



УДК 577.175.8'17

ЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ЭНКЕФАЛИНА С ДИСУЛЬФИДНЫМ МОСТИКОМ МЕЖДУ 2-м И 5-м ПОЛОЖЕНИЯМИ

*Корольков В. И., Власов Г. П., Королькова С. В.,
Веселкина О. С., Шпаков А. О., Денисов И. Г.,
Илларионова Н. Г., Петров А. Н.*, Шевчук М. К.*,
Георгианова Е. К.*, Дычаков А. В.*, Павлов В. Н.***

*Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР,
Ленинград;*

** Институт токсикологии Министерства здравоохранения СССР,
Ленинград;*

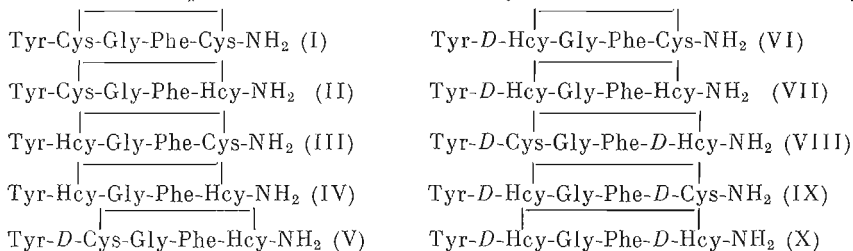
*** Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград*

Методом пентафторфениловых эфиров синтезированы в растворе циклические аналоги энкефалина с дисульфидным мостиком между 2-м и 5-м аминокислотными остатками, различающиеся размером цикла, местом расположения дисульфидной связи в нем и конфигурацией аминокислотных остатков во 2-м и 5-м положениях. Циклизацию проводили на стадии C-концевого тетрапептида иодом в метаноле после удаления бензильных защит с меркаптогрупп натрием в жидком аммиаке. Показано, что биологическая активность *in vitro* (GPI- и MVD-тесты) зависит от размера цикла, места расположения дисульфидной связи в цикле и конфигурации аминокислотных остатков во 2-м и 5-м положениях.

Наибольшую биологическую активность *in vivo* (анальгезия, двигательные эффекты, влияние на частоту сердечных сокращений и температуру тела) проявляют аналоги с остатками D-аминокислот. Методом КД изучены конформационные характеристики аналогов.

Из конформационно ограниченных аналогов энкефалина, созданных с целью получения высокоэффективных и селективнодействующих препаратов на основе энкефалинов, наибольший интерес представляют циклические аналоги с мостиком между 2-м и 5-м положениями. В настоящее время наиболее известны аналоги с амидным мостиком между 2-м и 5-м положениями, обладающие определенной δ-селективностью [1], аналоги с мостиком между цистеинами во 2-м и 5-м положениях, обладающие некоторой селективностью к μ-рецепторам [2], и пеницилламинсодержащие аналоги с ярко выраженной селективностью к δ-рецепторам [3].

Настоящая работа посвящена синтезу и изучению взаимосвязи «структура — активность» в следующей серии циклических дисульфидсодержащих аналогов энкефалина с мостиком между 2-м и 5-м положениями [4]:



Синтез этих соединений проводился по схеме, согласно которой наращивание пептидной цепи осуществлялось методом пентафторфениловых

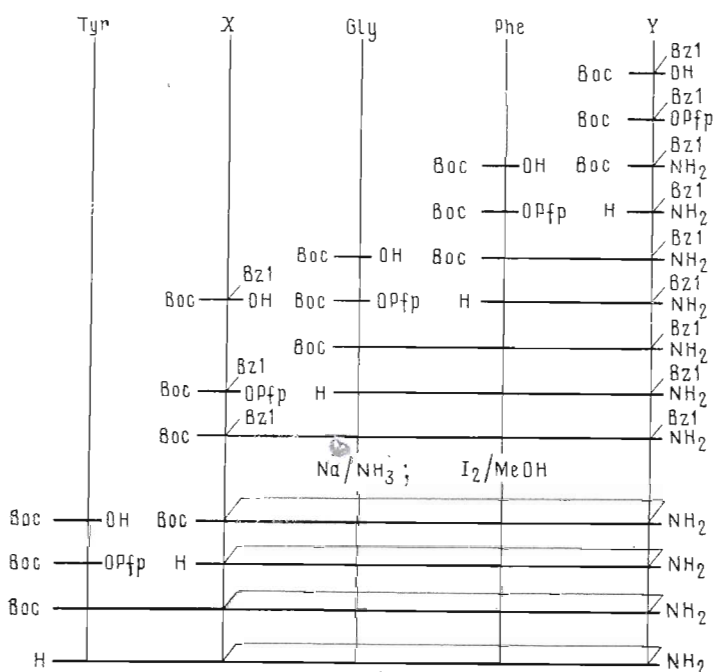
Сокращения: Pfp — пентафторфенил, NMM — N-метилморфолин, DMF — диметилформамид.

