



УДК 577.175.82'17

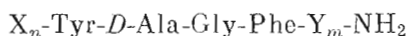
## СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ АНАЛОГОВ des-Met<sup>5</sup>-[D-Ala<sup>2</sup>]ЭНКЕФАЛИНАМИДА

*Власов Г. П., Гусель В. А., Кожевникова Н. Ю.,  
Павлов В. Н., Илларионова Н. Г., Дитковская И. Б.,  
Красникова Е. Н., Дорощ М. Ю., Москвичева Ю. Б.,  
Денисов И. Г., Веселкина О. С.*

*Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР,  
Ленинград*

Изучено влияние N- и C-концевых олигоаланиновых достроек des-Met<sup>5</sup>-[D-Ala<sup>2</sup>]энкефалинамида (I) на биологическую активность и пространственную структуру получаемых аналогов. Аналоги синтезированы твердофазным методом на сефадексе LH-20 в качестве полимерного носителя. Нарастивание пептидной цепи осуществляли комбинацией ступенчатого и блочного методов. Биологическую активность определяли по изменению порога болевой реакции у крыс, изменению температуры тела животных и средству к опиатным рецепторам. Показано, что активные аналоги были получены при модификации карбоксильной группы исходного тетрапептида (I) ди- и трипептидами D-аланина. Спектры КД C-производных тетрапептида (I) близки к спектрам КД [Met<sup>5</sup>]энкефалина и исходного соединения (I). Спектры КД N-производных значительно отличаются от спектров исходного соединения (I).

Энкефалины и их синтетические аналоги представляют собой удобную группу веществ для изучения зависимости биологических свойств и пространственного строения соединений от деталей их первичной структуры. Настоящая работа посвящена синтезу и изучению N- и C-олигоаланиновых производных одного из активных аналогов энкефалинов — des-Met<sup>5</sup>-[D-Ala<sup>2</sup>]энкефалинамида (I) [1]:



при  $m = 0$

- (I)  $n = 0$
- (II)  $X = D\text{-Ala}, n = 2$
- (III)  $X = D\text{-Ala}, n = 4$
- (IV)  $X = L\text{-Ala}, n = 2$
- (V)  $X = L\text{-Ala}, n = 4$

при  $n = 0$

- (VI)  $Y = D\text{-Ala}, m = 1$
- (VII)  $Y = D\text{-Ala}, m = 2$
- (VIII)  $Y = D\text{-Ala}, m = 3$
- (IX)  $Y = D\text{-Ala}, m = 4$
- (X)  $Y = L\text{-Ala}, m = 2$
- (XI)  $Y = L\text{-Ala}, m = 4$
- (XII)  $Y = L\text{-Ala}, m = 6$

Синтез исходного тетрапептида (I) и его аналогов проводили твердофазным методом на полимерном носителе сефадексе LH-20 [2, 3]. C-Концевую аминокислоту или дипептид (в случае получения аналогов (X) — (XII)) присоединяли к полимерному носителю в виде N-защитенного производного с помощью карбонилдимидазола [4]. Дальнейшее нарастивание олигопептидной цепи проводили на образцах ациламиносефадекса с начальной емкостью 0,4—0,6 ммоль/г. Удаление *трет*-бутилоксикарбонильной защитной группы в ходе синтеза и определение емкости пептидполимера на каждой стадии деблокирования осуществляли с помощью *n*-толуолсульфокислоты [4]. При синтезе аналогов (I)—(III), (VI)—(IX) цепь наращивали ступенчатым методом, используя симметричные ангидриды *трет*-бутилоксикарбониламинокислот [5]. При получении аналогов (IV)—(V), (X)—(XII) присоединение остатков L-аланина проводили дипептидными блоками, используя в качестве конденсирующего агента ди-

