

Т. А. Гудашева, В. П. Лезина, Е. П. Кирьянова, В. С. Троицкая,
Л. Г. Колик, С. Б. Середенин

СИНТЕЗ, КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И АНКСИОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РЕТРОПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ ХОЛЕЦИСТОКИНИНА-4

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

На базе структуры нейропептида холецистокинина-4 сконструированы и синтезированы потенциальные анксиолитики дипептидной природы общей формулы $\text{Ph}(\text{CH}_2)_5\text{CO-X-L-Trp-NH}_2$ ($\text{X}=\text{Gly}, \beta\text{-Ala}, \text{GABA}, \text{L-Pro}$). Эти соединения показали анксиолитическую активность в тесте приподнятого крестообразного лабиринта в дозах 0,01 – 0,5 мг/кг внутривнутрибрюшинно на крысах. Активность возрастала в ряду производных $\text{GABA} \rightarrow \beta\text{-Ala} \rightarrow \text{Gly} \rightarrow \text{Pro}$. Конформационный анализ дипептидов методом ^1H ЯМР в растворе с использованием данных спектров ядерного эффекта Оверхаузера и вицинальных констант спин-спинового взаимодействия $^3\text{J}(\text{H-NC}^\alpha\text{-H})$ показал, что процент $\beta\text{-I}$ поворотной конформации, стабилизированной внутримолекулярной водородной связью с участием протона С-концевой амидной группы увеличивается в ряду $\beta\text{-Ala} \rightarrow \text{Gly} \rightarrow \text{Pro}$. Делается вывод, что возможной биологически активной конформацией синтезированных замещенных дипептидов является βI -поворотная конформация.

Недавно нами был описан ряд дипептидов, представляющих собой N-феналканоилглицилтриптофаны и обладающих анксиолитической активностью в дозах 0,01 – 10 мг/кг при внутривнутрибрюшинном введении [1]. Эти дипептиды были сконструированы на основе структуры эндогенного анксиогенного тетрапептида холецистокинина-4 (Trp-Met-Asp-Phe, ХЦК-4) с использованием принципов ретропептидного дизайна [2] таким образом, что феналканоильный радикал имитирует остаток фенилаланина, остаток глицина играет роль спейсера между ним и остатком триптофана. Обратный ход пептидной цепи по отношению к ХЦК-4 обеспечивает антагонистическую активность при L-конфигурации аминокислотных остатков. Ранее также было изучено влияние длины феналканоильного радикала и природы С-замещения на активность дипептидов [3]. В данной работе мы расширили группу потенциальных анксиолитиков и изучили влияние природы первой аминокислоты на активность этих соединений (рис. 1). Кроме того, методом ПМР в растворе проведен конформационный анализ ретропептидных аналогов холецистокинина-4 для выявления возможной биологически активной конформации.

Наиболее активным среди ранее изученных ретропептидных аналогов ХЦК-4 был амид N-фенгексаноилглицил-L-триптофана (I). В предыдущей работе было показано, что активность ретропептидных аналогов ХЦК-4 увеличивается с увеличением длины феналканоильного радикала, который в данном случае занимает место остатка фенилаланина, удаленного в ХЦК от триптофана на два аминокислотных остатка. Мы заменили остаток глицина на остатки β -аланина (соединение II) и γ -аминомасляной кислоты (соединение III) для еще большего удаления фенильного радикала от остатка триптофана. Кроме того, известно [4], что остаток глицина способствует β -поворотной конформации пептидов, которая во многих случаях является биологически активной. Другая аминокислота,

пролин, обладает еще большей способностью формировать β -повороты в пептидах [4]. В связи с этим мы синтезировали амид N-фенгексаноил-L-пролил-L-триптофана (IV).

