



УДК 547.854+ 547.857+547.466

© 1994 М. М. Собиров, Ш. Х. Халиков, С. С. Саидов,  
М. З. Кодиров, С. В. Зайцев\*, О. Н. Чиченков\*\*, С. Д. Варфоломеев\*

## СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ АНАЛОГОВ β-КАЗОМОРФИНА-5

*Таджикский государственный университет, Душанбе;*

\* *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;*

\*\* *1-й Московский медицинский институт им. И. И. Сеченова*

Синтезированы четыре новых аналога β-казоморфина-5, модифицированных по С-концу модификаторами на основе этилендиамина и остатков глицина. Обсуждается опиоидная и анальгетическая активность полученных пептидов в сравнении с β-казоморфином-5 и морфином.

Эндогенные опиоидные пептиды выполняют самые разнообразные жизненно важные функции в живом организме. Они участвуют в процессах авторегуляции боли, изменения уровня кровяного давления, регуляции функции эндокринной системы, моторики и кислотной секреции кишечника, психического состояния и эмоционального поведения и т. д. Подобно наркотическим алкалоидам они воздействуют на организм посредством опиоидных рецепторов по сходному механизму. Однако действие алкалоидных наркотиков сопровождается рядом нежелательных побочных эффектов, ограничивающих их широкое применение без серьезных опасений. Эндогенные опиоидные пептиды, обладая бесспорными преимуществами перед ними, также не лишены недостатков, заключающихся в их чрезвычайной лабильности в присутствии эндогенных протеиназ, плохой проницаемости через гематоэнцефалический барьер и т. д. Поэтому синтез и исследование структурно-функциональных взаимоотношений в их ряду представляется актуальным и важным.

Одним из интересных опиоидных пептидов является β-казоморфин-5 (КМ-5), устойчивый к действию эндогенных протеиназ, μ-селективный лиганд опиоидных рецепторов, впервые выделенный из β-казеина коровьего молока [1]:

H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-OH.

Нами предварительно было сообщено о синтезе нескольких активных аналогов β-казоморфина-5 [2]. В данной статье подробно рассматривается синтез и исследование биологической активности новых соединений, модифицированных по С-концу реагентами на основе этилендиамина и остатков глицина, изменяющими кислотно-основные свойства пептидов

H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly-II, (I)

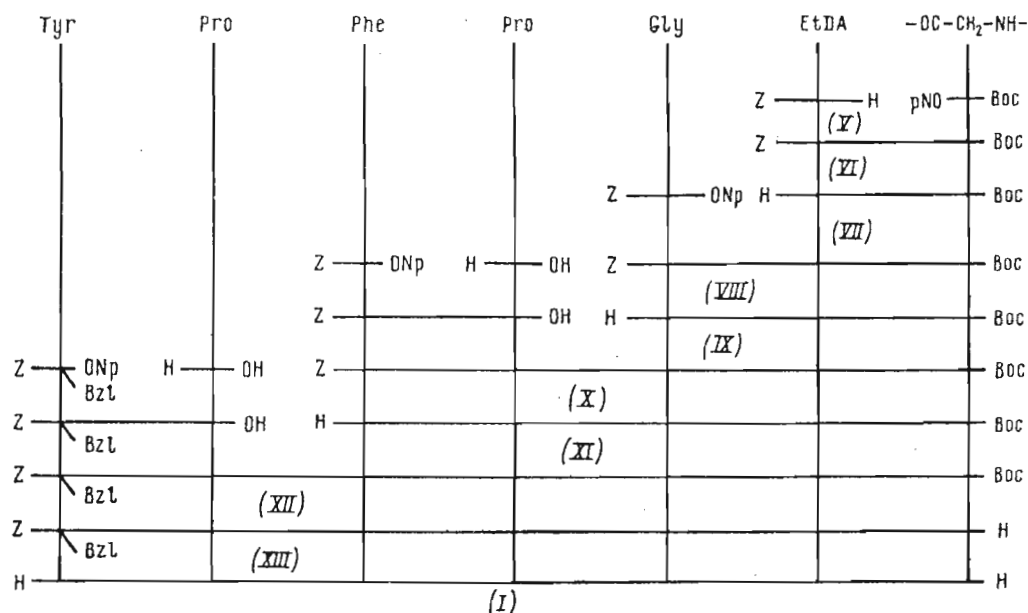
H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA-Gly←Gly-II, (II)

H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-CO-Cl<sub>3</sub>, (III)

Принятые сокращения: EtDA — этилендиамин, NMM — N-метилморфолин, ONp — *n*-нитрофенил-окси, OPcр — пентахлорфенилокси.

Синтез пептидов осуществлен классическими методами пептидной химии в растворе. Поскольку схема синтеза предполагала избирательное наращивание пептидов с любого конца, необходимо было первоначально синтезировать моноацилированное производное этилендиамина. Свой выбор мы остановили на монобензилоксикарбонильном производном этилендиамина (V), которое получали действием бензилоксикарбонилхлорида на этилендиамин (схема 1). Так как прямое воздействие бензилоксикарбонилхлорида на этилендиамин и его растворы в различных растворителях приводит к полностью замещенному производному этилендиамина, реакцию осуществляли, действуя сильноразбавленным раствором бензилоксикарбонилхлорида на эмульсию этилендиамина в хлороформе при охлаждении. По завершении синтеза моно-Z-производное освобождали от небольших количеств дизамещенного и непрореагировавшего этилендиамина.

