

Т. А. Гудашева, С. С. Трофимов, А. А. Морозова, С. В. Никитин,  
Р. У. Островская, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин

## СОЗДАНИЕ НООТРОПНЫХ ДИПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭВОЛЮЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДА

ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва

Развивается подход к поиску новых семейств биологически активных пептидов, основанный на переборе точковых мутантов по некритичным для активности аминокислотным остаткам. На основе участка гена, кодирующего дипептидную последовательность AVP(4-5), соответствующую ноотропному дипептиду pGlu-Asn-NH<sub>2</sub>, синтезированы точковые мутанты по остатку аспарагина pGlu-Ser-NH<sub>2</sub>, pGlu-Asp-NH<sub>2</sub> и pGlu-His-NH<sub>2</sub>. Первые два пептида, соответствующие транзиции по 1-му и 2-му основанию, проявили ноотропную активность в тесте пассивного избегания на крысах в дозе 0,1 мг/кг внутривенно, третий, соответствующий трансверсии по 1-му основанию, был неактивен. Оба активных пептида имеют электронно-структурные отличия от исходного: pGlu-Asp-NH<sub>2</sub> несет отрицательный заряд, имеет первичную спиртовую группу вместо амидной. Таким образом, новый подход позволяет получать генетически родственные аналоги известных нейропептидов, имеющие принципиальные структурные отличия от последних.

Несколько лет назад мы сконструировали группу дипептидных аналогов пираретама на основе пироглутаминовой кислоты [1–3]. Наиболее активным представителем этой группы ноотропных дипептидов был амид пироглутамиласпарагина [4], который совпадает с N-концевым фрагментом основного метаболита вазопрессина AVP(4–9). Этот эндогенный гексапептид в настоящее время рассматривается как один из основных регуляторов процессов обучения и памяти [5–7]. AVP(4–9) входит в состав вазопрессинового семейства пептидов, включающего также AVP(4–8), AVP(5–9), AVP(5–8) [8, 9]. Все они обладают высокой мнестической активностью и лишены гормональных свойств вазопрессина.

В настоящей работе для расширения группы ноотропных пироглутамилсодержащих дипептидов был использован эволюционно-генетический подход. Мы предположили, что, наряду с вазопрессиновым семейством, может существовать генетически родственное ему семейство других нейропептидов, регулирующих обучение и память. Это гипотетическое семейство может отличаться от вазопрессинового заменами в аминокислотной последовательности, вызванными точковыми мутациями соответствующего гена. В случае пироглутамилсодержащих дипептидов, соответствующих N-концевому фрагменту AVP(4–9), число вариантов таких мутаций ограничено, что допускает прямую экспериментальную проверку нашей гипотезы.

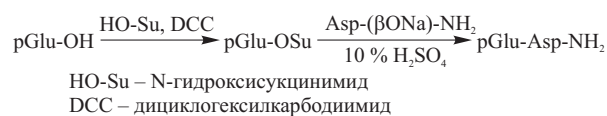
Здесь рассматривались только гипотетические мутации по второй аминокислоте, замены по которой (на глицин и небелковые аминокислоты), как нами было показано [1, 2] при изучении структурно-функциональных отношений в ходе дизайна пептидных аналогов пираретама, возможны без потери ноотропной активности.

AVP кодируется следующим участком ДНК [10]:

Cys	Tyr	Phe	Gln	Asn	Cys	Pro	Arg	Gly
TGC	TAC	TTC	CAG	AAC	TGC	CCG	AGG	GGC

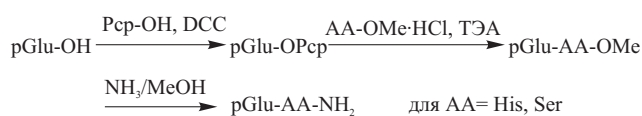
Остаток Asn кодируется нуклеотидной последовательностью AAC. Хорошо известно, что при точковых мутациях чаще встречается замена одного пиримидина на другой пиримидин (С на Т или Т на С), или одного пурина на другой пурин (А на G или G на А). Такие замены называются транзицией. Трансверсия, замена пурина на пиримидин или пиримидина на пурин, встречается гораздо реже. Как видно из табл. 1, для пироглутамиласпарагина существует только два варианта транзиций по кодону второй аминокислоты и 5 вариантов трансверсий.

