



УДК 577.112:615.787

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНАЛОГОВ ХОЛЕЦИСТОКИНИН-(30–33)-ТЕТРАПЕПТИДА

© 2005 г. Т. В. Проскурякова<sup>\*,#</sup>, Ж. Д. Беспалова<sup>\*\*</sup>, М. Е. Палькеева<sup>\*\*</sup>,  
О. Б. Петриченко<sup>\*</sup>, Н. В. Панкратова<sup>\*</sup>, В. А. Шохонова<sup>\*</sup>, И. П. Анохина<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>ГУ Национальный научный центр наркологии МЗ РФ,  
119002, Москва, ГСП-2, М. Мозильцевский пер., 3;

<sup>\*\*</sup>Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва

Поступила в редакцию 05.01.2004 г. Принята к печати 22.10.2004 г.

Синтезированы аналоги эндогенного тетрапептида – (30–33)-фрагмента холецистокинина (Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>) и исследована их биологическая активность. Показано, что сукцинилирование *N*-концевого триптофана в Nle<sup>2</sup>-аналоге тетрапептида приводило к усилению его анксиогенных свойств у крыс в тесте “светлая–темная” камера и способности увеличивать потребление алкоголя как контрольными, так и длительно алкоголизированными крысами в условиях свободного выбора. Введение в *C*-концевую амидную группировку Nle<sup>2</sup>-аналога тетрапептида пространственного изопропильного заместителя приводило к появлению анксиолитической и антиалкогольной активности, а также способности повышать анальгетический эффект морфина в тесте отдергивания хвоста у крыс. При этом оба синтезированных аналога сохраняли сродство к холецистокининовым рецепторам.

*Ключевые слова:* холецистокинин, (30–33)-фрагмент (ССК-4), синтез аналогов, биологическая активность.

### ВВЕДЕНИЕ

Функциональная роль холецистокинина (cholecystokinin, ССК), особенно в центральной нервной системе (ЦНС), до конца не выяснена. Однако уже сегодня можно констатировать, что ССК-система вовлечена в регуляцию насыщения [1], гастроинтестинальных реакций [2], иммунологических реакций [3], двигательной активности [4], памяти [5], обучения [6], болевой чувствительности [7] и тревожных состояний [8, 9]. Один из механизмов, посредством которого ССК-система участвует в регуляции перечисленных выше физиологических процессов, связан с иницированием ССК-пептидами образования сложных регуляторных цепей [10].

В организме ССК синтезируется в тканях поджелудочной железы и мозга. Под действием протеолитических ферментов ССК расщепляется на ряд биологически активных фрагментов (ССК-пептидов), из которых наиболее изученными являются октапептидный (ССК-8) и тетрапептидный (ССК-4) фрагменты [11]. Установлено, что

90% ССК-пептидов в ЦНС представлено ССК-8, сульфатированным по тирозину в положении 7 (ССК-8(S)) [12, 13]. Действие биологически активных ССК-пептидов опосредуется двумя типами рецепторов (ССК-1 и ССК-2), локализованных как в периферических тканях, так и в ЦНС [14]. Считается доказанным, что ССК-8(S) обладает практически одинаковым сродством к ССК-1- и к ССК-2-рецепторам, тогда как ССК-4 проявляет выраженную селективность к ССК-2-рецепторам [15].

Способность ССК-пептидов модулировать функционирование различных нейромедиаторных систем, а также положительный клинический опыт применения некоторых из них для купирования состояния тревоги [16, 17] инициировали серию исследований по разработке новых соединений, обладающих сродством к ССК-рецепторам. При этом в качестве основы для создания новых лигандов ССК-рецепторов берутся соединения различной химической природы [18–21]. На наш взгляд, наибольшего внимания заслуживают исследования, в которых новые лиганды ССК-рецепторов разрабатываются на основе эндогенных ССК-пептидов [22–25].

При разработке структурных модификаций ССК-пептидов на первое место выступает требование сохранения у вновь созданных пептидов сродства к ССК-рецепторам при выраженной селективности к одному из двух типов ССК-рецепторов, что позволяет уменьшать неспецифическую

Использованы стандартные сокращения, рекомендованные комиссией IUPAC-IUB, а также: ССК – холецистокинин; EGTA – (этилендиокси)диэтилендинитролотетрауксусная кислота; NEPES – *N*-(2-гидроксиэтил)пиперазин-*N'*-2-этансульфоновая кислота; ONSu – сукцинимид-*N*-оксид; Suc – сукцинил.

<sup>#</sup>Автор для переписки (тел.: (095) 241-02-43; эл. почта: pros-lab@mtu-net.ru).

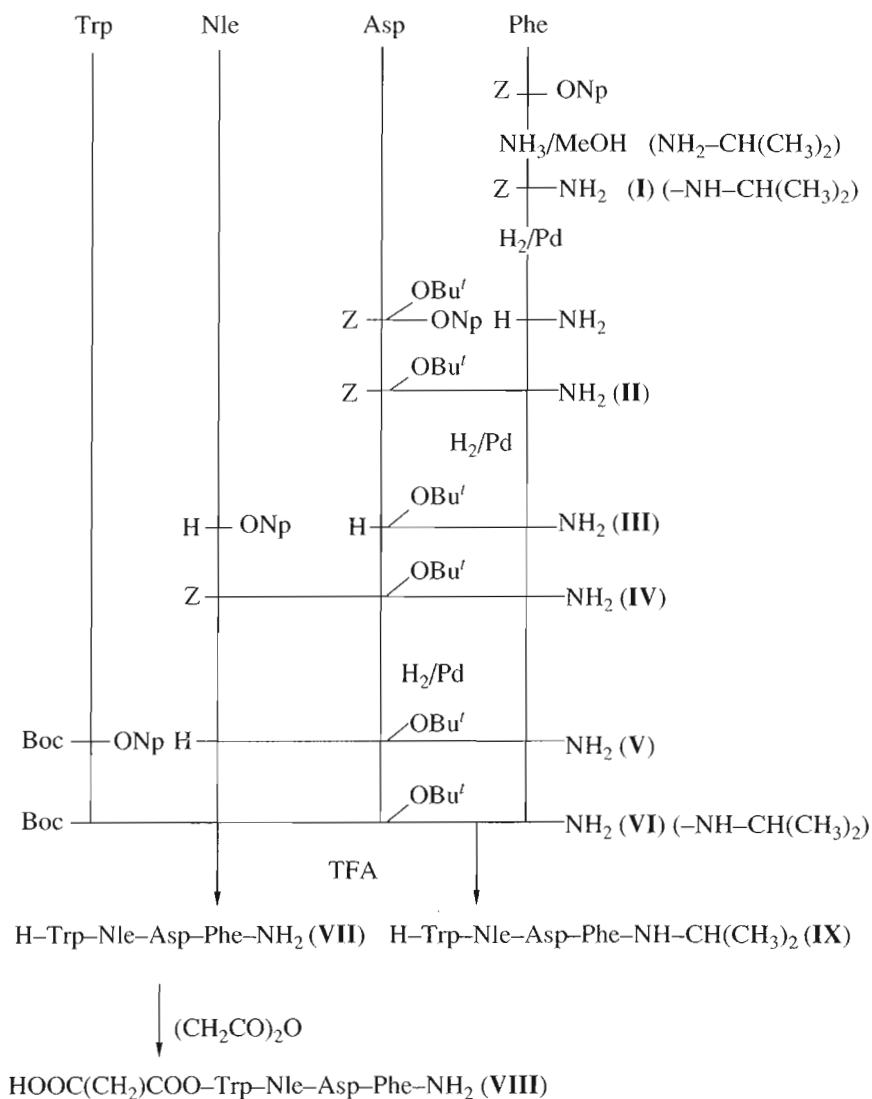


Схема.