Все дипептиды были синтезированы методом смешанных ангидридов с использованием изобутилхлорформиата в качестве конденсирующего агента и N-этилморфолина в качестве третичного основания в условиях Андерсена [5]. Анксиолитическую активность синтезированных пептидов оценивали по тесту “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) [6], который широко используется для скрининга потенциальных анксиолитиков. При внутривнутрибрюшинном введении все соединения проявили анксиолитическую активность (табл. 1), выражающуюся в увеличении относительного времени пребывания в открытых рукавах ПКЛ. Активность дипептидов II и III была ниже, чем у исходного глицин-содержащего ретропептидного аналога ХЦК-4. Это говорит о том, что дальнейшее увеличение расстояния между ароматическими радикалами за счет длины первой аминокислоты нецелесообразно. Отметим, что, в случае β -поворотной конформации, такое увеличение расстояния по цепочке ковалентных связей внутри β -поворота не приводит к

$\text{Ph}(\text{CH}_2)_5\text{CO-X-L-Trp-NH}_2$, где

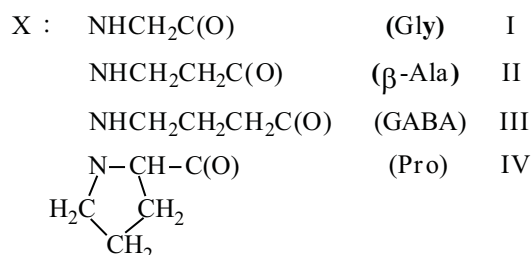


Рис. 1. Изученные триптофан-содержащие дипептиды.

Таблица 1
Влияние дипептидов I – IV на поведение беспородных крыс в тесте преподнятого крестообразного лабиринта

Дипептид	Дозы, мг/кг в/б (n)	% времени пребывания в открытых руках	% заходов в открытые рукава
I	0 (14)	4,01	13,04
	0,01 (14)	10,89	27,23
	0,05 (16)	12,46*	34,07*
	0,1 (8)	13,01*	42,14*
	0,2 (8)	11,89*	31,03*
II	0 (8)	0,2	3,13
	0,05 (8)	0,84	9,78
	0,1 (8)	4,78*	16,7
	0,2 (8)	7,54*	13,8
III	0 (8)	6,9	33,5
	0,05 (8)	12,2	35,9
	0,1 (7)	11,7	28,9
IV	0,5 (8)	21,1*	38,4
	0 (6)	10,6	25,9
	0,01 (6)	30,4*	49,2*
	0,05 (6)	27,2*	42,7*
	0,1 (6)	20,1	37,9
	0,5 (5)	20,5	40,7

Примечание: n — число животных; *p < 0,05 — по Mann-Whitney, U test; в/б — внутрибрюшинно.

увеличению расстояния между указанными гидрофобными радикалами в пространстве.

Замена глицина на пролин (соединение IV) увеличивает анксиолитическую активность в 5 раз по минимально действующей дозе (табл. 1). Это может свиде-

тельствовать о том, что биологически активной конформацией данной группы соединений является β-поворотная. Для более подробного исследования этого вопроса было проведено конформационное исследование соединений I – IV в растворе методом ¹H ЯМР.

Отнесение сигналов в ¹H ЯМР-спектрах амидов дипептидов (I – IV) проводили на основании литературных данных о спектрах аминокислотных остатков и с помощью двойного гомоядерного резонанса. Для проверки правильности отнесения сигналов протонов к отдельным аминокислотным фрагментам использована двухмерная корреляционная (COSY) спектроскопия, позволяющая выявить связанные спин-спиновым взаимодействием группы протонов конкретных аминокислотных остатков (табл. 2).

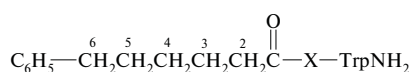
Поскольку рассматриваемые вещества представляют собой амиды N-ацилдипептидов и, по сути, являются аналогами тетрапептида, в растворе данные соединения могут находиться в нескольких конформационных состояниях, характерных для тетрапептидов (см. рис. 2 на примере соединения I).

Хорошо известно, что химические сдвиги протонов, принимающих участие в образовании внутримолекулярной водородной связи (ВМВС), мало зависят от полярности растворителя и практически не зависят от температуры и концентрации вещества.

Изучение зависимости химических сдвигов протонов групп NH и NH₂ от полярности растворителя показало, что в каждом соединении имеется один NH₂-протон с минимальной величиной Δδ — разницей химических сдвигов в DMSO-d₆ и CDCl₃ (табл. 3). Так, в случае соединения I для протона NH триптофа-

