



УДК 577.175.32'17.012 : 543.422.25

© 1990 г.

*Ю. Е. Шапиро, В. Я. Горбатюк, В. М. Кабанов,
А. А. Мазуров, С. А. Андронати, Б. А. Лобасюк,
Н. Я. Головенко, М. Г. Рокачинская*

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АНАЛОГОВ МЕЛАНОСТАТИНА

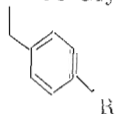
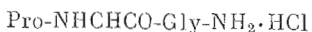
Физико-химический институт им. А. В. Богатского АН УССР, Одесса, 270080

Методами двумерной спектроскопии ^1H -ЯМР (COSY, NOESY, SECSY, δ -J-корреляционной) определена конформация меланостатина (Pro-Leu-Gly-NH₂·HCl, MIF) в растворе DMSO-d₆ и пяти его аналогов, содержащих *n*-замещенный фенилаланин. С помощью методов множественной линейной регрессии определена зависимость антидепрессивной активности, оцененной по тесту Порсолта, MIF и его аналогов (доза от 5,0 до 0,001 мг/кг) от структурных особенностей их молекул. В качестве структурных параметров выбраны константы спин-спинового взаимодействия, определяющие значения торсионных углов φ и χ второй аминокислоты и угол φ глицина. Показано, что для данных соединений реализуется «биологически активная конформация» (10-членный β -изгиб II рода).

Меланостатин (Pro-Leu-Gly-NH₂, MIF, 1) — гормон, ингибирующий высвобождение меланотропина, оказывает разнообразное действие на центральную нервную систему. Многочисленные структурные исследования позволили предположить наличие «биологически активной конформации» MIF в диметилсульфоксиде, существование которой можно связывать с биологической активностью нейропептида.

В основу модификации меланостатина положен предлагаемый нами принцип облигатного подобия аминокислот. Каждая из природных аминокислот кодируется триплетом нуклеотидов — кодоном. Согласно гипотезе «качания» Ф. Крика [1], первые два основания кодона (облигатные нуклеотиды) вносят наибольший вклад в специфичность кодирования в отличие от третьего основания (факультативного нуклеотида). Из 20 аминокислот белкового происхождения можно выделить 7 пар с одинаковыми облигатными нуклеотидами. Вторая аминокислота в молекуле MIF, лейцин, кодируется UUA и UUG подобно фенилаланину (UUU, UUC). Поскольку кодирование в организме определяет передачу и сохранение определенных признаков и свойств, мы заменили лейцин на облигатно подобный фенилаланин.

Ранее нами было показано [2], что введение облигатно подобного фенилаланина вместо лейцина в MIF не оказывает существенного влияния на его активность. Для выяснения влияния облигатной замены на конформацию определена пространственная структура MIF (1) и его аналогов (2—6), содержащих различные заместители в *n*-положении фенильного кольца фенилаланина, методами 2D ^1H -ЯМР.



- (2) R = H
- (3) R = NO₂
- (4) R = OH
- (5) R = NHCO(CH₂)₃NH₂·HCl
- (6) R = NH₂

Тирозин использован нами для получения пептида (4) как структурный аналог фенилаланина, содержащий в *n*-положении OH-группу.

Отнесение сигналов в спектрах ЯМР аналогов MIF проводили на основании литературных данных о спектрах самого MIF [3, 4] и амино-

Отнесение сигналов в спектрах ¹H-ЯМР MIF и его аналогов (δ, м.д.)

Соединение	Аминокислотный остаток	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	Ar		NH	NH ₂	
						H _A	H _B		чис	транс
(1)	Pro-	3,75	2,30; 1,87	1,87	3,18	-	-	10,19; 8,50	7,20	7,41
	-Leu- -Gly-NH ₂	4,32 3,63	1,51 -	1,64 -	0,94 -	-	-	8,82 8,21		
(2)	Pro-	4,14	2,28; 1,89	1,82	3,14	-	-	10,17; 8,43	5,70	
	-Phe- -Gly-NH ₂	4,55 3,63 3,71	3,08; 2,85 -	- -	- -	7	-	8,98 8,47		
(3)	Pro-	4,13	2,27; 1,83	1,82	3,15	-	-	10,16; 8,41	7,17	7,40
	-Phe (p-NO ₂)- -Gly-NH ₂	4,66	3,25; 2,97	-	-	7,60	8,13	9,04		
(4)	Pro-	4,13	2,27; 1,83	1,83	3,15	-	-	8,57 10,06; 8,44	7,23	7,43
	-Тур- -Gly-NH ₂	4,45	2,96; 2,71	-	-	6,66	7,06	8,86		
(5)	Pro-	4,15	2,28; 1,85	1,85	3,16	-	-	8,37 10,06; 8,44	7,09	7,31
	-Phe [p-NHCO(CH ₂) ₃ NH ₂]- -Gly-NH ₂	4,51	3,03; 2,78	-	-	7,20	7,53	8,92		
(6)	Pro-	4,11	2,28; 1,81	1,81	3,13	-	-	10,28 8,39 10,04; 8,45	10,65	*
	-Phe (p-NH ₂)- -Gly-NH ₂	4,57 3,61	2,87 -	- -	- -	7,32	7,44	8,98 8,68		

* Сигналы скрыты сигналами ароматического ядра.