Дипептиды, которые при этом получают, построены не из структурно близких аминокислот, как при традиционном методе конструирования функционально близких пептидов, а из генетически близких аминокислот, которые могут значительно отличаться по структуре. Например, аспарагиновая кислота, в отличие от аспарагина, несет отрицательный заряд. Для дизайна мы использовали все варианты транзиций и, для сравнения, один из вариантов трансверсий. Нами были синтезированы следующие дипептиды: pGlu-Asp-NH<sub>2</sub>, pGlu-Ser-NH<sub>2</sub>, pGlu-His-NH<sub>2</sub>. Первый из них был получен конденсацией сукцинимидного эфира пироглутаминовой кислоты и натриевой соли амида аспарагиновой кислоты:



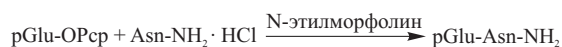
Остальные дипептиды были получены методом активированных эфиров исходя из пентахлорфенилового эфира пироглутаминовой кислоты и метиловых эфи-

ров соответствующих аминокислот с последующим аммонолизом:



Pcp-OH – пентахлорфенол  
TЭА – триэтиламин  
AA – аминокислота

Для улучшения транспорта дипептидов через гематоэнцефалический барьер были синтезированы *трет*-бутиловые эфиры pGlu-Asp(OBut)<sub>2</sub> и pGlu-Ser(OBut)<sub>2</sub> из пентахлорфенилового эфира пироглутаминовой кислоты и соответствующих эфиров. Базовый дипептид, амид пироглутамиласпарагина, был получен по схеме:



Структура и диастереомерная чистота (95 %) дипептидов были подтверждены методом ПМР (250 МГц).

Для изучения действия соединений на процессы обучения и памяти была использована модель ретроградной амнезии условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) с электросудорожным шоком (ЭСШ) в качестве амнезирующего агента [11].

Из табл. 2 видно, что пептиды, полученные путем транзисии (pGlu-Asp-NH<sub>2</sub> и pGlu-Ser-NH<sub>2</sub>), обладают антиамнезической активностью в тесте УРПИ, тогда как пептид pGlu-His-NH<sub>2</sub>, полученный путем трансверсии, неактивен. Интересно, что активен pGlu-Asp-NH<sub>2</sub>, несущий отрицательный заряд, в отличие от исходного pGlu-Asn-NH<sub>2</sub>. Введение гидрофобной *трет*-бутильной группы значительно увеличивает активность этого мутанта. В то же время в случае незаряженного серин-содержащего дипептида *трет*-бутильная группа почти не оказывает влияния на активность.

Последовательность Gln-Asp встречается в 10 нейропептидах, в том числе в динорфине В [12]. Последовательность Gln-Ser встречается в 13 нейропептидах, в том числе в β-эндорфине, кортистатине-29 и пептиде, родственном тахикинину I (Uru-TK I) [12]. При процессинге некоторые из них могут образовывать соответствующие пироглутамил-содержащие дипептиды.

Полученные данные, во-первых, свидетельствуют в пользу положения, что эволюция биологических функций, таких как память, сопровождается микроэволюцией белков рецепторов и их эндогенных лигандов, а, во-вторых, подтверждает литературные данные, что транзисия является более предпочтительной точечной мутацией, чем трансверсия.

Таким образом, применение эволюционно-генетического подхода позволило расширить группу ноотропных дипептидов на основе пироглутаминовой кислоты.