Таблица 2

Химические сдвиги в ¹H ЯМР-спектрах (DMSO-d₆) амидов дипептидов



Соединение	C ^β H ₂ Trp, два дд	C ^α H Trp, м	NH X, т	NH Trp, д	NH ₂ , два с	ArH, м	9-CH ^m д	NH ⁱⁿ с	Прочие сигналы
I (X = Gly)	2,93 3,14	4,44	7,89	8,0	7,40 7,07	6,90 – 7,10	7,57	10,80	1,26 (м, 2H, C ⁴ H ₂); 1,51 (м, 4H, C ^{3,5} H ₂); 2,08 (т, 2H, C ² H ₂); 2,59 (т, 2H, C ⁶ H ₂); 3,55 и 3,72 (два дд, 2H, CH ₂ Gly)
II (X = β-Ala)	2,89 3,11	4,46	7,68	7,97	7,40 7,02	6,91 – 7,34	7,59	10,77	1,22 (м, 2H, C ⁴ H ₂); 1,49 (м, 4H, C ^{3,5} H ₂); 1,99 (т, 2H, C ² H ₂); 2,53 (т, 2H, C ⁶ H ₂); 2,16 и 2,26 (два дд, 2H, C ^α H ₂ β-Ala); 3,15 и 3,30 (два дд, 2H, C ^β H ₂ β-Ala)
III (X = GABA)	2,91 3,10	4,46	7,70	7,91	7,43 7,01	6,91 – 7,34	7,53	10,76	1,23 (м, 2H, C ⁴ H ₂); 1,51 (м, 4H, C ^{3,5} H ₂); 2,01 (т, 2H, C ² H ₂); 2,50 (т, 2H, C ⁶ H ₂); 1,54 (м, 2H, C ^β H ₂ GABA); 2,0 м, 2H, C ^α H ₂ GABA); 2,92 (м, 2H, C ^γ H ₂ GABA)
IV ^a (X = L-Pro)	2,88 – 3,26, м	4,40 (<i>транс</i>) 4,57 (<i>цис</i>)	—	7,62 (<i>транс</i>) 8,18 (<i>цис</i>)		6,90 – 7,60, м		10,81 (<i>цис</i>) 10,84 (<i>транс</i>)	0,95 – 2,2 (м, 12 H, C ^{β,γ} H ₂ Pro и (CH ₂) ₄); 2,43- <i>цис</i> и 2,55- <i>транс</i> (т, 2H, C ⁶ H ₂); 3,5 (м, 2H под H ₂ O, C ^β H ₂ Pro); 4,16- <i>транс</i> и 4,28- <i>цис</i> (дд, 1H, C ^α H Pro)

Примечание: спектры сняты при 25° С и концентрации 0,027 М; а) данное соединение в DMSO-d₆ существует в виде двух изомеров: *транс* (65 %) и *цис* (35 %).

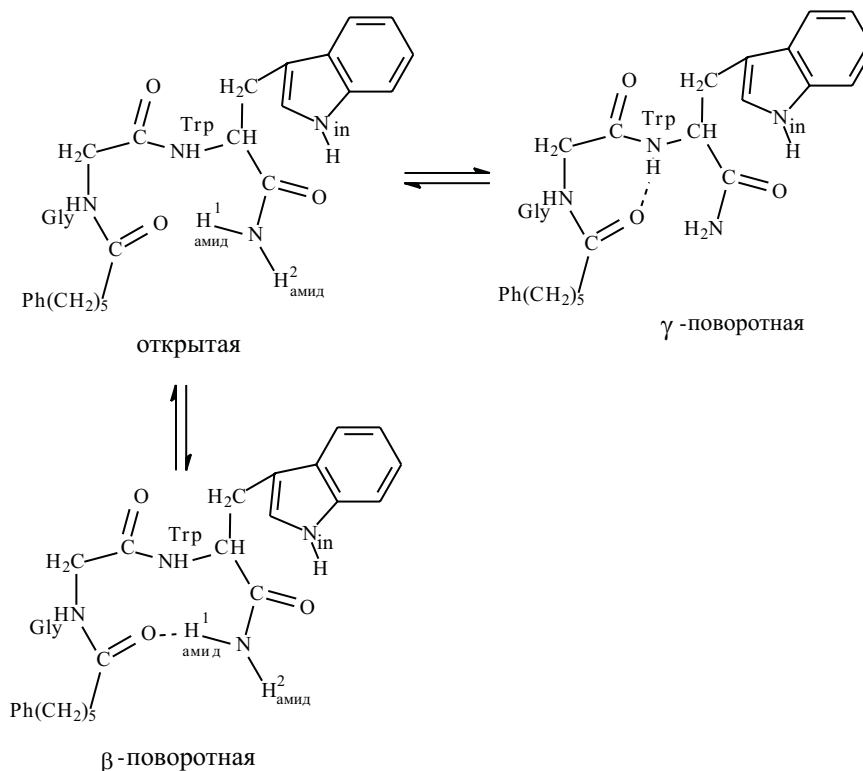


Рис. 2. Возможные конформации соединения I в растворе.