Схема 1



Синтез H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly-H (I)

Синтез пептидов требовал наличия двух разных, селективно снимающихся N-защитных групп, поэтому к полученному продукту был присоединен Вос-глицин методами смешанных ангидридов и активированных эфиров.

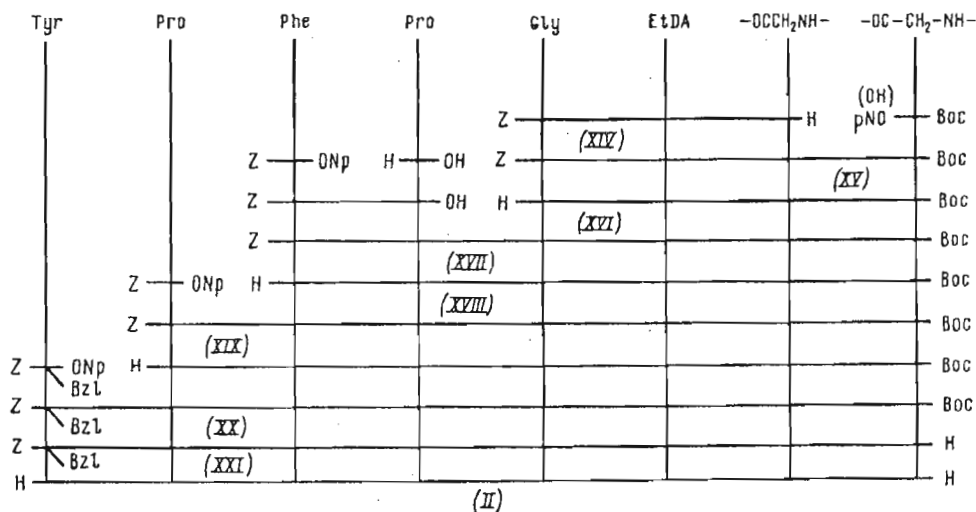
Полученное в результате новое соединение (VI) имеет две избирательно удаляемые N-защитные группы и хорошо растворяется в органических растворителях. Очистка этого продукта не составляет особого труда, поскольку его раствор в этилацетате можно промыть раствором как щелочи, так и кислоты.

Дальше соединение (VI) было подвергнуто каталитическому гидрогенолизу и к полученному продукту (VII) методами активированных эфиров или смешанных ангидридов был присоединен Z-глицин.

Нужно отметить, что оба метода приводят к целевому продукту примерно с одинаковым выходом, но очистка продукта достигается быстрее при использовании метода смешанных ангидридов. Дальнейшее наращивание пептидной цепи с N-конца до стадии получения гекса- и гептапептидов проводили снятием Z-защитной группы с последующим присоединением Z-аминокислоты или дипептида

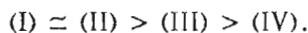
по схемам 1 и 2. Затем пептиды (XIII) и (XXI) были полностью деблокированы ацидолизом трифторуксусной кислотой и каталитическим гидрогенолизом. Соединение (XXI) было использовано для дальнейшей модификации путем ацетилирования и сукцинилирования по остатку глицина с последующим снятием бензилоксикарбонильной и бензильной групп, в результате чего были получены соединения (III) и (IV).

Схема 2



Синтез II-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-H (II)

В ряду полученных аналогов β-казоморфина-5 (I—IV) прослеживается изменение основных свойств в следующем порядке:



Если соединения (I) и (II), обладая двумя свободными аминогруппами, проявляют сильную основность, то в соединении (III) остается только одна аминогруппа, а в соединении (IV) появляющаяся карбоксильная группа способна компенсировать эту единственную аминогруппу. Пептиды после очистки методом ВЭЖХ были использованы для изучения их биологической активности.

Опиоидную активность новых аналогов определяли радиорецепторным методом на лиофилизированных мембранах головного мозга крыс [3].

Сродство пептидов к μ- и δ-центрам связывания опиоидных рецепторов определяли по концентрации исследуемых соединений, вызывающей 50%-ное ингибирование меченого лиганда (IC<sub>50</sub>). В качестве меченых μ- и δ-лигандов применяли соответственно [<sup>3</sup>H]-DAla<sup>2</sup>, McPhe<sup>5</sup>, Gly-ol]энкефалин (<sup>3</sup>H-DAGO) и [<sup>3</sup>H]-DAla<sup>2</sup>, DLeu<sup>5</sup>]энкефалин (<sup>3</sup>H-DADLE).

Определение агонист-антагонистического характера пептидов в проявлении их опиоидной активности проводили в двух средах: с ионами натрия и без них. В буферной среде без ионов натрия натрий был замещен на соответствующую соль калия.

Результаты исследования опиоидной активности (таблица) свидетельствуют о том, что само введение модификатора в виде -EtDA←Gly-H или -EtDA←Gly←Gly-H (соединения I и II) в молекулу β-казоморфина-5 вызывает некоторое уменьшение сродства получаемых пептидов к соответствующему центру связывания опиоидных рецепторов по сравнению с таковым для β-казоморфина-5. Дальнейшее модифицирование молекулы ацетилированием к существенному изменению опиоидной активности пептида (III) не приводит, но появление кар-

## Опиоидная и анальгетическая активность аналогов β-казоморфина-5

Пептид	Опиоидная активность *, IC <sub>50</sub> , нМ		Анальгетическая активность, ED <sub>50</sub> , нмоль/мышь
	μ	δ	
(I)	900	10 000	36,8
(II)	1000	10 000	54,44
(III)	1200	10 000	51,5
(IV)	48	200	0,2
β-КМ-5	296	1000	43,12

\* Определение в среде без ионов натрия.