## Экспериментальная химическая часть

Температуру плавления определяли в открытых капиллярах и не корректировали. ПМР спектры регистрировали на спектрометре Bruker AC-250 (Германия) в растворах ДМСО-d<sub>6</sub>, используя в качестве внутреннего стандарта ТМС. Удельное оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer-241 (Англия). ТСХ проводили на пластинах Kieselgel UV 254 (Macherey-Nagel, Германия), пятна проявляли в парах йода. Колоночную хроматографию проводили на Kieselgel 70 – 230 mesh (Aldrich, Германия). Используемые растворители очищали и сушили стандартными методами. Данные элементных анализов соответствуют брутто-формулам.

### Амид *L*-пироглутамил-*L*-аспарагина (*L*-pGlu-*L*-Asn-NH<sub>2</sub>).

Суспензию 100 мг (0,6 ммоль) гидрохлорида *L*-аспарагинамида (Merck) и 230 мг (0,6 ммоль) пентахлорфенилового эфира пироглутаминовой кислоты [2] в 10 мл ДМФА с 0,08 мл (0,6 ммоль) *N*-этилморфолина перемешивают 4 ч при комнатной температуре и оставляют на ночь. Растворитель упаривают в вакууме, твердый остаток промывают горячим этанолом, затем эфиром и получают 150 мг (95 %) продукта с т.пл. 215 °С (с разложением), *R*<sub>f</sub> 0,28 (диоксан – вода, 10:1), *R*<sub>f</sub> 0,34 (бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –16,1° (с 1, вода). ПМР-спектр в ДМСО-d<sub>6</sub>, δ, м.д.: 1,89 и 2,27 (2H, 2м, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> pGlu), 2,13 (2H, м, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> pGlu), 2,47 (2H, м, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Asn), 4,03 (1H, дд, C<sup>α</sup>H pGlu), 4,47 (1H, м, C<sup>α</sup>H Asn), 6,90, 7,11, 7,26, 7,37 (4H, 4с, NH<sub>2</sub>), 7,81 (1H, с, NH pGlu), 8,10 (1H, д, NH Asn). C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O.

Лит.[4]: т.пл. 229 °С (с разложением), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –14,0° (с 1, вода).

### Амид *L*-пироглутамил-*L*-аспарагиновой кислоты (*L*-pGlu-*L*-Asp-NH<sub>2</sub>).

а) Амид натриевой соли *L*-аспарагиновой кислоты (*L*-Asp(ONa)-NH<sub>2</sub>). 5,9 г (22,2 ммоль) амида *N*-карбобензоксид-*L*-аспарагиновой кислоты (Aldrich) гидрируют водородом в 80 мл метанола в присутствии 1 г 10 % Pd/C, добавляют 44,5 мл 0,5 М гидроксида натрия, отфильтровывают катализатор, упаривают и растворяют в смеси 50 мл ДМФА и 10 мл воды.

б) Сукцинимидный эфир *L*-пироглутаминовой кислоты (*L*-pGlu-OSu). Растворяют при нагревании 3,35 г (26 ммоль) *L*-пироглутаминовой кислоты и 3,34 г (30 ммоль) гидроксисукцинимид в 50 мл диоксана, охлаждают льдом и добавляют 5,5 г (26 ммоль) карбодиимида, перемешивают в течение ночи. Отфильтровывают мочевины.

в) Амид *L*-пироглутамил-*L*-аспарагиновой кислоты (*L*-pGlu-*L*-Asp-NH<sub>2</sub>). К раствору амида натриевой соли *L*-аспарагиновой кислоты добавляют раствор сукцинимидного эфира *L*-пироглутаминовой кислоты. К реакционной смеси добавляют воду до образования прозрачного раствора. Оставляют на ночь. Упаривают, растворяют в 200 мл воды, доводят до pH ~ 7, добавляя 10 % серную кислоту, фильтруют, разбавляют во-

