



УДК 547.962.057:577.175'.8'17

## СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКОГО АНАЛОГА ЭНКЕФАЛИНА ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

© 1995 г. И. В. Боброва\*, Н. А. Мышлякова, О. С. Папсуевич,  
И. А. Восекална, Е. И. Мекшун

Латвийский институт органического синтеза, LV-1006, Рига, ул. Айзкрауклес, 21

Поступила в редакцию 22.12.93 г. После доработки 18.04.94 г.

Классическими и твердофазным методами пептидной химии синтезированы циклический аналог энкефалина – cyclo(Lys-Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro-) и два соответствующих линейных гексапептида, содержащих остаток лизина на N- и C-конце молекулы: Lys-Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro и Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro-Lys. Наблюдается значительная пролонгация анальгетического эффекта циклического аналога энкефалина, исследованного методом “tail pinch” при интрацестеральном введении мышам. Циклоаналог оказывает слабое влияние на периферические опиатные рецепторы изолированного сегмента подвздошной кишки морской свинки. Присоединение остатка лизина к N-концу молекулы пентапептида энкефалина на порядок увеличивает селективность связывания с опиатным рецептором  $\mu$ -типа.

Ключевые слова: энкефалин, аналоги; пептидный синтез.

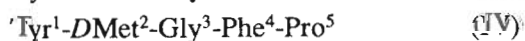
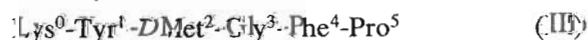
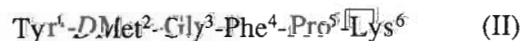
В 1975 г. Хьюз и сотр. [1] выделили из мозга животных и химически охарактеризовали два пентапептида с опиоидным действием – [Met<sup>5</sup>]- и [Leu<sup>5</sup>]энкефалины. Было показано, что отсутствие анальгетической активности у энкефалинов при их внутривенном введении, а также кратковременность действия даже при введении в желудочки головного мозга объясняются их быстрым расщеплением под воздействием ферментов крови и спинномозговой жидкости. В последующие годы в целях поиска высокоактивных опиоидных пептидов были проведены многочисленные синтезы аналогов энкефалинов. Из огромного числа различных структурных изменений в молекуле энкефалинов, приводящих к повышению устойчивости соединений к действию ферментов и существенному усилению анальгетической активности с ее пролонгацией, можно выделить два основных типа: замещение глицина в положении 2 на D-аминокислоту и замещение или модификация (амидирование, этерификация и т.д.) C-концевой аминокислоты пептида (см., например, работы [2, 3]). Удлинение пептидной цепи также может привести к усилению активности [4].

Особый интерес для дизайна [5] высокоактивных аналогов нейропептидов и гормонов представляет циклизация молекул линейных предшественников. Большая перспективность этого ме-

тода впервые была продемонстрирована на примере синтеза циклобрадикинина, а позже и других многочисленных циклопептидов, в том числе циклоэнкефалинов [6 - 8].

Надо полагать, что совмещение отмеченных выше наиболее существенных для биологической активности модификаций в одной молекуле может привести к более сильной пролонгации действия нового аналога по сравнению с аналогами с отдельными единичными модификациями.

В продолжение поиска высокоактивных аналогов энкефалинов пролонгированного действия в настоящей работе нами предпринят синтез нового циклоаналога – cyclo(Lys-Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro-) (I), модифицированного в положениях 2 и 5, с дополнительной вставкой остатка лизина. Циклическая структура соединения (I) сконструирована аналогично синтезированному нами ранее циклоаналогу [Leu<sup>5</sup>]энкефалина – cyclo(Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-), т.е. замыканием пептидной связи между  $\epsilon$ -аминогруппой лизина и C-концевой карбоксильной группой пептида [3]. Для сравнения биологической активности получены также соответствующие линейные гексапептиды (II) и (III), содержащие остаток лизина в 5-м (остаток присоединен через  $\epsilon$ -аминогруппу) и нулевом положении соответственно, а также пентапептид (IV).



Принятые сокращения: GPI – подвздошная кишка морской свинки, MVD – семьявыносящий проток мыши, OPr – пентафторфенил.

\* Автор для переписки.