на величина $\Delta\delta$ составляет 0,91 м.д., для NH глицина — 1,23 м.д., в то время как $\Delta\delta$ одного из протонов группы NH_2 составляет 1,76 м.д., а второго — 0,57 м.д. Следовательно, можно предположить, что один из протонов группы NH_2 участвует во ВМВС. Это подтверждается отсутствием влияния концентрации вещества и температуры на его химический сдвиг (табл. 4, 5).

Для пролин-содержащего соединения IV в ДМСО- d_6 наблюдается двойной набор сигналов протонов $\text{C}^\alpha\text{H}_{\text{Pro}}$, NH_{Trp} , $\text{C}^\alpha\text{H}_{\text{Trp}}$, NH_2 (табл. 2), что является следствием разной (*транс/цис*) ориентации заместителя относительно третичной амидной связи [8]. Содержание *транс*-конформера в соединении IV в ДМСО- d_6 при 25° С составляет 65 %. В растворе

CDCl_3 соединение IV полностью присутствует в форме *транс*-конформера (данные не приводятся), для которого только и возможно образование ВМВС. Анализ зависимости химических сдвигов протонов NH_{Trp} и NH_2 группы *транс*-изомеров IV от полярности растворителя показал, что величина $\Delta\delta$ для протона NH_{Trp} составляет 1,24 м.д., в то время как величина $\Delta\delta$ одного из протонов NH_2 -группы — 0,27 м.д. (табл. 3), что подтверждает участие последнего во ВМВС.

Участие в образовании ВМВС одного из протонов группы NH_2 свидетельствует в пользу того, что для исследованных соединений I – IV характерна наиболее распространенная среди биологически активных пептидов β-поворотная конформация, стабилизированная 1 – 4 ВМВС [4] (см. рис. 2). В данной работе мы сохраним это название и для пептидов, содержащих бета- и гамма-аминокислоты, хотя в последнем случае она и отличается от типичной β-поворотной конформации.

Как видно из табл. 3, наибольший процент β-поворотной конформации найден для пролин-содержащего пептида IV. Это хорошо согласуется с известной склонностью пролина в положении $i + 1$ способствовать образованию β-поворотной конформации пептид-

Таблица 3
Разница в химических сдвигах протонов NH и NH_2 соединений I – IV в ДМСО- d_6 и CDCl_3 и содержание β-поворотной конформации

Соединение	$\Delta\delta$ (NH_{Trp}), м.д.	$\Delta\delta$ (NH_X), м.д.	$\Delta\delta$ (NH_2), м.д.		% β-поворота
I	0,91	1,23	1,76	0,57	65
II	1,20	1,27	1,82	0,74	54
III	1,04	1,29	1,87	0,42	74
IV	1,24	—	под ArH	0,27	90

Примечание. Спектры сняты при концентрации 0,027 М и 25° С. Содержание β-поворотной конформации для соединения IV рассчитывалось по формуле: $[\beta\text{-поворота}] = 100 - 39\Delta\delta$ [7]. Вследствие плохой растворимости соединений I – III в CDCl_3 значения $\Delta\delta$ взяты для CDCl_3 , содержащего 8 % ДМСО- d_6 . В связи с этим содержание β-поворотной конформации для соединений I – III рассчитывалось по формуле: $[\beta\text{-поворота}] = 100 - 62\Delta\delta$ [7].

Таблица 4
Зависимость химических сдвигов амидных протонов соединения I в CDCl_3 , содержащего 8 % ДМСО, при 25° С от концентрации

Концентрация, М	δ (NH^1 амид), м.д.	δ (NH^2 амид), м.д.
0,020	6,26	6,95
0,025	6,38	6,95
0,047	6,56	7,02

ной цепи. Для этого же пептида выявлена наиболее высокая биологическая активность (табл. 1).