Характеристики полученных циклических аналогов энкефалина

Соединение	Молекулярная масса		Аминокислотный состав				E Gly	[α] _D ²⁰ (с, DMF), град	R _f в системе *		k', пол. ВЭЖХ **
	вычислено M	получено M+H	Tyr	Gly	Phe	A			B		
<u> </u> Tyr-Cys-Gly-Phe-Cys-NH ₂ (I)	588	589	0,91	1,00	1,04	0,64	+15,0 (0,0045)	0,73	0,51	2,05	
<u> </u> Tyr-Cys-Gly-Phe-Hcy-NH ₂ (II)	602	603	0,79	1,00	1,08	0,64	-10,9 (0,004)	0,73	0,53	1,94	
<u> </u> Tyr-Hcy-Gly-Phe-Cys-NH ₂ (III)	602	603	0,82	1,00	1,06	0,64	-11,0 (0,0061)	0,73	0,52	2,00	
<u> </u> Tyr-Hcy-Gly-Phe-Hcy-NH ₂ (IV)	616	617	0,81	1,09	1,00	0,63	-8,1 (0,005)	0,74	0,53	2,44	
<u> </u> Tyr-D-Cys-Gly-Phe-Hcy-NH ₂ (V)	602	603	0,84	1,00	0,96	0,64	-10,0 (0,003)	0,74	0,52	2,78	
<u> </u> Tyr-D-Hcy-Gly-Phe-Cys-NH ₂ (VI)	602	603	0,72	1,00	1,19	0,63	+3,0 (0,0045)	0,74	0,52	2,57	
<u> </u> Tyr-D-Hcy-Gly-Phe-Hcy-NH ₂ (VII)	616	617	0,73	1,13	1,00	0,64	-76,0 (0,0032)	0,74	0,51	2,69	
<u> </u> Tyr-D-Cys-Gly-Phe-D-Hcy-NH ₂ (VIII)	602	603	0,81	1,00	0,94	0,64	-9,3 (0,0045)	0,74	0,53	3,11	
<u> </u> Tyr-D-Hcy-Gly-Phe-D-Cys-NH ₂ (IX)	602	603	0,79	1,00	0,99	0,64	-21,5 (0,004)	0,74	0,53	3,4 ***	
<u> </u> Tyr-D-Hcy-Gly-Phe-D-Hcy-NH ₂ (X)	616	617	0,80	1,14	1,00	0,64	-27,0 (0,0052)	0,74	0,54	3,06	

* А — *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (4 : 1 : 1 : 2), В — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1).** Значения *k'* приведены для системы 82,5% 0,1 н. ацетата аммония (рН 4,5) + 17,5% ацетонитрил, λ 254 нм.*** Значения *k'* приведены для системы: А — 0,01 М трифторуксусная кислота В — ацетонитрил, градиент В от 15 до 30% за 15 мин.

эфиров. В качестве временной защиты аминогруппы использовалась *трет*-бутилоксикарбоильная защита. Меркаптогруппы цистеина или гомоцистеина блокировались бензильной защитой. *трет*-Бутилоксикарбонильную защиту удаляли трифторуксусной кислотой. Бензильные защитные группы снимали действием натрия в жидком аммиаке на стадии *трет*-бутилоксикарбонилзащищенного С-концевого тетрапептида, после чего пептиды циклизовали окислением иодом в метаноле. Затем циклические тетрапептиды деблокировали трифторуксусной кислотой. Для последующего присоединения тирозина пользовались карбодиимидным методом и методом пентафторфениловых эфиров. Тирозин использовали в виде *N-трет*-бутилоксикарбонил- или *O, N-ди-трет*-бутилоксикарбонилпроизводных. Существенных различий ни в выходе, ни в качестве продукта в зависимости от метода присоединения отмечено не было. Деблокирующим агентом на последней стадии служила трифторуксусная кислота.



Синтез циклических аналогов энкефалина с дисульфидным мостиком (X и Y — Cys, Hcy, D-Cys, D-Hcy)

Полученные соединения очищали с помощью колоночной хроматографии на сефадексе G-15 в 1 М уксусной кислоте; их гомогенность контролировали с помощью высоковольтного электрофореза, ТСХ и ВЭЖХ в различных системах с детекцией при различных длинах волн. Структуру продуктов доказывали аминокислотным и C, H, N-анализами, а также методом масс-спектрометрии ЭРИАД (рис. 1) *. Характеристики синтезированных соединений представлены в табл. 1.

Была изучена биологическая активность полученных аналогов *in vitro* в GPI- и MVD-тестах как показателей взаимодействия с μ - и δ -рецепторами соответственно и *in vivo* в тестах на анальгезию, двигательную активность, частоту сердечных сокращений и температуру тела.

Изучение влияния размеров цикла на биологическую активность аналогов *in vitro* (табл. 2) показало, что в случае аналогов (I) — (IV), содержащих L-цистеин или L-гомоцистеин во 2-м положении, расширение цикла от 14- до 15-членного и далее к 16-членному сопровождалось повышением активности к μ -рецепторам. Эта же общая тенденция сохраняется и по отношению к δ -рецепторам. Так, при переходе от соединения (I) к сое-

* ЭРИАД — экстракция растворенных ионов при атмосферном давлении.