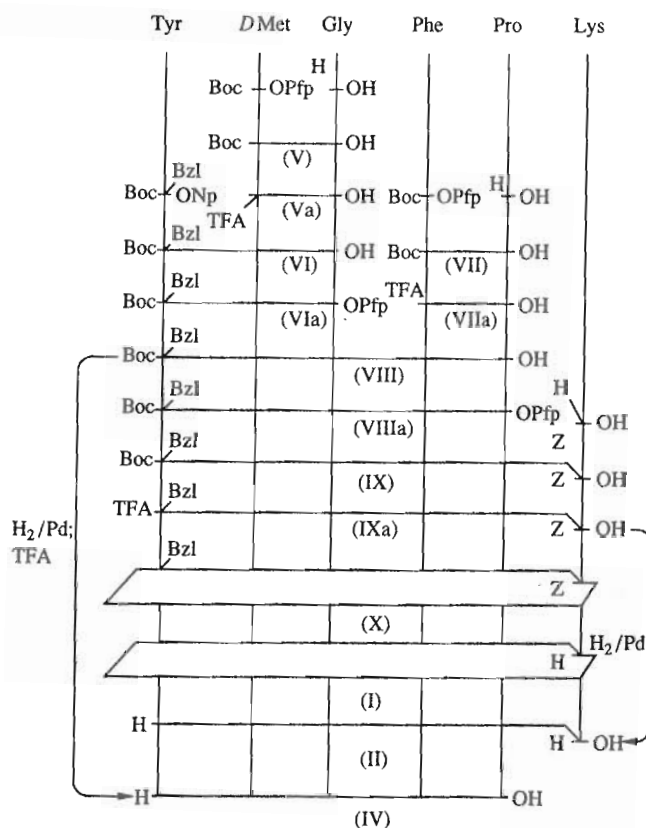


Схема синтеза лизинсодержащих аналогов [DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина.

Синтез циклоаналога энкефалина (I), его линейного предшественника (II) и пентапептида (IV) проводили классическими методами пептидной химии в растворе (см. схему), аналога (III) – модифицированным твердофазным методом. Выбор защитных групп, условия циклизации не отличались от описанных ранее [8].

Дипептид (V) получали конденсацией пентафторфенилового эфира Boc-DMet с натриевой солью глицина. Затем к деблокированному дипептиду (Va) присоединяли Boc-Tyr(Bzl)-ONp и получали защищенный трипептид (VI) с выходом 87%. Конденсацией соответствующих N- и C-концевых фрагментов синтезировали защищенные пента- и гексапептиды (VIII, IX). Гексапептид (IX) деблокировали трифторуксусной кислотой и циклизовали дифенилфосфорилиазидом [8]. Как видно из схемы, циклоаналог (X) получали, замыкая цепь между аминогруппой тирозина и карбоксильной группой лизина. Связь между ε-аминогруппой лизина и пролином была образована ранее. Выход циклического продукта реакции после хроматографического разделения образовавшейся при циклизации смеси веществ составил 40%. Синтез циклоаналога (I) был завершён гидрированием над палладиевой чернью в присутствии циклогексилламина. Использование метода

снятия защитных групп бензильного типа каталитическим гидрированием над палладиевой чернью ограничено для пептидов с серосодержащими аминокислотами. Чтобы не усложнять синтез другим, более трудоемким методом деблокирования, нами был успешно использован метод каталитического гидрирования серосодержащих пептидов в присутствии циклогексилламина, предложенный Медзиградским [9]. Циклическая структура синтезированного соединения (I) была подтверждена масс-спектроскопическим определением молекулярной массы вещества.

Деблокирование линейных пептидов (II, III, VI) проводили в аналогичных условиях.

Условия синтеза линейного гексапептида – [Lys<sup>0</sup>, DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина (III), проведенного твердофазным методом с использованием сефадекса LH-20 в качестве носителя, показаны ранее в работе [10], за исключением способа присоединения первой аминокислоты к носителю. Пролин присоединяли к сефадексу LH-20 действием DCC в присутствии диметиламинопиридина.

Спектры КД (рисунок) [DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина (IV), cyclo[Lys<sup>0</sup>, DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина (I) и его двух Lys-содержащих линейных аналогов (II) и (III) в воде характеризуются группой максимумов поглощения <sup>1</sup>L<sub>b</sub>-ароматических переходов с малыми значениями эллиптичности: от 250 до 290 нм (Phe – 250 - 270 нм, Tyr – 270 - 290 нм). Боковые цепи ароматических остатков Phe и Tyr ориентированы одинаково. Положительная полоса дихроичного поглощения при 220 - 230 нм состоит из перекрывающихся полос амидного (n-π\*) и ароматического <sup>1</sup>L<sub>a</sub>-переходов (рисунок). Максимум дихроичного поглощения при 190 - 200 нм относится к амидному π→π\*-переходу и свидетельствует о сходном пространственном строении пептидного остова у [DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина (IV), cyclo[Lys<sup>0</sup>, DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина (I) и [Lys<sup>0</sup>, DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина (III), отличающегося от строения [DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>, Lys<sup>6</sup>]энкефалина (II). Введение Lys в C-концевую часть молекулы приводит к исчезновению положительного максимума дихроичного поглощения при 190 - 200 нм, что свидетельствует о конформационной перестройке основной пептидной цепи аналога (II).

Сходство спектров КД циклопептида (I), его линейного предшественника (III), содержащего лизин на N-конце молекулы, и [DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина (IV) позволяет сделать вывод о близости их пространственной структуры.

