



УДК 577.175.82.15 : 577.151.7

© 1993 И. А. Прудченко, Л. В. Сташевская,
И. И. Михалева, В. Т. Иванов, А. А. Шандра*,
Л. С. Годлевский*, А. М. Мазарати*

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЯДА НОВЫХ АНАЛОГОВ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА I. АНТИЭПИЛЕПТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шенякина РАН, Москва;
* Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова, Одесса*

С целью дальнейшего структурно-функционального изучения пептида дельта-сна (ДСИП) осуществлен синтез 11 новых аналогов пептида с помощью твердофазного способа синтеза по Fmoc- и Boc-схемам. Модификации проводились в положениях 1, 2, 6 аминокислотной последовательности ДСИП. Проведено изучение антиэпилептической активности соединений в сравнении с нативным пептидом при внутримозговом (50 мкг/кг; на крысах) и внутрибрюшинном (1,0 мг/кг на мышках) введении в условиях острых форм генерализованной эпилептической активности, вызванной введением животным пикротоксина и коразола. Для ряда аналогов обнаружена антиэпилептическая активность, превышающая активность самого ДСИП как при внутримозговом, так и при внутрибрюшинном введении.

Пептид дельта-сна (ДСИП) был выделен из диализата венозной крови кроликов, таламическая область мозга которых была подвергнута низкочастотной электростимуляции, вызывающей медленноволновой сон (дельта-сон) [1]. Эндогенный пептид, обладающий сониндуцирующей активностью, привлек внимание физиологов, биохимиков и фармакологов. Но неоднозначность в результатах тестирования его гипногенной активности стала причиной некоторого скептицизма и известного падения интереса к изучению пептида. Однако своеобразный период некоторого «застоя» не был продолжительным, о чем свидетельствует большое число публикаций, посвященных различным аспектам исследования этого пептида с программируемыми функциями, обобщенных в обзорах М. Графа и А. Кэстина [2] и Ш. Иноэ [3].

В настоящее время уже сложилось представление о пептиде дельта-сна как о нейропептиде с широким спектром биоактивности. Помимо неоднозначного действия на сон этот пептид уменьшает двигательную активность животных, влияет на терморегуляцию и циркадные ритмы, изменяет концентрацию нейромедиаторов и нейропептидов, вызывает налоксон-чувствительную анальгезию, обладает выраженной стресс-протективной и адаптогенной активностью.

Изучение влияния ДСИП на очаговые формы судорожной активности,

В работе использованы стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC — IUB, а также: ДСИП — дельта-сониндуцирующий пептид; НОEt — 1-гидроксиметилпиперазин; TFA — трифторуксусная кислота; Pam — *n*-гидроксиметилфенилацетамидометил; cHex — циклогексил; Z(Br) — 2-бромбензилоксикарбонил; Fmoc — 9-флуоренилметилоксикарбонил; DIPA — диизопропилэтиламин; DMA — диметилацетамид; BOP — гексафторфосфат бензотриазолил-*N*-окситрисдиметиламинофосфония.

а также на судорожную активность, формируемую при коразоловом киндлинге, выявило противозипилептическую эффективность ДСИП [4]. Исследованы особенности противосудорожных эффектов ДСИП на моделях генерализованных судорог, вызываемых разными эпилептогенами. Показаны противозипилептические эффекты ДСИП в условиях создания эпилептических очагов в коре головного мозга крыс и кошек с помощью аппликации растворов пенициллина и стрихнина [5]. Показано также, что введение ДСИП в ретикулярную часть черной субстанции оказывает противосудорожное действие в условиях острых генерализованных судорог, вызываемых системным введением пикротоксина и коразола у интактных крыс, и выражается в удлинении латентного периода судорог, снижении их тяжести, а также снижении летальности животных в ответ на тестирующее применение конвульсанта [6, 7].

Настоящая работа посвящена исследованию противосудорожных свойств структурных аналогов ДСИП (II—XII) с заменами в положениях 1, 2 и 6 аминокислотной последовательности нативного пептида (I):

DSIP	¹ Trp-- ² Ala-- ³ Gly-- ⁴ Gly-- ⁵ Asp-- ⁶ Ala-- ⁷ Ser-- ⁸ Gly-- ⁹ Glu	(I)
ID-1	----DVal-----	(II)
ID-3	----DAla-----Tyr-----	(III)
ID-4	----DLeu-----	(IV)
ID-5	Tyr--Pro-----	(V)
ID-7	----DAla-----Pro-----	(VI)
ID-8	Tyr-DAla-----	(VII)
ID-9	--NMeAla-----	(VIII)
ID-10	----DAla-----	(IX)
ID-11	----Pro-----Pro-----	(X)
ID-12	---βAla-----	(XI)
ID-13	----DPhe-----	(XII)

Для увеличения устойчивости к протеолизу нами получен ряд аналогов с *D*- и *NMe*-аминокислотами в положении 2; исследована возможность замены триптофана на другую ароматическую аминокислоту*— тирозин в положении 1; проведена стабилизация молекулы за счет введения пролина в положения 2 и 6; получен ряд соединений с увеличенной липофильностью в положении 2.

Синтез аналогов осуществляли методом последовательного наращивания пептидной цепи с использованием Fmoc- и Boc-схем твердофазного пептидного синтеза. В случае синтеза по Boc-схеме для временной защиты α-аминогруппы аминокислот использовали Boc-группу. Боковые функциональные группы аминокислот защищали: Asp — OcHx; Glu — OBzl; Ser — Bzl, Tyr — Z(Br), Bzl. В качестве носителя использовали аминотетраметилсоединенный сополимер полистирола и 1% дивинилбензола с РАМ-якорной группировкой. Для проведения реакций конденсации использовали диизопропилкарбодиимид в присутствии *HOBT*. В случае проведения конденсации с *N*-метилаланилполимером применяли *ВОР*-реагент в присутствии *HOBT*. Для наиболее полного протекания реакции брали 3-кратные избытки реагентов по отношению к пептидил-полимеру. Полноту протекания реакции контролировали с помощью качественного и количественного нингидринового теста [8]. В процессе синтеза аналогов нами был проведен поиск оптимального времени конденсации с помощью этого теста на каждой стадии синтеза. В табл. 1 представлены результаты этого поиска.