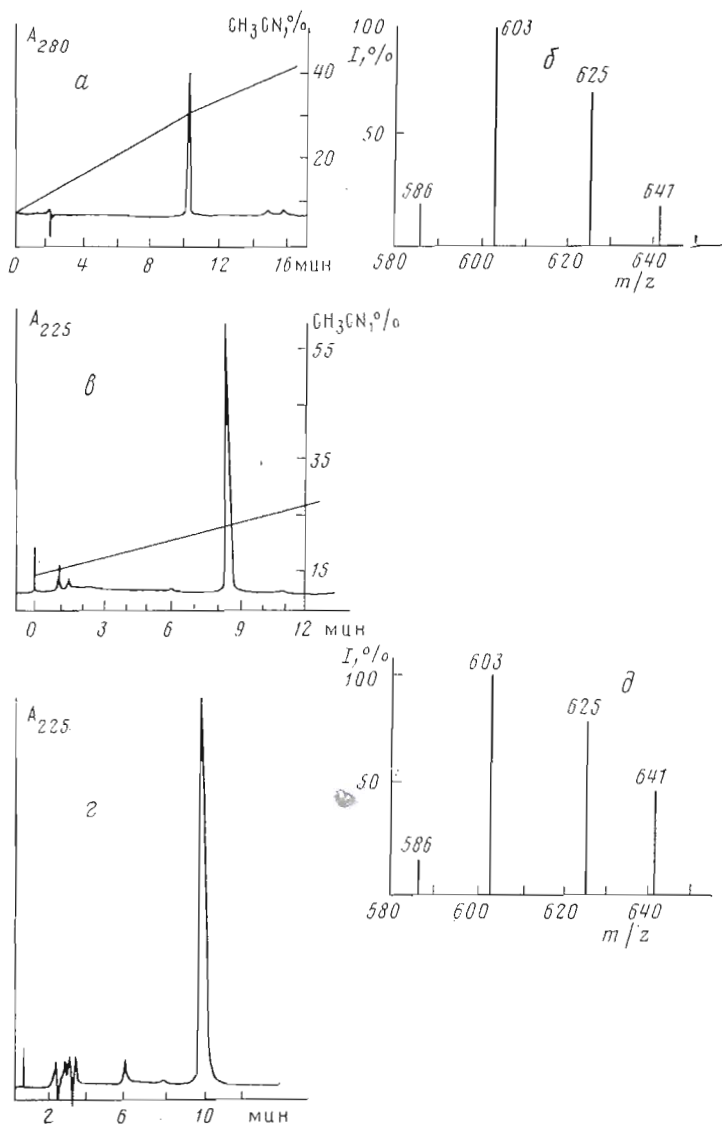


Рис. 1. Хроматография ВЭЖХ (а, б, в) и масс-спектры ЭРИАД (б, д) аналогов энкефалина (IX) (а, б) и (III) (в-д). При ВЭЖХ использовали градиент концентрации ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония, рН 4,55 (а) или в 0,01 М трифторуксусной кислоте (в) и смесь 82,5% 0,1 М ацетата аммония (рН 4,55) с 17,5% ацетонитрила (в)

дивению (III) и далее к (IV) тенденция выдерживается полностью. Однако соединение (II) с 15-членным циклом приблизительно в 2 раза активнее аналога (IV) с 16-членным циклом. Важно, что для всех этих аналогов была характерна определенная избирательность к δ -рецепторам, причем наиболее селективным был аналог (II).

Увеличение активности при расширении цикла наблюдается и для циклических аналогов (V) – (VII), содержащих остаток D-аминокислоты во 2-м положении, хотя и не столь значительное, как в случае аналогов с остатками L-аминокислот во 2-м положении. Так, при расширении цикла от 14- до 16-членного блокирующая активность в GPI-тесте увеличивается приблизительно в 16 раз для аналогов (I) и (IV) с L-аминокислотными остатками и всего в 3 раза для аналога (VII) с остатком D-аминокислоты во 2-м положении.

Для аналогов (VIII)–(X) с остатками D-аминокислот во 2-м и 5-м положениях влияние размеров цикла на биологическую активность не

Биологическая активность *in vitro* аналогов энкефалина с дисульфидным мостиком
Приведена $IC_{50} \pm m$ для 7 опытов

Соединение	Размер цикла	GPI, нМ (μ -рецепторы)	MVD, нМ (δ -рецепторы)	GPI/MVD
(I)	14	387 \pm 138	219 \pm 81	1,76
(II)	15	248 \pm 46	9,03 \pm 0,27	27,5
(III)	15	132 \pm 13	115 \pm 20	1,14
(IV)	16	23,5 \pm 9,5	16,4 \pm 3,5	1,43
(V)	15	0,446 \pm 0,0085	0,57 \pm 0,12	0,78
(VI)	15	1,16 \pm 0,38	0,91 \pm 0,21	1,27
(VII)	16	0,452 \pm 0,0089	0,318 \pm 0,113	1,42
(VIII)	15	31,4 \pm 14,6	3,35 \pm 1,12	9,37
(IX)	15	0,94 \pm 0,11	4,23 \pm 0,71	0,22
(X)	16	0,257 \pm 0,035	0,68 \pm 0,18	0,37
Tyr- $\overline{D-Cys-Gly-Phe-Cys}$ -NH ₂ [2]	14	1,51 \pm 0,03	—	—
Tyr- $\overline{D-Cys-Gly-Phe-D-Cys}$ -NH ₂ [2]	14	0,78 \pm 0,01	—	—
[Met ⁵]энкефалин [5]	14	172	13,2	0,076

столь однозначно. Как и в предыдущих случаях, наибольшую активность в обоих тестах проявил аналог (X) с наибольшим (16-членным) циклом. Для аналогов с 15-членным циклом наблюдается иная картина. Активность аналога (IX) в GPI-тесте сходна с активностью 14-членного [*D-Cys*², *D-Cys*⁵] энкефалинамида, тогда как активность аналога (VIII)

падает более чем в 30 раз по сравнению с тем же [*D-Cys*², *D-Cys*⁵] энкефалинамидом. Активности же аналогов (VIII) и (IX) в MVD-тесте почти одинаковы. Это говорит о том, что наряду с величиной цикла на биологическую активность существенное влияние оказывает также расположение дисульфидной связи в цикле.