боксильной группы с одновременным удлинением пептида (III) (III → IV) влечет за собой резкое изменение сродства как к μ-, так и к δ-центрам связывания опиоидных рецепторов, причем это сродство заметно выше сродства исходного β-казоморфина-5.

Такое изменение сродства, по-видимому, связано с приобретением данной молекулой квазициклической структуры за счет взаимодействия конечных COOH- и NH<sub>2</sub>-групп в растворе. Это предположение хорошо согласуется с литературными данными [4] и получает еще большее подтверждение при сопоставлении структур и активностей соединений (I)—(IV): пептиды (I)—(III) лишены возможности образовать квазициклическую структуру, поскольку в их молекулах отсутствует концевая свободная карбоксильная группа и их активность намного ниже активности исходного β-казоморфина-5; в соединении (IV) с появлением COOH-группы на модифицируемом конце молекулы возникает возможность образования квазициклической структуры и активность препарата резко возрастает, превышая активность пептидов (I)—(III) более чем на порядок и активность β-казоморфина-5 в 6 раз. Эти данные наводят на мысль о том, что в рассмотренном ряду молекула (IV), имеющая возможность образовать квазициклическую структуру, вероятно, более комплементарна к центрам связывания опиоидных рецепторов по сравнению с их аналогами (I)—(III), лишенными этой возможности.

Анальгетическую активность препаратов определяли на мышах линии Black интрацистеральным введением препаратов по тесту tail pinch (прижатие хвоста). Эффективную дозу препаратов (ED<sub>50</sub> — доза препарата, вызывающая 50%-ную анальгезию у подопытных животных) определяли методом Личфилда и Уилкоксона [5].

Результаты, приведенные в таблице, показывают, что удлинение β-казоморфина-5 с С-конца при одновременном повышении основности не ведет к существенному изменению анальгетической активности (соединение (I)). Соединения (II) и (III) проявляют почти одинаковую активность, однако наличие карбоксильной группы на модифицируемом конце молекулы резко усиливает анальгетическую активность, приводя к продукту, обладающему в 200 раз большей анальгетической активностью, чем β-казоморфин-5, и почти в 30 раз большей, чем у морфина.

## Экспериментальная часть

В работе использовались L-аминокислоты (Reanal, Венгрия), гидроксиды натрия, калия, хлориды натрия, калия, кальция (CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O), магния (MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O), дигидрофосфаты натрия (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) и калия марки ос. ч., 2,5-дифенилоксазол (PPO) и 1,4-бис(5-фенил-2-оксазоллил)бензол (POPOP) марки х. ч., толуол и диоксан марки х. ч., скнтилляционный, тритон X-100 (Merck), бацитрацин, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-этансульфоновая кислота (HEPES), трис (Fluka), морфин фармацевтический, DADLE (Protein Research

Foundation), DAGO (ВКНЦ АМН СССР),  $^3\text{H}$ -DADLE (45,2 Ки/ммоль) и  $^3\text{H}$ -DAGO (48 Ки/ммоль) производства New England Nuclear.

Температуры плавления определяли на нагревательном столике Voetius (ГДР). Оптическое вращение измеряли на автоматическом поляриметре А-1-ЕПЛ (СССР). Аминокислотный анализ пептидов проводили на аминокислотном анализаторе Robotronick-LC-2000 (ФРГ). Индивидуальность синтезированных соединений и ход реакций контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol-UV-254 (ЧССР) в следующих системах:  $\text{CHCl}_3$ — $\text{MeOH}$ , 60 : 13 (А),  $\text{CHCl}_3$ — $\text{MeOH}$ — $\text{AcOH}$ , 90 : 10 : 5 (Б), пиридин— $\text{AcOH}$ — $\text{H}_2\text{O}$ — $\text{EtOAc}$ , 20 : 6 : 11 : 9 (В),  $\text{BuOH}$ — $\text{H}_2\text{O}$ — $\text{AcOH}$ , 4 : 1 : 1 (Г),  $\text{BuOH}$ — $\text{H}_2\text{O}$ — $\text{MeOH}$ , 10 : 5 : 2 (Д),  $\text{C}_6\text{H}_6$ — $\text{CH}_3$ — $\text{CO}$ — $\text{CH}_3$ — $\text{AcOH}$ , 100 : 50 : 2 (Е).

Вещества на хроматограммах обнаруживали опрыскиванием 0,05% раствором нингидрина в ацетоне или хлорированием с последующей обработкой хроматограмм смесью, состоящей из равных объемов 0,5% раствора KI и бензидина в 2% уксусной кислоте.

Вос-аминокислоты получали по известной методике [6, 7]. Бензилоксикарбониламиноокислоты синтезировали в условиях реакции Шоттен-Баумана [8], активированные эфиры N-ациламинокислот — карбодиимидным методом с последующей кристаллизацией из изопропанола или другого подходящего растворителя.