Для конечного деблокирования пептидов использовали жидкий фтористый водород в присутствии *n*-крезола (9 : 1); в случае триптофансодержащих пептидов в реакционную смесь добавляли 2% индола или триптофана. По данным ВЭЖХ для реакционной смеси, можно предположить, что выбранные условия деблокирования позволяют свести к минимуму протекание побочных реакций, связанных с наличием в пептидах триптофана и тирозина. При этом оказалось предпоч-

Оптимальное время конденсации на каждой стадии синтеза

Номер остатка	Вводимый остаток	Вос-схема		Фмос-схема
		количество раз	время, ч	время, ч
8	Gly	1	2	2
7	Ser	1	1	1
6	Ala, Tyr, Pro	1	1	1
5	Asp	1	1	1
	Asp на Pro	1	2	2
4	Gly	1	2	1
3	Gly	1	2	2
2	DAla, β Ala	1	2	2
	Pro	2	1	2
	DVal, DLeu	2	2	—
1	Trp, Tyr	2	1	2
	Trp, Tyr на Pro	2	2	4
	Trp на NMeAla *	1	4	—

* Конденсация проводилась в ручном режиме с помощью ВОР-реагента.

тительнее использовать индол, поскольку при последующей гель-фильтрации удается полностью от него избавиться.

В случае синтеза по Фмос-схеме для временной защиты α -аминогруппы аминокислот использовали Фмос-группу, для защиты боковых функций — трет-бутильные группы. В качестве носителя применяли *n*-гидроксиметилфенилоксиметилполистирол. Для увеличения скорости протекания реакции конденсации нами применялись 4-кратные избытки реагентов. Для синтеза по Фмос-схеме, так же как и в случае синтеза по Вос-схеме, определяли оптимальное время конденсации на каждой стадии синтеза с помощью нингидринового теста (табл. 1).

Для конечного деблокирования пептидов использовали три различных реагента. Применение реагента R (TFA — тиаоанизол — этандитиол — анизол, 90 : 5 : 3 : 2) [9] привело к трудноразделимой смеси продуктов с содержанием целевого продукта не более 60% (по данным ВЭЖХ для реакционной смеси после гель-фильтрации; рис. 1а). Этот реагент был выбран исходя из литературных данных о предпочтительности использования этандитиола в смеси с другими «скевенджерами» для подавления алкилирования триптофана в случае триптофансодержащих пептидов [9]. При использовании реагента К (TFA — фенол — вода — тиаоанизол — этандитиол, 82,5 : 5 : 5 : 5 : 2,5), предложенного в работе [10], результаты деблокирования оказались существенно лучше (рис. 1б), однако остались трудности с выделением пептидов из реакционной смеси. В этих двух случаях оказалось недостаточно очистки гель-фильтрацией и пришлось использовать препаративную ВЭЖХ на конечной стадии очистки. С целью избежать дополнительных стадий очистки нами использован реагент А (TFA — хлороформ — индол, 75 : 23 : 2). Деблокирование проходило в течение 3 ч при 5° С с последующим упариванием на ротаторном испарителе при комнатной температуре. Этот реагент позволяет практически полностью избежать протекания побочных реакций при деблокировании (по данным ВЭЖХ; рис. 1в) и выделить желаемый продукт за одну стадию очистки.

Для выделения деблокированных пептидов, полученных по Вос- и Фмос-схемам, мы использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-15. Для большинства аналогов (см. табл. 2) этой стадии очистки оказалось достаточно, чтобы получить гомогенные