В зависимости от геометрии пептидной цепи различают несколько типов β -поворотов, характеризующихся торсионными углами ϕ и ψ центральных $i + 1$ и $i + 2$ аминокислотных остатков [9]. Информацию о величине угла ϕ_i можно получить из значений вицинальных констант спин-спинового взаимодействия $^3J(\text{H-NC}^\alpha\text{-H})$, используя уравнение М. Karplus — В. Ф. Быстрова [10]:

$$^3J(\text{H-NC}^\alpha\text{-H}) = 9,4\cos^2(60 - \phi_i) - 1,1 \cos(60 - \phi_i) + 0,4.$$

В табл. 6 приведены значения вицинальных констант спин-спинового взаимодействия и соответствующие им расчетные значения торсионного угла ϕ_i для соединений I — IV в ДМСО- d_6 и в CDCl_3 , содержащем 8 % ДМСО. Эти значения мало зависели от растворителя. Идеальный торсионный угол ϕ для $i + 1$ аминокислотного остатка равен -60° в поворотах типа βI , βII и βIII . Для $i + 2$ аминокислотного остатка этот угол равен соответственно -90° , 80° и -60° . β -Повороты других типов встречаются в пептидах и белках чрезвычайно редко. Экспериментально найденный угол ϕ_{i+1} близок к -60° для всех соединений, а для ϕ_{i+2} найдены значения, близкие к -90° и $+80^\circ$, но не -60° (табл. 6). Сопоставление идеальных и экспериментально полученных торсионных углов ϕ свидетельствует о том, что мы имеем дело с βI - или βII -поворотом.

Для того, чтобы уточнить тип β -поворота для наиболее активного соединения IV, мы изучили спектры ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Известно [11, 12], что в идеальной β -поворотной конформации типа I расстояние между C^αH $i + 1$ остатка и NH $i + 2$ остатка составляет $\approx 3,5 \text{ \AA}$, и наблюдается ЯЭО, величина которого меньше 10 %. Для идеальной β -поворотной конформации типа II это расстояние около $2,1 \text{ \AA}$, а значения ЯЭО больше 10 %. Мы установили наличие ЯЭО для протона NH_{Trp} , $\text{C}^\alpha\text{H}_{\text{Pro}}$ транс-конформера соединения IV в CDCl_3 , величина которого составляет 7 %, что свидетельствует в пользу β -поворотной конформации типа I.

А. Aubry с соавторами [13] на основании зависимости протон-протонного взаимодействия H-N, $\text{C}^\alpha\text{-H}$ $i + 2$ остатка от торсионного угла ϕ для замещенных дипептидов *L*-Pro-*L*-Хаа (Хаа = Ala, Leu, Val, Met, Cys) установил, что значение $^3J(\text{H-NC}^\alpha\text{-H})$ около 9 Гц соответствует β -поворотной конформации типа I, а значение около 4,5 Гц — β -поворотной конформации типа

II. Сравнение этих результатов с экспериментально определенными константами для триптофанового аминокислотного остатка в соединении IV ($^3J_{(\text{H-NC}^\alpha\text{-H})} = 8,3 \text{ Гц}$) также приводит к выводу о предпочтительной реализации β -поворота типа I.

Таким образом, результаты, представленные в данной работе, позволяют предположить, что биологически активной конформацией изученных соединений, вероятнее всего, является βI -поворотная конформация. В дальнейшем с целью ее подтверждения планируется синтез пространственно ограниченных аналогов, имитирующих βI - и βII -поворотные конформации.

Экспериментальная химическая часть

Температуру плавления определяли в открытых капиллярах и не корректировали. Удельное оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer-241 (Германия). ТСХ проводили на пластинках Polygram Syl G/UV₂₅₄, пятна проявляли в парах йода или наблюдали под УФ. Колоночную хроматографию проводили на Kieselgel 100 (Merck). Данные элементного анализа соединений относительно процентного содержания C, H и N отклоняются от теоретических данных не более чем на 0,4 %. Все растворители, используемые в ходе реакций, высушивали и очищали стандартными методами.