токсичность. При решении этой задачи приоритетным является анализ связи структура–активность, проведение которого для больших молекул сложно. Поэтому при разработке новых структур большинство исследователей берет за основу минимальный биологически активный фрагмент ССК–ССК-4 (Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>) с выраженной селективностью к ССК-2-рецепторам [15].

В связи с этим, цель настоящей работы состояла в синтезе аналогов пептида ССК-4 и изучении их биологической активности в экспериментальных моделях на животных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что изменение конформации практически всех пептидных связей ССК-4 оказывает влияние как на сродство, так и на селективность аналогов к ССК-рецепторам [26–28]. При этом выявлены структурные модификации, позволяю-

щие создавать аналоги, обладающие выраженной селективностью к ССК-1-рецепторам [29]. Кроме того, продемонстрирована возможность при одновременной модификации N- и C-терминальных участков ССК-4 формировать у новых соединений свойства, характерные как для агонистов, так и для антагонистов ССК-рецепторов [24, 25].

На основании данных компьютерного конформационного анализа ССК-4, проведенного нами с помощью коммерческой программы “Modeller”, был разработан ряд структурных модификаций и осуществлен синтез двух его аналогов: Suc-Trp-Nle-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (VIII) и Trp-Nle-Asp-PheNHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (IX) (схема).

Синтез обоих пептидов осуществляли классическим методом в растворе путем последовательного наращивания пептидной цепи, начиная с соответствующей C-концевой аминокислоты, с использованием активированных эфиров Z- и Boc-защитен-

**Таблица 1.** Химические сдвиги  $\delta$  (м. д.) амидных и алифатических протонов в пептидных аналогах ССК-4

Остаток в пептиде	NH	C $\alpha$ H	C $\beta$ H	Другие сигналы
Suc-Trp-Nle-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> (VIII)				
Trp1	8.11	4.52	3.11; 2.94	–
Nle2	7.93	4.16	1.47; 1.57	–
Asp3	8.13	4.49	2.65; 2.49	–
Phe4	7.79	4.36	3.03; 2.84	Suc: CH <sub>2</sub> 3.35
Trp-Nle-Asp-Phe-NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (IX)				
Trp1	–	3.92	3.19; 2.96	–
Nle2	8.58	4.26	1.63; 1.50	–
Asp3	8.40	4.49	2.45; 2.63	–
Phe4	7.80	4.36	2.94; 2.83	–NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> : NH 7.60; CH 3.37; CH <sub>3</sub> 1.02; 0.92

ных аминокислот. Боковая карбоксильная функция аспарагиновой кислоты защищалась *трет*-бутильной группой. Деблокирование Boc-, Bu<sup>t</sup>-защищенного тетрапептида в обоих случаях проводили действием TFA с 5% воды и 5% этандитиола. Идентификацию целевых продуктов (VIII), (IX) выполняли методами количественного аминокислотного анализа и спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР, гомогенность подтверждали методами ТСХ и аналитической ВЭЖХ на обращенной фазе. Данные

ЯМР-спектроскопии синтезированных соединений приведены в табл. 1, физико-химические характеристики – в табл. 2.

Для того чтобы выяснить, сохранили ли аналоги (VIII) и (IX) средство к ССК-рецепторам, в первую очередь, была проведена оценка их действия на связывание [<sup>125</sup>I]-ССК-8(S) с мембранными препаратами коры больших полушарий головного мозга (cortex), где преимущественно локализованы ССК-2-рецепторы, и препаратами поджелудочной железы (pancreas), где локализованы ССК-1-рецепторы. При добавлении в реакционную среду оба аналога ССК-4 вызывали дозозависимое ингибирование связывания [<sup>125</sup>I]-ССК-8(S) со специфическими участками (рис. 1), константы ингибирования связывания указаны в табл. 3.

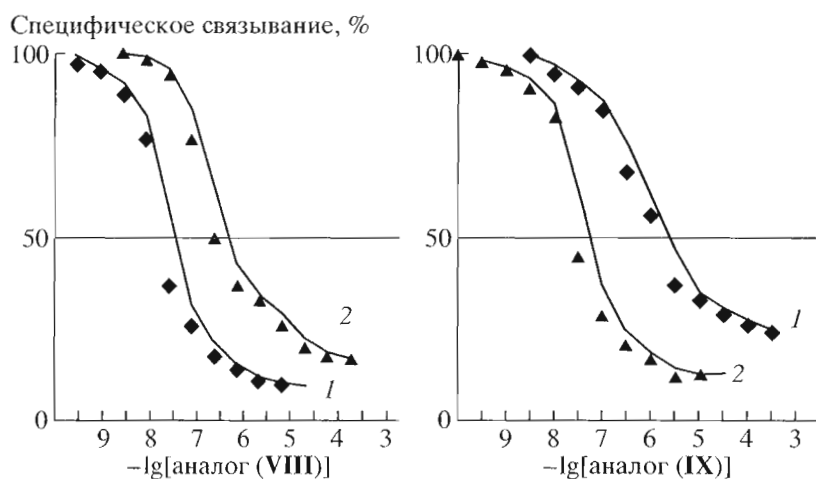
Представленные данные свидетельствуют, что оба аналога ССК-4 сохранили средство к ССК-рецепторам, но при этом аналог (VIII) демонстрирует более выраженную избирательность к ССК-2-рецепторам, а аналог (IX) – к ССК-1-рецепторам.