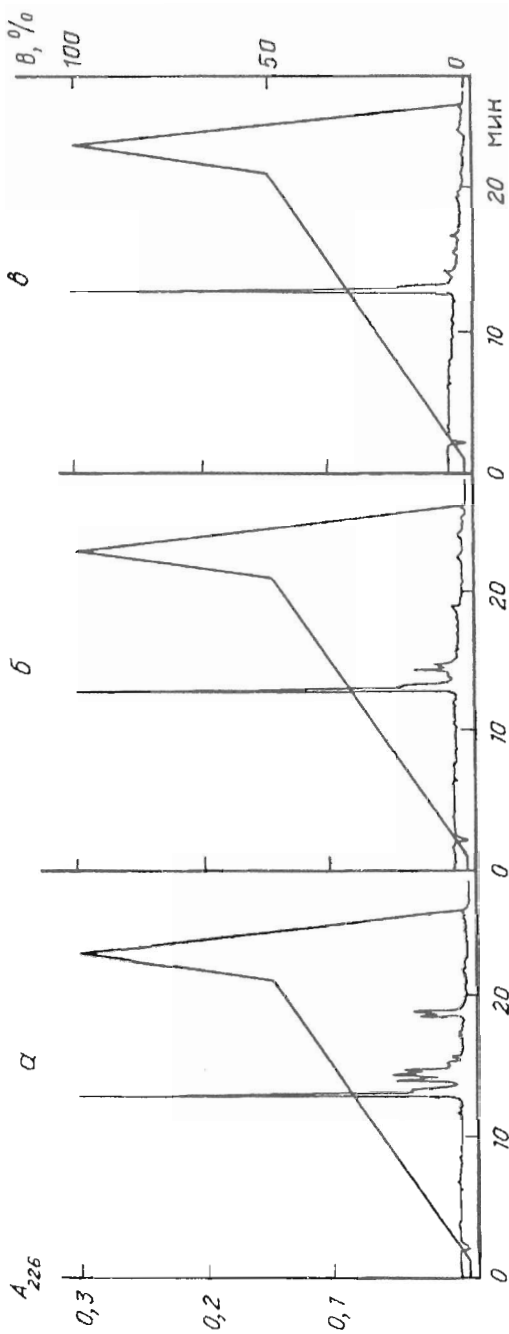


Рис. 1. Аналитическая ВЭЖХ целевого продукта при синтезе по Fmoc-схеме аналога (XI) после гель-фильтрации реакционной смеси при деблокировании реагентом R (TFA — тиоанизол — этандитиол — анизол, 90 : 5 : 3 : 2) (*а*), реагентом K (TFA — фенол — вода — тиоанизол — этандитиол, 82,5 : 5 : 5 : 2,5) (*б*) и реагентом A (TFA — хлороформ — индол, 75 : 23 : 2) (*в*). Скорость элюции 1 мл/мин

Аналоги, полученные по Вос- и Fмос-схемам

Номер пептида	Шифр	Конечная стадия очистки	Выход, %	
			Вос-схема	Fмос-схема
I	DSIP	G-15	61	57
II	ID-1	G-15	52	—
III	ID-3	G-15	47	—
IV	ID-4	ВЭЖХ *	49	—
V	ID-5	G-15	63	67
VI	ID-7	G-15	56	62
VII	ID-8	G-15	51	58
VIII	ID-9	ВЭЖХ *	34	—
IX	ID-10	G-15	64	—
X	ID-11	ВЭЖХ *	—	37
XI	ID-12	G-15	—	51
XII	ID-13	G-15	58	—

* Препаративный вариант, скорость элюции 8 мл/мин.

соединения (чистота более 97% по данным аналитической ВЭЖХ). В более сложных случаях мы применяли препаративную ВЭЖХ в качестве последующего этапа выделения пептидов. Все аналоги охарактеризованы корректными данными аминокислотного анализа и масс-спектрометрии; структура подтверждена данными ¹H-ЯМР-спектроскопии.

Для пептидов, содержащих пролин и N-метилаланин в положении 2 (ID-5, ID-9, ID-11), мы столкнулись с явлением пространственной *цис-транс*-изомерии, обнаруживаемой при анализе спектров ЯМР. Для доказательства нашего предположения о *цис-транс*-изомерии в лаборатории ЯМР института были сняты спектры этих аналогов при разных температурах (30 и 90° C). Действительно, при повышении температуры происходит уширение и слияние сигналов, принадлежащих разным конформерам (рис. 2), что свидетельствует о пространственной *цис-транс*-изомерии и об отсутствии примесей в этих пептидах.

В результате синтеза по Вос- и Fмос-схемам мы имели возможность сравнить эти способы твердофазного синтеза, выявить их достоинства и недостатки применительно к аналогам ДСИП. Оба способа при правильном выборе условий синтеза позволяют получить желаемый продукт с хорошим выходом. Однако при использовании Fмос-схемы расходуются существенно меньшие объемы растворителей и уменьшается время, необходимое для получения конечного продукта. Таким образом, при наличии необходимых аминокислотных производных использование Fмос-схемы оказалось предпочтительнее, чем Вос-схемы.

Для сравнения противосудорожной эффективности аналогов ДСИП использовали результаты, полученные на модели генерализованной эпилептической активности, вызываемой внутрибрюшинным введением пикротоксина у крыс. При внутринигральном введении пептидов сравнимая с эффективностью ДСИП или более высокая эффективность обнаружена у аналогов ID-5, ID-8, ID-12; при этом ID-5 полностью предотвращал развитие генерализованных клонико-тонических судорог. Аналог ID-4 облегчал развитие эпилептической активности, что выражалось в увеличении тяжести пикротоксин-вызванных судорог (рис. 3). При внутригиппокампальном введении пептидов более высокая, чем у ДСИП, активность обнаружена у аналогов ID-5, ID-8, ID-12. При этом, если ДСИП