1. *Монобензилоксикарбонилэтилendiамин (V)*. К охлажденной до  $-15^\circ\text{C}$  эмульсии 3,56 мл (52,5 ммоль) этилсндиамин в 60 мл сухого хлороформа при интенсивном перемешивании в течение 2 ч по каплям добавляли раствор 2,4 мл (15 ммоль) 82% Z-Cl в 100 мл хлороформа. Реакционную смесь оставляли до достижения комнатной температуры и хлороформный раствор промывали 6 н. HCl до кислой реакции промывных вод. Органический слой отбрасывали, pH водного слоя доводили до 3—4 и экстрагировали серным эфиром (3 × 30 мл). Водный раствор подщелачивали гранулированным KOH до сильнощелочной реакции и экстрагировали эфиром (4 × 30 мл). Эфирный слой промыли насыщенным раствором  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  до перехода pH промывных вод от сильно- до слабощелочного. Затем раствор промыли еще трижды дистиллированной водой, растворитель упаривали, остаток воды удаляли азеотропной перегонкой с изопропиловым спиртом. Полученную массу сушили в вакуум-эксикаторе над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Получили 2,2 г маслообразного продукта.  $R_f$  0,22 (А), 0,1 (Б), 0,3 (В).

2. *Вос-Gly-EtDA-Z (VI)*. К раствору 1,94 г (10 ммоль) Z-EtDA-H (V) в 15 мл абсолютного диоксана при  $20^\circ\text{C}$  добавляли 2,96 г (10 ммоль) Вос-Gly-ONp и перемешивали 3 ч. Затем растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в эфире и промывали 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 н. NaOH,  $\text{H}_2\text{O}$  последовательно. Эфир упаривали в вакууме, остаточную воду удаляли азеотропной отгонкой. После вакуумной сушки маслообразный продукт растворяли в эфире, кристаллизацию вызывали перетирированием. Кристаллы отфильтровывали и сушили в вакууме. Получили 3,02 г (86%) белого порошка (т. пл.  $99$ — $100^\circ\text{C}$ ).

3. *Z-Gly-EtDA←Gly-Вос (VIII)*. 1,682 г (4,48 ммоль) Вос-Gly-EtDA-Z (VI) растворяли в 30 мл метанола и гидрировали в присутствии 10%-ного Pd/C до исчезновения пятна исходного вещества на хроматограмме в системе А. После удаления катализатора фильтрованием растворитель упаривали, а остаток, растворив в 10 мл DMF, приливали к раствору 1,74 г (4,93 ммоль) Z-Gly-ONp в 10 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при  $20^\circ\text{C}$ , затем растворитель упаривали в вакууме. Остаток растворяли в этилацетате и промывали 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 н. NaOH,  $\text{H}_2\text{O}$  последовательно. Затем растворитель упаривали в вакууме, остаток высушивали и снова растворяли в этилацетате. Кристаллизацию вызывали перетирированием с добавлением гексана. Повторную кристаллизацию осуществляли из сухого этилацетата. Получили 1,616 г (82,2%) белого кристаллического порошка (т. пл.  $127^\circ\text{C}$ ).  $R_f$  0,52 (А), 0,32 (Б), 0,1 (В).

4. *Z-Gly-Gly-EtDA←Gly-Вос*. 0,41 г (1 ммоль) Z-Gly-EtDA←Gly-Вос растворяли

в 30 мл метанола и подвергали каталитическому гидрогенолизу в присутствии 10%-ного Pd/C до исчезновения пятна исходного вещества на хроматограмме в системе А. После завершения гидрирования катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали в вакууме досуха. Продукт гидрирования без выделения растворяли в 25 мл сухого DMF и при 20° С туда же добавляли 0,33 г (1 ммоль) Z-Gly-ONp.

Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение ночи и обрабатывали аналогично методике 3. После кристаллизации из этилацетата получили 0,38 г (81%) белого порошка (т. пл. 150—152° С).  $R_f$  0,52 (А), 0,32 (Б), 0,1 (В).

5. Z-Gly-EtDA←Gly-Gly-Boc (XV). Раствор 1,89 г (4,62 ммоль) Z-Gly-EtDA-Gly-Boc в 3 мл трифторуксусной кислоты оставляли при 20° С на 40 мин, затем трифторуксусную кислоту упаривали в вакууме досуха и остаток растворяли в 25 мл DMF. К полученному раствору добавляли по каплям N-метилморфолин до pH 8 (по индикаторной бумаге) и 1,37 г (4,62 ммоль) Boc-Gly-ONp. Раствор оставляли перемешиваться в течение ночи при 20° С, после чего растворитель упаривали в вакууме до состояния масла, остаток растворяли в 100 мл этилацетата и промывали последовательно 0,5 н. NaOH, H<sub>2</sub>O, 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и H<sub>2</sub>O до нейтральной реакции. Растворитель упаривали в вакууме, следы воды удаляли азеотропной перегонкой с изопропанолом. Остаток растворяли в метаноле, дважды осаждали эфиром и получали 1,46 г (58%) белого кристаллического вещества (т. пл. 136—137° С).  $R_f$  0,56 (А), 0,3 (Б).