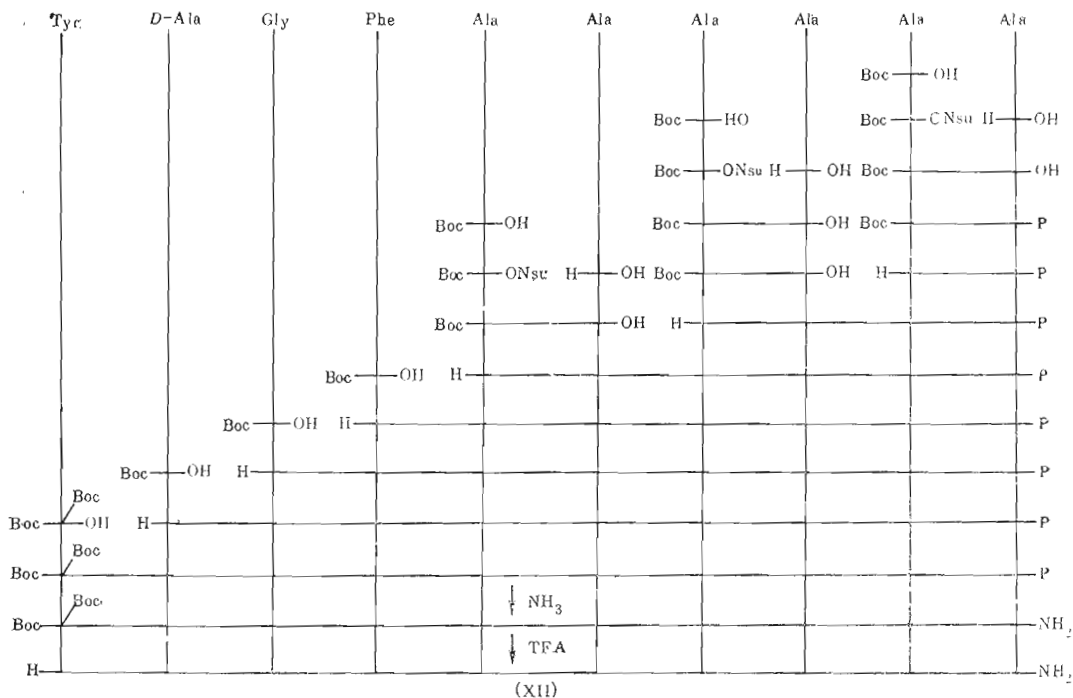


Схема синтеза декапептида (аналог (XII)) блочным методом. Присоединение Вос-защищенных аминокислот Phe, Gly, Tyr, D-Ala проводили методом симметричных ангидридов; присоединение Вос-Ala-Ala — карбодимидным методом

циклогексилкарбодимид (схема). Дипептид Вос-Ala-Ala синтезировали в растворе методом N-гидроксисукцинимидных эфиров. Все синтезированные аналоги удаляли с носителя аммонолизом с последующим полным деблокированием трифторуксусной кислотой. Характеристика синтезированных аналогов представлена в табл. 1.

Влияние структурных модификаций на биологическую активность изучали по тестам *in vivo* и *in vitro*. Биологическую активность синтезированных аналогов *in vivo* определяли после их введения в желудочки мозга крыс в дозах 5 и 200 мкг в 5 мкл раствора по изменению порога болевой реакции у животных при стимуляции одиночными электрическими им-

Таблица 1

Физико-химические константы синтетических аналогов des-Met<sup>5</sup>-[D-Ala<sup>2</sup>]энкефалинамида (I)

Соединение	Аминокислотный состав				[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup> , град (с, метанол)
	Phe	Tyr	Gly	Ala	
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH <sub>2</sub> (I)	1,00	1,00	0,95	0,98	+39,0 (0,5)
D-Ala <sub>2</sub> -Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH <sub>2</sub> (II)	1,00	0,90	1,10	2,90	+10,8 (0,5*)
D-Ala <sub>4</sub> -Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH <sub>2</sub> (III)	0,98	0,95	1,00	5,20	+38,4 (0,5)
Ala <sub>2</sub> -Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH <sub>2</sub> (IV)	1,00	1,00	0,96	3,20	-11,2 (0,5)
Ala <sub>4</sub> -Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH <sub>2</sub> (V)	0,95	0,95	1,00	5,12	+0,4 (0,25*)
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Ala-NH <sub>2</sub> (VI)	1,00	0,96	1,02	2,00	+12,8 (0,5)
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Ala <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> (VII)	1,00	0,95	1,05	3,05	+35,2 (0,5)
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Ala <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub> (VIII)	0,95	0,91	1,00	4,00	+24,0 (0,5)
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Ala <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (IX)	0,91	0,91	1,00	5,15	+29,6 (0,5)
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Ala <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> (X)	1,00	0,94	1,10	3,20	+5,2 (0,5)
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Ala <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (XI)	0,95	0,90	1,00	5,20	-0,8 (0,5*)
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Ala <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub> (XII)	1,00	0,87	1,10	7,80	-27,6 (0,12**)

\* Растворитель — уксусная кислота.