Рассматривая в этом плане взаимосвязь «структура — активность» *in vitro*, можно увидеть, что в случае аналогов с остатками *L*-аминокислот введение остатка гомоцистеина в 5-е положение (аналоги (II) и (IV)) вызвало резкое повышение активности по отношению к δ -рецепторам по сравнению с [*Cys*², *Cys*⁵] энкефалинамидом (аналог (I)). При расширении цикла со стороны 2-го положения наблюдается тенденция к повышению активности по отношению к μ -рецепторам, что видно из сравнения аналогов (III) и (I), а также (IV) и (II).

У аналогов с остатками *D*-аминокислот во 2-м положении наиболее активны по отношению к δ -рецепторам также соединения с остатком гомоцистеина в 5-м положении (аналоги (V) и (VII)). Введение дополнительной метиленовой группы со стороны 2-го положения (ср. аналог (VI) и [*D-Cys*², *Cys*⁵] энкефалинамид) мало сказывается на активности по отношению к μ -рецепторам. Следовательно, аналог (V) с остатком *D*-цистеина во 2-м положении обладает селективностью к μ -рецепторам, а аналоги (VI) и (VII) с остатком *D*-гомоцистеина во 2-м положении — к δ -рецепторам. При рассмотрении активности к μ - и δ -рецепторам среди аналогов (VIII) — (X) с *D*-аминокислотами во 2-м и 5-м положениях одновременно не было выявлено корреляции между местом расположения дисульфидной связи и активностью.

При изучении взаимосвязи «структура — активность» с точки зрения влияния конфигурации аминокислотных остатков во 2-м и 5-м положениях выяснилось, что наиболее существенна модификация 2-го положения. Интересно, что циклические дисульфидсодержащие аналоги с *L*-аминокислотами во 2-м положении сохраняют активность, сходную с активностью нативного энкефалина, или даже превосходят ее, что не характерно

Биологическая активность аналогов энкефалина с дисульфидным мостиком
 Приведена величина $ED_{50} \pm m$ при внутрицистернальном (в/ц), внутривенном (в/в)
 и подкожном (п/к) введении белым мышам *

Соединение	Анальгетическая активность		
	в/ц, мкг/животное	в/в, мг/кг	п/к, мг/кг
(I)	50,0	25,0 (не акт.)	—
(II)	100,0	25,0 (не акт.)	—
(III)	50,0	25,0 (не акт.)	—
(IV)	100,0	25,0 (не акт.)	—
(V)	0,0011±0,0006	2,04±0,47	15,0
(VI)	—	12,5 (не акт.)	10,0
(VII)	0,0040±0,0026	5,15±0,12	25,0
(VIII)	0,143±0,0038	2,04±0,47	15,0
(IX)	0,015±0,001	1,04±0,36	8,15±1,88
(X)	—	2,87±2,09	5,74±1,22
Морфин	4,02±0,06	7,07±1,06	7,30±1,60

Соединение	Влияние на двигательную активность		
	в/ц, мкг/животное	в/в, мг/кг	п/к, мг/кг
(I)	50,0	25,0 (не акт.)	—
(II)	100,0	25,0 (не акт.)	—
(III)	50,0	25,0 (не акт.)	—
(IV)	100,0	25,0 (не акт.)	—
(V)	0,005±0,00026	2,20±0,46	12,5 (не акт.)
(VI)	—	12,5 (не акт.)	3,26±0,75
(VII)	0,00188±0,00057	0,58±0,14	1,34±0,38
(VIII)	0,095±0,029	1,23±0,35	6,54±1,39
(IX)	0,009±0,0029	0,89±0,31	4,40±0,94
(X)	—	1,76±0,50	3,54±0,76
Морфин	1,28±0,90	4,35±0,92	11,1±2,2

* Прочерк означает, что аналоги в данном тесте не испытывались.

но для линейных аналогов энкефалина. Тем не менее введение *D*-аминокислоты во 2-е положение вызывает резкое повышение активности, хотя и в разной степени, в зависимости от класса рецептора (например, возрастание блокирующей активности в GPI-тесте в среднем на порядок выше, чем в MVD-тесте).

Модификация 5-го положения сказывается неоднозначно. Сопоставленные аналоги (VIII)–(X), содержащих *D*-аминокислотные остатки во 2-м и 5-м положениях, с аналогами (V)–(VII) с остатками *D*-аминокислот только во 2-м положении показывает, что такая модификация приводит к падению активности по отношению к δ -рецепторам и возрастанию по отношению к μ -рецепторам. Однако в случае аналога (VIII) подобная модификация (ср. с аналогом (V)) вызвала падение активности по отношению к μ -рецепторам более чем в 70 раз, а по отношению к δ -рецепторам — только в 6 раз.

Все это говорит о том, что активность по отношению к различным классам рецепторов — сложная функция, зависящая от размеров цикла, места расположения дисульфидной связи в цикле и конфигурации аминокислотных остатков во 2-м и 5-м положениях.