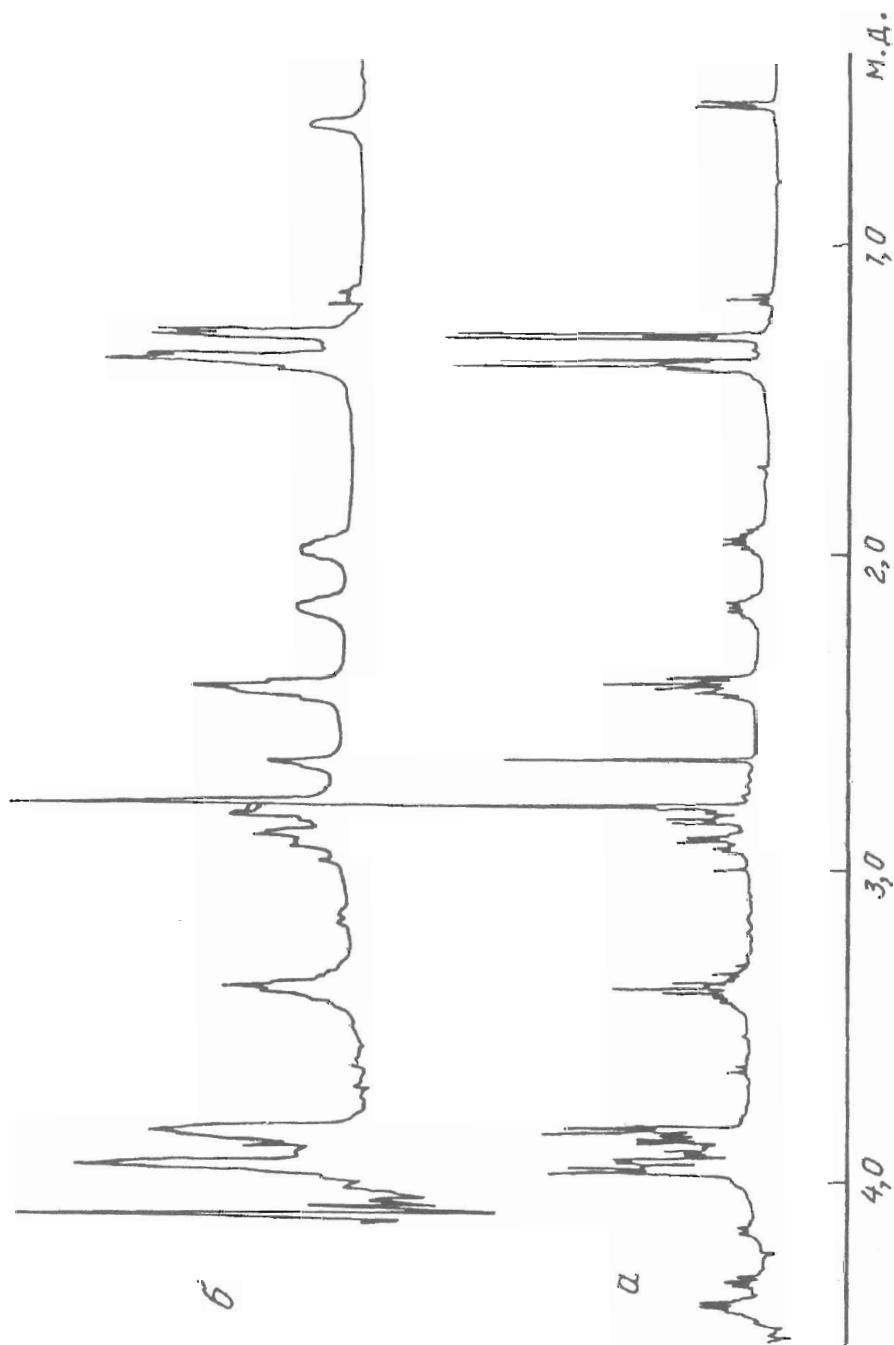


Рис. 2. $^1\text{H-NMR}$ -спектр аналога $[\text{NMeAla}^2]\text{ДСИП}$ при 30 (а) и 90° С (б)

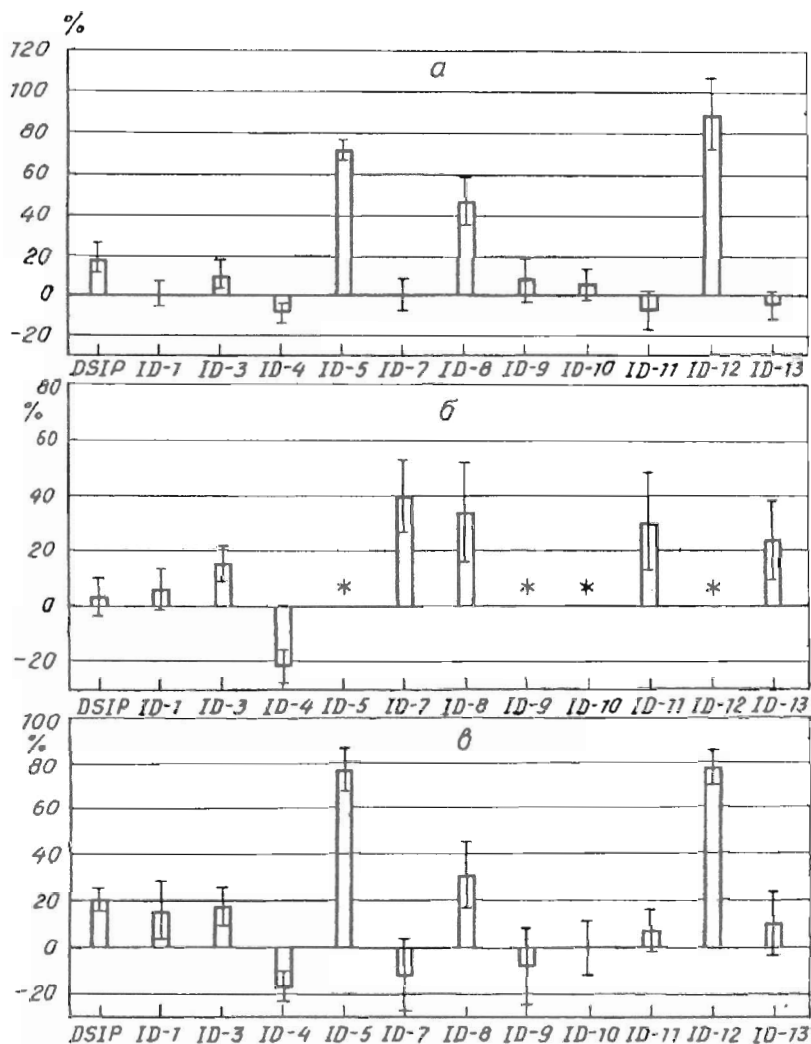


Рис. 3. Влияние ДСИП и его аналогов на epileptическую активность при внутринигральном введении (50 мкг/кг) крысам. Судорожная активность вызвана внутрибрюшинным применением пикротоксина (2,0 мкг/кг). а — увеличение (в процентах к контролю) латентного периода первых судорог; б — увеличение (в процентах к контролю) латентного периода клонико-тонических судорог; в — снижение тяжести судорог (в процентах к контролю). Звездочка означает отсутствие клонико-тонических судорог

только приводил к удлинению латентного периода первых судорог, перечисленные аналоги вызвали существенное снижение тяжести судорог (рис. 4). Введение аналогов ID-9 и ID-10 практически не влияло на тяжесть судорог; в экспериментах с этими аналогами тяжесть судорог как в контроле, так и в опыте не достигала уровня, при котором развиваются клонико-тонические судороги.