\*\* Растворитель — диметилформамид.

Биологическая активность аналогов des-Met<sup>5</sup>-[D-Ala-<sup>2</sup>]энкефалинамида (I)

Соединение	Порог болевой реакции *, В		Относительная активность <sup>2*</sup>				Максимальное изменение температуры		Блокирующая активность <sup>3*</sup> , ЭК <sub>50</sub> , моль
			анальгезия		гипо/гипертермический эффект				
	1	2	1	2	1	2	1	2	
(I)	150	100	100	100	100	100	-4,8	-0,9	(7,33±3,18)·10 <sup>-8</sup>
(II)	42	- <sup>4*</sup>	25	-	76	-	+1,7	-	2,8·10 <sup>-6</sup>
(III)	40	-	10	-	26	-	+0,4	-	-
(IV)	150	-	105	-	110	-	-6,0	-	-
(V)	150	-	65	-	70	-	-2,9	-	-
(VI)	-	63	-	140	-	180	-	+0,7	(4,51±2,34)·10 <sup>-6</sup>
(VII)	150	104	200	165	215	315	-7,4	+1,2	(6,75±4,54)·10 <sup>-9</sup>
(VIII)	-	150	-	230	-	280	-	-4,4	(1,94±0,72)·10 <sup>-8</sup>
(IX)	150	65	150	110	110	175	-8,4	+0,4	(2,04±1,79)·10 <sup>-7</sup>
(X)	150	-	65	-	70	-	-3,9	-	-
(XI)	150	-	70	-	55	-	-2,8	-	-
(XII)	150	-	75	-	70	-	-3,5	-	-
Морфин	-	-	-	-	-	-	-	-	(7,53±1,03)·10 <sup>-8</sup>

\* Порог болевой реакции — амплитуда стимулирующего импульса в вольтах, при которой у крыс возникает во время электрического раздражения реакция на боль (вздрагивание, писк).

<sup>2\*</sup> Препарат вводился в желудочки мозга крыс в дозе 200 (1) и 5 мкг/животное (2); относительная активность определялась отношением длительности эффекта соответствующих аналогов к длительности эффекта аналога (1), которая составляла 280 мин (доза 200 мкг), 75 мин (доза 5 мкг) — для анальгетического эффекта; 260 мин (доза 200 мкг), 57 мин (доза 5 мкг) — для гипо/гипертермического эффекта.

<sup>3\*</sup> ЭК<sub>50</sub> — эффективная концентрация аналога, вызывающая угнетение амплитуды сокращений кишки морской свинки на 50%.

\* Прочерк означает, что аналоги в данных текстах не испытывались.

пульсами корня хвоста крыс и по изменению температуры тела животных измеряемой в прямой кишке электротермометром.

Аналоги, содержащие 6 и 8 D-аланиновых остатков по C-концу исходного тетрапептида, не прошли биологических испытаний из-за практически полного отсутствия растворимости.

Все синтезированные аналоги, за исключением аналогов (II), (III), при введении в дозе 200 мкг повышали порог болевой реакции за пределы 150 В (табл. 2), что затрудняло сравнение активности этих соединений, так как используемый нами стимулятор ЭСЛ-1 генерирует импульсы с максимальной амплитудой 150 В. В связи с этим для сопоставления изменений порога болевой реакции вводимая доза наиболее активных аналогов (VI)–(IX) была уменьшена в 40 раз (до 5 мкг). При этом было обнаружено, что изменение порога болевой реакции у крыс находится в корреляции с длительностью анальгетического эффекта (табл. 2).