Анальгетическая активность синтезированных аналогов энкефалина оценивалась по методу "tail-pinch" (прижатия хвоста) при интрацистернальном введении мышам [8, 11], влияние на периферические опиатные рецепторы – на препаратах

подвздошной кишки морской свинки (GPI) и семявыносящем протоке мыши (MVD) [8, 12]. Результаты исследования биологической активности приведены в табл. 1, 2.

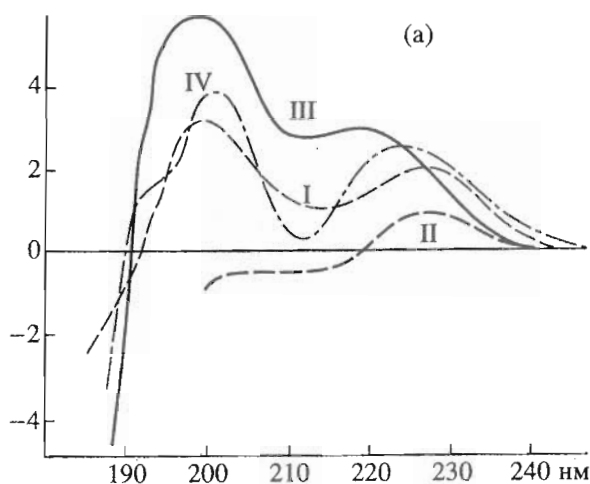
Из табл. 1 видно, что новый циклический аналог (I) обладает высокой анальгетической активностью, превышающей активность природного энкефалина [13], хотя по сравнению с описанным в литературе пентапептидом (IV) [2] он несколько менее активен. Анальгетическая активность аналога с циклической структурой (I) практически не отличается от активности линейного предшественника (III), однако аналог (I) имеет преимущество – он менее токсичен при исследовании на животных. В интервале изученных доз (0.1 - 100 мкг/животное) циклоаналог (I) не проявляет токсических эффектов в отличие от линейного аналога энкефалина (III), который в дозе 25 мкг/животное, хотя и вызывает устойчивый анальгетический эффект у 90% животных в течение 1.5 ч, приводит в 10% случаев к летальному исходу.

Как и ожидалось, циклизация привела к существенной пролонгации анальгетического действия: продолжительность анальгезии при ED<sub>60-80</sub> для циклоаналога (I) составляет 90 мин, для линейных предшественников (гексапептидов (II) и (III)) – 60 мин (ср.: для энкефалина (XI) и линейного пентапептида (IV) только 15 и 5 мин). Доза 100 мкг/животное вызывает анальгетический эффект циклоаналога (I) продолжительностью 2.5 ч.

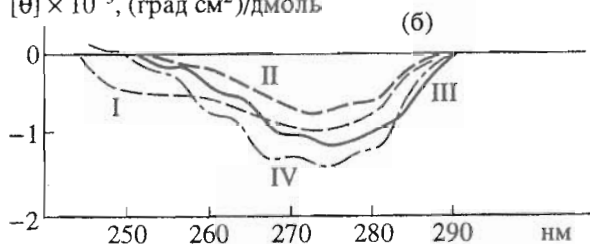
Влияние циклоаналога (I) на периферические опиатные рецепторы изолированного сегмента подвздошной кишки морской свинки (GPI) оказалось весьма низким: менее 1% активности [DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина (IV) (табл. 2).

Присоединение остатка лизина к N-концу [DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина увеличило μ-активность (GPI) (160%) и уменьшило сродство к δ-типу рецептора (MVD) (3.7%), т.е. аналог (III) на порядок

$[\theta] \times 10^{-4}$ , (град см<sup>2</sup>)/дмоль



$[\theta] \times 10^{-3}$ , (град см<sup>2</sup>)/дмоль



Спектры кругового дихроизма аналогов (I) - (IV) энкефалина в дальней (а) и ближней (б) ультрафиолетовой области.

более селективен (индекс GPI/MVD 43.2), чем исходный пентапептид (IV) (индекс GPI/MVD 1). Такой же вывод был сделан при исследовании лизинсодержащих ди- и трипептидов энкефалина [14]. Селективность [Leu<sup>5</sup>]энкефалина и [DMet<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>]энкефалина (IV) одинакова.

Присоединение остатка лизина к C-концу через ε-аминогруппу (II) вызвало практически полную утрату активности в обоих тестах (табл. 2).