Синтезированные аналоги были также исследованы на модели генерализованной epileptической активности, вызываемой внутрибрюшинным применением коразола (60 мг/кг) у мышей. Внутрибрюшинное введение аналогов ID-5, ID-8, ID-12 (1,0 мг/кг) оказывало достоверное снижение судорожных проявлений, вызванных коразолом (рис. 5).

В результате анализа полученных данных можно заключить, что замена триптофана на тирозин в положении 1 молекулы ДСИП с одновременным увеличением устойчивости к протеолизу за счет введения в положение 2 пролина

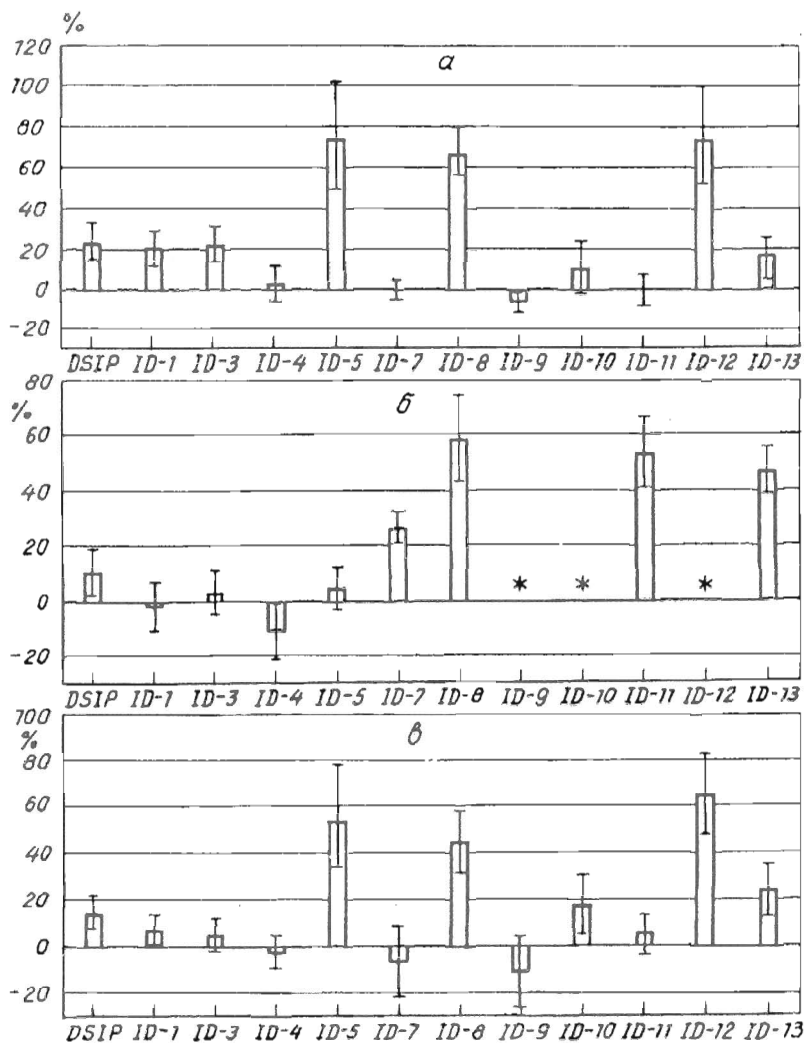


Рис. 4. Влияние ДСИП и его аналогов на эпилептическую активность при внутригиппокампальном введении (50 мкг/кг) крысам. Судорожная активность вызвана внутривнутрибрюшинным применением пикротоксина (2,0 мг/кг). а — увеличение (в процентах к контролю) латентного периода первых судорог; б — увеличение (в процентах к контролю) латентного периода клонико-тонических судорог; в — снижение тяжести судорог (в процентах к контролю). Звездочка означает отсутствие клонико-тонических судорог

или *D*-аланина значительно повышает антиэпилептическую активность. К подобным результатам приводит также замена аланина в положении 2 на β -аланин.

Проявление антиэпилептической активности аналогами ID-5, ID-8 и ID-12 как при их внутримозговом, так и при внутривнутрибрюшинном введении можно объяснить вероятной способностью этих пептидов преодолевать гематоэнцефалический барьер подобно нативному ДСИП.

Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислотные производные и реактивы фирм Reanal (ВНР), PRF (Япония), Advanced Chemtech (США), Aldrich (США), Fluka (Швей-