Таблица 2

Значения вицинальных констант спин-спинового взаимодействия и соответствующих им торсионных углов для MIF и его аналогов (растворитель - DMSO-d₆)

Соединение	X					Gly		
	³ J _{NH, C^αH Гц}		φ, град	³ J _{C^αH, C^βH Гц}	χ', град	³ J _{NH, C^αH Гц}		φ, град
	эксп.	корр.				эксп.	корр.	
(1)	7,7	8,4	38; -87	10,3	0; 162	5,6	6,1	95; -75 25; -165
(2)	8,0	8,7	40; -89	9,9	14; 62	5,7	6,2	95; -75 25; -165
(3)	8,1	8,8	41; -90	9,9	13; 58	5,9	6,4	95; -72 25; -168
(4)	8,3	8,0	43; -91	10,8	0; 61	5,7	6,2	90; -75 30; -165
(5)	8,6	9,4	60; -95	10,1	9; 161	6,2	6,7	88; -76 30; -162
(6)	8,9	9,7	-100	-	-	5,9	6,4	95; -76 25; -168

кислот [5]. Для проверки правильности отнесения сигналов протонов определенных фрагментов использовали двумерные корреляционную (COSY) и спин-эхо-корреляционную (SECSY) спектроскопии. Эти методики позволяют выявлять связанные спин-спиновым взаимодействием (*J*-связями) группы протонов, относящихся к индивидуальным амини-

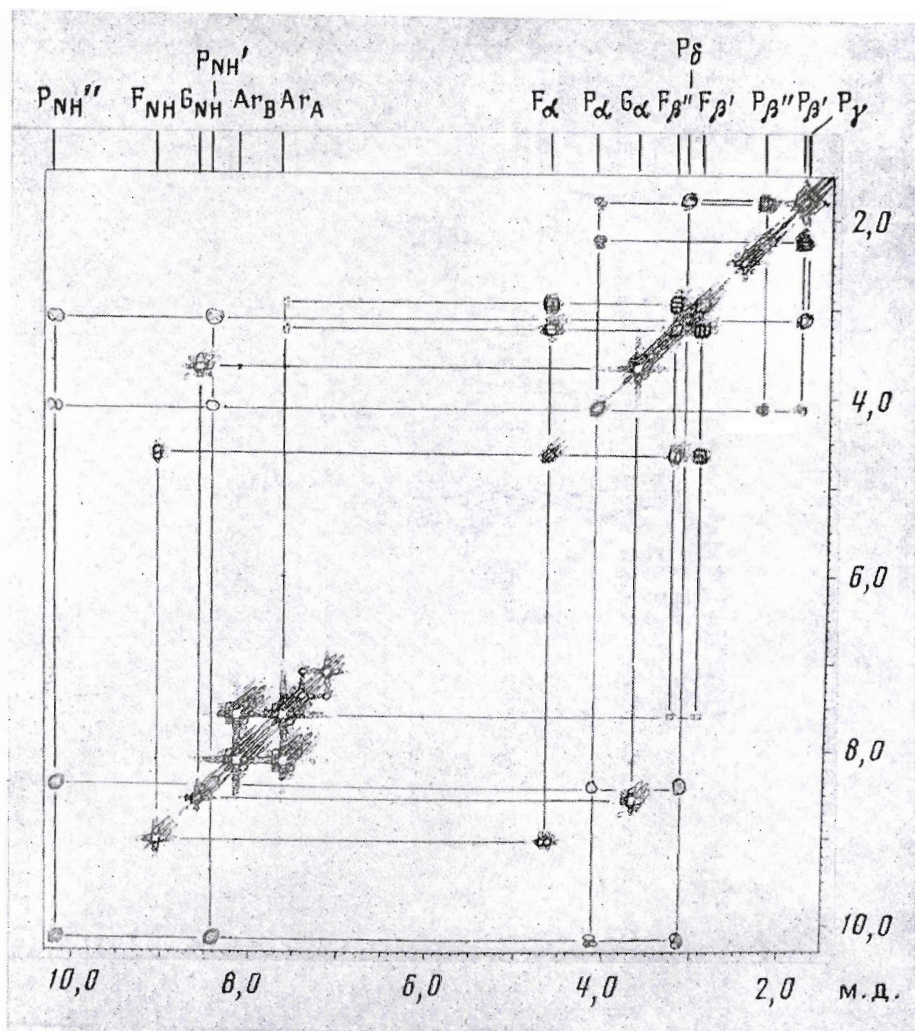


Рис. 1. Двумерный спектр COSY 0,3 М раствора Pro-Phe(*p*-NO₂)-Gly-NH₂·HCl в DMSO-*d*₆ при 20° С. Указаны протон-протонные *J*-связи; обозначения аминокислотных остатков даны в однобуквенном коде

кислотным остаткам (табл. 1). Отнесение перекрывающихся сигналов протонов C^βH, C^γH и C^δH проводили с помощью спектров COSY (рис. 1) и SECSY.

Зная аминокислотный состав и установив наличие *J*-связей, можно связать аминокислотные остатки между собой по цепи с помощью ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО, *d*-связи) на основании двумерного спектра ЯЭО (NOESY), который содержит информацию о достаточно сильных диполь-дипольных взаимодействиях в молекуле.

Известно [6], что пространственное строение олигопептидов характеризуется торсионными углами $\varphi_i, \psi_i, \omega_i$, описывающими вращение вокруг связей N—C^α, C^α—C', C'—N основной цепи, и углами χ_i^1 (C^α—C^β), χ_i^2 (C^β—C^γ) для боковой цепи *i*-й аминокислоты. Угол ω_i обычно равен 180°, что соответствует транс-конфигурации пептидной связи. Углы φ_{Gly} и ψ центрального аминокислотного остатка взаимосвязаны в случае наших пептидов и не могут принимать любые значения. Информацию об углах φ_i и χ_i можно извлечь из значений вицинальных констант спин-спинового взаимодействия $^3J_{NH, C^{\alpha}H}$ и $^3J_{C^{\alpha}H, C^{\beta}H}$ соответственно, используя зависимости Карплуса—Быстрова [7].