При сравнении средства синтезированных аналогов ССК-4 с аффинностью эндогенного тетрапептида ССК [26, 30] удалось выявить следующее. Суццинирование *N*-концевого Trp в норлейциновом аналоге ССК-4 в 2 раза увеличивает средство аналога (VIII) к ССК-1-рецепторам (*K*<sub>i</sub> 4770 против 11900 нМ), тогда как аффинность к ССК-2-рецепторам не меняется (*K*<sub>i</sub> 34 против 42 нМ). В то же время введение в *C*-концевой амид изопропильного радикала –CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> у аналога (IX) еще более

**Таблица 2.** Характеристики синтезированных соединений

Соединение	<i>R</i> <sub>f</sub> в системах						<i>R</i> <sub>t</sub> <sup>*</sup> , мин	Т. пл., °С	Выход, % от теор.
	А	Б	В	Г	Д	Е			
Z-Phe-NH <sub>2</sub> (I)					0.59	0.34		165–167	67
Z-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub> (II)			0.52	0.63				163–164	69
H-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub> (III)			0.24					117–119	77
Z-Nle-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub> (IV)			0.54			0.37		171–172	97
H-Nle-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub> (V)			0.19		0.39			–	83
Boc-Trp-Nle-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH <sub>2</sub> (VI)			0.51		0.61			179–181	79
H-Trp-Nle-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> (VII)					0.25		20.6	125–127	73
Suc-Trp-Nle-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> (VIII)					0.56		22.4	121–123	82
Z-Phe-NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.86			0.94				154–155	97
Z-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.89	0.5						159–160	98
Z-Nle-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.59			0.88				192–193	77
Boc-Trp-Nle-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Phe-NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.34		0.57					218–221	72
H-Trp-Nle-Asp-Phe-NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (IX)			0.28	0.55			19.5	132–137	24 (в расчете на исх. Z-Phe-ONp)

\* Аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили как описано в “Эксперимент. части” в условиях 30-минутной градиентной элюции от 20 до 80% буфера Б в буфере А: для соединений (VII) и (IX) – буфер А – 0.1% водная TFA, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А; для соединения (VIII) – буфер А – 0.05 М КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 3.0, буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А.



**Рис. 1.** Специфическое связывание [<sup>125</sup>I]-ССК-8(S) мембранными препаратами коры больших полушарий головного мозга (1) и поджелудочной железы (2) в присутствии аналогов (VIII) и (IX).

увеличивает его сродство к ССК-1-рецепторам ( $K_i$  234 нМ), уменьшая при этом на два порядка его способность взаимодействовать с ССК-2-рецепторами ( $K_i$  3290 нМ).

Согласно данным литературы [26], сукцинилирование *N*-концевого Trp в ССК-4 (Suc-Trp-Met-Asp-PheNH<sub>2</sub>, Suc-ССК-4) увеличивало селективность пептида к ССК-2-рецепторам на два порядка по сравнению с Вос-ССК-4. Одновременная с этим замена Met<sup>2</sup> на Leu незначительно снижала селективность к ССК-2-рецепторам, тогда как при замене Met<sup>2</sup> на Gly, Ser, Phe, Pro и Ala селективность новых соединений к ССК-2-рецепторам существенно снижалась, практически приближаясь к селективности антагониста ССК-2-рецептора L-365,260. При других заменах Met<sup>2</sup>, в частности на Asp, Lys и *D*-Pro, аналоги не демонстрировали выраженной селективности ни к одному из двух типов ССК-рецепторов. Аналогичная ситуация наблюдается, когда в Suc-ССК-4 одновременно Trp<sup>1</sup> заменяется на Ala, а Met<sup>2</sup> на Leu или одновременно Met<sup>2</sup> заменяется на Leu, а Phe<sup>4</sup> на Ala. Напротив, другие авторы [31] сообщают, что замена в Suc-ССК-4 Met<sup>2</sup> на Lys увеличивала селективность к ССК-2-рецепторам.

На сродство и селективность пептидов к ССК-рецепторам влияет модификация как *N*-, так и *C*-конца. Так, введение алкильных заместителей в амид *C*-концевого Phe ведет к уменьшению селективности и сродства к ССК-рецепторам обоих типов. При введении одного метильного заместителя в амид *C*-концевого Phe величина IC<sub>50</sub> в радиорецепторном анализе для поджелудочной железы составляла около 170, а для церебральной коры – около 4250 нМ. При введении второго диэтильного заместителя величина IC<sub>50</sub> для поджелудочной железы составляла около 117, а для церебральной коры – более 10000 нМ [29]. По-видимому,

структура ССК-2-рецептора более чувствительна к введению заместителей у *C*-концевого амидного азота.

Как было показано выше, синтезированные аналоги с разной степенью селективности взаимодействовали с ССК-2-рецепторами, поэтому при оценке их биологической активности в первую очередь была предпринята попытка выяснить, сохранили ли синтезированные аналоги ССК-4 свойственную эндогенному ССК-4 анксиогенную активность, т.е. способность вызывать состояние тревоги, в реализацию которой вовлечены ССК-2-рецепторы [9].

Как видно из представленных в табл. 4 данных, в тесте “светлая–темная” камера (см. “Эксперимент. часть”) эндогенный ССК-4 обладает выраженным анксиогенным эффектом, что проявляется в достоверном уменьшении времени пребывания животных в светлом отсеке камеры с увеличением дозы пептида. Аналог (VIII) не изменял времени нахождения животных в светлом отсеке только при минимальной дозе (0.03 мкг/кг веса животного), увеличение дозы сопровождалось достоверным уменьшением времени нахождения животных в светлом отсеке и снижением

**Таблица 3.** Константа ингибирования аналогами ССК-4 связывания [<sup>125</sup>I]-ССК-8(S) с ССК-рецепторами в тканях больших полушарий головного мозга (cortex) и поджелудочной железы (pancreas)\*

Аналог ССК-4	$K_i$ , нМ (pancreas)	$K_i$ , нМ (cortex)	Отношение $K_i$ pancreas/ $K_i$ cortex
(VIII)	4770 ± 100	34 ± 6	140.3
(IX)	234 ± 150	3290 ± 150	0.07

\* Pancreas и cortex – преимущественная локализация ССК-1- и ССК-2-рецепторов соответственно.

**Таблица 4.** Влияние эндогенного ССК-4 и его аналогов на поведение животных в тесте "светлая–темная" камера

Исследуемое соединение	Доза, мкг/кг	Время в светлом отсеке, с	Кол-во выходов в светлый отсек
– (контроль)	–	27.2 ± 2.8	2.9 ± 0.1
ССК-4	0.03	27.9 ± 1.9	1.9 ± 0.8
	0.1	21.9 ± 4.5	2.1 ± 0.1
	0.3	13.7 ± 3.5*	1.6 ± 0.6
(VIII)	0.03	26.9 ± 4.5	2.4 ± 0.9
	0.1	15.0 ± 4.5*	1.9 ± 0.6
	0.3	9.8 ± 3.1*	1.6 ± 0.5
(IX)	0.03	24.8 ± 2.3	2.0 ± 0.8
	0.1	22.7 ± 3.8	2.1 ± 0.3
	0.3	19.2 ± 2.5	1.8 ± 0.2

\*  $p < 0.05$  – достоверность различий в сравнении с контрольной группой животных; каждая группа состояла из 10 животных.