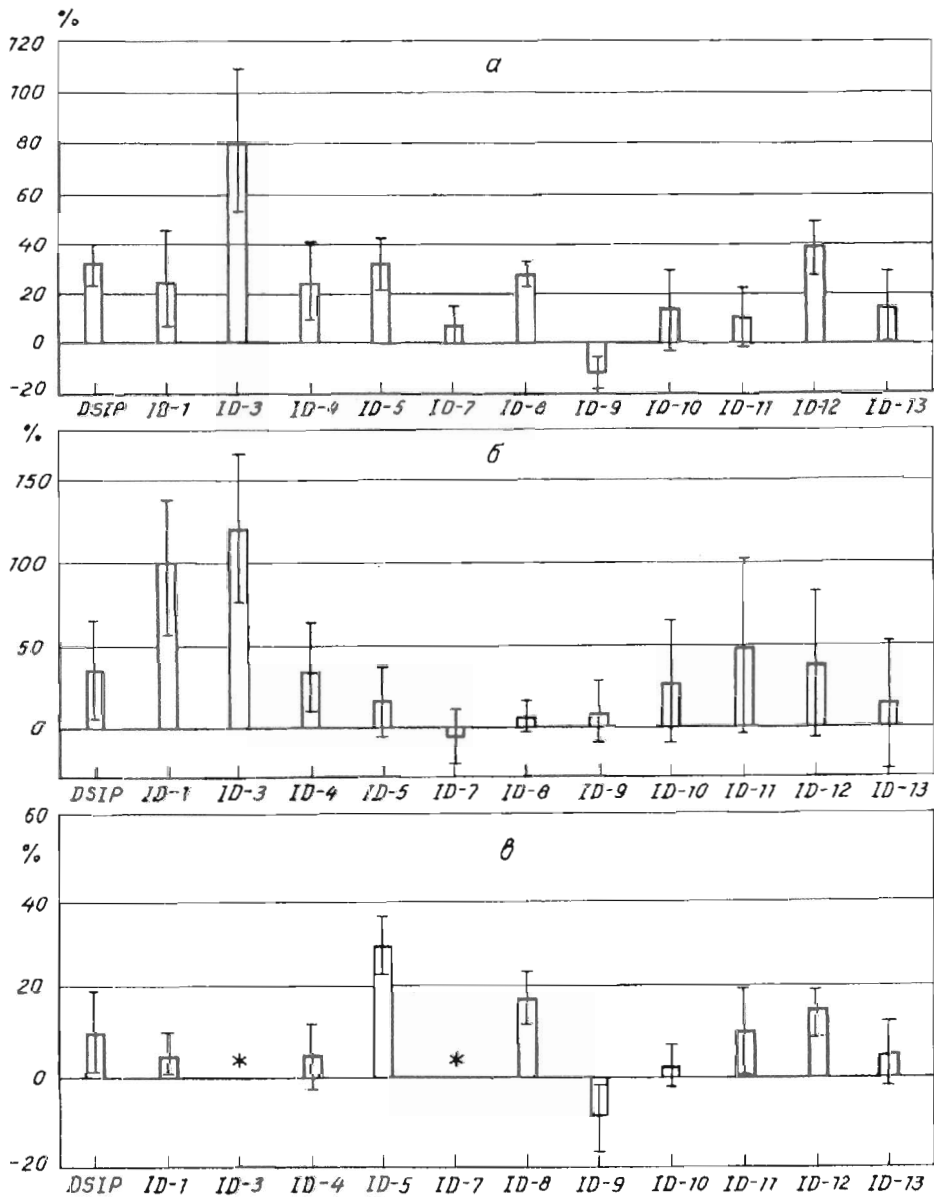


Рис. 5. Влияние ДСИП и его аналогов на epileptическую активность при внутривбрюшинном введении (1 мг/кг) мышам. Судорожная активность вызвана внутривбрюшинным применением коразола (60 мг/кг). а — увеличение (в процентах к контролю) латентного периода первых судорог; б — увеличение (в процентах к контролю) латентного периода клонико-тонических судорог; в — снижение тяжести судорог (в процентах к контролю). Звездочка означает отсутствие изменений в тяжести судорог

цария). Пептиды получали твердофазным методом пептидного синтеза на автоматическом синтезаторе Biosearch 9500 (Milligen/Biosearch, США). В качестве исходного полимера брали *n*-гидроксиметилфенилоксиметилполимер (Novabiochem) и *n*-(Вос-Ala-оксиметил)- и *n*-(Вос-Glu(OBzl)-оксиметил)фенилацетамидометилполимеры (Advanced Chemtech). Отщепление со смолы и деблокирование пептидов проводили в HF-аппарате фирмы PRF (Япония); для гель-фильтрации применяли сефадекс G-15 (Pharmacia, Швеция). Центрифугирование проводили

Протокол твердофазного синтеза по Вос-схеме

Номер шага	Растворитель	Объем, мл	Число промывок	Время, мин
1	CHCl ₃	30	2	0,5
2	TFA — CHCl ₃ — анизол (48 : 50 : 2)	30	2	1; 19
3	CHCl ₃	75	5	0,5
4	10% DIPEA в CHCl ₃	30	2	1
5	CHCl ₃	75	5	0,5
6	В реактор добавляют 0,6 М раствор в диметилформамиде: 3 экв. защищенной аминокислоты + 3 экв. НОВt, 3 экв. диизопропилкарбодиимида; перемешивание (В случае двукратной реакции конденсации повторяют стадии 3—7)			60, 120
7	DMF — CHCl ₃ (1 : 1)	30	2	1
8	CHCl ₃	30	2	0,5
9	Отбирают 5 мг для нингидринового теста			
10	По окончании каждого цикла повторяют стадии 1—9 По окончании синтеза повторяют стадии 1—5			
11	Этанол	45	3	0,5

на приборе Centrifuge 5413 (Eppendorf, ФРГ). ВЭЖХ осуществляли на приборе System Gold (Beckman, США) с использованием колонок Nucleosil 5C18 (4×200 мм; Macherey-Nagel, ФРГ) и Silasorb C18, 7,5 мкм (24×250 мм; «Хроматосервис», Россия) и градиента концентрации MeCN — 0,2% TFA — R₁OH, 80 : 25 : 20 (B) в 0,2% TFA. Удельное вращение измеряли на поляриметре DIP-360 (Jasco, Япония). Аминокислотный анализ кислотных гидролизатов пептидов осуществляли на приборе D-500 (Durrum, США). Гидролиз пептидов проводили 6 н. HCl (110° С, 24 ч) или смесью пропионовая кислота — HCl (1 : 1, 155° С, 15 мин). Молекулярную массу веществ определяли с помощью FAB-масс-спектрометрии на приборе Kratos MS50TS (Великобритания). Спектры ¹H-ЯМР (500 МГц) снимали на спектрометре WM 500 (Bruker, ФРГ), УФ-спектры — на приборе Ultrospec II (LKB, Швеция).