дой до 0,8 л. Наносят на колонку с 0,6 л ДЕАЕ-сефадексом, элюируют 0,1 М пиридин-ацетатным буферным раствором. Фракции, содержащие чистое вещество, упаривают с 50 мл изопропанола. Перекристаллизовывают из метанола. Получают 1,8 г продукта (33 %) с т.пл. 187 °С,  $R_f$  0,30 (диоксан – вода, 10:1),  $R_f$  0,39 (бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1),  $[\alpha]_D^{20}$  –28,1 ° (с 1, ДМФА). ПМР-спектр в ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.: 1,89 и 2,24 (2H, 2м,  $C^\beta H_2$  pGlu), 2,10 (2H, м,  $C^\gamma H_2$  pGlu), 2,51 и 2,67 (2H, 2дд,  $C^\beta H_2$  Asp), 4,01 (1H, дд,  $C^\alpha H$  pGlu), 4,49 (1H, ддд,  $C^\alpha H$  Asp), 7,16 и 7,28 (2H, 2с,  $NH_2$  Asp), 7,77 (1H, с,  $NH$  pGlu), 8,19 (1H, д,  $NH$  Asp), 12,3 (1H, оч.ш.с,  $COOH$  Asp).  $C_9H_{13}N_3O_5$ .

#### Метиловый эфир *L*-пироглутамил-*L*-серина (*L*-pGlu-*L*-Ser-OMe).

К раствору 1,89 г (5 ммоль) пентахлорфенилового эфира *L*-пироглутаминовой кислоты в 20 мл ДМФА прибавляют 0,78 г (5 ммоль) гидрохлорида метилового эфира *L*-серина (Fluka) и 0,7 мл (5 ммоль) триэтиламина. Смесь перемешивают 4 ч при комнатной температуре и оставляют на ночь. Осадок гидрохлорида триэтиламина отфильтровывают, растворитель упаривают в вакууме, остаток перекристаллизовывают из этанола. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают небольшим количеством спирта и эфира и сушат над  $P_2O_5$  в вакуум-эксикаторе. Получают 0,34 г белого кристаллического вещества с т.пл. 165 – 166 °С. Из маточника дополнительно выделяют 0,4 г вещества, т.пл. 165 °С. Общий выход 0,74 г (64,3 %).  $R_f$  0,47 (диоксан – вода, 10:1),  $R_f$  0,53 (бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1),  $R_f$  0,57 (изопропанол – аммиак, 7:3),  $[\alpha]_D^{20}$  –18 ° (с 1, метанол). ПМР-спектр в ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.: 1,87 и 2,24 (2H, 2м,  $C^\beta H_2$  pGlu), 2,09 (2H, м,  $C^\gamma H_2$  pGlu), 3,61 и 3,70 (2H, 2м,  $C^\beta H_2$  Ser), 3,63 (3H, с,  $OCH_3$ ), 4,12 (1H, дд,  $C^\alpha H$  pGlu), 4,34 (1H, м,  $C^\alpha H$  Ser), 5,12 (1H, с, OH), 7,83 (1H, с,  $NH$  pGlu), 8,30 (1H, д,  $NH$  Ser).

Лит.[13]: т.пл. 177 – 178 °С,  $[\alpha]_D^{20}$  –21 ° (с 1, метанол).

#### Амид *L*-пироглутамил-*L*-серина (*L*-pGlu-*L*-Ser- $NH_2$ ).

Раствор 210 мг (1,1 ммоль) метилового эфира *L*-пироглутамил-*L*-серина в 10 мл метанола, насыщенного газообразным аммиаком, оставляют на ночь при 20 °С. Раствор упаривают вдвое. Выпавший белый осадок отфильтровывают, промывают эфиром и сушат над

$P_2O_5$  в вакуум-эксикаторе. Получают 120 мг (60 %) продукта с т.пл. 182 – 183 °С,  $[\alpha]_D^{20}$  –5,8 ° (с 1, вода),  $R_f$  0,29 (изопропанол – аммиак, 7:3),  $R_f$  0,34 (диоксан – вода, 10:1). ПМР-спектр в ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.: 1,90 и 2,24 (2H, 2м,  $C^\beta H_2$  pGlu), 2,12 (2H, м,  $C^\gamma H_2$  pGlu), 3,58 (2H, м,  $C^\beta H_2$ , 4,08 (1H, дд,  $C^\alpha H$  pGlu), 4,20 (1H, м,  $C^\alpha H$  Ser), 4,92 (1H, м, OH), 7,12 и 7,32 (2H, 2с,  $NH_2$ ), 7,82 (1H, с,  $NH$  pGlu), 7,87 (1H, д,  $NH$  Ser).  $C_8H_{13}N_3O_4$ .