Изучение длительности анальгетического эффекта показало, что модификация N-конца тетрапептида (I) приводит к соединениям, активность которых, как правило, значительно ниже активности аналогов по C-концу и уступает активности исходного соединения. Модификация N-конца исходного тетрапептида олигомерами L-аланина (аналоги (IV), (V)) дает соединения несколько более активные, чем модификация олигомерами D-аланина (аналоги (II), (III)). Модификация тетрапептида по C-концу олигомерами D-аланина (аналоги (VI)–(IX)) приводит к соединениям, активность которых существенно превышает активность соответствующих аналогов, содержащих олигомеры L-аланина.

На примере аналогов (VI)–(IX) было показано, что активность соединений с ростом D-аланиновой цепи возрастает, достигая максимума при  $n = 3$  (аналог (VIII)), а затем снижается ( $n = 4$ , аналог (IX)) (табл. 2).

Было изучено влияние на порог болевой реакции и длительность его изменения аналогов (VI)–(IX) при их внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг. У исходного тетрапептида при этом анальгетический эффект не был обнаружен. Длительность эффекта аналога (VI) составила 15 мин, аналога (VII) — 47 мин и аналога (VIII) — 13 мин, порог болевой реак-

ции увеличился соответственно до 45, 77, 43 В. У аналога (IX) анальгетическая активность при внутрибрюшинном введении не была выявлена.

При изучении влияния на температуру тела животных было показано, что все синтезированные аналоги, за исключением соединений с наиболее низкой анальгетической активностью ((II), (III)), при введении в желудочки мозга в дозе 200 мкг обладают гипотермическим эффектом. Введение аналогов (VI), (VII), (IX) в дозе 5 мкг повышало температуру тела животных. При внутрибрюшинном введении все испытанные аналоги обладали гипертермическим действием. Полученные данные свидетельствуют о том, что в большинстве случаев увеличение анальгетического эффекта путем введения достаточно сильных анальгетиков (соединение (VIII)) или увеличения вводимой дозы (соединения (VII), (IX)) сопровождается понижением температуры тела животных. Соединения (II), (III), проявляющие слабое анальгетическое действие, вызывают только гипертермический эффект.

У ряда синтезированных соединений — (I), (II), (VI)—(IX) — было изучено сродство к периферическим опиатным рецепторам изолированной подвздошной кишки морской свинки, в которой в основном присутствуют опиатные рецепторы  $\mu$ -типа [6]. Наиболее высокое сродство к опиатным рецепторам проявил аналог (VII), наименьшая активность по данному тесту обнаружена у аналога (II), что полностью совпадает с анальгетическими эффектами, выявленными у этих соединений.

Для изучения связи между биологической активностью и структурно-конформационными характеристиками синтезированных аналогов были сняты спектры КД для  $[\text{Met}^5]$ энкефалина, тетрапептида (I) и различных его N- и C-олигоаланиновых аналогов (рис. 1, 2). Спектры КД в области 240—300 нм обусловлены вкладами ароматических хромофоров остатков тирозина и фенилаланина ( $L_\alpha$ -переход). В области 215—240 нм наблюдаемый спектр КД является суммой вкладов  $L_\alpha$ -перехода ароматических и  $n - \pi^*$ -перехода пептидных хромофоров. При  $\lambda < 215$  нм определяющим является вклад пептидных хромофоров ( $\pi - \pi^*$ -переход).

Из сравнения полученных данных в области поглощения ароматических хромофоров (240—280 нм) видно, что ковалентная пришивка олигопептидов аланина с  $n = 2, 4, 6$  по N- и C-концам тетрапептида (I) по-разному влияет на спектры КД этих хромофоров. Модификация по N-концевой аминогруппе приводит к резкому изменению спектров КД по сравнению со спектром исходного тетрапептида. Молекулярная эллиптичность  $[\theta]$  меняет знак и возрастает по абсолютной величине. Модификация же по C-концевой карбоксильной группе мало сказывается на спектрах КД модифицированного тетрапептида. Это указывает на то, что модификация по N-концевой аминогруппе приводит к заметному изменению характера окружения ароматических хромофоров по сравнению с исходным тетрапептидом. В случае же модификации по C-концевой карбоксильной группе асимметрическое окружение ароматических хромофоров меняется незначительно.