Общая методика получения эфиров дипептидов

К охлажденному до -10°C раствору *N*-фенилгексаноил-замещенной аминокислоты (1,5 ммоль) в ДМФА (8 мл) при перемешивании одновременно из разных капельных воронок прикапывают изобутилхлорформиат (1,5 ммоль) и *N*-этилморфолин (1,5 ммоль). После 2–3 мин перемешивания при этой температуре добавляют охлажденный также до -10°C раствор хлоргидрата эфира *L*-триптофана (1,5 ммоль) и *N*-этилморфолина (1,5 ммоль) в ДМФА (4 мл). Реакционную смесь перемешивают 1 ч при -10°C и 1 ч при комнатной температуре, затем упаривают под вакуумом, остаток растворяют в хлороформе и поочередно троекратно промывают 5 % раствором NaHCO_3 , водой, 1 н. раствором HCl и водой. Растворитель удаляют в вакууме, продукт очищают с помощью колоночной хроматографии, используя в качестве элюента хлороформ и смесь хлороформ — этанол.

Этиловый эфир *N*-(6-фенилгексаноил)глицил-*L*-триптофана получают из *N*-фенилгексаноилглицина и этилового эфира триптофана в виде масла с выходом 53 %. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 5,2^\circ$ (с 0,4, метанол); R_f 0,59 (хлороформ — этанол, 9:1). ПМР-спектр (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 1,26 (м, 2H, C^4H_2); 1,51 (м, 4H, $\text{C}^3\text{-}^5\text{H}_2$); 2,08 (т, 2H, C^6H_2); 2,59 (т, 2H, C^2H_2); 3,03 и 3,13 (два дд, 2H, C^βH_2 Trp); 3,63 и 3,72 (два дд, 2H, CH_2 Gly); 4,0 (кв, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$); 4,48 (м, 1H, C^αH Trp); 6,91–7,51 (м, 9H, ArH); 7,7 (с, 1H, 9-CH (индол)); 8,0 (т, 1H, NH Gly); 8,23 (д, 1H, NH Trp); 10,89 (ш.с., 1H, NH^{in}). $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$.

Этиловый эфир *N*-(6-фенилгексаноил)- β -аланил-*L*-триптофана получают из *N*-фенилгексано-

Таблица 5

Зависимость химических сдвигов амидных протонов соединения I в CDCl_3 , содержащего 8 % ДМСО, при концентрации 0,02 М от температуры

Температура, $^\circ\text{C}$	δ (NH^{I} амид), м.д.	δ (NH^{II} амид), м.д.
25	7,39	7,10
45	7,20	7,05
65	6,90	7,00

ил-β-аланина и этилового эфира триптофана. Продукт, выделенный с помощью колоночной хроматографии, кристаллизуют под гексаном. Выход 45 %; т.пл. 56 – 59 °С; $[\alpha]_D^{20} + 26,9^\circ$ (с 0,4, хлороформ); R_f 0,49 (хлороформ – этанол, 9:1). ПМР спектр (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 1,05 (т, 3H, –OCH₂CH₃); 1,22 (м, 2H, C⁴H₂); 1,5 (м, 4H, C³:H₂); 2,0 (т, 2H, C⁶H₂); 2,26 (м, 2H, C^αH₂β-Ala); 2,53 (т, 2H, C²H₂); 3,01 и 3,11 (два дд, 2H, C^βH₂ Trp); 3,17 (м, 2H, C^βH₂ β-Ala); 3,99 (кв, 4H, –OCH₂CH₃); 4,48 (м, 1H, C^αH Trp); 6,92 – 7,52 (м, 10H, ArH); 7,76 (т, 1H, NH β-Ala); 8,36 (д, 1H, NH Trp); 10,87 (с, 1H, NH^m). C₂₈H₃₅N₃O₄.

Метилловый эфир 4-(N-(6-фенилгексаноил)амино)бутирил-L-триптофана получают из N-фенилгексаноиламинобутановой кислоты и метилового эфира триптофана. Продукт, выделенный с помощью колоночной хроматографии, кристаллизуют под гексаном. Выход 52 %; т.пл. 84 – 86 °С; $[\alpha]_D^{20} + 28,5^\circ$ (с 0,4, хлороформ); R_f 0,55 (хлороформ – этанол, 9:1). ПМР спектр (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 1,23 (м, 2H, C⁴H₂); 1,52 (м, 4H, C³:H₂); 1,55 (м, C^δH₂ GABA, 2H); 2,01 (т, 2H, C⁶H₂); 2,07 (м, 2H, C^αH₂ GABA); 2,54 (т, 2H, C²H₂); 2,96 (м, 2H, C^γH₂ GABA); 3,01 и 3,13 (два дд, 2H, C^βH₂ Trp); 3,56 (с, 3H, –OCH₃); 4,47 (м, 1H, C^αH Trp); 6,91 – 7,53 (м, 10H, ArH); 7,72 (т, 1H, NH GABA); 8,28 (д, 1H, NH Trp); 10,84 (с, 1H, NH^m). C₂₈H₃₅N₃O₄.