#### Дихлоргидрат метилового эфира *L*-гистидина (*L*-His-OMe · 2HCl).

Синтезирован согласно [14]. Выход 85,8 %, т.пл. 195 – 200 °С,  $R_f$  0,42 (изопропанол – аммиак, 7:3),  $R_f$  0,55 (диоксан – вода, 10:1),  $R_f$  0,26 (бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1). ПМР-спектр в ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.: 3,32 (2H, д,  $C^\beta H_2$ ), 3,73 (3H, с,  $OCH_3$ ), 4,47 (1H, т,  $C^\alpha H$ ), 7,53 (1H, с,  $C^{4k}H$ ), 9,09 (1H, с,  $C^{2k}H$ ), 14,5 (3H, ш.с,  $NH_3^+$ ).

Лит.[14]: т.пл. 200 – 201 °С.

#### Метиловый эфир *L*-пироглутамил-*L*-гистидина (*L*-pGlu-*L*-His-OMe).

К раствору 0,76 г (2 ммоль) пентахлорфенилового эфира *L*-пироглутаминовой кислоты в 10 мл ДМФА прибавляют 0,58 г (2,41 ммоль) дихлоргидрата метилового эфира *L*-гистидина и 0,67 мл (4,82 ммоль) триэтиламина. Смесь перемешивают 5 ч при комнатной температуре и оставляют на ночь. Осадок гидрохлорида триэтиламина отфильтровывают, растворитель упаривают в вакууме. Остаток хроматографируют на колонке с силикагелем, элюируя смесью хлороформа и этанола. Продукт элюируется в смеси хлороформ – этанол, 40:1, растворитель упаривают и твердый остаток перекристаллизовывают из метанола. Получают 160 мг (29 %) белого кристаллического вещества с т.пл. 178 – 180 °С (с разл.),  $[\alpha]_D^{20}$  –3,9 ° (с 1, этанол).  $R_f$  0,30 (диоксан – вода, 10:1),  $R_f$  0,23 (бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1),  $R_f$  0,47 (изопропанол – аммиак, 7:3). ПМР-спектр в ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.: 1,80 и 2,22 (2H, 2м,  $C^\beta H_2$  pGlu), 2,06 (2H, м,  $C^\gamma H_2$  pGlu), 2,88 и 2,95 (2H, дд,  $C^\beta H_2$  His), 3,60 (3H, с,  $OCH_3$ ), 4,02 (1H, дд,  $C^\alpha H$  pGlu), 4,48 (1H, ддд,  $C^\alpha H$  His), 6,84 (1H, с,  $C^{4k}H$  His), 7,59 (1H, с  $NH$  pGlu), 7,89 (1H, с,  $C^{2k}H$  His), 8,39 (1H, д,  $NH$  His).

#### Амид *L*-пироглутамил-*L*-гистидина (*L*-pGlu-*L*-His- $NH_2$ ).

Таблица 1

Возможные варианты точковых мутаций по второй аминокислоте в дипептиде pGlu-Asn- $NH_2$

Мутация	Тип мутации	Кодон	Аминокислота	Синтезированный дипептид
–	–	AAC	Asn	pGlu-Asn- $NH_2$
A–G	Транзиция по 1-му основанию	GAC	Asp	pGlu-Asp- $NH_2$
A–G	Транзиция по 2-му основанию	AGC	Ser	pGlu-Ser- $NH_2$
A–C	Трансверсия по 1-му основанию	CAC	His	Glu-His- $NH_2$
A–T	Трансверсия по 1-му основанию	TAC	Tyr	–
A–T	Трансверсия по 2-му основанию	ATC	Ile	–
A–C	Трансверсия по 2-му основанию	ACC	Thr	–
C–A(G)	Трансверсия по 3-му основанию	AAG AAA	Lys	–