Модификация по N- и C-концевым остаткам, хоть и не затрагивает непосредственно асимметрический атом углерода тирозина или фенилаланина, происходит в ближайшей к этому атому группе, которая определяет как локальное окружение хромофоров, так и их локальное стерическое состояние, способные привести к конформационным изменениям в модифицированном тетрапептиде [7]. Поэтому наблюдаемые изменения в спектрах КД при присоединении первых остатков аланина по N-концевой аминогруппе могут быть связаны как с локальным изменением окружения хромофора за счет модификации молекулы, так и с изменениями пространственной структуры. При дальнейшем увеличении длины модифицирующего олигопептида изменения в спектрах КД могут быть связаны лишь с конформационными перестройками модифицированного тетрапептида (как видно из рис. 1, 2, эти изменения невелики). Замена L-аланина на D-аланин существенного влияния на конформационное состояние модифицированного тетрапептида не оказывает.

При модификации C-концевой карбоксильной группы олигопептидами L- и D-аланина спектры КД практически не отличаются от спектра КД

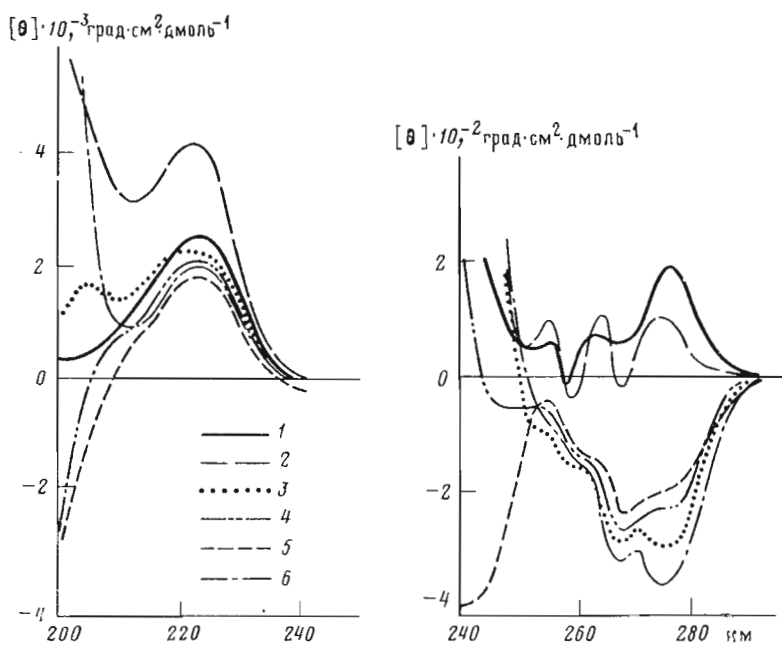


Рис. 1. Спектры КД: 1 — [Met<sup>5</sup>]энкефалина, 2 — тетрапептида (I), 3 — аналога (IV), 4 — (V), 5 — (III), 6 — (II)

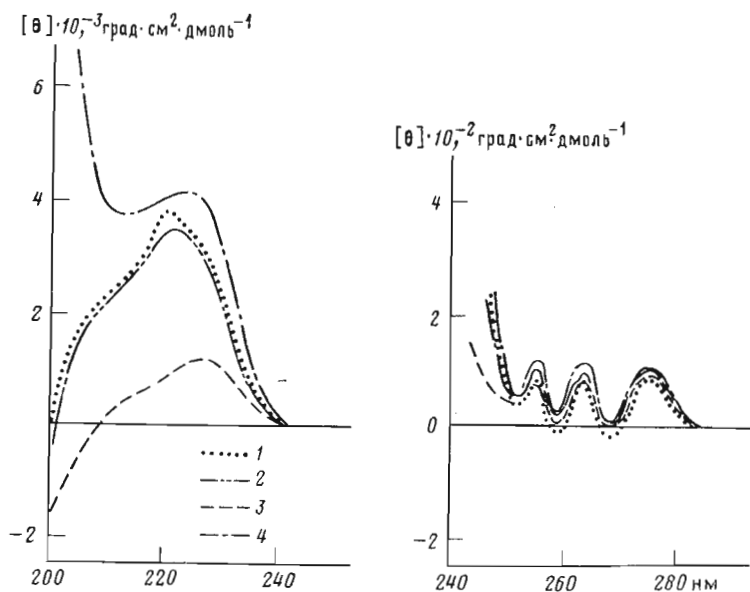


Рис. 2. Спектры КД: 1 — аналога (X), 2 — (XI), 3 — (XII), 4 — (VII)