В табл. 2 представлены значения констант спин-спинового взаимодействия $^3J_{NH, C^{\alpha}H}$ для MIF и его аналогов, найденные из двумерных δ -*J*-

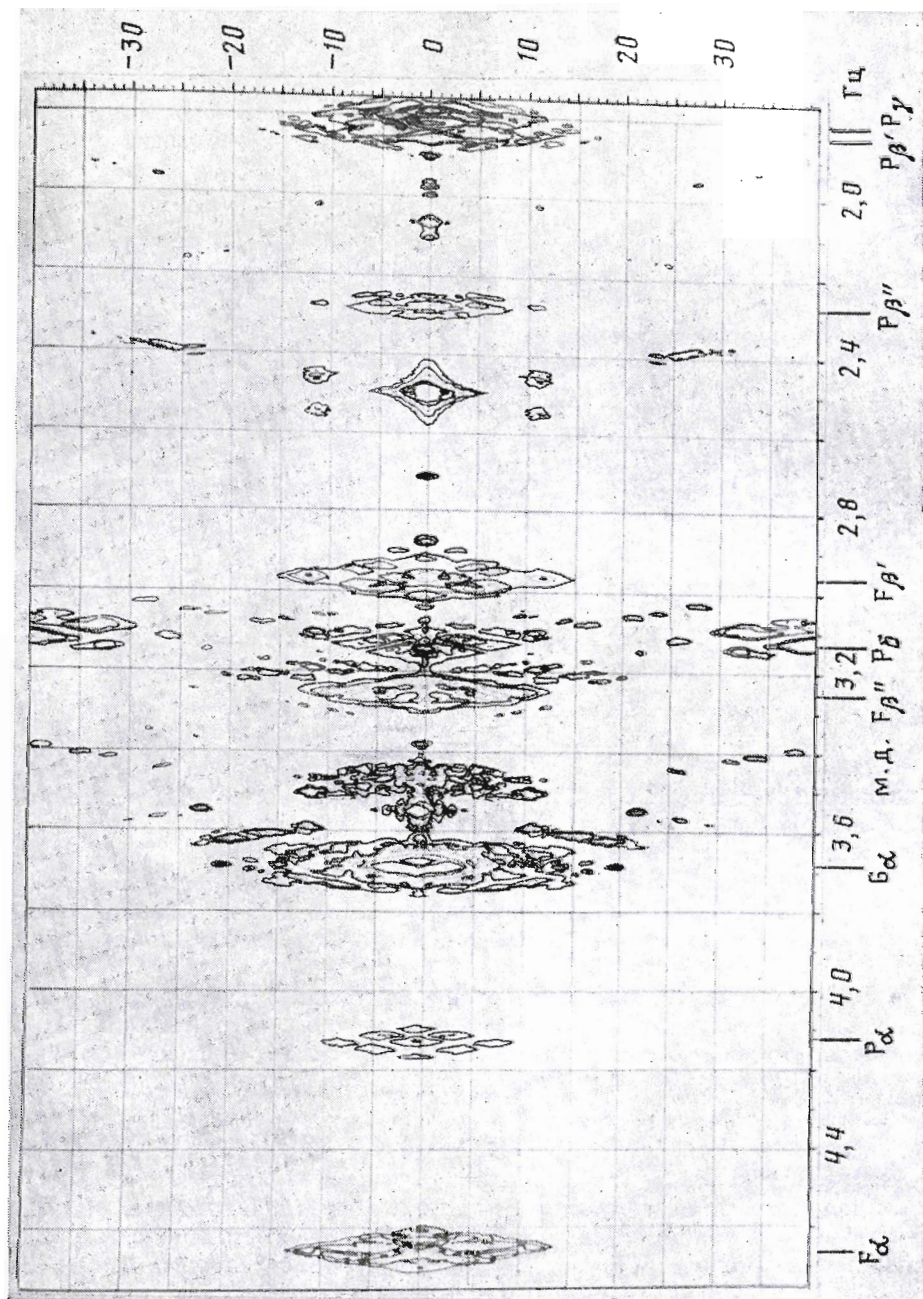


Рис. 2. Двумерный δ - τ -корреляционный спектр 0,3 М раствора $P\alpha$ -Phe \cdot $(p\text{-NO}_2)\text{-Gly-NH}_3^+\text{HCl}$ в $\text{DMSO-}d_6$ при 20°C

корреляционных спектров (рис. 2) и скорректированные по уравнению, учитывающему электроотрицательность заместителей [7]. На основании зависимости Карплуса — Быстрова для вицинальной константы ${}^3J_{\text{NH}, \text{C}^\alpha\text{H}}$ от торсионного угла φ было вычислено несколько значений этого угла для каждого аминокислотного остатка. Количество решений варьирует от двух до четырех.

Ранее методами динамического ЯМР и конформационного расчета было показано наличие внутримолекулярной водородной связи в молекуле MIF [4]. В результате этого молекула принимает конформацию β -изгиба II рода (рис. 3). Молекулы MIF существуют в форме β -изгиба II рода также и в кристалле [8]. Энергетически выгодной конформации MIF соответствует $\varphi_{\text{Leu}} = -60^\circ$, $\chi_{\text{Leu}} = -180^\circ$, $\varphi_{\text{Gly}} = 60^\circ$ [9]. В кристалле эти торсионные углы близки к расчетным значениям: $\varphi_{\text{Leu}} = -61,2^\circ$, $\varphi_{\text{Gly}} = 71,8^\circ$ [8].

Как видно из табл. 2, значения торсионных углов MIF в растворе в DMSO существенно отличаются от расчетных и определенных в кристалле. Существование внутримолекулярной водородной связи в MIF, растворенном в DMSO, CH_3CN [4, 10, 11], позволяет нам исключить то значение торсионного угла $\varphi_{\text{Leu}} = -155^\circ$, которое привело бы к разрыву этой связи. Реализация конформаций β -изгиба I или II рода определяется значениями двух взаимосвязанных торсионных углов: φ_{Gly} и φ_{X} . Расчет на основании констант спин-спинового взаимодействия показал, что для MIF β -изгиб II рода реализуется при значениях $\varphi_{\text{Gly}} = 25$; 95° . При $\varphi_{\text{Gly}} = -75$; -165° реализуется β -изгиб I рода, поэтому эти углы, в соответствии с литературными данными [4, 8], мы можем исключить из рассмотрения.