Этиловый эфир N-(6-фенилгексаноил)-L-пролил-L-триптофана получают из N-фенилгексаноил-L-пролина и этилового эфира триптофана в виде масла с выходом 56 %. $[\alpha]_D^{20} - 27,5^\circ$ (с 0,4, метанол); R_f 0,72 (хлороформ – этанол, 9:1). ПМР-спектр (ДМСО-d₆), δ, м.д. (соотношение *цис*/*транс*-изомеров 45 %/55 %): 1,05 (*транс*) и 1,08 (*цис*) (т, 3H, –OCH₂CH₃); 1,35 – 2,54 (м, 14H, C^β:H₂ Pro и (CH₂)₅); 3,03 и 3,13 (два дд, 2H, C^βH₂ Trp); 3,65 и 3,72 (м, 2H, C^δH₂ Pro); 3,97 (*цис*) и 4,03 (*транс*) (кв, 2H, –OCH₂CH₃); 4,23 (*транс*) и 4,35 (*цис*) (м, 1H, C^αH Pro); 4,39 (*транс*) и 4,56 (*цис*) (м, 1H, C^αH Trp); 6,91 – 7,60 (м, 9H, ArH); 7,15 (с, 1H, 9-CH (индол)); 8,16 (*транс*) и 8,45 (*цис*) (д, 1H, J 8,1 Гц, NH Trp); 10,86 (*транс*) и 10,90 (*цис*) (с, 1H, NH^m). C₃₀H₃₇N₃O₄.

Общая методика получения амидов дипептидов

Метилловый или этиловый эфир N-фенилгексаноил-замещенного дипептида (0,3 ммоль) растворяют в метаноле (10 мл), предварительно насыщенном газообразным аммиаком при температуре 0 °С. Оставляют при комнатной температуре на 3 дня. Растворитель удаляют в вакууме. Продукт кристаллизуют, растирая с сухим эфиром.

Амид N-(6-фенилгексаноил)глицил-L-триптофана (I) получают с выходом 71 %; т.пл. 171 – 172 °С; $[\alpha]_D^{20} - 5,7^\circ$ (с 0,4, метанол); R_f 0,27 (хлороформ – этанол, 9:1). C₂₅H₃₀N₄O₃.

Амид N-(6-фенилгексаноил)-β-аланил-L-триптофана (II) получают с выходом 71 %; т.пл. 145 – 147 °С; $[\alpha]_D^{20} - 2,5^\circ$ (с 0,4, метанол); R_f 0,22 (хлороформ – этанол, 9:1). C₂₆H₃₂N₄O₃.

Амид 4-(N-(6-фенилгексаноил)амино)бутирил-L-триптофана (III) получают с выходом 69 %; т.пл. 165 °С; $[\alpha]_D^{20} - 2,0^\circ$ (с 0,4, метанол); R_f 0,15 (хлороформ – этанол, 9:1). C₂₇H₃₄N₄O₃.

Амид N-(Фенилгексаноил)-L-пролил-L-триптофана (IV) получают с выходом 63 % после перекристаллизации из этилацетата; т. пл. 117 – 119 °С; $[\alpha]_D^{20} - 67,9^\circ$ (с 0,4, метанол); R_f 0,43 (хлороформ – этанол, 9:1). C₂₈H₃₄N₄O₃.

¹H ЯМР-исследования

¹H ЯМР-спектры регистрировали при комнатной температуре на спектрометре Bruker AC-250 (Германия) в растворах CDCl₃ и ДМСО-d₆, используя в качестве внутреннего стандарта ТМС. Исследовали растворы с концентрацией пептидов 0,02 – 0,047 моль/л. Для установления внутримолекулярных водородных связей изучали зависимость химического сдвига протонов NH от концентрации вещества в CDCl₃, содержащем 8 % ДМСО-d₆, необходимых для растворения дипептида, от температуры в интервале 25 – 65 °С и от природы растворителя, используя смеси CDCl₃/ДМСО-d₆. Константы спин-спинового взаимодействия ³J в системе NH-C^αH измеряли по сигналу протонов NH. Для определения величины ЯЭО проводили селективное облучение низкой мощностью на