исходного тетрапептида (рис. 2), и можно полагать, что эта модификация существенного влияния на пространственную структуру тетрапептида не оказывает. Сравнение спектра КД [Met<sup>6</sup>]энкефалина со спектрами исходного тетрапептида и исследованных аналогов (VII), (X) — (XII) также указывает на большее сходство конформационного состояния его ароматических хромофоров с хромофорами этих соединений, чем в случае соединений, модифицированных по N-концевой аминогруппе (аналоги (II) — (V)) (рис. 1).

В области 215—240 нм наблюдаются те же различия в изменении молекулярной эллиптичности. В случае модификации тетрапептида по аминогруппе величина  $\theta$  резко уменьшается, а в случае модификации по C-кон-

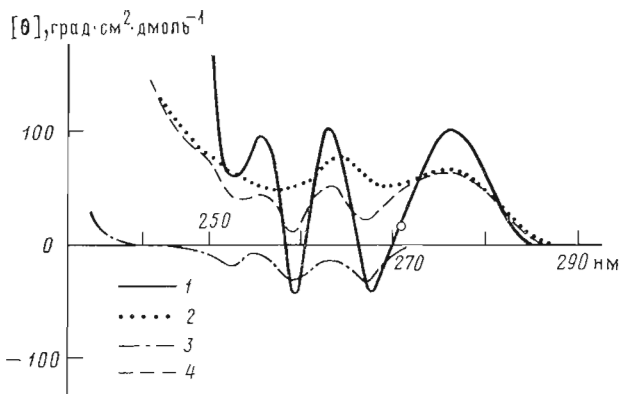


Рис. 3. Спектры КД: 1 — тетрапептида (I), 2 — Tyr-D-Ala-Gly, 3 — D-Ala-Gly-Phe-NH<sub>2</sub>, 4 — суммарный спектр 2—3

цевой карбоксильной группе изменяется мало (за исключением аналога (XII)). Уменьшение молекулярной эллиптичности в этой области длин волн сопровождается появлением дополнительного минимума в области 240—250 нм.

Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о наличии изгиба в [Leu<sup>3</sup>]энкефалине [8]. Расчеты Никифоровича и сотр. [7] также показывают, что среди набора конформаций энкефалина наиболее вероятны конформации со сближенными N- и C-концами. Нами были сняты спектры КД в области 240—300 нм трипептидов Tyr-D-Ala-Gly и D-Ala-Gly-Phe-NH<sub>2</sub>, выбранных в качестве модельных соединений для исследования состояния тирозина и фенилаланина в тетрапептиде (рис. 3). Сравнение суммарного спектра КД этих модельных соединений с измеренным спектром для тетрапептида показывает, что они заметно различаются. Это может быть обусловлено взаимодействием ароматических хромофоров в тетрапептиде, что указывает на их сближенность, возможную при паличии β-изгиба.

Таким образом, в ряду рассмотренных аналогов в целом удалось выявить определенную корреляцию между их пространственной структурой и биологической активностью. Модификация C-концевой карбоксильной группы исходного тетрапептида (I) олигомерами аланина приводит к более активным аналогам, чем аналоги, получаемые при модификации его N-концевой аминогруппы; при этом, по данным спектров КД, наблюдается сохранение пространственной структуры в первом случае и ее нарушение во втором.

### Экспериментальная часть

Трет-бутилоксикарбониламинокислоты получали по методу [9], симметричные ангидриды N-защищенных аминокислот — по методу [5]. Аминокислотный состав пептидов определяли с помощью аминокислотных анализаторов ААА-881 (ЧССР) и Biotronik LC 2000 (ФРГ), гидролиз образцов для анализа проводили 6 н. HCl в течение 24 ч. Индивидуальность синтезированных соединений доказывали с помощью электрофореза и хроматографии на пластинках Silufol UV<sub>254</sub> (ЧССР). Электрофоретическую подвижность определяли на бумаге марки Filtrak FN7 (ГДР) в 6% уксусной кислоте (рН 2,4) на приборе горизонтального электрофореза ОЕ-201 Labor (ВНР). Оптическое вращение измеряли на спектрополяриметре Perol-60 (Bellingham and Stanley, Великобритания).