Таблица 1. Анальгетическая активность аналогов энкефалина при интракостеральном введении мышам (метод "tail pinch")

Пептид	Структура	ED <sub>50</sub> <sup>*</sup> , нмоль/животное	Время максимального эффекта, мин	Продолжительность анальгезии при ED <sub>60-80</sub> , мин	Относительная анальгетическая активность <sup>**</sup>
I	Lys-Тур-DMet-Gly-Phe-Pro-	5.9 (1.6 - 23.3)	15	90	30
II	Тур-DMet-Gly-Phe-Pro-Lys	54.0 (34.0 - 87)	5 - 15	60	3
III	Lys-Тур-DMet-Gly-Phe-Pro	5.1 (2.3 - 11.8)	5 - 15	60	34
IV	Тур-DMet-Gly-Phe-Pro	1.8 (1.3 - 2.9)	5	15	97
XI	Тур-Gly-Gly-Phe-Leu	174 (102 - 281)	5	5	1
XII	Морфин	1.2 (0.6 - 2.2)	5 - 15	60	145

\* В скобках указаны пределы доверительного интервала по уровню 0.95.

\*\* Вычислена относительно [Leu<sup>5</sup>]энкефалина (XI).

**Таблица 2.** Ингибиторная активность ( $IC_{50}$ ) аналогов энкефалина, исследованная на препаратах подвздошной кишки морской свинки (GPI) и семьявыносящем протоке мыши (MVD)

Соединение	GPI			MVD			$GPI_{отн}/MVD_{отн}$	
	$IC_{50}$ , нмоль	$GPI_{отн}, \%*$		$IC_{50}$ , нмоль	$MVD_{отн}, \%*$		А	Б
		А	Б		А	Б		
I	9500 ± 1200	3	0.7	**	—	—	—	—
II	**	—	—	21000	0.9	$1 \times 10^{-4}$	—	—
III	42.6 ± 7.7	678.6	160	79 ± 26	25	3.7	27	43.2
IV	68.0 ± 6.6	419.1	100	2.93 ± 0.35	682	100	0.6	1
XI	285 ± 78	100	24	20 ± 1	100	14.6	1	1.6
XII	78 ± 19	365.4	87	579 ± 244	3.4	0.5	107.4	174

\* Ингибиторная активность ( $GPI_{отн}$ ,  $MVD_{отн}$ ) подсчитана по отношению к  $[Leu^5]$ энкефалину (XI) (А),  $[DMet^2, Pro^5]$ энкефалину (IV) (Б), активность которых принята за 100%.

\*\* Концентрация  $10^{-4}$  М вызывает ингибирование менее 50%.

Сходство спектров КД циклопептида (I) и линейного гексапептида (III), а также одинаковая анальгетическая активность позволяют предположить, что такой вариант циклизации не затрагивает основных конформационных особенностей гексапептида и сохраняет необходимые для эффективности действия функциональные группы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Синтез пептидов.** Для синтеза аналогов энкефалина использовали аминокислоты их производные фирмы Reanal (Венгрия). Все аминокислоты имеют *L*-конфигурацию, кроме *D*-Met. Индивидуальность промежуточных соединений контролировали ТСХ на пластинках Silufol UV<sub>254</sub> (ЧСФР). Для хроматографии аналогов энкефалина применяли стеклянные пластинки с закрепленным слоем силикагеля (Silica Gel 60 F-254, Merck, ФРГ). Использовали следующие системы растворителей: хлороформ–этанол–AcOH, 85 : 10 : 5 (А); *n*-бутанол–пиридин–AcOH–H<sub>2</sub>O, 15 : 10 : 3 : 6 (Б); 15 : 12 : 3 : 10 (В); хлороформ–метанол–AcOH–H<sub>2</sub>O, 30 : 20 : 4 : 6 (Г); 60 : 18 : 2 : 3 (Д); *n*-бутанол–AcOH–H<sub>2</sub>O, 4 : 1 : 1 (Е); этилацетат–пиридин–AcOH–H<sub>2</sub>O, 60 : 5 : 1.5 : 3 (Ж). Хроматограммы проявляли нингидрином, а также бензидином в присутствии 3% раствора KI, выдерживая предварительно хроматограмму в парах хлора. Удельное оптическое вращение пептидов измеряли на автоматическом цифровом поляриметре Perkin-Elmer 141 М (США), длина кюветы 1 дм. Кислотный гидролиз проводили 24 ч при 120°C.

Аминокислотный состав определяли на анализаторе Jeol-3. Молекулярную массу циклопептида определяли масс-спектрометрически на приборе CN-5 Varian MAT (США) при 250°C и ионизирующем напряжении 70 эВ.

Очистку защищенных пептидов проводили на хроматографических колонках фирмы Merck: size B (310-25); size C (440-37), заполненных силикагелем с размером частиц 40 - 63 и 63 - 125 мкм соответственно. Очистку конечных продуктов осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на СМ-целлюлозе (Whatman CM-32) и/или обращенно-фазовой жидкостной хроматографии на хроматографе Du Pont-830 с использованием колонки Zorbax C<sub>8</sub> в режимах градиентного элюирования. Фракции контролировали с помощью детектора Uvicord II или Uvicord III (LKB, Швеция) при 206, 254 и 280 нм. Характеристики синтезированных пептидов приведены в табл. 3.