6. Z-Phe-Pro-OH. Раствор 2,3 г (20 ммоль) пролина в 20,18 мл 0,991 н. NaOH приливали к раствору 6,3 г (15 ммоль) Z-Phe-ONp в 50 мл DMF при 20° С и оставляли на ночь. Затем растворитель упаривали, остаток растворяли в воде и экстрагировали эфиром (4 × 25 мл). Водный слой подкисляли 5 н. HCl до pH 3 и экстрагировали этилацетатом (4 × 30 мл). Этилацетатный слой промывали водой до нейтральной реакции. Растворитель упаривали досуха, остатки воды удаляли азеотропной перегонкой с изопропиловым спиртом в вакууме.

Маслообразный остаток растворяли в 100 мл сухого эфира и оставляли в холодильнике. Выпавшие кристаллы отфильтровывали и высушивали в вакууме. Получали 4,7 г (79,12%) белого кристаллического порошка. Т. пл. 108—109° С,  $[\alpha]_D^{23}$  —15,615° (с 1, EtOAc),  $R_f$  0,52 (А), 0,65 (Б), 0,74 (В).

7. Z-Tyr(Bzl)-Pro-OH синтезировали по методике 6, исходя из 3,26 г (5 ммоль) Z-Tyr(Bzl)-OPсr и 0,575 г (5 ммоль) пролина. После выделения продукт имеет примесь (контроль ТСХ, система Е), от которой избавились жидкостной хроматографией на колонке (3,5 × 20 см) силикагелем L 100/160. Примесь промывали системой Е, основное вещество элюировали метанолом. После упаривания растворителя и сушки продукта получали 1,76 г белого хроматографически чистого порошка. Выход 70,04%. Т. пл. 69° С,  $[\alpha]_D^{24}$  —10,24° (с 1, EtOAc),  $R_f$  0,68 (Б), 0,9 (Г), 0,5 (Е).

8. Z-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly-Boc (X). а) 1,707 г (4,18 ммоль) Z-Gly-EtDA←Gly-Boc гидрировали в присутствии 10% Pd/C до исчезновения пятна исходного соединения на хроматограмме в системе А, после чего катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали досуха, маслянистый остаток растворяли в 10 мл сухого свежеперегнанного DMF.

б) 1,66 г (4,18 ммоль) Z-Phe-Pro-OH растворяли в 40 мл свежеперегнанного тетрагидрофурана, добавляли 0,47 мл (4,18 ммоль) N-метилморфолина. Раствор охлаждали до —15° С и добавляли 0,55 мл изобутилхлорформиата при интенсивном перемешивании. Через 2,5 мин к этому раствору приливали охлажденный раствор продукта гидрирования, описанного в пункте «а».

Реакционную смесь перемешивали 2,5 ч при указанной температуре и 1 ч при 20° С, затем отфильтровывали от выпавшего осадка соли N-метилморфолина, осадок промывали тетрагидрофураном, растворитель упаривали досуха в вакууме, остаток растворяли в этилацетате и промывали 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, насыщ. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 н.

$\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  последовательно. Растворитель упаривали в вакууме, остатки воды удаляли азеотропной перегонкой с пропанолом-2 в вакууме. Масло не кристаллизуется из эфира и имеет примесь с  $R_f$  0,2 (E). Полученный пептид нанесли на колонку ( $3,5 \times 20$  см) с силикагелем L 100/160 (ЧССР) и вначале элюировали хлороформом, затем системой E (1 л) и метанолом. После упаривания метанола и высушивания получали 2,12 г (77,7%) хроматографически чистого белого порошка (т. пл.  $74-78^\circ\text{C}$ ).  $[\alpha]_D^{23} -3,47^\circ$  (с 1, EtOAc),  $R_f$  0,6 (A), 0,8 (B), 0,9 (B).

9. *Z-Tyr(Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly-Boc* (XII). Раствор 0,9 г (1,8 ммоль) *Z-Tyr(Bzl)-Pro-OH* в 20 мл тетрагидрофурана, содержащего 0,2 мл (1,8 ммоль) *N*-метилморфолина, охлаждали до  $-15^\circ\text{C}$  и добавляли 0,235 мл (1,8 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 2,5 мин к реакционной смеси добавляли раствор 0,96 г (1,85 ммоль) *H-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly-Boc* (XI), полученного каталитическим гидрогенолизом соединения (X) в 10 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь 2,5 ч перемешивали при  $-15^\circ\text{C}$  и 1 ч при  $20^\circ\text{C}$ , затем отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в этилацетате и промывали 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , насыщ.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,5 н.  $\text{NaHCO}_3$ , насыщ.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  последовательно. Этилацетатный раствор сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , отфильтровывали, осадок промывали этилацетатом, этилацетатный раствор упаривали в вакууме и получали желтоватый сироп. Вещество вновь растворяли в этилацетате и кипятили с активированным углем. Раствор отфильтровывали от угля, упаривали до минимального объема и осаждали перетиранием с гексаном. Выпавший белый осадок отфильтровывали и сушили. Получали 0,84 г (46,6%) хроматографически чистого вещества (т. пл.  $84-90^\circ\text{C}$ ).  $[\alpha]_D^{23} -12,43^\circ$  (с 1, EtOAc),  $R_f$  0,7 (B), 0,9 (Г).