Спектры КД измеряли на дихрографе Mark III (Jobin Yvon, Франция) при чувствительности  $2 \cdot 10^{-6}$  ΔA/мм, постоянной времени 5 с, скорости сканирования 0,1 нм/с в кюветах 10 и 0,1 мм. Данные представлены в единицах молярной эллиптичности в расчете на молярную концентрацию тирозина и фенилаланина в области 240—300 нм (для удобства сравнения

## Общая программа синтеза пептидов на полимерном носителе сефадексе LH-20 \*

Номер стадии	Реагент	Объем, мл	Число обработок	Время, мин
1	1 M TsOH/AcOH	30	1	90
2	MeOH	25	5	1
3	Эфир	20	2	0,5
4	10% TEA/DMF 2*	25	2	0,5
5	DMF	25	2	0,5
6	MeOH	25	2	0,5
7	Эфир	20	2	0,5
8	Конденсирующий агент/DMF 3*	25	1	120
9	DMF	25	2	1

\* Объем реагентов и растворителей соответствует 5 г аминокислотсефадекса.

2\* Фильтраты после 4—6 стадий собирали для спектрофотометрического определения емкости пептидил-полимера [4].

3\* При конденсации методом симметричных ангидридов использовали трехкратные избытки N-защищенных симметричных ангидридов соответствующих аминокислот; при конденсации карбонимидным методом добавляли трехкратные избытки дихлорогексилкарбонимиды и соответствующей N-защищенной аминокислоты. Количество реагентов на каждой стадии конденсации рассчитывали в соответствии с емкостью аминокислотсефадекса, определенной на предыдущей стадии деблокирования. При нингидринположительном тесте пробы пептидил-сефадекса реакцию конденсации повторяли.

образцов разного аминокислотного состава). Все измерения проводили в 0,2 M NaCl при pH 9,0.

*Присоединение трет-бутилоксикарбониламинокислот к сефадексу LH-20 (типовая методика).* К 7,5 ммоль трет-бутилоксикарбониламинокислоты и 7,5 ммоль карбонилдиимидазола (Fluka) добавили при интенсивном перемешивании 50 мл безводного диметилформамида и через 15 мин 5 г сефадекса LH-20. Реакционную смесь выдержали 40 ч при 20° C, затем аминокислотсефадексы отфильтровали, промыли 150 мл диметилформамида, 150 мл метанола и 50 мл эфира. Образец высушили в вакууме до постоянного веса. Получили аминокислотсефадексы с емкостью (ммоль/г) Boc-Phe-O-Seph — 0,55; Boc-D-Ala-O-Seph — 0,6; Boc-Ala-Ala — 0,4.

*Синтез пептидов* осуществляли в стеклянном реакционном сосуде с впаянным крупнопористым фильтром по общей программе, приведенной в табл. 3.

*Выделение пептида (типовая методика).* Через суспензию 5 г пептидил-сефадекса в 50 мл метанола пропускали в течение 2 ч ток аммиака. Реакционную смесь оставляли на 16 ч, затем повторяли обработку газообразным аммиаком. Через 48 ч раствор фильтровали, промывали 50 мл метанола, объединенный фильтрат упаривали и сухой остаток дважды переосаждали из метанола эфиром. Сухой осадок N-защищенного пептида растворяли в 10 мл безводной трифторуксусной кислоты и выдерживали 30 мин при 20° C. Затем полученный раствор приливали при интенсивном перемешивании к 500 мл эфира. Осадок переосаждали из метанола в эфир. При аммонолизе и деблокировании аналогов (IX), (XI), (XII) вместо метанола использовали в качестве растворителя диметилформамид.

Деблокированные пептиды фракционировали на колонке (150 × 2 см) с сефадексом G-15 в 1 н. уксусной кислоте (одноразовое нанесение образца на колонку не превышало 100 мг). Собирали фракции по 2 мл, детектирование осуществляли спектрофотометрически при  $\lambda$  253 нм и ТХС в системе бутанол-1 — уксусная кислота — пиридин — вода (4 : 1 : 1 : 2).