**Таблица 5.** Влияние эндогенного ССК-4 и его аналогов на потребление этанола крысами

Исследуемое соединение	Время введения	Объем алкоголя, мл	Объем воды, мл
Контрольные животные			
ССК-4	I	12.7 ± 2.7	26.3 ± 1.2
	II	7.7 ± 3.0	29.9 ± 5.1
	III	11.4 ± 3.1	28.2 ± 1.2
(VIII)	I	12.0 ± 1.7	17.6 ± 2.4
	II	23.5 ± 2.4*	8.6 ± 1.1*
	III	27.1 ± 2.8*	5.8 ± 0.7*
(IX)	I	11.1 ± 1.0	21.5 ± 3.1
	II	13.6 ± 2.9	20.3 ± 2.7
	III	11.9 ± 1.3	18.7 ± 1.6
Длительно алкоголизованные животные			
ССК-4	I	15.4 ± 3.1	18.1 ± 2.2
	II	21.4 ± 3.7	11.3 ± 1.9
	III	19.4 ± 1.6	10.2 ± 2.5
(VIII)	I	17.4 ± 2.9	10.8 ± 2.4
	II	29.2 ± 3.0*	2.4 ± 0.6*
	III	27.8 ± 2.8*	1.7 ± 0.4*
(IX)	I	14.4 ± 1.7	13.1 ± 2.8
	II	4.9 ± 1.6*	32.3 ± 2.7*
	III	11.5 ± 3.2	26.3 ± 2.6*

Примечание: I – до введения соединений (10 сут); II – в период введения (10 сут); III – после окончания введения (10 сут); \*  $p < 0.05$  – достоверность различий в сравнении с группой I для каждого соединения.

числа выходов в светлый отсек камеры. Таким образом, модификация *N*-концевого остатка эндогенного ССК-4 сохраняла и даже усиливала анксиогенный эффект аналога (VIII).

При тестировании аналога (IX) не было обнаружено достоверных изменений ни времени пребывания животных в светлом отсеке, ни числа выходов в светлый отсек камеры по сравнению с контрольными животными. Это свидетельствует об отсутствии у аналога (IX) анксиогенной активности, и этот эффект был достигнут благодаря одновременной модификации *N*- и *C*-концевых участков в структуре эндогенного ССК-4.

Следует отметить, что выявленные особенности действия синтезированных аналогов ССК-4 были получены на интактных животных без учета их исходного уровня тревоги.

Аналогичные эксперименты были проведены на животных с повышенным уровнем тревоги. Моделирование состояния тревоги осуществлялось путем лишения на 24 ч доступа к этанолу животных, которые на протяжении 7 месяцев получали раствор этанола в качестве единственного источника жидкости. У алкоголизованных животных в период лишения алкоголя (т.е. в период абстиненции) наблюдались признаки повышенной тревоги, о чем судили по снижению времени пребывания в светлом отсеке камеры по сравнению с контрольными животными ( $13.8 \pm 3.8$  и  $27.2 \pm 2.8$  с,  $p \leq 0.05$ ). Аналог (IX) увеличивал время пребывания длительно алкоголизованных животных в светлом отсеке до  $42.3 \pm 10.7$  с ( $p \leq 0.05$ ), а число выходов в светлый отсек камеры – с  $1.5 \pm 0.3$  до  $2.4 \pm 0.2$  с ( $p \leq 0.05$ ). Эти данные позволяют говорить об избирательности действия аналога (IX), иными словами, этот эффект проявляется только в случае повышенного уровня тревоги и не проявляется, если уровень тревоги находится в пределах нормы (табл. 4).

Влияние синтезированных аналогов ССК-4 на потребление этанола контрольными и длительно алкоголизованными животными оценивалось с помощью теста на предпочтительное потребление алкоголя при одновременном предоставлении воды и 10% раствора этанола в условиях свободного выбора.

Приведенные в табл. 5 результаты показывают, что эндогенный ССК-4 существенно не влиял на потребление раствора этанола и воды ни контрольными, ни длительно алкоголизованными животными. Обращает внимание лишь тенденция увеличения потребления раствора этанола в группе длительно алкоголизованных животных. Введение аналога (VIII) вызывало у контрольных и длительно алкоголизованных животных достоверное, сохраняющееся после прекращения введения препарата увеличение потребления раствора этанола, а также достоверное снижение

объема потребляемой воды. Аналог (IX) не изменял потребление этанола у контрольных животных, но достоверно снижал потребление этанола длительно алкоголизованными животными, и это снижение наблюдалось только во время введения аналога (IX). В этот же период отмечалось и достоверное увеличение объема потребляемой воды, т.е. снижалась доля этанола в общем объеме суточной потребляемой жидкости. Достоверное увеличение объема потребляемой воды сохранялось и по окончании введения аналога (IX) на протяжении 10 дней наблюдения.

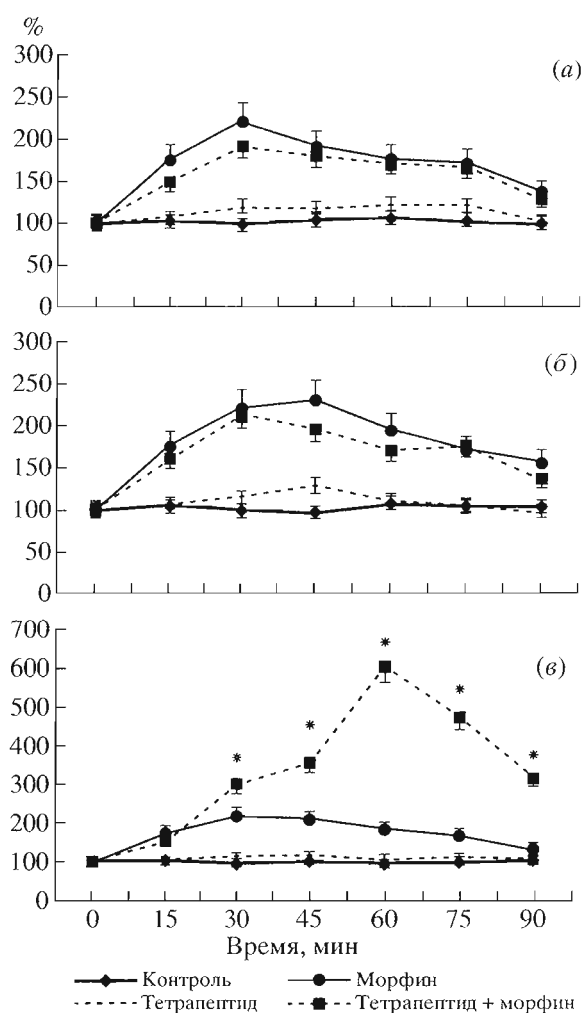
Способность синтезированных аналогов ССК-4 влиять на анальгезию, индуцированную морфином, изучали в тесте отдергивания хвоста (tail-flick). Результаты определений приведены на рис. 2.