Раствор 80 мг метилового эфира *L*-пироглутамил-*L*-гистидина в 10 мл метанола, насыщенного газобразным аммиаком, оставляют на ночь при комнатной температуре. Растворитель немного упаривают и выпавший осадок отфильтровывают, промывают эфиром и получают 70 мг (82 %) белого кристаллического вещества с т.пл. 211 °С (с разл.),  $R_f$  0,22 (диоксан – вода, 10:1),  $R_f$  0,17 (бутанол – уксусная кислота – вода, 4:1:1),  $[\alpha]_D^{20} +2,6^\circ$  (с 0,5, этанол). ПМР-спектр в ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.: 1,76 и 2,21 (2H, 2м,  $C^{\beta}H_2$  pGlu), 2,07 (2H, м,  $C^{\gamma}H_2$  pGlu), 2,80 и 2,93 (2H, 2дд,  $C^{\beta}H_2$  His), 4,00 (1H, дд,  $C^{\alpha}H$  pGlu), 4,40 (1H, ддд,  $C^{\alpha}H$  His), 6,76 и 7,10 (2H, 2с,  $NH_2$  His), 7,37 (1H, с,  $C^4H$  His), 7,51 (1H, с, NH pGlu), 7,97 (1H, с,  $C^2H$  His), 8,12 (1H, д, NH His), 11,80 (1H, ш.с,  $N^{\kappa}H$  His).  $C_{11}H_{15}N_5O_3$ .

Лит.[15]: т.пл. 216 °С,  $[\alpha]_D^{26} -20,0^\circ$  (с 1, уксусная кислота).

#### Ди-*трет*-бутиловый эфир *L*-пироглутамил-*L*-аспарагиновой кислоты (*L*-pGlu-*L*-Asp(OBut)<sub>2</sub>).

К раствору 0,25 г (0,9 ммоль) хлоргидрата ди-*трет*-бутилового эфира *L*-аспарагиновой кислоты (Serva) и 0,375 г (1,0 ммоль) *L*-pGlu-OPсr в 10 мл ДМФА при охлаждении (вода со льдом) прибавляют 0,12 мл (0,9 ммоль) *N*-этилморфолина и перемешивают при комнатной температуре 1 ч. Растворитель упаривают в вакууме, остаток хроматографируют на силикагеле, элюируя хлороформом, смесью хлороформ – метанол. Получают 0,26 г (72 %) *L*-pGlu-*L*-Asp(OBut)<sub>2</sub> в виде прозрачного масла с  $R_f$  0,64 (хлороформ – метанол, 9:1),  $[\alpha]_D^{20} -11,20$  (с 1,  $C_2H_5OH$ ). ПМР-спектр в  $CDCl_3$ ,  $\delta$ , м.д.: 1,35 и 1,40 (18H, каждый с,  $COOC(CH_3)_3$ ), 2,00 – 2,55 (4H, м,  $C^{\beta}H_2 - C^{\gamma}H_2$  pGlu), 2,65 – 2,85 (2H, м,  $C^{\beta}H_2$  Asp), 4,10 – 4,15 (1H, м,  $C^{\alpha}H$  pGlu), 4,60 – 4,65 (1H, м,  $C^{\alpha}H$  Asp), 6,45 (1H, с, NH pGlu), 7,05 (1H, д, NH pGlu).  $C_{17}H_{28}N_2O_6$ .