#### Изучение биологической активности синтезированных аналогов

*Определение сродства к опиатным рецепторам изолированной подвздошной кишки морской свинки.* Сегмент подвздошной кишки морской свинки помещали в раствор Кребса при 36° C, ткань стимулировали полем (прямоугольными импульсами супрамаксимального напряжения (40—55 В) длительностью 1 мс с частотой 0,1 Гц). Сокращения в изометриче-

ском режиме регистрировали с помощью тензометрического датчика. Количественную оценку степени сродства синтетических аналогов к рецепторам производили путем определения концентрации пептида в молях, вызывающей угнетение электрически вызванных сокращений продольной мускулатуры кишки на 50% ( $ЭК_{50}$ ) [10].

*Анальгетическую активность аналогов* изучали путем определения порога болевой реакции (вздрагивание, писк) белых крыс (180—220 г) при электрической стимуляции корня хвоста. Параметры стимуляции (электростимулятор ЭСЛ-1): длительность прямоугольного импульса 0,5 мс, частота импульсов 1 имп/с, длительность стимуляции 1 с. При определении порога болевой реакции у контрольных крыс (до и после введения в боковые желудочки мозга растворителя пептидов — бидистиллированной воды в объеме 0,005—0,01 мл) и у подопытных крыс (до и после инъекции в желудочки мозга растворов пептидов в том же объеме) повторные стимуляции корня хвоста проводили не менее чем через 5 мин. У контрольных животных порог болевой реакции составлял 15—25 В и в течение 4—6 ч эксперимента колебался не более чем на 5 В.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Fujino M., Shinagawa S., Kawai K., Ishii H. Z. Naturwissenschaften, 1979, В. 66, Н. 12, S. 625—626.
2. А. с. 250153 (СССР). Способ получения пептидов/Власов Г. П., Билибин А. Ю. Оpubл. в Б. И., 1969, № 26.
3. Козжевникова Н. Ю., Власов Г. П. Журн. общ. химии, 1979, т. 49, № 4, с. 924—930.
4. Билибин А. Ю., Власов Г. П. Журн. общ. химии, 1973, т. 43, № 8, с. 1844—1848.
5. Hagenmaier H., Franck H. Z. Physiol. Chem., 1972, В. 353, S. 1973—1979.
6. Dimaio J., Nguyen Thi M.-D., Lemieux C., Schiller P. W. J. Med. Chem., 1982, v. 25, p. 1432—1438.
7. Нижифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. Конформация пептидных биорегуляторов. М.: Медицина, 1983. 190 с.
8. Swith G. D., Griffin I. F. Science, 1978, v. 199, p. 1214—1218.
9. Позднее В. Ф. Биоорг. химия, 1977, т. 3, с. 1605—1610.
10. Hughes J. Brain. Res., 1975, v. 88, p. 295—308.

Поступила в редакцию  
12.VII.1985  
После доработки  
29.X.1985

#### SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF THE des-Met<sup>5</sup>-[D-Ala<sup>2</sup>]ENKEPHALIN AMIDE ANALOGUES

VLASOV G. P., GUSEL V. A., KOZHEVNIKOVA N. Yu., PAVLOV V. N.,  
ILLARIONOVA N. G., DITKOVSKAYA I. B., KRASNIKOVA E. N.,  
DOROSH M. Yu., MOSKVITCHOVA Yu. B., DENISOV I. G., VESYOLKINA O. S.

*Institute of High Molecular Weight Compounds, Academy  
of Sciences of the USSR, Leningrad*

The effects of N- and C-terminal oligoalanine insertions into des-Met<sup>5</sup>-[D-Ala<sup>2</sup>]enkephalin amide (I) on the biological activity and spatial structure were examined. The corresponding analogues were obtained by solid-phase synthesis using Sephadex LH-20 as a polymeric support. Biological activity was assayed via changes in the pain threshold in the rat, body temperature, and also as affinity for opiate receptors. Active analogues were obtained upon modifying the carboxylic group in the tetrapeptide I with di- and tri-D-alanyls. The CD spectra of the C-derivatized analogues were similar to those of the starting tetrapeptide I and [Met<sup>5</sup>]enkephalin, whereas the N-derivatized analogues showed essentially different CD spectra.