Как следует из представленных на графиках а и б результатов, ни эндогенный ССК-4, ни аналог (VIII) не изменяли характер и динамику анальгетического эффекта морфина. Введение же аналога (IX) усиливало анальгетическое действие морфина начиная с 20 мин наблюдения, а максимум эффекта составлял 410% и регистрировался на 60 мин наблюдения (рис. 2в); продолжительность наблюдаемого эффекта составляла 2.5–3 ч. Следует подчеркнуть, что ни один из аналогов ССК-4, введенный отдельно, анальгетическим эффектом не обладал (рис. 2).

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что проведенные структурные модификации эндогенного ССК-4 изменили его биологическую активность. Так, сукцинирование N-концевого триптофана в структуре норлейцинового аналога эндогенного ССК-4 приводило к усилению анксиогенных свойств аналога (VIII) и способности увеличивать потребление алкоголя. Введение в C-концевой амид пространственного заместителя  $-CH(CH_3)_2$  приводило к появлению у аналога (IX) анксиолитической и антиалкогольной активности, а также способности повышать анальгетический эффект морфина.

Согласно данным литературы, для агонистов ССК-1-рецепторов характерно индуцирование сокращения желчного пузыря, освобождения панкреатических ферментов, усиления гидролиза фосфатидилинозитола, увеличения выработки амилазы [32–34], состояния насыщения [35]. У антагонистов ССК-1-рецепторов эти эффекты не регистрируются.

Необходимо отметить, что агонисты ССК-1-рецепторов, например ССК-8(S), обладают способностью снижать потребление этанола у животных в условиях свободного выбора между водой и этанолом [36–38]. Правда, различий в действии ССК-8(S) на потребление этанола между животными с высокой и низкой чувствительностью к этанолу (мышами линий HAS и LAS соответственно) обнаружено не было [39].



**Рис. 2.** Влияние ССК-4 (а) и его аналогов (VIII) – (б) и (IX) – (в) на анальгетический эффект морфина. По оси абсцисс – время наблюдения; по оси ординат – порог болевой чувствительности в процентах от фонового показателя. За 100% принимали порог болевой чувствительности, измеряемый в период адаптации животных к условиям эксперимента (3 раза в течение 30 мин). Доза аналогов ССК-4 – 2.0 мкг/кг веса, доза морфина – 5.0 мг/кг. Введение эндогенного ССК-4 и его аналогов проводили за 15 мин до введения морфина. \* $p < 0.05$  – достоверность различий в сравнении с группой крыс, получавших только морфин.

Снижение потребления этанола у предпочитающих этанол животных наблюдалось только при центральном введении ССК-8(S). При этом ССК-8(S) не изменял потребления этанола у отвергающих этанол животных [40].

В то же время сообщается, что антагонист ССК-1-рецепторов (L-364,718) в низких дозах снижает потребление этанола у предпочитающих этанол животных и не оказывает эффекта у отвергающих этанол животных [41].

Агонисты ССК-2-рецепторов инициируют состояние тревоги, страха и панических расстройств,



тогда как антагонисты ССК-2-рецепторов обладают выраженным анксиолитическим действием [9] и способностью потенцировать анальгетический эффект морфина [42, 43]. Наряду с этим имеются данные и о способности антагонистов ССК-1-рецепторов потенцировать анальгетический эффект морфина [44].

С учетом этих данных литературы полученные в работе результаты позволяют прийти к заключению, что выявленные у аналога (IX) физиологические эффекты (способность снижать потребление этанола у длительно алкоголизированных животных, купировать состояние тревоги и потенцировать анальгетический эффект морфина) свидетельствуют о наличии у него свойств, характерных для антагонистов ССК-1-рецепторов. Сочетание таких эффектов у одного соединения представляет несомненный интерес для практической наркологии, так как создание на основе аналога (IX) лекарственного средства расширит спектр фармакологических препаратов, применяемых для лечения алкоголизма и наркомании.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы *L*-аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия; Bachem и Fluka, Швейцария), изопропиламин (Fluka). DMF перегоняли над нингидрином и ВаО. Для экстракции, кристаллизации и хроматографии на силикагеле применяли растворители марки "ос. ч" (РФ). ТСХ осуществляли на хроматографических пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–50% уксусная кислота, 90 : 10 : 2 (А); этилацетат–гексан, 1 : 1 (Б); хлороформ–метанол–50% уксусная кислота, 85 : 15 : 2 (В); хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 15 : 4 : 1 (Г), хлороформ–метанол–50% уксусная кислота, 14 : 6 : 1 (Д), хлороформ–этилацетат–метанол 6 : 3 : 1 (Е). Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлор-бензидинового реагента и нингидрина. Гидрирование пептидов проводили в присутствии 10% палладия на угле (Pd/C, Merck, Германия).

Аналитическую ВЭЖХ соединений (VII), (VIII) и (IX) проводили на хроматографе Gilson (Франция) с колонкой Ultrasphere ODS (4.6 × 250 мм, 5 мкм) (Beckman, США). Элюенты: буфер А – 0.1% TFA в воде, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А (для соединений (VII) и (IX)); буфер А – 0.05 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, рН 3.0, буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А для соединения (VIII). Используемый градиент концентраций: от 20 до 80% буфера Б, скорость потока 1 мл/мин. Детекцию осуществляли с помощью УФ-детектора Gilson (Франция) при длине волны 220 нм. Препаративную ВЭЖХ проводили на колонке с Диасорбом-130 С16-Т (10 мкм) ЗАО "Биохиммак СТ" (РФ), детекция при длине волны 226 нм. Элюенты: буфер А –

0.1% раствор TFA в воде, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Градиент концентраций от 20 до 80% буфера Б в течение 30 мин со скоростью 0.5% в мин, скорость потока 4 мл/мин.

Аминокислотный анализ пептида (VII), гидролизованного 6 н. HCl с 2% тиогликолевой кислоты при 110°C в течение 24 ч в запаянной под вакуумом ампуле, проводили на автоматическом анализаторе Biotronik LC 5001 (Германия).

Температуры плавления (нескорректированные) образцов измеряли на приборе "Voetius" (Германия).

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц (Германия) в DMSO-*d*<sub>6</sub> при 300 К, концентрация пептидов составляла 2–3 мг/мл. Химические сдвиги (δ, м. д.) измеряли относительно тетраметилсилана.

**Z-Phe-NH<sub>2</sub> (I).** К раствору 10.0 г (23.8 ммоль) Z-Phe-ONp в 20 мл метанола прибавляли 20 мл насыщенного при 0°C раствора аммиака в метаноле, выдерживали 12 ч, упаривали досуха и пересаждали из изопропанола гексаном. Выход соединения (I) 4.8 г (66.7%), т. пл. 165–167°C, *R*<sub>f</sub> 0.59 (Д), 0.34 (Е).