Изучение влияния полученных остатков на анальгезию и двигательную активность (табл. 3) показало, что аналоги (I)–(IV) с остатками *L*-аминокислот во 2-м положении практически неактивны — по-видимому, вследствие их быстрой ферментативной деградации. Аналоги с остатками *D*-аминокислот оказались высокоактивными при внутрицистернальном и внутривенном введениях, что, вероятно, объясняется их высокой активностью по отношению к рецепторам, а также устойчивостью к действию ферментов. Наиболее активными при внутривенном введении оказались аналоги

Влияние циклических дисульфидсодержащих аналогов энкефалина на частоту сердечных сокращений (ЧСС) у белых мышей *

Соединение	Доза, мг/кг	Путь введения	ЧСС		Число животных
			фон	через 30 мин	
(V)	2,0	в/в	688±42	<u>517±19</u>	6
(V)	10,0	п/к	732±23	<u>458±19</u>	6
(VI)	2,5	»	653±32	<u>537±21</u>	6
(VII)	0,5	в/в	583±28	<u>488±27</u>	6
(VII)	1,0	»	707±21	<u>412±25</u>	6
(VIII)	2,0	»	695±30	<u>673±42</u>	6
(X)	0,05	»	792±19	<u>715±35</u>	6
(X)	0,25	»	728±11	<u>458±34</u>	6
Контроль	—	»	725±10	735±11	24

* Подчеркнутые результаты статистически достоверно отличаются от фона, $P \leq 0,05$; в/в — внутривенный, п/к — подкожный пути введения; контроль — введение физиологического раствора.

Таблица 5

Влияние циклических дисульфидсодержащих аналогов энкефалина на ректальную температуру у белых мышей *

Соединение	Доза, мг/кг	Путь введения	Ректальная температура		Число животных
			фон	через 30 мин	
(V)	2,0	в/в	37,9±0,2	38,0±0,2	6
(V)	10,0	п/к	38,7±0,1	<u>36,6±0,5</u>	6
(VI)	2,5	»	38,1±0,1	<u>37,2±0,3</u>	6
(VII)	0,5	в/в	36,9±0,2	37,4±0,4	6
(VII)	1,0	»	38,0±0,1	<u>36,4±0,4</u>	6
(VIII)	2,0	»	38,7±0,2	38,5±0,2	6
(X)	0,05	»	37,9±0,5	<u>38,6±0,2</u>	6
(X)	0,25	»	37,9±0,2	<u>35,8±0,5</u>	6
Контроль	—	»	38,8±0,1	38,8±0,1	23

* См. примечание к табл. 4.

(VIII)–(X) с остатками D-аминокислот во 2-м и 5-м положениях. Возможно, это связано также с их повышенной устойчивостью к ферментативной деградации. Для большинства аналогов была характерна некоторая избирательность влияния на двигательную активность, позволяющая в некоторых случаях (например, аналог (VII)) вводить препарат в дозах, вызывающих в основном изменение двигательной активности.

У наиболее активных препаратов было исследовано их влияние на частоту сердечных сокращений (табл. 4) и температуру тела (табл. 5) у белых мышей. Частоту сердечных сокращений определяли по ЭКГ, записанной во 2-м стандартном отведении с помощью игольчатых электродов. Температуру тела измеряли ректально.

Все соединения, за исключением аналога (VIII), в данных условиях эксперимента статистически достоверно снижали частоту сердечных сокращений у белых мышей.

Влияние исследованных соединений на ректальную температуру по-сило дозозависимый характер (для тех соединений, которые были обсле-

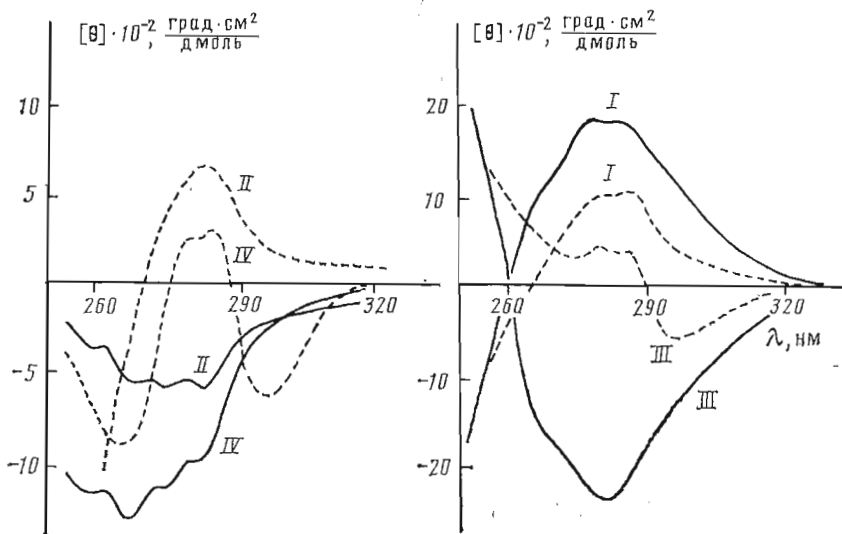


Рис. 4

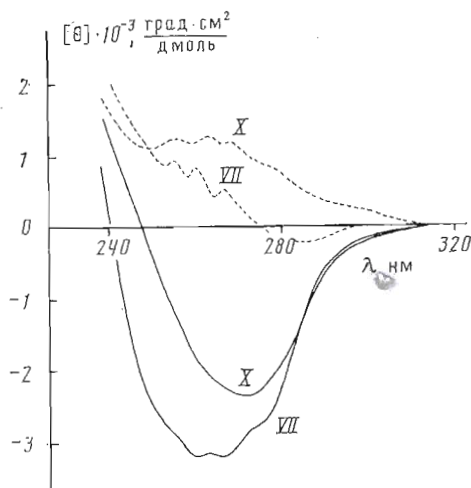


Рис. 5

Рис. 4. Спектры КД аналогов энкефалина (I)–(IV) с дисульфидным мостиком в воде (сплошная линия) и в диметилсульфоксиде (штриховая)