10. *Z-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-Boc* (XVII). 0,8 г (1,72 ммоль) *Z-Gly-EtDA←Gly←Gly-Boc* растворяли в 25 мл метанола и гидрировали над Pd/C до исчезновения пятна исходного соединения на хроматограмме в системе А. Продукт гидрирования после фильтрации и упаривания растворителя растворяли в 20 мл сухого свежеперегнанного DMF. К полученному раствору добавляли 0,23 (1,7 ммоль) 1-гидроксibenзтриазола и 0,74 г (1,8 ммоль) *Z-Phe-Pro-OH*. Реакционную смесь охлаждали до  $-15^\circ\text{C}$  и добавляли раствор 0,42 г DCC в 10 мл хлороформа и перемешивали 3 ч. Затем растворители упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата и отфильтровывали от выпавшего осадка дициклогексилмочевины. Этилацетатный раствор промывали последовательно 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 н.  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ . Растворитель упаривали досуха, остаток высушивали, дважды пересаждали из этилацетата эфиром и получали 1,15 г (94%) белого порошка. Т. пл.  $131^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{23} -7,3^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,55 (A), 0,46 (B).

11. *Z-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-Boc* (XIX). 1 г (1,72 ммоль) пептида (XVII) гидрировали в метаноле в присутствии 10%-ного Pd/C до исчезновения пятна исходного соединения в системе А. Затем катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали досуха, остаток (соединение (XVIII)) растворяли в 30 мл DMF, туда же добавляли 0,64 г (1,72 ммоль) *Z-Pro-ONp* и оставляли перемешиваться в течение ночи. По завершении реакции DMF упаривали в вакууме, остаток растворяли в 100 мл этилацетата и последовательно промывали 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ . Этилацетатный раствор сушили над безводным  $\text{MgSO}_4$ , раствор отфильтровывали от сушителя, растворитель упаривали до минимального объема и добавляли сухой эфир. Полученный осадок отделяли и еще дважды пересаждали из этилацетатного раствора эфиром. После выделения и сушки в вакууме получили 1,08 г (77,80%) белого порошка.  $[\alpha]_D^{22} -9^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,5 (A), 0,43 (B).

12. *Z-Tyr(Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-Boc* (XX). а) раствор 1,058 г (1,31 ммоль) пептида (XIX) в 30 мл метанола гидрировали в присутствии 10%-ного Pd/C. Продукт гидрирования после обработки растворяли в 20 мл сухого диоксана и к полученному раствору добавляли 0,76 г (1,44 ммоль) *Z-Tyr(Bzl)-ONp*.

Раствор оставляли перемешиваться в течение ночи. По завершении реакции растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в этилацетате и обрабатывали аналогично методике 10. Выход 0,88 г (64%).  $[\alpha]_D^{20} -28^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,82 (B).

б) 0,404 г (0,4 ммоль) Z-Tyr(Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly-Voc (XII) растворяли в 2 мл  $CF_3COOH$  и выдерживали до полного исчезновения пятна исходного соединения ( $R_f$  0,8) и появления нового пятна ( $R_f$  0,3) на хроматограмме в системе А, после чего  $CF_3COOH$  упаривали в вакууме. Полученный трифтороацетат соединения (XIII) растворяли в 15 мл абсолютного диоксана, по каплям при перемешивании добавляли N-метилморфолин до pH 8. К полученному раствору добавляли 0,13 г (0,44 ммоль) Voc-Gly-ONp и оставляли перемешиваться в течение ночи. Затем растворитель упаривали, масло растворяли в 100 мл этилацетата и обрабатывали аналогично методике 8. Получали 0,4 г (94,3%) белого аморфного порошка.  $[\alpha]_D^{20} -28^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,82 (B).

13. Z-Tyr(Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-Ac. 0,436 г (0,41 ммоль) пептида (XX) растворяли в 2 мл  $CF_3COOH$  и оставляли при периодическом перемешивании на 40 мин. Затем избыток  $CF_3COOH$  упаривали в вакууме и к остатку добавляли сухой эфир. Выпавший осадок быстро отфильтровывали и растворяли в 10 мл свежеперегнанного DMF. К полученному раствору соединения (XXI) по каплям добавляли N-метилморфолин до pH 8, а затем 0,47 г (5 ммоль) уксусного ангидрида. Реакционную смесь перемешивали 1 сут при  $20^\circ C$ , поддерживая pH 8. Затем растворитель упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата и последовательно промывали 2%  $H_2SO_4$ ,  $H_2O$ , 0,5 н.  $NaHCO_3$ ,  $H_2O$ , растворитель упаривали, остатки воды удаляли азсotropicной перегонкой с изопропанолом, к маслянистому остатку добавляли эфир и оставляли в холодильнике. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, высушивали. Выход 0,367 г (89,3%) белого кристаллического порошка. Т. пл.  $104^\circ C$ ;  $[\alpha]_D^{20} -38,93^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,58 (A), 0,29 (B), 0,46 (B).

14. Z-Tyr(Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-( $CH_2$ )<sub>2</sub>-COOH. Синтез осуществили, исходя из 0,424 г (0,4 ммоль) пептида (XX) и 0,4 г (4 ммоль) янтарного ангидрида, аналогично методике 13. По завершении реакции растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в 100 мл этилацетата и промывали водой (3 × 10 мл), 2%  $H_2SO_4$  (4 × 10 мл),  $H_2O$  (3 × 10 мл), после чего растворитель упаривали, остаток растворяли в 40 мл метанола, добавляли катионообменник Dowex-50 и перемешивали 3 ч при  $20^\circ C$ . Затем смесь отфильтровывали, ионообменник промывали 25 мл метанола. Метанольный раствор подвергали вакуумной отгонке на роторном испарителе до минимального объема. Вещество кристаллизовали добавлением сухого эфира. Выход 0,34 г (80%).  $[\alpha]_D^{20} -29^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,35 (A), 0,56 (B).

