were active upon intravenous administration. Conformational aspects of this series of analogues are discussed in detail; the abrupt increase in activity upon transition from tri- to tetrapeptides does not appear to be related to conformational changes.