Синтез пептидов с использованием Вос-схемы

Синтез аналогов (II—VIII, XII) и самого пептида (I) проводили исходя из 1 г Вос-Glu(OBzl)-РАМ-полимера (0,4 ммоль/г), а аналога (IX) — из 1 г Вос-Ala-РАМ-полимера (0,3 ммоль/г). В качестве конденсирующего агента применяли диизопропилкарбодиимид с НОВt (1 : 1). Для образования амидной связи с N-концевым остатком N-метилаланина (VIII) использовали следующее соотношение реагентов: Вос-Trp—ВОР—НОВt—DIEA (12 : 3 : 1 : 6). Протокол синтеза приведен в табл. 3. В качестве боковых защитных групп брали для Asp — ОСНх, для Glu — OBzl, для Ser — Bzl, для Tyr — Bzl и Z(Br). Конечное деблокирование проводили жидким фтористым водородом в присутствии *n*-крезола и индола (9 : 1 : 0,2) или смесью фтористый водород — *n*-крезол (9 : 1) в течение 1 ч при 0° С. После упаривания фтористого водорода реакционную смесь промывали эфиром (5×10 мл) на стеклянном фильтре, затем экстрагировали 10% уксусной кислотой (3×10 мл) и лиофилизовали.

Протокол твердофазного синтеза по Fmoc-схеме

Номер шага	Растворитель	Объем, мл	Число промывок	Время, мин
1	DMF — CHCl_3 (1 : 1)	30	2	1
2	Пиперидин — DMF — толуол (30 : 35 : 35)	30	2	3,7
3	DMF — CHCl_3 (1 : 1)	90	6	0,5
4	В реактор добавляют 0,4 М раствора в диметилформамиде: 4 экв. защищенной аминокислоты + 4 экв. HOBT , 4 экв. диизопропилкарбодиимида; перемешивание			60, 120
5	DMF — CHCl_3 (1 : 1)	30	2	0,5
6	Отбирают 5 мг для нингидринового теста Кайзера			
7	По окончании каждого цикла повторяют стадии 1—6			
	По окончании синтеза повторяют стадии 1—3			
8	Этанол	45	3	0,5

Синтез пептидов с использованием Fmoc-схемы

n-(Fmoc-Glu(OBu^t)-оксиметил)фенилксиметилполимер получали по следующей методике [11]: к раствору 5,82 г Fmoc-Glu(OBu^t)-OH (16,0 ммоль) в 30 мл DMA добавляли раствор 1,60 г (11,9 ммоль) HOBT в 7 мл DMA и охлаждали до 0° С, затем добавляли раствор 2,40 мл (16,0 ммоль) диизопропилкарбодиимида в 7 мл DMA. Реакционную смесь перемешивали 10 мин при 0° С и добавляли в реакционный сосуд, содержащий 5 г (0,8 ммоль/г) ПАМ-полимера. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20° С, отфильтровывали и смолу промывали хлороформом (3×30 мл), изопропанолом (3×30 мл), хлороформом (3×30 мл) и метанолом (3×30 мл). Сушили 2 ч в вакууме масляного насоса. Нагрузку определяли количественным аминокислотным анализом: 0,25 ммоль/г.

Аналоги (V—VII, X, XI) и пептид (I) синтезировали исходя из 1 г Fmoc-Glu(OBu^t)-ПАМ-полимера (0,25 ммоль/г). В качестве конденсирующего агента применяли диизопропилкарбодиимид с HOBT (1 : 1). Протокол синтеза приведен в табл. 4. В качестве боковых защитных групп для Glu, Asp, Ser и Tyr использовали *tert*-бутильную группу.

Были использованы три варианта конечного деблокирования пептидов (II): реагентом R (TFA — тиоанизол — этандитиол — анизол, 90 : 5 : 3 : 2), 2 ч при 5° С, реагентом К (TFA — фенол — вода — тиоанизол — этандитиол, 82,5 : 5 : 5 : 5 : 2,5), 3 ч при 5° С, и реагентом А (TFA — хлороформ — индол, 75 : 23 : 2), 3 ч при 5° С, с последующим упариванием на роторном испарителе при 20° С. В случае применения реагентов R и К реакционную смесь упаривали на роторном испарителе при 30° С, обрабатывали сухим эфиром и отфильтровывали; осадок тщательно промывали эфиром (более 7 раз). Для всех трех вариантов полученный осадок экстрагировали 10% уксусной кислотой (3 раза) и лиофилизировали.

Очистка и идентификация полученных пептидов

Лиюфилизат, полученный после деблокирования пептидов, растворяли в 4 мл 0,1 М уксусной кислоты, центрифугировали 5 мин (20 000 об/мин); супернатант подвергали гель-фильтрации на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-15 (0,1 М уксусная кислота). Скорость элюции 25 мл/ч; детекция при 226 нм. Дальнейшую очистку проводили с помощью препаративной ВЭЖХ (табл. 2).

Чистота продуктов подтверждена аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Физико-химические свойства аналогов

Шифр соединения	Аналог	М, Да	R_f	$[\alpha]_D^{25}$ (t, °C)	λ_{max}	ϵ , М ⁻¹ ·см ⁻¹
I	ID-0	849	12,47	-15,99 (26)	278	4770
II	ID-1	877	16,91	-11,99 (26)	278	4970
III	ID-3	941	15,71	11,99 (27)	277	5820
IV	ID-4	891	18,05	21,33 (27)	278	4220
V	ID-5	852	11,18	-35,33 (28)	274	1050
VI	ID-7	875	14,35	-21,99 (28)	278	4460
VII	ID-8	826	11,73	5,99 (28)	274	1120
VIII	ID-9	863	13,78	-19,72 (26)	278	4890
IX	ID-10	576	14,80	18,66 (28)	278	2640
X	ID-11	875	15,24	-45,33 (28)	278	4000
XI	ID-12	848	12,83	-15,99 (29)	278	4040
XII	ID-13	925	19,08	-8,66 (29)	277	5030

* с 0,3, H₂O; для пептида (I) $[\alpha]_D^{25}$ -16,2 (с 0,3; H₂O) [12].