15. Z-Tyr(Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly-H·HCl (XIII). К раствору 0,7 г (0,7 ммоль) соединения (XII) в 2 мл ледяной  $CH_3COOH$  при перемешивании приливали 2 мл 3 н. HCl в ледяную  $CH_3COOH$ . После снятия Voc-группы к раствору соединения (XIII) добавляли 40 мл сухого эфира, выпавшие кристаллы отфильтровывали и сушили в вакуум-эксикаторе над KOH. Получили 0,654 г (99,6%) кристаллического вещества. Т. пл.  $117-119^\circ C$ ,  $[\alpha]_D^{20} -20,1^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,07 (B), 0,17 (B).

16. H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly-H (I). Раствор 0,5 г (0,53 ммоль) хлоргидрата соединения (XIII) в 30 мл метанола подвергли каталитическому гидрогенолизу в присутствии 10%-ного Pd/C до исчезновения пятна исходного соединения на хроматограмме в системе Д (3 ч). По окончании гидрирования раствор отфильтровывали от катализатора, катализатор обильно промывали водой, растворители упаривали, остаток растворяли в воде и обрабатывали анионообменником IRA-410. После фильтрования раствор подвергли лиофильной сушке и получили 0,27 г (75,5%) белого пушистого порошка. Полученный порошок



растворяли в дистиллированной воде, дополнительно очищали методом ВЭЖХ на колонке (10 мм × 25 см) Ultrosphere-ODS градиентом метанола в 0,1% водном растворе трифторуксусной кислоты и собрали основную фракцию. После лиофильной сушки получили 0,2 г (55,9%) хроматографически чистого вещества, в расчете на исходное вещество.  $[\alpha]_D^{21} -30,6^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,1 (А), 0,41 (Г). Аминокислотный состав: Tyr 0,96(1), Pro 1,97(2), Phe 1,12(1), Gly 2,1(2).

17. *H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-H (II)*. 0,5 г (0,51 ммоль) Z-Tyr(Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-Вос растворяли в 25 мл метанола и гидрировали в присутствии 10%-ного Pd/C до исчезновения пятна исходного соединения в системах А и Б (3 ч). По окончании гидрирования катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали досуха в вакууме. Продукт гидрирования растворяли в 3 мл трифторуксусной кислоты и выдерживали 45 мин. Затем избыток трифторуксусной кислоты удаляли вакуумной перегонкой, к полученному продукту добавляли сухой эфир и перетирали. Осадок отфильтровывали и сушили в вакууме. Полученный порошок растворяли в дистиллированной воде и очищали методом ВЭЖХ на колонке (25 см × 10 мм) Ultrosphere-ODS градиентом метанола в 0,1% водном растворе трифторуксусной кислоты. Собрали основную фракцию, лиофильно высушили и получили 0,21 г (70%) хроматографически чистого белого порошка.  $[\alpha]_D^{23} -35^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,1 (А), 0,39 (Г). Аминокислотный состав: Tyr 0,97 (1), Pro 1,98 (2), Phe 1,05 (1), Gly 3,0 (3).

18. *H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly-Ac (III)*. К раствору 0,35 г (0,35 ммоль) Z-Tyr(Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-Ac (см. методику 13) в 25 мл метанола добавляли несколько капель  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и гидрировали 3 ч в присутствии 10%-ного Pd/C. После удаления катализатора растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в 30 мл дистиллированной воды с 2 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и экстрагировали *n*-бутанолом (2 × 10 мл). Водный слой разбавляли до 50 мл и лиофильно сушили. Выход 0,19 г (69,94%), белый пушистый порошок. Полученный продукт дополнительно очищали методом ВЭЖХ на колонке (25 см × 10 мм) Ultrosphere-ODS градиентом метанола в 0,1% водном растворе трифторуксусной кислоты. Собирали основную фракцию и после лиофильной сушки получили 0,163 г (60%) белого, пушистого, хроматографически чистого вещества.  $[\alpha]_D^{23} -35^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,12 (А), 0,3 (Д). Аминокислотный состав: Tyr 0,89 (1), Pro 1,93 (2), Phe 1,1 (1), Gly 3,25 (3).

19. *H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH (IV)*. Синтез осуществляли аналогично методике 18, исходя из 0,32 г (0,3 ммоль) Z-Tyr(Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA←Gly←Gly-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH (см. методику 14). После окончательной очистки методом ВЭЖХ градиентом метанола в 0,1% водном растворе трифторуксусной кислоты получили 0,200 г (80%) белого пушистого порошка.  $[\alpha]_D^{20} -27^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,27 (Г), 0,49 (Д). Аминокислотный состав: Tyr 0,96 (1), Pro 1,98 (2), Phe 1,07 (1), Gly 3,2 (3).