**Вос-DMet-Gly (V).** К 0.98 г (13 ммоль) глицина приливали 13 мл 1 н. раствора NaOH и при перемешивании и охлаждении около 0°C прибавляли 1.08 г (13 ммоль) NaHCO<sub>3</sub>, 10 мл DMF и 5.4 г (13 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*-трет-бутилоксикарбонил-*D*-метионина, растворенного в 10 мл DMF. После окончания реакции (хроматографический контроль) реакционную массу разбавляли этилацетатом (200 мл) и водой (до разделения слоев), охлаждали до 0°C и подкисляли 5% раствором KHSO<sub>4</sub> до pH 3. Этилацетатный слой отделяли, водную фазу экстрагировали еще два раза. Объединенный этилацетатный слой промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После упаривания этилацетата выделяли 2.14 г (54%) дипептида (V) в виде масла, которое сушили в вакуум-экссикаторе.

**Вос-Tyr(Bzl)-DMet-Gly (VI).** Раствор 2.6 г дипептида (V) в 15 мл 70% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле выдерживали 30 мин. Растворитель отгоняли, остаток растирали с эфиром и высушивали в вакууме над KOH. Получили 2.56 г (94%) трифторацетата дипептида (Va),  $R_f$  0.05 (A).

Таблица 3. Физико-химические свойства синтезированных пептидов

Пептид	Структура	[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup> , град, 0,2 М СН <sub>3</sub> СООН (концентрация)	R <sub>f</sub> в системах			ВЭЖХ*	
			А	Б	Другие системы	Состав подвижной фазы <sup>2*</sup>	Коэффициент емкости (k')
I	Lys-Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro	+25.7 (0.33)	-	0.48	0.52 Г	30 : 70	0.2
II	Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro-Lys	+7.0 (1)	-	-	0.34 Г; 0.12 Д <sup>3*</sup>	15 : 85 <sup>4*</sup>	1
III	Lys-Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro	+10.4 (0.5) <sup>5*</sup>	-	0.61	0.54 В	30 : 70	1.5
IV	Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro	+24.1 (1)	-	0.60	0.66 В; 0.60 Г <sup>3*</sup>	20 : 80 <sup>6*</sup>	10.2
V	Woc-DMet-Gly		0.55	-	0.62 Г <sup>3*</sup>		
VI	Woc-Tyr(Bzl)-DMet-Gly	-3.0 (1) <sup>7*</sup>	0.71	-	0.82 Г <sup>3*</sup>	40 : 60	2.1
VII	Woc-Phe-Pro	-46.8 (0.5) <sup>8*</sup>	0.73	-		40 : 59 : 1 <sup>9*</sup>	8.5
VIII	Woc-Tyr(Bzl)-DMet-Gly-Phe-Pro	-10.4 (1) <sup>7*</sup>	0.76 <sup>3*</sup>	0.79	0.68 Г; 0.72 В <sup>3*</sup>	50 : 50 <sup>4*</sup>	13.6
IX	Woc-Tyr(Bzl)-DMet-Gly-Phe-Pro-Z-Lys	-14.1 (1) <sup>7*</sup>	0.79	0.69 <sup>3*</sup>		45 : 55 <sup>4*</sup>	3.1
X	Z-Lys-Tyr(Bzl)-DMet-Gly-Phe-Pro	+15.2 (0.5) <sup>10*</sup>	0.60	-	0.90 Г		

\* Для анализа пептидов использовали жидкостный хроматограф фирмы Du Pont 8800 с УФ-спектрофотометром (λ 220 нм), колонка Zorbax ODS (для соединений II, IX, VIII), колонка Silasorb SPH C<sub>18</sub> (для соединений I, III, VI), в остальных случаях колонка Zorbax C<sub>8</sub>. <sup>2\*</sup> Где не отмечено особо – ацетонитрил – 0.1 М ацетат аммония, pH 5, приведено соотношение в объемных процентах. <sup>3\*</sup> Хроматография выполнена на пластинках Silufol, в остальных случаях – на пластинках Merck. <sup>4\*</sup> Ацетонитрил – 0.1 М КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub> + 0.1 М Н<sub>3</sub>Р<sub>4</sub>. <sup>5\*</sup> Раствор в метаноле. <sup>6\*</sup> С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН – 0.1 М ацетат аммония, pH 5. <sup>7\*</sup> Раствор в DMF. <sup>8\*</sup> Раствор в этаноле. <sup>9\*</sup> С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН–вода–АсОН. <sup>10\*</sup> Раствор в СН<sub>3</sub>СООН.