Значения торсионных углов φ_{X} аналогов MIF близки к φ_{Leu} и возрастают по модулю в ряду $\text{X} = \text{Phe}$, $\text{Phe}(p\text{-NO}_2)$, Tyr , $\text{Phe}[p\text{-NHCO}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2\text{F}]$, $\text{Phe}(p\text{-NH}_2)$ от 40 (-89) до 60 (-95°). Исключение составляет аналог (6), для которого наблюдается единственное значение $\varphi_{\text{X}} = -100^\circ$. Увеличение φ_{X} в ряду аналогов MIF вызывает существенное искажение конформации β_{II} и увеличивает вероятность разрыва внутримолекулярной водородной связи. При этом становится возможным свободное вращение вокруг связей $(\text{C}^\alpha\text{—CO})_{\text{X}}$ и $(\text{N—C}^\alpha)_{\text{Gly}}$ с последующей стабилизацией конформации β_{I} . Значения φ_{Gly} для аналогов MIF практически не изменяются при замене или модификации аминокислотного остатка во 2-м положении.

Сигналы от протонов C^αH и C^βH перекрываются между собой в спектрах ${}^1\text{H}$ -ЯМР пептидов. Это делает невозможным измерение констант спин-спинового взаимодействия протонов $\text{C}^\alpha\text{H—C}^\beta\text{H}$ в одномерных спектрах. Поэтому для измерения вицинальных констант ${}^3J_{\text{C}^\alpha\text{H}, \text{C}^\beta\text{H}}$ и ${}^3J_{\text{C}^\alpha\text{H}, \text{C}^\beta\text{H}}$ и геминальной ${}^2J_{\text{C}^\beta\text{H}, \text{C}^\alpha\text{H}}$ удобно использовать поперечные J -сечения в δ - J -корреляционных спектрах (рис. 4). Полученные из J -сечений значения констант спин-спинового взаимодействия приведены в табл. 2. Значения торсионного угла χ^1 найдены по уравнению, предложенному в работе [12]:

$${}^3J_{\text{C}^\alpha\text{H}, \text{C}^\beta\text{H}} = 5,1 \cos 2\chi - 1,8 \cos \chi + 7,0,$$

при этом $\chi_{\text{C}^\alpha\text{H—C}^\beta\text{H}} = \chi_{\text{C}^\alpha\text{H—C}^\beta\text{H}} - 120^\circ$.

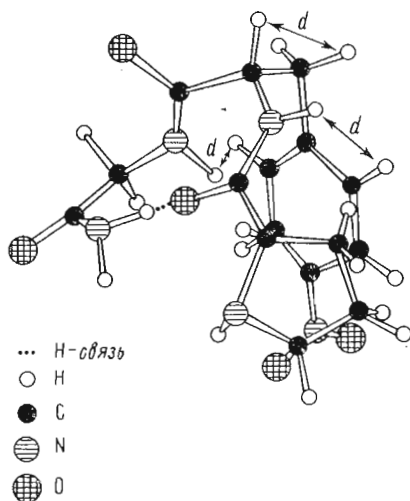


Рис. 3. Конформация β_{II} , принимаемая молекулой $\text{Pro-Phe}(p\text{-NO}_2)\text{-Gly-NH}_2\cdot\text{HCl}$ в растворе $\text{DMSO-}d_6$. Стрелками обозначены некоторые d -контакты, наблюдаемые в спектре NOESY

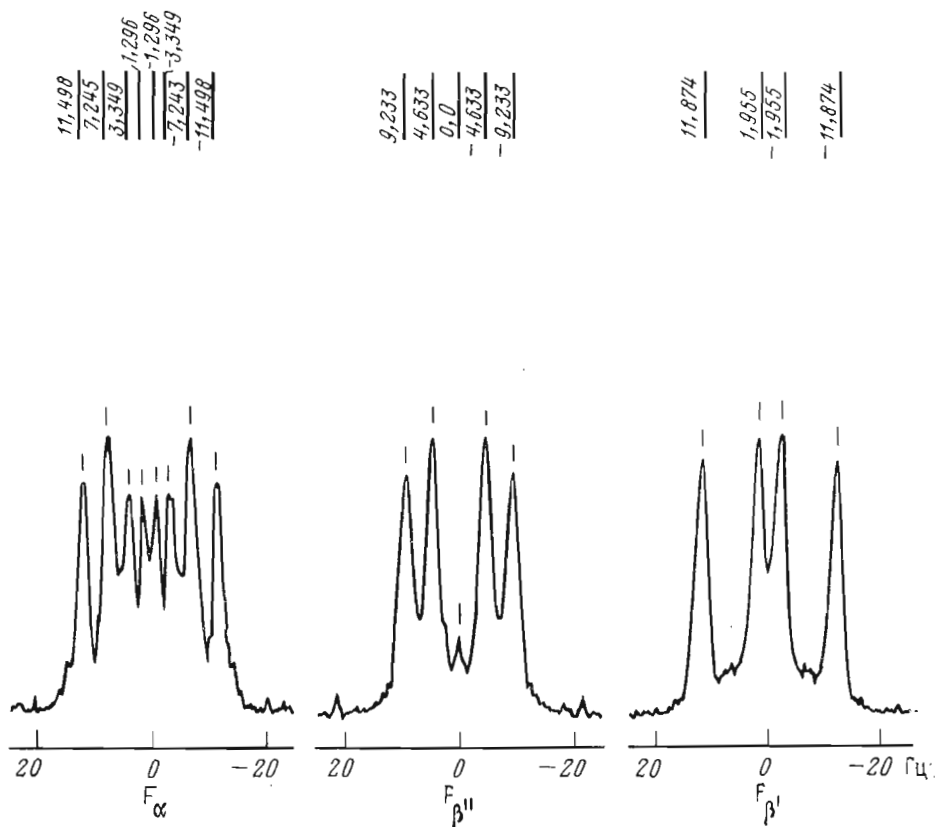


Рис. 4. Поперечные сечения вдоль оси J в δ - J -корреляционном спектре пептида, представленном на рис. 3

Как видно из табл. 2, каждому значению константы спин-спинового взаимодействия $C^{\alpha}H-C^{\beta'}H$ соответствуют два решения указанного уравнения. При этом значения угла χ^1 , вычисляемые из констант спин-спинового взаимодействия $C^{\alpha}H-C^{\beta'}H$ и $C^{\alpha}H-C^{\beta''}H$, получаются взаимно сопряженными (с погрешностью $\pm 20^\circ$).