Рис. 5. Спектры КД аналогов энкефалина (VII), (X) с дисульфидным мостиком в 0,05 н. HCl (сплошная линия) и в 0,05 н. HCl, содержащей $1,5 \cdot 10^{-2}$ М додецилсульфат натрия (штриховая)

ной связи, что не позволяло сравнивать спектры КД дисульфидсодержащих аналогов со спектром энкефалина. Тем не менее из спектров ясно, что модификация 2-го положения гораздо сильнее сказывается на конформации дисульфидного мостика, чем модификация 5-го положения. Это видно, например, из сравнения спектров аналогов (I) и (III) с *L*-аминокислотными остатками и спектров аналогов (VI), (VII), (X) и (V) и (VIII) с *D*-аминокислотными остатками. Изучение спектров КД, снятых в диметилсульфоксиде (рис. 4), свидетельствует, что в отличие от водных растворов в спектре появляется большой положительный дихроизм тирозина. Это говорит о высокой подвижности функционально важной боковой цепи тирозина. Сопоставление спектров КД аналогов (VII) и (X), снятых в водном растворе и в растворе, содержащем додецилсульфат натрия (рис. 5), показало, что переход в более липофильную фазу, экспериментально подтвержденный дифференциальными спектрами аналогов в мицеллах додецилсульфата, сопровождается изменением конформационного равновесия этих циклических аналогов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что структура пептидов с дисульфидным мостиком, не смотря на циклизацию, сохраняет заметную подвижность.

Авторы выражают глубокую благодарность Н. Ю. Кожениковой и Н. В. Городной за помощь в работе, а также О. А. Миргородской и

Е. Р. Матвеевой (НПО «Аналитприбор» АН СССР) за определение молекулярных масс циклоаналогов по методу ЭРИАД.

Экспериментальная часть

трет-Бутилоксикарбониламиноокислоты получали по методу [6], пентафторфениловые эфиры *трет*-бутилоксикарбониламиноокислот — по методу [7], *S*-бензилгомоцистеин — по методу [8]. Температуры плавления определяли на століке Кофлера Voëtius (Nagema, ГДР). Аминокислотный состав пептидов определяли с помощью аминокислотного анализатора Biotronik LC-2000 (ФРГ), образцы для анализа гидролизовали в 6 н. HCl в течение 24 ч. Электрофоретическую подвижность относительно глицина (E_{01y}) определяли на бумаге марки Filtrak FN 7 (ГДР) в 6% уксусной кислоте (рН 2,4) при потенциале 1000 В на приборе горизонтального электрофореза ОЕ-201 Labor (ВНР). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧССР). Оптическое вращение измеряли на спектрополяриметре Perol-60 (Bellingham and Stanley, Великобритания). ВЭЖХ осуществляли на хроматографе DuPont 8800 (США) на колонке Zorbax ODS при 35° С и скорости потока 2 мл/мин. Молекулярные массы определяли масс-спектрометрически (ЭРИАД) на приборном комплексе ХЖ-МС-3303 — опытный образец НИО «Аналитприбор» АН СССР (Ленинград). Концентрация пептида 10^{-4} М, скорость подачи смеси в масс-спектрометр 0,2 мл/мин, время регистрации спектра 2–5 мин.

Спектры КД измеряли на дихрографе Marek III (Jobin Yvon, Франция) при чувствительности $2 \cdot 10^{-6}$ ДА/мм, постоянной времени 5 с, скорости сканирования 0,1 нм/с (длина кюветы 2 мм). Данные приведены в единицах молярной эллиптичности в расчете на 1 дмоль пептида. Физико-химические константы и выходы защищенных соединений см. в табл. 6.

Получение Вос-Phe-Y(Bzl)-NH₂, где Y — Cys, D-Cys, Hcy, D-Hcy (типичная методика I). Через раствор 30 ммоль Вос-Y(Bzl)-OPip в 100 мл смеси хлороформ — диоксан (1 : 1), охлажденный до 0° С, в течение 4 ч пропускали газообразный аммиак. Выпавший осадок отфильтровали, раствор

Таблица 6

Физико-химические константы пептидов, полученных в ходе синтеза циклических аналогов энкефалина