2.5 г (7.8 ммоль) соединения (Va) растворяли при перемешивании в 50 мл DMF, добавляли 3.9 мл 2 н. раствора NaOH, 0.65 г (7.8 ммоль) NaHCO<sub>3</sub> и 3.93 г (7.8 ммоль) Woc-Tyr(Bzl)-ONp, растворенного в 10 мл DMF. Смесь перемешивали 2 ч при 0°C и 48 ч при 20°C. Реакционную массу обрабатывали аналогично соединению (V) и выделяли в виде аморфного осадка, который высушивали в вакууме. Выход трипептида (VI) составил 3.8 г (87%).

**Woc-Phe-Pro (VII).** К 4.6 г (40 ммоль) пролина прибавляли 20 мл 2 н. NaOH, 25 мл DMF, 3.36 г (40 ммоль) NaHCO<sub>3</sub> и при перемешивании и охлаждении до 0°C 15.4 г (40 ммоль) Woc-Phe-ONp, растворенного в 15 мл DMF. После завершения реакции (~48 ч) реакционную смесь обрабатывали и выделяли с выходом 12.2 г (84%) продукт (VII) аналогично соединению (V). Аналитический образец очищен ВЭЖХ.

**Woc-Tyr(Bzl)-DMet-Gly-Phe-Pro (VIII).** К раствору 4.67 г (8.35 ммоль) трипептида (VI) в 50 мл этилацетата, охлажденному до 0°C, при перемешивании добавляли 1.65 г (9 ммоль) пентафторфенола и 1.85 г (9 ммоль) DCC, растворенных в этилацетате. Через 3 ч смесь охлаждали до -10°C, выпавшую дидиклогексилмочевину отфильтровывали, растворитель отгоняли, остаток растирали с эфиром. Полученный осадок отфильтровывали, вновь промывали эфиром и перекристалли-

зовывали из смеси этилацетата и гексана (80 : 20). Выход пентафторфенилового эфира трипептида (VI) 5.0 г (69%), R<sub>f</sub> 0.84 (A).

Раствор 5.5 г (15.2 ммоль) дипептида (VII) в 25 мл 70% трифторуксусной кислоты в дихлорметане выдерживали 30 мин. Растворитель отгоняли, остаток растирали с эфиром и сушили в вакууме над КОН. Получали 5.6 г (98%) трифторацетата дипептида (VIIa), R<sub>f</sub> 0.12 (A), 0.70 (Г).

К раствору 2.7 г (6.9 ммоль) трифторацетата дипептида (VIIa) в 25 мл DMF, охлажденному до 0°C, добавляли при перемешивании 1.2 мл (6.9 ммоль) диизопропилэтиламина в 7 мл DMF и 5 г (6.9 ммоль) пентафторфенилового эфира трипептида (VIa). Реакционную массу перемешивали несколько часов и после завершения реакции обрабатывали аналогично соединению (V). Защищенный пентапептид хроматографировали на колонке с силикагелем (size C) в системе: хлороформ–этанол–этилацетат–АсОН–вода, 185 : 5 : 8 : 2 : 0.25. Соответствующие фракции собирали, растворитель отгоняли. После сушки в вакууме получали 2.9 г (52%) защищенного пентапептида (VIII).

**Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro (IV).** К раствору 585 мг (0.73 ммоль) защищенного пентапептида (VIII) в 25 мл метанола добавляли 0.36 мл (2.92 ммоль) циклогексиламина, палладиевой черни и гидрировали несколько дней до завершения реакции

(хроматографический контроль). Катализатор отфильтровывали, промывали метанолом, метанольные растворы упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали 5% раствором бисульфата калия, водой, насыщенным раствором хлористого натрия и сушили над безводным сульфатом натрия. Этилацетатный раствор отфильтровывали и упаривали, остаток растворяли в 6 мл 50% раствора трифторуксусной кислоты в дихлорметане и выдерживали 30 мин. Раствор упаривали, остаток растирали с эфиром и сушили в вакууме. 520 мг пентапептида (IV) очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией на колонке Zorbax C<sub>8</sub>. Элюирование проводили смесью этанол-0.1 М раствор ацетата аммония, 20 : 80. Соответствующие фракции собирали и лиофилизировали. Выход свободного пентапептида (IV) 267 мг (43%). Аминокислотный анализ: Tyr 0.84, Gly 1.00, Phe 1.12, Met 0.84, Pro 0.75.

**Вос-Tyr(Bzl)-DMet-Gly-Phe-Pro-Z-Lys (IX).** К раствору 2.09 г (2.6 ммоль) пентапептида (VIII) в 20 мл DMF, охлажденному до 0°C, при перемешивании добавляли 0.53 г (2.9 ммоль) пентафторфенола, 0.59 г (2.9 ммоль) DCC, растворенных в DMF. По завершении реакции смесь охлаждали до -10°C, выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали, получали раствор, содержащий активированный эфир пентапептида (VIIIa) с R<sub>f</sub> 0.67 (A), который сразу вводили в следующую реакцию.