Поскольку полученные экспериментальные значения χ^1 существенно отличаются от рассчитанных для MIF на основании оптимизации конформационной энергии, для отбора реализуемых в растворе значений χ^1 использованы значения ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Данные этого эксперимента позволили также отобрать углы ϕ и оценить углы ψ . NOESY-спектры, как показано на рис. 5, содержат большое число кросспиков — проявления ЯЭО между пространственно приближенными протонами молекулы [6]. В это число входят тривиальные с точки зрения конформационного анализа пептидов ЯЭО между вицинальными и геминальными протонами аминокислотных остатков. Скалярные спин-спиновые связи между вицинальными и геминальными протонами проявляются в COSY-спектрах. Поэтому в NOESY-спектрах такие ЯЭО легко выделить и исключить из дальнейшего рассмотрения путем сравнения NOESY- и COSY-спектров. Аналогичные диполь-дипольные контакты можно проследить и в спектрах NOESY остальных изученных пептидов.

Межпротонные расстояния между приближенными протонами соединения (3) были определены из значений ЯЭО (табл. 3). Связь между ЯЭО и межъядерными расстояниями определяется выражением [13]

$$(\text{ЯЭО})^{-1} = A d^6.$$

Для двух пар протонов с близкими временами корреляции справедливо соотношение

$$\frac{(\text{ЯЭО})_{ij}^{-1}}{(\text{ЯЭО})_{kl}^{-1}} = \frac{d_{ij}^6}{d_{kl}^6}.$$

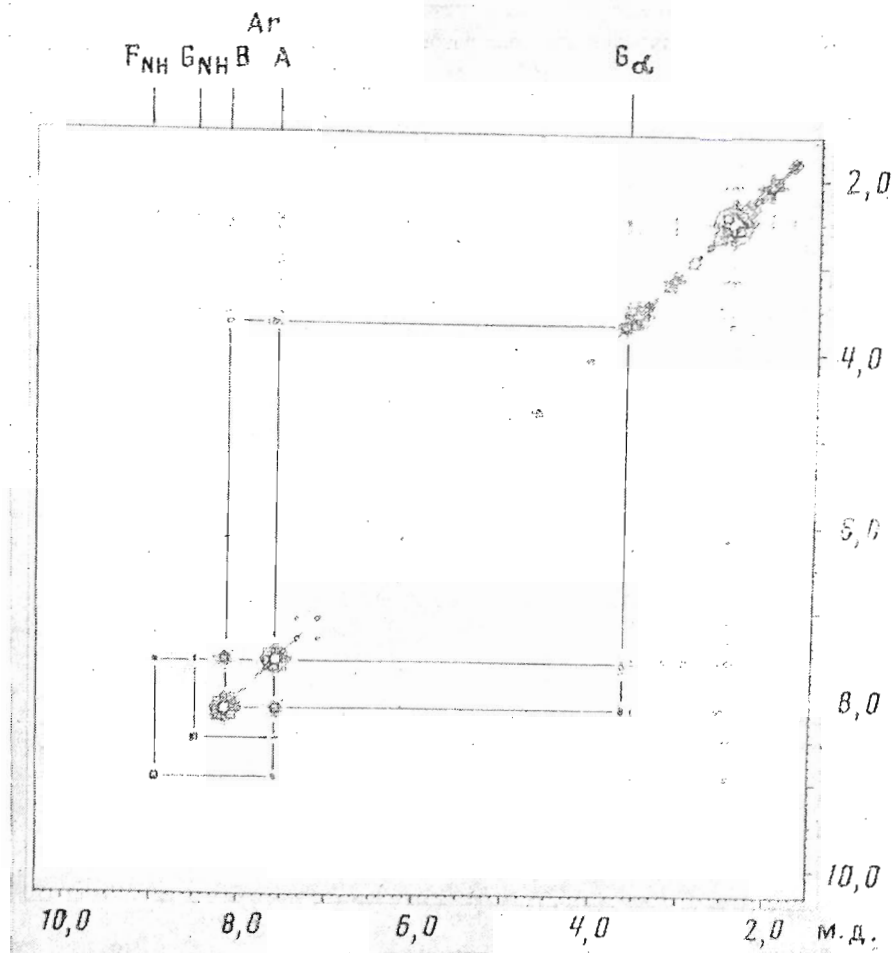


Рис. 5. Двумерный спектр NOESY 0,03 М раствора Pro-Phe(*p*-NO₂)-Gly-NH₂·HCl в DMSO-*d*₆ при 20° С

Если известно расстояние d_{kl} , можно найти d_{ij} из измеренных ЯЭО для соответствующих пар протонов. В качестве известного расстояния мы использовали расстояние между соседними протонами ароматического кольца, равное 2,48 Å. Результаты расчета приведены в табл. 3.

Для конформации β -изгиба II рода с торсионными углами $\varphi_{\text{H}} = -90^\circ$ и $\varphi_{\text{Gly}} = 95^\circ$ наблюдается согласие с измеренным расстоянием между протонами C ^{α} H пролина и протонами NH остатков Gly, Phe(*p*-NO₂), протоном NH₂^{гис}-группы. Это согласие наблюдается при угле $\varphi_{\text{Pro}} = 30^\circ$. Указанные в табл. 3 расстояния между протонами NH глицина и C ^{α} H остатков Pro и Phe(*p*-NO₂) реализуются при $\varphi_{\text{Phe}(p\text{-NO}_2)} = 30^\circ$. Полученные расстояния между протонами C ^{α} H и C ^{β} H, C ^{β} H остатка Phe(*p*-NO₂) соответствуют углам $\chi^1 = 58$ и 159° . При $\chi^1 = 58^\circ$ возможно диполь-дипольное взаимодействие между протоном NH и протонами ароматического кольца остатка Phe(*p*-NO₂), на которое указывают кросс-пики в NOESY-спектре. Диполь-дипольные взаимодействия между протонами ароматического кольца и NH-, C ^{α} H-протонами глицина, которым соответствуют кросс-пики в NOESY-спектре, реализуются при $\chi^1 = 159^\circ$. Полученное расстояние между протонами NH' остатка Pro и C ^{β} H остатка Phe(*p*-NO₂) также соответствует углам $\chi^1 = 58, 159^\circ$ и $\varphi_{\text{Pro}} = 30^\circ$. Кроме того, для конформации β -изгиба II рода при $\chi^1 = 13$ и 129° наблюдаются стерические затруднения вращения ароматического кольца. Наблюдаемые в NOESY-спектре кросс-пики между протоном C ^{β} H остатка Pro и протонами ароматического кольца и определенное по ЯЭО рас-