**Z-Asp(OBu')-Phe-NH<sub>2</sub> (II).** Соединение (I) (2.0 г, 12.3 ммоль) гидрировали в 20 мл метанола с добавкой 10% DMF в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, промывали метанолом, фильтрат упаривали. Гелеобразный остаток растворяли в 50 мл DMF и к полученному раствору прибавляли 5.3 г (12.0 ммоль) Z-Asp(OBu')-ONp. Через 16 ч реакционную смесь концентрировали в вакууме, к остатку добавляли 50 мл 5% раствора NaHCO<sub>3</sub>. Выпавший белый гелеобразный осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой до нейтральной реакции, сушили и пересаждали из изопропилового спирта гексаном. Выход соединения (II) 3.8 г (69.2%) в виде кристаллов с т. пл. 163–164°C, *R*<sub>f</sub> 0.63 (Г), 0.52 (В).

**H-Asp(OBu')-Phe-NH<sub>2</sub> (III).** Соединение (II) (3.8 г, 8.3 ммоль) растворяли в 25 мл этанола и гидрировали аналогично соединению (I). Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растирали в смеси сухого эфира и гексана в соотношении 2 : 1. Выход кристаллического продукта 2.1 г (77.3%), т. пл. 117–119°C, *R*<sub>f</sub> 0.24 (В).

**Z-Nle-Asp(OBu')-Phe-NH<sub>2</sub> (IV).** К раствору 1.0 г (3.0 ммоль) соединения (III) в 15 мл DMF прибавляли 1.2 г (3.0 ммоль) Z-Nle-ONp, через 26 ч реакционную смесь обрабатывали аналогично соединению (II). Выход соединения (IV) 1.6 г (96.5%), т. пл. 171–172°C, *R*<sub>f</sub> 0.54 (В), 0.37 (Е).

**H-Nle-Asp(OBu')-Phe-NH<sub>2</sub> (V).** Соединение (IV) (1.6 г) гидрировали в этаноле аналогично соединениям (I) и (II). После кристаллизации продукта гидрирования из смеси хлороформ–гексан получили 1.1 г (83.3%) соединения (V). *R*<sub>f</sub> 0.19 (В), 0.39 (Д).

**Вос-Trp-Nle-Asp(OBu<sup>+</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> (VI).** К раствору 1.1 г (2.4 ммоль) соединения (V) в 10 мл DMF прибавляли 1.0 г (1.4 ммоль) Вос-Trp-ONp и через 16 ч обрабатывали аналогично соединением (II) и (IV). Выход 1.4 г (78.8%) соединения (VI) с т. пл. 179–181°C, *R<sub>f</sub>* 0.51 (B), 0.61 (D).

**H-Trp-Nle-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (VII).** Раствор 1.0 г (1.4 ммоль) соединения (VI) в охлажденной до 0°C смеси 9 мл TFA, 0.5 мл деионизованной воды и 0.5 мл этандитиола, выдерживали 1 ч, реакционную смесь концентрировали в вакууме, масляобразный остаток обрабатывали холодным сухим эфиром. Полученный осадок отфильтровывали и промывали на фильтре эфиром. Выход соединения (VII) 0.82 г (79%), по данным ВЭЖХ, содержание целевого пептида 89%. Сырой продукт (0.15 г) очищали методом препаративной ВЭЖХ на обращенной фазе в условиях, указанных выше. Фракции, соответствующие целевому продукту, собирали и лиофилизировали. Выход 0.11 г (73%), т. пл. 125–127°C, *R<sub>f</sub>* 0.25 (D). Аминокислотный анализ: Phe 1.0 (1), Asp 1.04 (1), Nle 0.95 (1), Trp 0.33 (1).

**Suc-Trp-Nle-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (VIII).** К раствору 0.11 г (0.17 ммоль) пептида (V) в 5 мл воды, содержащей 10% DMF, прибавляли при перемешивании 2 мл 1 н. NaOH и 0.20 г (10-кратный избыток) янтарного ангидрида. Полноту сукцинилирования определяли с помощью ТСХ в системе Д (проявление нингидрином). Целевой продукт экстрагировали этилацетатом из водного раствора после подкисления реакционной смеси 2 н. HCl до pH 3, органическую фазу промывали водой, этилацетат упаривали, остаток суспендировали в воде и лиофилизировали. Препаративную и аналитическую ВЭЖХ целевого продукта – пептида (VIII) проводили как описано выше. Выход соединения (VIII) – 0.09 г (81.8%); т. пл. 121–123°C, *R<sub>f</sub>* 0.56 (D).

**H-Trp-Nle-Asp-Phe-NH-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (IX).** К раствору 1.26 г (3 ммоль) Z-Phe-ONp в 10 мл метанола прибавляли 10 мл 5% раствора изопропиламина в хлороформе. Далее синтез пептида осуществляли как описано выше для соединения (VII). Характеристики промежуточных соединений приведены в табл. 2. После очистки выход пептида (IX) 0.11 г (24.4% в расчете на исходный Z-Phe-ONp); т. пл. 132–137°C, *R<sub>f</sub>* 0.28 (B), 0.55 (Г).

Характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 2.

**Изучение биологической активности пептидов** проводилось на 150 крысах породы Вистар.

**Тестирование животных на предпочтительное потребление алкоголя** выполняли при одновременном предоставлении воды и 10% раствора этанола в условиях свободного выбора в течение 10 дней как у крыс после длительной алкоголизации (7 месяцев получавших 10% этанол), так и у контрольных животных, получавших в течение этого вре-

мени воду. После тестирования животные случайным образом разделялись на подгруппы по 10 крыс в каждой. Животным одной подгруппы ежедневно в течение 10 дней вводили исследуемый аналог ССК-4 в дозе 2.0 мкг/кг, а другой – эквивалентные объемы 0.9% раствора NaCl и в условиях свободного выбора между 10% раствором этанола и водой ежедневно регистрировали объемы потребляемого этанола и воды. Аналогичным образом эти подгруппы животных тестировали на предпочтительное потребление алкоголя в последующие 10 дней, когда исследуемый аналог ССК-4 уже не вводили.

В качестве экспериментальной модели тревоги использовали тест “светлая–темная” камера [45].

“Светлая–темная” камера представляет собой бокс, разделенный на два отсека. Темный отсек с крышкой (20 × 20 × 20 см) сделан из темного плексигласа, светлый отсек без крышки (20 × 20 × 20 см), сделанный из светлого плексигласа, сверху освещается лампой в 60 Вт, находящейся на расстоянии 25 см от светлого отсека (4000 лк). Два отсека соединены между собой отверстием 7 × 7 см, что позволяет животным свободно перемещаться между отсеками.