Соединение	R_f в системе *		$[\alpha]_D^{30}$ (с, DMF), град	Т. пл. °С	Выход, %
	В	Г			
Вос-Phe-Cys(Bzl)-NH ₂	0,81	0,74	-25,6 (0,004)	169–170	88,8
Вос-Phe-D-Cys(Bzl)-NH ₂	0,81	0,74	+13,6 (0,02)	142–144	92,5
Вос-Phe-Hcy(Bzl)-NH ₂	0,82	0,73	-20,4 (0,04)	156–157	91,1
Вос-Phe-D-Hcy(Bzl)-NH ₂	0,81	0,72	+21,6 (0,008)	141–143	89,1
Вос-Gly-Phe-Cys(Bzl)-NH ₂	0,88	0,53	-29,0 (0,02)	136–137	91,9
Вос-Gly-Phe-D-Cys(Bzl)-NH ₂	0,87	0,53	+22,6 (0,006)	89–90	92,8
Вос-Gly-Phe-Hcy(Bzl)-NH ₂	0,87	0,53	-16,4 (0,02)	98–100	92,3
Вос-Gly-Phe-D-Hcy(Bzl)-NH ₂	0,87	0,53	+22,7 (0,018)	134–136	91,8
Вос-Cys(Bzl)-Gly-Phe-Cys(Bzl)-NH ₂	0,90	0,62	-40,0 (0,007)	149–151	88,9
Вос-Hcy(Bzl)-Gly-Phe-Cys(Bzl)-NH ₂	0,90	0,62	-40,7 (0,012)	171–173	88,4
Вос-D-Hcy(Bzl)-Gly-Phe-Cys(Bzl)-NH ₂	0,91	0,61	-18,0 (0,008)	148–149	85,6
Вос-Cys(Bzl)-Gly-Phe-Hcy(Bzl)-NH ₂	0,91	0,62	-28,5 (0,01)	93–94	89,7
Вос-Hcy(Bzl)-Gly-Phe-Hcy(Bzl)-NH ₂	0,89	0,62	+22,5 (0,015)	129–131	90,0
Вос-D-Hcy(Bzl)-Gly-Phe-Hcy(Bzl)-NH ₂	0,90	0,61	+1,5 (0,01)	156–157	86,2
Вос-D-Cys(Bzl)-Gly-Phe-Hcy(Bzl)-NH ₂	0,90	0,62	-1,9 (0,012)	161–162	87,2
Вос-D-Hcy(Bzl)-Gly-Phe-D-Cys(Bzl)-NH ₂	0,91	0,61	+18,2 (0,012)	127–129	90,1
Вос-D-Hcy(Bzl)-Gly-Phe-D-Hcy(Bzl)-NH ₂	0,89	0,61	+10,2 (0,008)	174–176	90,9
Вос-D-Cys(Bzl)-Gly-Phe-D-Hcy(Bzl)-NH ₂	0,90	0,61	+29,0 (0,016)	155–156	86,1

* В — хлороформ — метанол — уксусная кислота (85 : 10 : 5); Г — бензол — ацетон (1 : 1)

упарили в вакууме, остаток закристаллизовали под гексаном, отфильтровали, промыли гексаном, высушили. Полученный Вос-Y(Bzl)-NH₂ деблокировали трифторуксусной кислотой (продукт растворили в трифторуксусной кислоте из расчета 1 г вещества на 5 мл трифторуксусной кислоты, через 20 мин раствор упарили, остаток закристаллизовали под эфиром, отфильтровали, высушили). К раствору деблокированного продукта в 20 мл добавили 30 ммоль Вос-Phe-OPfr и 30 ммоль NMM. Через 12 ч к реакционной смеси добавили 150 мл воды, выпавший осадок отфильтровали, промыли водой, гексаном, эфиром, высушили, перекристаллизовали из системы этилацетат — гексан.

Получение Вос-Gly-Phe-Y(Bzl)-NH₂ (типовая методика II). 22 ммоль Вос-Phe-Y(Bzl)-NH₂ деблокировали трифторуксусной кислотой (аналогично методике I). Полученный продукт растворили в 30 мл DMF, к раствору добавили 22 ммоль Вос-Gly-OPfr и 22 ммоль NMM и через 12 ч — 150 мл воды. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой, гексаном, эфиром, перекристаллизовали из системы метанол — вода.

Получение Вос-X(Bzl)-Gly-Phe-Y(Bzl)-NH₂, где X и Y — Cys, D-Cys, Hcy, D-Hcy (типовая методика III). 5,8 ммоль Вос-Gly-Phe-Y(Bzl)-NH₂ деблокировали трифторуксусной кислотой (аналогично методике I). Полученный продукт растворили в 30 мл DMF, к раствору добавили 5,8 ммоль Вос-X(Bzl)-OPfr и 5,8 ммоль NMM и через 15 ч — 200 мл воды. Выпавший осадок отфильтровали, промыли водой, гексаном, эфиром, перекристаллизовали из системы метанол — вода.

Получение TFA-H-Tyr-X-Gly-Phe-Y-NH₂, (типовая методика IV). 4,2 ммоль Вос-X(Bzl)-Gly-Phe-Y(Bzl)-NH₂ растворили в 200 мл свежепрегнанного жидкого аммиака, при интенсивном перемешивании добавили порциями металлический натрий до появления интенсивной синей окраски, устойчивой в течение 3 мин, затем ацетат аммония до исчезновения синей окраски и упарили в вакууме. Остаток растворили в 3 л метанола и охладили до -20° С. При интенсивном перемешивании к раствору добавили концентрированную соляную кислоту до pH 7, затем по каплям 0,1 М раствор иода в метаноле до появления желтой окраски. Через 20 мин к реакционной смеси добавили 0,1 М раствор гипосульфита натрия до исчезновения желтой окраски и 50 мл 1% раствора бикарбоната натрия, после чего раствор упарили в вакууме. Остаток закристаллизовали под водой, отфильтровали, промыли водой, гексаном, эфиром, высушили. (По данным ТСХ и элементного анализа, полученные соединения наряду с основным веществом содержали до 10% неорганических примесей, не мешавших дальнейшему синтезу, поэтому в дополнительной очистке не было необходимости.) 0,5 г полученного циклического тетрапептида деблокировали трифторуксусной кислотой (аналогично методике I) и растворили в 5 мл DMF. К раствору добавили 0,42 г Вос-Tyr-OPfr и 0,1 мл NMM. Через 15 ч реакционную смесь осадили в 100 мл эфира. Выпавшие кристаллы отфильтровали, промыли эфиром, высушили и деблокировали трифторуксусной кислотой. Полученный продукт фракционировали на колонке (140×2 см), наполненной сефадексом G-15. Элюент — 1 М уксусная кислота. Загрузка пептида не более 100 мг. Скорость элюирования 36 мл/ч. Выделенную фракцию лиофилизировали. Выход пептидов 55—60%. Характеристики полученных циклических аналогов энкефалина приведены в табл. 1.