Значения ЯЭО и вычисленные межпротонные расстояния для сближенных фрагментов трипептида (3)

Пространственный контакт	ЯЭО, отн. ед.	d^* , Å
NH(Phe) — C $^{\alpha}$ H(Pro)	0,030	3,2
NH(Gly) — C $^{\alpha}$ H(Pro)	0,025	3,3
NH $_2^{uic}$ — C $^{\alpha}$ H(Phe)	0,021	3,5
NH(Gly) — C $^{\alpha}$ H(Phe)	0,052	3,0
NH $_2^{m\mu ic}$ — NH(Phe)	0,015	3,7
C $^{\alpha}$ H(Phe) — C $^{\beta}$ H(Phe)	0,027; 0,064	3,2; 2,9
NH'(Pro) — C $^{\beta}$ 'H(Phe)	0,008	4,1
NH(Phe) — C $^{\beta}$ 'H(Pro)	0,040	3,1
NH $_2^{uic}$ — C $^{\beta}$ 'H(Pro)	0,031	3,2
NH $_2^{uic}$ — C $^{\delta}$ H(Pro)	0,031	3,2

* Погрешность определения межпротонных расстояний d составляла $\pm 0,2$ Å.

стояние C $^{\beta}$ 'H_{Pro}—NH_{Phe} возможны при углах $\psi_{Pro} = -150^\circ$ и $\chi^1 = 58^\circ$. Для конформации β -изгиба II рода полученные расстояния между протонами C $^{\beta}$ 'H, C $^{\delta}$ H₂ пролина и протоном NH $_2^{uic}$ -группы также реализуются при $\psi_{Pro} = -150^\circ$. Из анализа расстояний между протонами NH $_2$ и C $^{\alpha}$ H пролина, NH остатка Phe(p -NO $_2$) следует, что образуется внутримолекулярная водородная связь с одним из протонов амидной группы. Таким образом, анализ измеренных расстояний позволяет оценить углы $\psi_{Pro} = 30^\circ$; -150° и $\psi_{Phe(p-NO_2)} = 30^\circ$ и отобразить углы $\chi^1 = 58^\circ$; 159° .

Проведенный анализ пространственной структуры аналогов меланостатина позволяет заключить, что замена Leu на Phe слабо влияет на значения торсионных углов и не изменяет конформации β_{II} молекулы. Однако введение электроподонорных или электроноакцепторных заместителей в n -положение ароматического кольца Phe вызывает ослабление внутримолекулярной водородной связи и повышает вероятность искажения β -изгиба II рода.

Антидепрессивную активность синтезированных пептидов оценивали по тесту «поведенческого отчаяния» [14], который используется для скрининга типичных и атипичных антидепрессантов. При подкожном введении активность пептида Pro-Phe-Gly-NH $_2$ в дозе 5 мг/кг превосходила таковую для меланостатина. Введение в n -положение фенильного ядра фенилаланина электроноакцепторной нитрогруппы несколько снижало активность пептида, а присутствие электроподонорных заместителей в том же положении приводило к почти полной потере активности соединений. Соединение Pro-Phe[p -NHCO(CH $_2$) $_3$ NH $_2$]-Gly-NH $_2$ в дозе 5 мг/кг снижало время иммобилизации животных более чем на 30%. Следует отметить, что уменьшение дозы соединения Pro-Tyr-Gly-NH $_2$ до 1 мг/кг и соединений Pro-Phe-Gly-NH $_2$, Pro-Phe(p -NO $_2$)-Gly-NH $_2$ и Pro-Phe[p -NHCO(CH $_2$) $_3$ NH $_2$]-Gly-NH $_2$ до 0,001 мг/кг приводит к реверсивному эффекту.

Нами предпринята попытка проведения множественной корреляции антидепрессивной активности MIF и его аналогов, взятых в различных дозах, со структурными особенностями их молекул в соответствии с уравнением

$$\Delta A = A_0 + {}^3J_{NH, C^{\alpha}H(X)} A_1 + {}^3J_{C^{\alpha}H, C^{\beta}H(X)} A_2 + {}^3J_{NH, C^{\alpha}H(Gly)} A_3,$$

где структуроопределяющими параметрами являются вицинальные константы спин-спинового взаимодействия, а значения A_0 , A_1 , A_2 , A_3 — коэффициенты линейной регрессии. Значения структурных параметров и активности пептидов при различных дозах приведены в табл. 4.

Антидепрессивную активность считали положительной, а реверсивный эффект отрицательным по сравнению с контролем в соответствии

Значения параметров, характеризующих структуру и физиологическое действие пептидов при различных дозах

Соединение	X		³ J _{NH, C^αH} ^{Gly}	ΔA *, % для доз (мг/кг)				
	³ J _{NH, C^αH}	³ J _{C^αH, C^βH}		5,0	1,0	0,1	0,01	0,001
(1)	8,4	10,3	6,1	7,2	14,8	19,2	29,6	-1,8
(2)	8,7	9,9	6,2	38,3	32,0	21,3	23,0	-10,6
(3)	8,8	9,9	6,4	19,4	8,9	22,7	16,4	-25,2
(4)	9,0	10,8	6,2	4,0	-18,8	8,9	-1,2	8,2
(5)	9,4	10,1	6,7	31,1	1,6	-1,1	1,6	-17,3
(6)	9,7	10,0	6,4	-7,9	2,9	15,1	-6,3	-1,6

* Активность при различных дозах.