К раствору 0.78 г (2.6 ммоль) N<sup>α</sup>-бензилоксикарбониллизина в 5.2 мл 0.5 н. гидроокиси натрия добавляли 0.22 г (2.6 ммоль) бикарбоната натрия, 10 мл DMF и раствор активированного эфира пентапептида (VIIIa) в DMF. Через 48 ч реакционную массу обрабатывали аналогично соединению (V). Продукт, полученный после упаривания этилацетата, очищали на колонке с силикагелем (size B), аналогично соединению (VIII). Выход гексапептида (IX) 1.54 г (57%).

**cyclo(-Tyr(Bzl)-DMet-Gly-Phe-Pro-Z-Lys-) (X).** 0.5 г (0.5 ммоль) гексапептида (IX) обрабатывали раствором трифторуксусной кислоты так же, как описано для соединения (IV). Получили 0.51 г (94%) трифторацетата гексапептида (IXa), R<sub>f</sub> 0.50 (D) (Merck).

К раствору 0.4 г (0.37 ммоль) трифторацетата гексапептида (IXa) в 400 мл очищенного DMF, охлажденному до -20°C, прибавляли триэтиламин до pH 7.2 и медленно, по каплям, 0.11 мл (0.5 ммоль) дифенилфосфорилиазида в 50 мл DMF. Раствор перемешивали 7 сут и периодическим добавлением триэтиламина поддерживали pH реакционной массы равным ~7. Растворитель отгоняли при 40°C, к остатку приливали 1 - 1.5 мл этилацетата. Нерастворившуюся часть отфильтровывали, сушили в вакууме и очищали на двух последова-

тельно соединенных колонках с силикагелем в системе хлороформ-метанол-АсОН, 85 : 10 : 5. Выход циклогексапептида (X) 145 мг (40%).

**cyclo(-Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro-Lys-) (I).** К раствору 60 мг (0.063 ммоль) циклогексапептида (X) в 5 мл метанола и 0.03 мл (0.252 ммоль) циклогексилamina добавляли палладиевую чернь и гидрировали 4 сут. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха, остаток растирали с эфиром, отфильтровывали и сушили в вакууме над гидроокисью калия. Полученный продукт очищали на СМ-целлюлозе (СМ-32) в линейном градиенте аммоний-ацетатного буфера (0.01 М, pH 4.4 → 0.05 М, pH 6.2). Соответствующие фракции собирали и лиофилизировали. Выход циклогексапептида (I) 35 мг (76%). Величина расчетной молекулярной массы совпала с ее экспериментальным значением, определенным масс-спектрометрически, M 723. Аминокислотный анализ: Tyr 0.89, Gly 1.00, Phe 1.09, Met 0.76, Pro 1.07, Lys 0.81.

**Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro-Lys (II).** К раствору 160 мг (0.148 ммоль) трифторацетата гексапептида (IXa) в 20 мл метанола добавляли 0.072 мл (0.592 ммоль) циклогексилamina, палладиевой черни и гидрировали 4 сут. Продукт выделяли и очищали аналогично соединению (I). Выход аналога энкефалина (II) 35 мг (32%). Аминокислотный анализ: Tyr 0.89, Gly 1.00, Phe 1.14, Met 0.83, Pro 0.97, Lys 0.95.

**Lys-Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro (III).** а) *Присоединение Вос-Pro-OH к сефадексу LH-20.* Сефадекс LH-20 (20 г) суспензировали в 150 мл DMF, содержащего симметричный ангидрид Вос-пролина, приготовленный предварительно из 4.3 г (20 ммоль) Вос-пролина и 2.06 г (10 ммоль) DCC, прибавляли 0.24 г (2 ммоль) диметиламинопиридина и оставляли, периодически помешивая суспензию стеклянной палочкой. Через 24 ч продукт отфильтровывали, промывали DMF, метанолом, эфиром и сушили в вакууме.

б) *Отщепление Вос-группы.* Вос-Pro-сефадекс заливали 200 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 300 мл 10% раствора Et<sub>3</sub>N в хлористом метиле и метанолом; Про-сефадекс промывали эфиром и сушили в вакууме, а в фильтрате спектрофотометрическим способом определяли содержание *n*-толуолсульфокислоты. Оно было равно 3.6 ммоль, что соответствует емкости смолы 0.18 ммоль/г.

в) *Ацилирование.* К Про-сефадексу прибавляли 3.01 г (7 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).

2) *Снятие пептида с сефадекса LH-20*. Защищенный гексапептид (Вос-Lys(Z)-Тур(Bzl)-DMet-Gly-Phe-Pro) снимали с носителя действием 0.1 н. метанольного раствора гидроокиси натрия в течение 4 ч. Сефадекс промывали метанолом и объединенный фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в воде, подкисляли 2 н. раствором соляной кислоты, отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Синтезированный пептид трижды очищали на колонке с силикагелем (size C) в системах хлороформ-этанол-этил-ацетат-АсОН-Н<sub>2</sub>O (285 : 5 : 8 : 2 : 0.25) и хлороформ-этанол-АсОН (85 : 10 : 5; 85 : 5 : 2.5). Выход защищенного гексапептида 2.70 г (75%), R<sub>f</sub> 0.49 (А), 0.90 (Б).