Изучение биологической активности синтезированных аналогов.

Определение влияния полученных аналогов на опийные рецепторы подвздошной кишки морской свинки (GPI-тест) и семявыводящего протока мыши (MVD-тест). Сегмент подвздошной кишки морской свинки (семявыводящего протока мыши) помещали в раствор Кребса при 36° С, ткань стимулировали подем (прямоугольными импульсами супрамаксимального напряжения (40—55 В) длительностью 1 мс с частотой 0,1 Гц). Сокращения в изометрическом режиме регистрировали с помощью тензодатчика на двухкоординатном графопостроителе Н-306 (СССР). Количественную оценку блокирующей активности синтезирован-

ных аналогов производили путем определения концентрации пептида в молях, вызывающей угнетение электрически вызванных сокращений продольной мускулатуры органов на 50% (IC₅₀).

Анальгетическое действие исследовали в тесте «горячей пластинки». В качестве критерия эффекта использовали латентный период болевой реакции (время от момента помещения животного (белая мышь) на горячую поверхность ($55 \pm 0,5^\circ \text{C}$) до начала облизывания лап).

Изменение двигательной активности оценивали по способности мышей сохранять приданное им вертикальное положение в течение 20 с при помещении передних лап на кубик высотой 5 см.

Анальгетический эффект и влияние на двигательную активность оценивали, определяя дозу препарата, вызывающую соответствующий эффект у 50% животных (ED₅₀). Величины ED₅₀ рассчитывали на микроЭВМ «Электроника БЗ-21» по программе В. И. Саноцкого.

ЛИТЕРАТУРА

1. DiMaio J., Nguyen T. M. D., Lemieux C., Schiller P. W. // J. Med. Chem. 1982. V. 25. № 12. P. 1432-1438.
2. Schiller P. W., Egimann B., DiMaio J., Lemieux C., Nguyen T. M. D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1981. V. 101. № 2. P. 337-343.
3. Mosberg H. I., Hurst R., Hrubby V. J., Gee K., Amiyama K., Yamamura H. J., Galligan J. J., Burks T. F. // Life Sci. 1983. V. 33. № 1. P. 447-450.
4. Корольков В. И., Власов Г. П., Георгианова Е. К., Денисов И. Г., Илларионова Н. Г., Кожевникова Н. Ю., Лычаков А. В., Павлов В. П., Петров А. Н., Шевчук М. К. // Тез. VII Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов. Таллин, 1987. С. 196.
5. Беспалова Ж. Д., Коробов Н. В., Титов М. И., Чиченков О. Н. // Фармакол. и токсикол. 1982. № 2. С. 39-44.
6. Позднеев В. Ф. // Биоорг. химия. 1977. Т. 3. № 12. С. 1605-1610.
7. Гершкович А. А., Кубишев В. К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наук. думка, 1987. С. 62-64.
8. Armstrong M. D., Brow G. B. // Biochem. Prepara. 1957. V. 5. P. 91-93.

Поступила в редакцию
11.V.1988
После доработки
10.IX.1988

ENKEPHALIN CYCLIC ANALOGUES WITH A DISULPHIDE BRIDGE BETWEEN SECOND AND FIFTH POSITIONS

KOROLKOV V. I., VLASOV G. P., KOROLKOVA S. V., VESJOLKINA O. S., SHPAKOV A. O.,
DENISOV I. G., ILLARIONOVA N. G., PETROV A. N.*, SHEVCHUK M. K.*,
GEORGIANOVA E. K.*, LYCHAKOV A. V.*, PAVLOV V. N.**

*Institute of Macromolecular Compounds,
Academy of Sciences of the USSR:*

* *Institute of Toxicology, Ministry of Public Health of the USSR:*

** *Military-Medical Academy, Leningrad*

Biological activity of the enkephalin cyclic analogues with a disulphide bridge between second and fifth positions, and the dependence of the activity on the cycle size, disulphide bridge localization and configuration of the amino acid residues have been studied. The analogues were synthesized by chemical approach with the use of pentafluorophenyl esters. The cyclization was carried out at the C-terminal tetrapeptide stage by iodine in methanol after removing benzyl protecting groups from thiol groups of cystein and homocystein by sodium in liquid ammonia. The blocking activity in vitro (GPI and MVD tests) to the μ - and δ -receptors depends on cycle size, localization of disulphide bridge in the cycle, and amino acid configuration at second and fifth positions. Analogues with D-amino acids proved to be most active in vivo (analgesia, cataleptic activity, effect on frequency of heart contractions and body temperature). Conformational characteristics of enkephalin analogues were investigated by means of CD spectroscopy.