Таблица 5

Множественная корреляция физиологического влияния MIF и его аналогов с геометрическими параметрами их молекул

Доза, мг/кг	Уравнение регрессии	R	\hat{t}
5,0	$\Delta A = -(68 \pm 27) - (30 \pm 62)J_1 + (1 \pm 92)J_2 + (52 \pm 128)J_3$	0,57	0,99
1,0	$\Delta A = (697 \pm 11) - (11 \pm 26)J_1 - (43 \pm 37)J_2 - (23 \pm 53)J_3$	0,93	3,62
0,1	$\Delta A = (442 \pm 6) - (1 \pm 14)J_1 - (19 \pm 20)J_2 - (37 \pm 32)J_3$	0,93	3,56
0,01	$\Delta A = (433 \pm 5) - (23 \pm 12)J_1 - (15 \pm 16)J_2 - (1 \pm 26)J_3$	0,98	7,36
0,001	$\Delta A = -(680 \pm 6) + (18 \pm 14)J_1 + (19 \pm 19)J_2 + (49 \pm 31)J_3$	0,96	5,11

с уравнением

$$\Delta A = \frac{\sum \Delta t^{\text{контр}} - \sum \Delta t^{\text{оп}}}{\sum \Delta t^{\text{контр}}} 100\%,$$

где Δt — периоды иммобилизации животных (с).

Уравнения регрессии, полученные при множественной корреляции, а также коэффициенты корреляции R и значения \hat{t} -критерия при уровне значимости $p < 0,1$ приведены в табл. 5. Анализ уравнений регрессии показывает, что при уменьшении дозы вводимого препарата эффект становится устойчивым и увеличивается связь всех геометрических параметров молекулы с антидепрессивной активностью. При более высокой дозе (1,0 мг/кг) статистически значимое воздействие оказывает лишь один параметр, а на максимальной — ни одного. В то же время на минимальной дозе (0,001 мг/кг) наблюдается реверсивный эффект, что выражается в изменении знаков коэффициентов регрессии.

При введении в n -положение фенильного кольца фенилаланина различных заместителей возрастают значения $^3J_{\text{NH, C}^\alpha\text{H}}$ для второй аминокислоты, а следовательно, увеличивается значение φ_X , что повышает вероятность искажения конформации β_{II} . Из табл. 4 видно, что наибольшей активностью обладают именно те соединения, у которых β -изгиб II рода наименее искажен. С увеличением этого искажения активность падает. Так, аналог (6), у которого β -изгиб II рода наиболее искажен, был почти неактивен во всем интервале изученных доз. Поэтому имеет смысл говорить о «физиологически активной конформации» (β -изгиб II рода). В то же время искажения конформации β -изгиба II рода (изменение угла φ_X) при изменении аминокислотного остатка X или его химической модификации ослабляют антидепрессивную активность.

Экспериментальная часть

Меланостатин (Pro-Leu-Gly-NH₂·HCl) и его аналог Pro-Phe-Gly-NH₂·HCl получены по методу [2]. Соединения Pro-Phe(*p*-NO₂)-Gly-NH₂·HCl, Pro-Phe(*p*-NH₂)-Gly-NH₂·HCl, Pro-Phe[*p*-NHCO(CH₂)₃NH₂·

·HCl]-Gly-NH₂·HCl и Pro-Tyr-Gly-NH₂·HCl синтезированы также карбодимидным методом с использованием солевой защиты в присутствии краун-эфиров.

Pro-Phe(*p*-NO₂)-Gly-NH₂·HCl: т. пл. 148—150° С, $[\alpha]_{577}^{21}$
—11 (*c* 1,6, MeOH).

Pro-Phe(*p*-NH₂)-Gly-NH₂·HCl: масло, $[\alpha]_{578}^{20}$
+37 (*c* 1,5, MeOH).

Pro-Phe[*p*-NHCO(CH₂)₃NH₂·HCl]-Gly-NH₂·HCl: масло, $[\alpha]_{578}^{20}$
+6,5 (*c* 1,4, MeOH).

Pro-Tyr-Gly-NH₂·HCl: т. пл. 143—145° С, $[\alpha]_{578}^{20}$ +72,5
(*c* 1,2, MeOH).

Изучение биологической активности полученных пептидов проводили по методу [14]. Экспериментальных животных индивидуально помещали в узкий цилиндр диаметром 10 см, высотой 25 см. Цилиндр заполняли на 1/3 водой, температура 23—25° С. Активность соединений оценивали по времени поз имобилизации животных (в секундах), находящихся в воде, по отношению к соответствующему показателю в контрольной группе. Животных наблюдали в течение 6,5 мин, регистрацию начинали с 3-й мин. Соединения вводили в дозах 5,0—0,001 мг/кг, подкожно за 5 мин до тестирования, в физиологическом растворе. Контрольным животным вводили физиологический раствор.

Двумерные ¹H-ЯМР: COSY-, SECSY-, NOESY- и δ-*J*-спектры получены на спектрометре Bruker AM-250 с рабочей частотой 250 МГц, оснащенном ЭВМ Aspect 3000. Спектры 0,3 и 0,03 М (NOESY) растворов MIF и его аналогов в DMSO-*d*₆ записывали в 5-мм ампулах при 25 и 50° С. Химические сдвиги сигналов в спектрах ¹H-ЯМР измерены относительно сигнала растворителя с погрешностью ±0,01 м. д. Стабилизацию проводили на ядрах дейтерия растворителя.

Двумерные δ-*J*-спектры получены с помощью последовательности из двух неселективных 90- и 180-градусных импульсов [15]: (90° — *t*₁/2 — 180° — *t*₁/2 — *t*₂)_{*n*}, где *t*₁ и *t*₂ — периоды эволюции и наблюдения сигнала соответственно. Для получения двумерного δ-*J*-спектра измерения были проведены для набора из 64 эквидистантных значений *t*₁ от 3 мкс с шагом 5,34 мс. Значение времени *t*₂ составляло 1,516 с.