#### Ди-*трет*-бутиловый эфир *L*-пироглутамил-*L*-серина (*L*-pGlu-*L*-Ser(OBut)<sub>2</sub>).

К раствору 500 мг (1,32 ммоль) пентахлорфенилового эфира *L*-пироглутаминовой кислоты в 6 мл ДМФА прибавляют 360 мг (1,4 ммоль) хлоргидрата *трет*-бутилового эфира *O*-*трет*-бутилсерина (Reanal) и 0,2 мл (1,4 ммоль) триэтиламина. Смесь перемешивают 5 ч при комнатной температуре и оставляют на

ночь. Осадок гидрохлорида триэтиламина отфильтровывают, растворитель упаривают в вакууме, остаток хроматографируют на колонке с силикагелем, элюируя смесью хлороформа и этанола. Продукт элюируется в смеси хлороформ – этанол, 48:2. Получают 210 мг (44 %) хроматографически однородного соединения с т.пл. 103 °С,  $R_f$  0,38 (хлороформ – этанол, 9:1),  $R_f$  0,31 (диоксан – вода, 10:1),  $[\alpha]_D^{20} -1,7^\circ$  (с 1, этанол). ПМР-спектр в ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.: 1,42 (9H, с,  $(CH_3)_3$ ), 1,40 (9H, уш.с,  $(CH_3)_3$ ), 1,88 и 2,24 (2H, 2м,  $C^{\beta}H_2$  pGlu), 2,08 (2H, м,  $C^{\gamma}H_2$  pGlu), 3,43 и 3,64 (2H, 2дд,  $C^{\beta}H_2$  Ser), 4,15 (1H, дд,  $C^{\alpha}H$  pGlu), 4,33 (1H, ддд,  $C^{\alpha}H$  Ser), 7,83 (1H, с, NH pGlu), 8,08 (1H, д, NH Ser).  $C_{16}H_{28}N_2O_5$ .

#### Экспериментальная фармакологическая часть

Эксперименты выполнялись на белых беспородных крысах-самцах весом 180 – 240 г (Крюково, Московская обл.).

Для изучения действия соединений на процессы обучения и памяти была использована модель УРПИ с ЭСШ в качестве амнезирующего агента. Соединения вводили внутрибрюшинно в виде раствора в 0,9% NaCl. Контрольным животным вводили 0,9 % раствор NaCl и наносили настоящий или ложный ЭСШ. Опыты проводили на установке Laffact Instrument Co., Ltd. (USA) в соответствии с методом однократного обучения [11]. Освещенную стартовую платформу размером 25 × 7 см соединяли с темной камерой размером 40 × 40 × 40 см через квадратную гильотиновую дверь. Темная камера была оборудована электрифицированным полом. Животное помещали на стартовую платформу хвостом к темной камере и через 3 мин, когда животное находилось в темной камере, оно получало через пол 8 неустраимых электрошоковых стимулов силой 0,45 мА и длительностью 1 с каждый. Немедленно после этого крысу извлекали из темной камеры и подвергали ЭСШ (70 в, 300 мс), наносимому транскорнеально. Через 24 ч животное вновь помещали на освещенную платформу для тестирования обученности. Регистровали время пребывания животного в светлой камере. Антиамнестическую активность (АА) рассчитывали по формуле:

$$AA\% = \frac{T_{(ЭСШ + \text{вещество})} - T_{(ЭСШ + NaCl)}}{T_{(NaCl)} - T_{(ЭСШ + NaCl)}} 100\%$$

Т а б л и ц а 2

#### Физико-химические и ноотропные свойства пироглутамилсодержащих дипептидов

Дипептид	Брутто-формула	Т.пл., °С	$[\alpha]_D$	Антиамнестическая активность (%) в дозе 0,1 мг/кг внутрибрюшинно
pGlu-Asn-NH <sub>2</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	215	-16,1 (с 1, вода)	57*
pGlu-Asp-NH <sub>2</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	187	-28,1 (с 1, ДМФА)	19*
pGlu-Ser-NH <sub>2</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	182 – 183	-5,8 (с 1, вода)	20*
pGlu-His-NH <sub>2</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	218 – 230	+2,6 (с 0,5, этанол)	8
pGlu-Asp(OBut) <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	масло	-11,2 (с 1, этанол)	46*
pGlu-Ser(OBut) <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	103	-1,7 (с 1, этанол)	22*