Пептиды охарактеризованы корректными данными аминокислотного анализа и масс-спектрометрии; индивидуальность подтверждена с помощью ЯМР и аналитической ВЭЖХ. Константы полученных соединений приведены в табл. 5.

Методика исследования антиэпилептической активности аналогов

Опыты выполнены в условиях острого эксперимента на крысах линии Вистар массой 200—320 г и мышах линии BALB/C массой 18—22 г.

Внутрирмозговые введения пептидов в дозах 50 мкг/кг осуществлялись за 15—18 мин до введения пикротоксина в условиях фиксации крыс в стереотаксическом аппарате под эфирным рауш-наркозом. Пептиды, растворенные в 0,9% физиологическом растворе NaCl, инъецировали билатерально по координатам атласа [13] в вентральный гиппокамп (AP = -4,8; L = 5,0; H = 7,0) и в ретикулярную часть черной субстанции (AP = -4,8; L = 3,0; H = 8,5). В объеме 2,0 мкл вводили 10 мкг исследуемого вещества с помощью микроинъектора Тог (Индия) со скоростью 1,0 мкл/мин. Животным контрольных групп в аналогичных условиях в соответствующие структуры мозга вводили 2,0 мкл 0,9% раствора NaCl.

Судороги у крыс вызывали внутрибрюшинным введением пикротоксина (2,0 мг/кг) в объеме 0,5 мл 0,9% раствора NaCl. После инъекции конвульсанта животных помещали в стеклянную камеру (40×50×30 см) и наблюдали в течение 60 мин. Оценивали латентный период первых и максимальных судорог, а также тяжесть судорог по шестибалльной шкале [14].

Генерализованные судорожные реакции у мышей вызывали с помощью внутрибрюшинного введения коразола (60 мг/кг) в объеме 0,2—0,3 мл. Внутрибрюшинное введение пептидов (за 30 мин до применения коразола) производили в дозе 1,0 мг/кг в объеме 0,2—0,3 мл 0,9% физиологического раствора NaCl. В течение 30 мин после инъекции конвульсанта наблюдали судорожные реакции в прозрачных индивидуальных камерах (40×30×20 см). Учитывали латентный период первых и максимальных судорог, а также тяжесть судорожных проявлений, которые оценивали по принятой шкале [14].

Результаты исследований обрабатывали статистически с применением критерия Т-Стьюдента.

Авторы выражают свою признательность Т. А. Балашовой за помощь в получении и интерпретации ^1H -ЯМР-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schoenenberger G. A., Monnier M.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 3. P. 1282—1286.
2. Graf M. V., Kastin A. J.//Peptides. 1986. V. 7. P. 1165—1187.
3. Inoue S.//Biology of Sleep Substances/Voca Raton. Florida CRC Press, 1989. P. 45—70.
4. Шандра А. А., Годлевский Л. С., Крыжановский Г. Н., Макулькин Р. Ф., Михалева И. И., Иванов В. Т.//Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1988. Т. 106. № 9. С. 269—271.
5. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Годлевский Л. С., Карпова М. Н., Михалева И. И., Иванов В. Т.//Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1987. Т. 104. № 11. С. 582—585.
6. Shandra A. A., Godlevsky L. S., Mazarati A. M., Oleshko A. A., Lobenko A. A.//I Congress of Epileptology. Polish Chapter of ILAE: Abstr. Warsaw, 1991. P. 63.
7. Шандра А. А., Годлевский Л. С., Мазарати А. М., Макулькин Р. Ф.//Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1989. Т. 107. № 2. С. 211—214.
8. Sarin V. K., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B.//Anal. Biochem. 1981. V. 117. № 1. P. 147—157.
9. Fields G. B., Noble R. L.//Int. J. Peptide and Protein Res. 1990. V. 35. P. 161—214.
10. King D., Fields C., Fields G.//Int. J. Peptide and Protein Res. 1990. V. 36. P. 255—266.
11. Grandas A., Jorba X., Giralt E., Pedroso E.//Int. J. Peptide and Protein Res. 1989. V. 33. P. 386—390.
12. Саргсян А. С., Сумская Л. В., Александрова И. Ю., Безруков М. В., Михалева И. И., Иванов В. Т., Балабан П. М.//Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 8. С. 1125—1149.
13. Paxinos G., Watson C.//The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Sydney: Acad. Press, 1982.
14. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Макулькин Р. Ф., Годлевский Л. С.//Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1985. Т. 99. № 5. С. 527—532.

Поступила в редакцию
23.VII.1992

I. A. PRUDCHENKO, L. V. STASHEVSKAYA, I. I. MIKHALEVA, V. T. IVANOV,
A. A. SHANDRA *, L. S. GODLEVSKY *, A. M. MAZARATI *

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF NOVEL ANALOGUES OF DELTA SLEEP INDUCING PEPTIDE (DSIP). I. ANTI-EPILEPTIC ACTION

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow;
* N. I. Pirogov Odessa Medical Institute, Odessa

To study structure-functional relationship in the series of DSIP, eleven DSIP analogues varying in positions 1, 2 and 6 were synthesized by the solid-phase method using both Boc- and Fmoc-approaches. The antiepileptic action of these analogues was compared with that of DSIP. The seizure activity was induced by the corazol or picrotoxin i. p. injection. Some analogues proved more efficient as antiepileptic agents than DSIP after their central (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in rats) and peripheral (1.0 mg/kg in mice) administration.