После окончания накопления спектральных данных получали матрицу 64 × 8192 точек. Перед фурье-преобразованием эту матрицу дополняли нулями до размера 256 × 8192 точки, что соответствовало разрешению 0,3 Гц вдоль оси δ и 0,1 Гц вдоль оси *J*. Полученные из δ-*J*-спектров значения констант спин-спинового взаимодействия проверяли методом двойного гомоядерного резонанса и с помощью ЭВМ-анализа по программе PANIC.

Спектры COSY получены с помощью последовательности из двух неселективных 90-градусных импульсов [16]: (90° — *t*₁ — 90° — *t*₂)_{*n*}. Спектры COSY получены для 512 значений *t*₁ от 3 мкс с шагом 0,364 мс. Значение времени *t*₂ составляло 0,378 с.

Для получения спектров SECSY использовали 2-импульсную последовательность [16]: (90° — *t*₁/2 — *t*₂ — 90° — *t*₂ — *t*₁/2 — *t*₃)_{*n*}, где *t*₁ и *t*₃ — периоды эволюции и наблюдения сигнала. Спектры SECSY получены для 256 значений *t*₁ от 3 мкс с шагом 0,197 мс. Значение *t*₃ составляло 0,758 с.

Спектры NOESY получали, используя 3-импульсную последовательность [17]: (90° — *t*₁ — 90° — τ_{*m*} — 90° — *t*₂)_{*n*}, где τ_{*m*} — время смешивания. Время τ_{*m*} составляло 300 мс. Остальные параметры накопления спектров NOESY аналогичны соответствующим параметрам спектров COSY.

В каждом эксперименте после окончания времени *t*₂ началу следующей серии импульсов предшествовал временной интервал 1,2—3 с для достижения равновесного состояния ядерной намагниченности. Во всех экспе-

риментах использовали квадратурное детектирование. При накоплении спектров каждую из приведенных выше импульсных последовательностей повторяли 16 раз с различными фазами неселективных 90- и 180-градусных импульсов [15]. Для COSY- и NOESY-спектров в результате преобразования Фурье получали матрицу данных 512×512 точек, которую во временной области дополняли нулями до 1024 точек для t_2 . Это соответствовало спектральному разрешению 1,3 Гц на точку. Для спектра SECSY матрицу данных во временной области также дополняли нулями до размера 2048×4096 точек, но спектральное разрешение при этом составляло 0,6 и 1,2 Гц соответственно. Перед преобразованием Фурье матрицу данных во временной области умножали на функции, уменьшающие полосу пропускания сигналов в спектре [17]. Измерение одномерного ЯЭО проводили как описано в работе [13] при мощности насыщения сигнала 40 Гц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crick F. H. C. // *J. Mol. Biol.* 1966. V. 19. P. 584.
2. Мазуров А. А., Андранати С. А., Лобасюк Б. А., Кабанов В. М., Коротенко Т. И. // *Хим.-фармацевт. журн.* 1986. № 2. С. 155.
3. Walter R., Bernal J., Johnson L. F. // *Chemistry and biology of peptides* / Ed. Meienhofer J. Ann. Arbor. Sci., Publ. Ann. Arbor, Michigan, 1972. P. 131—135.
4. Higashijima T., Tasumi M., Miyazawa T., Miyoshi M. // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 89. P. 543—556.
5. Бови Ф. А. ЯМР высокого разрешения макромолекул. М.: Химия, 1977. С. 265—268.
6. Быстров В. Ф. // *Биоорган. химия.* 1984. Т. 10. № 8. С. 997—1043.
7. Bystrov V. F. // *Progr. NMR Spectr.* 1976. V. 10. № 2. P. 41—81.
8. Reed L. L., Johnson P. L. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1973. V. 95. P. 7523—7524.
9. Ralston E., de Coen J.-L., Walter R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1974. V. 71. № 4. P. 1142—1144.
10. Deslauriers R., Walter R., Smith J. C. P. // *FEBS Lett.* 1973. V. 37. P. 27—32.
11. Deslauriers R., Smith J. C. P., Somorjai R. L., Ralston E., Orlowski R. C., Walter R. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1979. V. 13. P. 473—478.
12. Арсеньева А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. // *Биоорган. химия.* 1983. Т. 9. № 12. С. 1667—1689.
13. Bell R. A., Saunders J. K. // *Canad. J. Chem.* 1970. V. 48. P. 1114—1122.
14. Porsolt R. D., Le Richon M., Galjre M. // *Nature.* 1977. № 266. P. 730.
15. Бакс Э. Двумерный ЯМР в жидкости. Новосибирск: Наука, 1989. С. 82.
16. Vax A., Freeman R. // *J. Magn. Res.* 1981. V. 44. P. 542.
17. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Волкова Т. М., Гришин Е. В., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. // *Биоорган. химия.* 1983. Т. 9. № 6. С. 768—793.

Поступила в редакцию
2.1.1990

После доработки
22.III.1990

Yu. E. SHAPIRO, V. Ya. GORBATYUK, V. M. KABANOV, A. A. MAZUROV,
S. A. ANDRONATI, B. A. LOBASUYUK, N. Ya. GOLOVENKO, M. G. ROKACHINSKAYA

CONFORMATIONAL PECULIARITIES OF BIOLOGICALLY ACTIVE MIF ANALOGUES

A. V. Bogatsky *Physico-chemical Institute, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Odessa*

On the basis of the two-dimensional ^1H NMR studies the conformation of melanocyte inhibiting hormone ($\text{HCl} \cdot \text{Pro-Leu-Gly-NH}_2$, MIF) and its five analogues with *p*-substituted phenylalanine has been determined. Structure-antidepressant activity relationship (examined by the Porsolt test) of MIF and its analogues has been estimated by means of the multivariety statistical analysis, the vicinal spin coupling constants, which determine φ and χ dihedral angles of the second amino acid and φ dihedral angle of glycine, being selected as structural parameters. It is shown that a biologically active conformation (10-membered β -turn II) is realized for the considered peptides.