Тестирование животных в модели “светлая–темная” камера проводилось между 10 и 16 ч в слабоосвещенной комнате (4 лк). Животные адаптировались к новым условиям в течение 30 мин, находясь в индивидуальных клетках. Затем животных случайным образом делили на подгруппы (по 10 животных). Животным одной подгруппы внутрибрюшинно вводили исследуемый препарат (опытная группа), а животным другой подгруппы – эквивалентный объем 0.9% NaCl (контрольная группа). Аналоги ССК-4 вводили внутрибрюшинно в дозах 0.03, 0.1 и 0.3 мкг/кг веса за 30 мин до тестирования. Затем животное помещали в центр темной камеры и в течение 5 мин наблюдали за ним, фиксируя время нахождения в светлом отсеке и количество выходов в светлый отсек камеры. Увеличение длительности нахождения животных опытной группы в светлом отсеке, а также увеличение числа выходов в светлый отсек по сравнению с контрольной группой является показателем наличия у исследуемого аналога ССК-4 анксиолитической активности, и, наоборот, уменьшение длительности нахождения животных опытной группы в светлом отсеке, а также числа выходов в светлый отсек по сравнению с контрольной группой является показателем наличия у исследуемого аналога ССК-4 анксиогенной активности. Эта экспериментальная модель тревоги, дозы аналога ССК-4 и время его введения были выбраны согласно результатам исследований других авторов [46–48].

**Определение анальгетического эффекта морфина** осуществляли в тесте отдергивания хвоста (тест tail-flick). Крыс помещали в индивидуальные



клетки и после 30-минутного периода адаптации у них трижды через каждые 10 мин регистрировали болевую чувствительность при погружении хвоста в воду при температуре 56°C. За показатель болевой чувствительности принимали время от момента погружения хвоста животного в воду до момента его извлечения животным. Исходный показатель болевой чувствительности (измеряемый в период адаптации) принимали за 100%. Затем животных случайным образом были разделены на группы по 10 крыс в каждой. Животным II группы внутривенно вводили морфин из расчета 5.0 мг/кг веса, животным III группы – исследуемый аналог ССК-4 в дозе 2.0 мкг/кг веса, животным IV группы – исследуемый аналог ССК-4 в той же дозе, а через 15 мин после введения ССК-4 – раствор морфина гидрохлорида в дозе 5.0 мг/кг веса и животным I группы (контрольной) вводили эквивалентный объем 0.9% раствора NaCl. Затем каждые 15 мин на протяжении 1.5 ч регистрировали показатели болевой чувствительности. Полученные результаты представлялись в виде соотношения текущей величины к базовому уровню, за который принимали среднее значение из трех измерений, предшествующих введению препаратов.

**Радиорецепторный анализ.** Для проведения вытесняющего радиорецепторного анализа были использованы мембранные препараты клеток коры больших полушарий головного мозга и поджелудочной железы (ССК-2- и ССК-1-рецепторы соответственно). Для этого крыс декапитировали в утренние часы, быстро извлекали головной мозг и поджелудочную железу.

Область мозга или поджелудочной железы гомогенизировали в 25 объемах 50 мМ Трис-НСI-буфера рН 7.4 (4°C) в гомогенизаторе типа Даунса. Полученную суспензию центрифугировали при 30000 g 15 мин при 4°C. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в первоначальном объеме 50 мМ Трис-НСI-буфера (рН 7.4) на холоду и вновь центрифугировали. Процедуру центрифугирования повторяли еще один раз.

Реакционная смесь общим объемом 0.5 мл содержала: 250 мкл буфера (20 мМ HEPES, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ EGTA, 5 мМ KCl, 120 мМ NaCl, 45 мкМ бацитрацин), 50 мкл меченого лиганда (10 пМ), 50 мкл аналога ССК-4 (в концентрациях от 0.1 до 100 нМ), 150 мкл суспензии мембранного белка, конечная концентрация которого составляла от 1.2 до 1.8 мг/мл. В качестве лиганда ССК-рецепторов был использован [<sup>125</sup>I]-ССК-8(S), 2000 Ки/ммоль (Amersham, Великобритания). Реакцию связывания проводили в течение 2 ч при 21°C.

Специфическое взаимодействие метки с рецепторами определяли как разницу в количестве связанной с мембранами радиоактивности при общем связывании (в отсутствие меченого лиганда) и при неспецифическом связывании (в присутст-

вии 1000-кратного избытка немеченого лиганда). Реакцию останавливали быстрой фильтрацией проб через стекловолокнистые фильтры GF/B (Whatman, Великобритания) с использованием аппарата фирмы "Millipore" (Франция). Промытые 6 мл Трис-НСI-буфера (рН 7.4), а затем подсушенные на воздухе фильтры помещали во флаконы для сцинтилляционного счета, заливали 7 мл стандартного диоксанового сцинтиллятора.

Радиоактивность подсчитывали на сцинтилляционном спектрометре RackBeta 1219 (ЛКВ, Швеция) с эффективностью счета не ниже 30%.

Математическую обработку результатов радиорецепторного анализа осуществляли с помощью программы LIGAND. В качестве критериев оценки были использованы константы ингибирования (K<sub>i</sub>) аналогом связывания меченого лиганда в мембранных препаратах коры больших полушарий головного мозга (cortex) и поджелудочной железы (pancreas).

Статистическую обработку результатов работы проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Работа частично поддержана грантом № 02-04-49902 Российского фонда фундаментальных исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morley J.E. // Life Science. 1982. V. 30. P. 479–493.
2. Silver A.E., Morley J.E. // Prog. Neurobiol. 1991. V. 36. P. 23–34.
3. De la Fuente M., Carrasco M., Del Rio M., Hernanz A. // Neuropeptides. 1998. V. 32. P. 225–233.
4. Vasar E., Yarro J., Lang A., et al. // Psychopharmacology – Berl. 1991. V. 105. P. 393–399.
5. Bohme G.A., Blanchard J.C. // Therapie. 1992. V. 47. P. 541–548.
6. Harro J., Vasar E. // Eur. J. Pharmacol. 1991. V. 193. P. 379–381.
7. Wang X.J., Wang X.H., Han S. // Brain Res. 1996. V. 523. P. 5–10.
8. Zachrisson O., Lindfors N. // Lakartidningen. 1996. V. 93. P. 1225–1227.
9. van Megen H.J.G.M., Westenberg H.G.M., den Boer J.A., Kahn R.S. // Eur. Neuropsychopharmacol. 1996. V. 6. P. 263–280.
10. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. // Биохимия. 1986. Т. 51. С. 3–8.
11. Blanke S.E., Johnsen A.H., Rehfeld J.F. // Peptides. 1993. V. 46. P. 575–582.
12. Dockray G.J. // Nature. 1976. V. 264. P. 568–570.
13. Beinfeld M.C., Palkovits M. // Neuropeptides. 1981. V. 2. P. 123–129.
14. Moran T.H., Robinson P., Goldrich M.C., McHugh P. // Brain Res. 1986. V. 362. P. 175–179.
15. Innis R.B., Snyder S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 77. P. 6917–6921.
16. Cutler N.R., Sramek J.J., Kramer M.S., Reines S.A. // NCDEU 34<sup>th</sup> Annual Meeting, Marco Island, Florida, 1994. P. 45.