Защищенный гексапептид (0.470 г, 0.440 ммоль) деблокировали и очищали аналогично соединению (I). Выход аналога энкефалина (III) 140 мг (43%). Аминокислотный анализ: Тур 0.85, Gly 1.00, Phe 1.15, Met 0.79, Pro 0.92, Lys 0.88.

Спектры КД записывали на дихрографе Jobin-Ivon Mark III (Франция). Дихрограф калибровали по стандартам 10-камфарсульфоново́й кислоты и эпиандростерона. Для записи спектров использовали кюветы из плавленого кварца фирмы Hellma с длиной оптического пути 1 см в спектральном диапазоне 300 - 250 нм и 0.1 - 0.01 см в области 250 - 180 нм. Концентрация водных растворов 10<sup>-3</sup> - 10<sup>-4</sup> М. Молекулярную эллиптичность [θ] измеряли в град см<sup>2</sup>/дмоль.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hughes J., Smith T.W., Kosterlitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A., Morris H.R. // Nature. 1975. V. 258. P. 577 - 579.
2. Bajusz S., Ronai A.Z., Szekely J.I., Dunai-Kovacs Z., Berzetei I., Graf L. // Acta biochim. et biophys. Acad. scient. hung. 1976. V. 11. № 4. P. 305 - 309.
3. Kiso Y., Yamaguchi M., Akita T., Moritoki H., Takei M., Nakamura H. // Naturwissenschaften. 1981. B. 68. № 4. S. 210 - 212.
4. Dutta A.S., Gormley J.J., Hayward C.F., Morley J.S., Shaw J.S., Stacey G.J., Turnbull M.T. // Acta Pharm. Suec. 1977. Suppl. 14. P. 14 - 15.
5. Bobrova I.V., Nikiforovich G.V., Balodis J., Abissova N.A., Vegners R., Perkone I., Rozentals G., Klusa V., Chipens G. // Beitr. Wirkst. Forsch. 1985. H. 24. S. 14 - 33.
6. Sarantakis D. 1979. U.S. Patent 4. 148, 786.
7. DiMaio D., Schiller P.W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 7152 - 7160.
8. Боброва И.В., Абиссова Н.А., Розенталь Г.Ф., Никифорович Г.В., Чипенс Г.И. // Биооргани. химия. Т. 11. № 11. С. 1457 - 1467.
9. Medzihradsky K., Medzihradsky H., Schweiger P. // Acta chim. Acad. scient. hung. 1965. V. 44. P. 15.
10. Боброва И.В., Абиссова Н.А., Подиный Л.У., Вестерман Б.Г., Никифорович Г.В., Чипенс Г.И. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 746 - 758.
11. Ueda H., Amano H., Shiomi H., Takagi H. // Eur. J. Pharmacol. 1979. V. 56. P. 265 - 268.
12. Paton W.D.M., Vizi E.S. // Brit. J. Pharmacol. 1969. V. 35. P. 10 - 28.
13. Чипенс Г.И., Боброва И.В., Абиссова Н.А., Клауша В.Е. Циклический аналог энкефалина, обладающий пролонгированной анальгетической активностью. А. с. 1048702 от 16.10.81.
14. Vavrek R.G., Ren-Lin Cui, York E.G., Stewart J.M., Paterson S., Kosterlitz H.W. // Life Sci. 1983. V. 33. Suppl. 1. P. 451 - 454.

## Synthesis of a Cyclic Analog of Enkephalin with Prolonged Analgesic Action

I. V. Bobrova\*, N. A. Myshlyakova, O. S. Papsuevich,  
I. A. Vosekalna, and E. I. Mekshun

Latvian Institute of Organic Synthesis, LV-1006, ul. Aizkraukles 21, Riga, Latvia

**Abstract** - A cyclic analog of enkephalin, cyclo(Lys<sup>1</sup>-Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro-) and two corresponding linear hexapeptides with lysine residue on the N- and C-termini of the pentapeptide sequence, Lys-Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro and Tyr-DMet-Gly-Phe-Pro-Lys were synthesized by classical and solid phase methods of peptide chemistry. The cyclic analog exhibited significantly prolonged analgesic effect, evaluated by the "tail pinch" method after intracysternal injection to mice. The cycloanalog also had a weak influence on the peripheral opiate receptors of the isolated segment of guinea pig iliac intestine. Addition of the lysine residue to the N-terminus of the pentapeptide sequence enhanced by an order of magnitude the selectivity of binding of the analog with opiate receptors of μ-type.

*Key words:* enkephalin analogs; peptide synthesis.

\* To whom correspondence should be addressed.