#### Определение опиоидной активности пептидов

Опиоидную активность пептидов определяли радиорецепторным методом анализа на лиофилизированных мембранах головного мозга крыс в условиях равновесного связывания при 37° С, с использованием следующих буферных растворов:

А (среда инкубации с ионами натрия): HEPES — 5 мМ, NaCl — 120 мМ, KCl — 5 мМ,  $\text{CaCl}_2$  — 1 мМ,  $\text{MgCl}_2$  — 1 мМ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,5 мМ (pH 7,4; 37° С);

Б (среда инкубации без ионов натрия): этот раствор отличается от буферного раствора А тем, что соли натрия заменены соответствующим количеством соответствующих солей калия;

В (среда промывки с ионами натрия): трис-HCl — 5 мМ, NaCl — 120 мМ, KCl — 5 мМ,  $\text{CaCl}_2$  — 1 мМ,  $\text{MgCl}_2$  — 1 мМ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,5 мМ (pH 7,4; 4° С);

Г (среда промывки без ионов натрия): этот раствор от предыдущего отличается

тем, что соли натрия в нем заменены соответствующим количеством соответствующей соли калия.

Препарат лиофилизированных мембран суспендировали в буферном растворе А (или Б) до однородного состояния при 4° С из расчета 4 мг/мл и во избежание агрегации частиц мембран оставляли на магнитной мешалке, охлаждая колбочку льдом. К полученной суспензии добавляли бацитрацин из расчета 10<sup>-5</sup> М конечной концентрации.

В пластиковые пробирки вносили растворы испытуемого препарата в разных концентрациях (из расчета достижения конечных концентраций в пробе: 0,5—10 000 нМ) при постоянной концентрации меченных тритием лигандов [<sup>3</sup>H]-DAGO или [<sup>3</sup>H]-DADLE (0,5—1,0 нМ в пробе). К полученному раствору добавляли суспензию мембран и термостатировали 20 мин при 37° С на качалке. По истечении времени в пробирки наливали по 3,0 мл ледяного буферного раствора В (или Г) и отфильтровывали на стеклянном фильтре GF/B (Англия). Пробирки еще трижды ополаскивали тем же количеством того же раствора и отфильтровывали. Фильтры с мембранами вынимали и вносили во флаконы для измерения уровня радиации, заливая 7 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола, и выдерживали при перемешивании 3 ч на качалке. После этого уровень остаточной радиации измеряли на сцинтилляционном счетчике Mark-III (Tracor, США). Уровень неспецифического связывания пептидов определяли при концентрации пептида 10 000 нМ в присутствии радиоактивного лиганда, а уровень общего связывания — без участия исследуемого пептида.

#### *Определение анальгетической активности пептидов*

Группу мышей линии Black предварительно обучали действию раздражителя наложением артериального зажима на основание хвоста. Реакцию мышей определяли по писку или грызению зажима.

Отбирали группу по 6 мышей и вводили дозы пептидов в физиологическом растворе. Препараты вводили с помощью *l*-образной иглы в желудочек головного мозга. Реакцию животных определяли альтернативно наложением артериального зажима на основание хвоста, через 5, 15, 30 и далее через каждые 30 мин до исчезновения действия препарата.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Henschen A., Lottspeich F., Brantl V., Teshmacher H. // Hoppe — Seyler's Z. physiol. Chem. 1979. В. 360. S. 1217—1224.
2. Собиров М. М., Халиков Ш. Х., Зайцев С. В., Саидов С. С., Варфоломеев С. Д. // Химия природных соединений. 1990. № 4. С. 565—567.
3. Курочкин И. П., Сергеева М. Г., Складкина О. А., Зайцев С. В., Варфоломеев С. Д. // Нейрохимия. 1986. Т. 6. № 1. С. 11—19.
4. Чинелс Г. И. Целенаправленный поиск нейротропных препаратов. Рига: Зинатне, 1989. С. 12.
5. Litchfield I. T., Wilcoxon F. A. // J. Exp. Ther. 1949. V. 96. P. 99—113.
6. Позднев В. Ф., Подгорнова Н. П., Зенцова Н. К., Лихонс Г. И., Калей У. О. // Химия природных соединений. 1979. № 4. С. 543—548.
7. Позднев В. Ф. // Биооргани. химия. 1977. Т. 13. № 12. С. 1605—1610.
8. Гришштейн Дж., Вилиц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965. 821 с.

Поступила в редакцию  
15.III.1993

После доработки  
29.IX.1993

*M. M. Sobirov, Sh. Kh. Khalikov, S. S. Saidov, M. Z. Kadirov,  
S. V. Zaitsev<sup>\*</sup>, O. N. Chichenkov<sup>\*\*</sup>, S. D. Varfolomeev<sup>\*</sup>*

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW ANALOGUES OF  
 $\beta$ -CAZOMORPHINE-5

*Tajik State University, Dushanbe;*

*<sup>\*</sup>M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;*

*<sup>\*\*</sup>I. M. Sechenov Medical Academy, Moscow*

Four new analogues of  $\beta$ -cazomorphine-5 modified at the C-end with ethylenediamine- and glycine-containing derivatives were synthesized by the standard method of peptide chemistry (mixed anhydrides, carbodiimid, activated esters):

H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA-Gly-II (I)

H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA-Gly-Gly-II (II)

H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA-Gly-Gly-CO-Cl<sub>3</sub> (III)

H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-EtDA-Gly-Gly-CO-ClH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH (IV)

The level of affinity and the degree of selectivity of the peptides towards the  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors of the rat brain lyophilized membranes were studied by the radioreceptor method. All the new peptides displayed analgetic activity, largely depending upon their structure.