17. Kramer M.S., Cutler N.R., Ballenger J.C., Patterson W.M., Mendels J., Chenault A., Shrivastava R., et al. // *Biol. Psychiatry*. 1995. V. 37. P. 462–466.
18. van der Bent A., Ter Laak A.M., Ijzerman A.P., Soudijn W. // *Eur. J. Pharmacol.* 1992. V. 226. P. 327–334.
19. Hull R.A.D., Shankley N.P., Harper E.A., Gerskowitz V.P., Black J.W. // *Br. J. Pharmacol.* 1993. V. 108. P. 734–740.
20. Bock M.G., DiPardo R.M., Evans B.E., Rittle K.E., Veber D.F., Whitter W.Z., Chang R.S., et al. // *J. Controlled Release*. 1992. V. 21. P. 73–80.
21. Akiyama T., Tachibana I., Hirohata Y., Shirohara H., Yamamoto M., Otsuki M. // *Br. J. Pharmacol.* 1996. V. 117. P. 1558–1564.
22. Shiosaki K., Lin C.W., Kopecka H., Tufano M.D., Bianchi B.R., Miller T.R., Witte D.G., Nadzan A.M. // *J. Med. Chem.* 1991. V. 34. P. 2837–2842.
23. Lin C.W., Shiosaki K., Miller T.R., Witte D.G., Bianchi B.R., Wolfram C.A., Kopecka H., et al. // *Mol. Pharmacol.* 1991. V. 39. P. 246–351.
24. Goudreau N., Weng J.H., Rogues B.P. // *Arch. Pharm. Weinheim*. 1996. V. 329. P. 197–204.
25. Weng J.H., Blommaert A.G., Moizo L., Bado A., Ducos B., Bohme A., Garbay C., Roques B.P. // *Bioorg. Med. Chem.* 1996. V. 4. P. 563–573.
26. Harhammer R., Schafer U., Henklein P., Ott T., Repke H. // *Eur. J. Pharmacol.* 1991. V. 209. P. 263–266.
27. Corringer P.J., Weng J.H., Ducos B., Durieux C., Boudeau P., Bohme A., Roques B.P. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 166–172.
28. Kolodziej S.A., Nikiforovich G.V., Skeean R., Lignon M.F., Martinez J., Marshall G.R. // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. P. 137–149.
29. Holladay M.W., Kopecka H., Miller T.R., Bednarz L., Nikkel A.L., Bianchi B.R., Witte D.G., et al. // *J. Med. Chem.* 1994. V. 37. P. 630–635.
30. Hruby V.J., Fang S., Knapp R., Kazmiersky W., Lui G., Yamamura H. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990. V. 35. P. 566–573.
31. Rodriguez M., Lignon M.F., Galas M.C., Amblard M., Martinez J. // *Mol. Pharmacol.* 1990. V. 38. P. 333–341.
32. Morley I.S. // *Proc. R. Soc. London*. 1968. V. 170. P. 97–111.
33. Mutt V. // *Gastrointestinal Hormones* / Ed. G.B.J. Glass. New York, 1980. P. 169–221.
34. Ondetti M.A., Rubin B., Engel S.L., Pluscec J., Sheehan J.T. // *Am. J. Dig. Dis.* 1970. V. 15. P. 149–156.
35. Asin K.E., Gore P.A., Bednarz L., Holladay M., Nadzan A.M. // *Brain Res.* 1992. V. 571. P. 169–174.
36. Kulkosky P.J., Chavez M.R. // *Alcohol*. 1984. V. 1. P. 409–412.
37. Himick B.A., Vigna S.R., Peter R.E. // *Am. J. Physiol.* 1996. V. 27. P. 137–143.
38. Dore D., Smith G.P. // *Physiol. Behav.* 1998. V. 65. P. 11–14.
39. Kulkosky P.J., Clayborne Y.J., Sandoval S.L. // *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 1993. V. 17. P. 545–551.
40. Медведева О.Ф. Влияние холецистокинина на поведенческие и нейрохимические эффекты этанола у крыс: Автореф. канд. дис. М.: Анахарсис, 1997.
41. Crespi F. // *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 1998. V. 20. P. 679–697.
42. Xu X.J., Hoffmann O., Wiesenfeld-Hallin Z. // *Neuropeptides*. 1996. V. 30. P. 203–206.
43. Vanderah T.W., Bernstein R.N., Yamamura H.J., Hruby V.J., Porreca F. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996. V. 278. P. 212–219.
44. Ballaz S., Barber A., Fortuno A., Del Rio J., Martin-Martinez M., Gomez-Monterrey I., Herranz R., et al. // *Br. J. Pharmacol.* 1997. V. 121. P. 759–767.
45. Grawley J.N., Goodwin F.K. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1980. V. 13. P. 167–170.
46. Harro J., Vasar E. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1991. V. 15. P. 473–477.
47. Rex A., Barth T., Voight J.P., Domeney A.M., Fink H. // *Neurosci. Lett.* 1994. V. 172. P. 139–142.
48. Charrier D., Dangoumau L., Puech A.L., Hamon M., Thiebot M.H. // *Psychopharmacol.* 1995. V. 121. P. 127–134.

## Biological Activity of Cholecystokinin (30–33) Tetrapeptide Analogues

T. V. Proskuryakova<sup>\*,#</sup>, Zh. D. Bespalova<sup>\*\*</sup>, M. E. Pal'keeva<sup>\*\*</sup>, O. B. Petrichenko<sup>\*</sup>,  
N. V. Pankratova<sup>\*</sup>, V. A. Shokhonova<sup>\*</sup>, and I. P. Anokhina<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 241-0243; e-mail: pros-lab@mtu-net.ru

<sup>\*</sup>National Research Center of Addiction, Ministry of Public Health of the Russian Federation,  
Malyi Mogil' tsevskii per. 3, Moscow, 119002 Russia

<sup>\*\*</sup>Russian Cardiological Research and Production Association, Ministry of Public Health of the Russian Federation,  
Tret'ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

Analogues of the endogenous peptide corresponding to the 30–33 sequence of cholecystokinin (Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>) were synthesized, and their biological activity was studied. It was shown that, in rats, the *N*-succinylated Nle<sup>2</sup> analogue of this tetrapeptide exhibits increased anxiolytic properties in the dark–bright chamber test and an enhanced alcohol intake by both the control animals and the long-time alcohol-dependent animals under the conditions of free choice. Introduction of an isopropyl residue into the C-terminal amide of the Nle<sup>2</sup> analogue resulted in the appearance of anxiolytic and antialcohol activity and the ability to increase the morphine analgesic effect in the tail-flick test on rats. The two synthesized analogues retained an affinity to cholecystokinin receptors. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* cholecystokinin, 30–33 fragment, synthesis of analogues, biological activity