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

где  $T_{(\text{ЭСШ} + \text{NaCl})}$  — среднее время пребывания в светлой камере животных, получивших 0,9 % раствор NaCl и подвергнутых ЭСШ 24 ч тому назад,  $T_{(\text{ЭСШ} + \text{вещество})}$  — среднее время пребывания в светлой камере животных, получивших вещество и ЭСШ,  $T_{(\text{NaCl})}$  — то же для животных, получивших NaCl и ложный ЭСШ. Статистический анализ различий времени пребывания животных в светлой камере при тестировании проводился с использованием U-теста (Манн-Уитни).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, Р. У. Островская, С. С. Трофимов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **19**(11), 1322 – 1324 (1985).
2. Т. А. Гудашева, Р. У. Островская, Ф. В. Максимова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **22**(3), 271 – 275 (1988).
3. Т. А. Гудашева, А. П. Сколдинов, *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(2), 15 – 20 (2003).
4. Т. А. Гудашева, Г. Г. Розанцев, Р. У. Островская и др., *Хим.-фарм. журн.*, **29**(1), 15 – 18 (1995).
5. A. Dietrich and J. D. Allen, *Behav. Brain Res.*, **87**(2), 195 – 200 (1997).
6. Y. Nakayama, Y. Takano, Y. Shimohigashi, et al., *Brain Res.*, **858**(2), 416 – 423 (2000).
7. А. Н. Чепкова, Н. А. Капай, В. Г. Скребницкий, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **131**(2), 167 – 169 (2001).
8. J. P. H. Burbach, G. L. Kovacs, D. DeWied, et al., *Science*, **221**, 1310 – 1314 (1983).
9. M. Fujiwara, Y. Ohgami, K. Inada and K. Iwasaki, *Behav. Brain Res.*, **83**(1 – 2), 91 – 96 (1997).
10. E. Sausville, D. Carney and J. Battey, *J. Biol. Chem.*, **260**(18), 10236 – 10241 (1985).
11. R. Ader, J. A. W. M. Weijnen and P. Moleman, *Psychol. Sci.*, **26**, 125 – 128 (1972).
12. А. А. Замятин, *Специализированный банк данных EROP-Moscow*, <http://erop.inbi.ras.ru>.
13. А. П. Смирнова, С. М. Фунтова, В. В. Князева, *Хим.-фарм. журн.*, **35**(8), 32 – 33 (2001).
14. N. C. Davis, *J. Biol. Chem.*, **223**, 935 (1956).
15. J. Rivier, W. Vale, R. Burgus, et al., *J. Med. Chem.*, **16**(5), 545 – 549 (1973).

Поступила 30.03.04.

## DESIGNING NOOTROPIC DIPEPTIDES USING EVOLUTIONARY-GENETIC APPROACH

T. A. Gudasheva, S. S. Trofimov, A. A. Morozova, S. V. Nikitin, R. U. Ostrovskaya, T. A. Voronina, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

A novel approach to the search for the new groups of biologically active peptides is developed, which is based on the selection of point mutants with respect to noncritical amino acid residues is developed. Based on the gene site encoding the AVP(4 – 5) sequence corresponding to the pGlu-Asn-NH<sub>2</sub> nootropic dipeptide, the point mutants with respect to Asn — namely, pGlu-Ser-NH<sub>2</sub>, pGlu-Asp-NH<sub>2</sub> and pGlu-His-NH<sub>2</sub> — have been synthesized. The first two peptides corresponding to transitions on the 1st and 2nd base display the nootropic activity in the passive avoidance test in rats at a dose of 0.1 mg/kg (i.p.). The last peptide corresponding to a transition on the 2nd base proved to be inactive. Both active peptides exhibit electronic and structural differences compared to the parent dipeptide: pGlu-Asp-NH<sub>2</sub> possesses a negative charge, while pGlu-Ser-NH<sub>2</sub> has a hydroxy group instead of the amide group. Thus, using the proposed method, it is possible to create genetically related analogs of the well-known neuropeptides with substantially different structures.