Таблица 6

Видиальные константы спин-спинового взаимодействия (Гц) протонов дипептидов I – IV и соответствующие им торсионные углы φ в ДМСО-d₆ и CDCl₃

Соединение	CDCl ₃				ДМСО-d ₆			
	X		L-Trp		X		L-Trp	
	³ J _(H-NCα-H)	φ _X , °	³ J _(H-NCα-H)	φ _{Trp} , °	³ J _(H-NCα-H)	φ _X , °	³ J _(H-NCα-H)	φ _{Trp} , °
I (X = Gly)	5,3 ^a	– 71	7,8	79, – 86	5,6 ^a	– 73	8,1	75, – 88
II (X = Ala)	4,9	– 79	7,8	79, – 86	5,4	– 72	8,1	75, – 88
III (X = GABA)	5,8	– 75	7,8	79, – 86	5,8	– 75	8,1	75, – 88
IV (X = L-Pro)	—	– 60 ^b	8,1	75, – 88	—	– 60 ^b	8,3	72, – 90

Примечания. Спектры сняты при концентрации 0,027 М и 25 °С.

Расчетные значения углов, не соответствующих β-поворотной конформации, отброшены.

^a) Для остатка глицина, содержащего два остатка протона C^αH, наблюдается две КССВ H–N–CaH–H, значения которых практически одинаковы.

^b) Данный угол является постоянной величиной и взят из литературных данных [4].

Для соединений I – III спектры сняты в CDCl₃, содержащем 8 % ДМСО

частоте выбранного резонанса. Величину ЯЭО_j (*i*) определяли как соотношение изменения интегральной интенсивности сигнала *j* в спектре ЯМР в условиях насыщения ядра *i* (*I_j*) к интегральной интенсивности сигнала *j* в отсутствие насыщения (*I_j⁰*): ЯЭО_j (*i*) = (*I_j* - *I_j⁰*)/*I_j⁰*. Спектры COSY получены с помощью последовательности из двух неселективных 90-градусных импульсов: (90° - *t*₁ - 90° - *t*₂)_{*n*} [14].

Экспериментальная фармакологическая часть

Опыты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 200 – 270 г. Потребление животными стандартного гранулированного корма и воды не ограничивали. Крыс содержали в виварии в стандартных пластиковых клетках (60×40×20) по 8 особей в каждой. В течение 3 сут, предшествующих эксперименту, с каждой из подопытных крыс проводили процедуру “хендлинга”. Животных помещали в экспериментальную комнату за 3 – 4 ч до начала опыта, который выполняли в интервале 16 – 20 ч местного времени. Эксперименты проводили в затемненном помещении, источник света (лампа мощностью 60 Вт) был экранирован так, чтобы сама установка освещалась только рассеянным, отраженным светом. Водно-твиновые растворы дипептидов готовили *ex tempore* и вводили крысам внутрибрюшинно за 15 мин до тестирования в лабиринте. Контрольные животные получали равный объем дистиллированной воды. Был использован ПКЛ в базовой модификации, который имел следующие характеристики: длина каждого из 4 рукавов лабиринта составляла 50 см, их ширина — 15 см, высота бортиков 2 противоположных закрытых рукавов — 15 см, бортики были светонепроницаемы, центральная площадка — 15 × 15 см, лабиринт был приподнят над полом на высоту 75 см. Для облегчения подсчета числа горизонтальных перемещений пол каждого из рукавов, покрытый черной эмалевой краской, был разделен белой линией на 2 равные части; для оценки двигательной активности определяли число пересеченных линий, учитывая указанную линию и линию, условно отделяющую выход из рукава на центральную площадку. В начале опыта крыс помещали в центр лабиринта, случайным образом ориентируя их относительно входа в рукав. Поведение животных оценивали в течение 5 мин. Регистрировали следующие показатели: горизонтальную двигательную актив-

ность в открытых и в закрытых рукавах в сумме, вертикальную активность — число подъемов на задние лапы, число заходов во все рукава, число заходов в открытые рукава, % этих заходов, число заходов в закрытые рукава, время пребывания в открытых рукавах и % этого показателя от общего времени тестирования, число выходов на центральную площадку и время пребывания на ней.

Результаты обрабатывали статистически, используя пакет программ CSS (Complete statistical system, version B640). Данные представляли как средние значения по группам. Для оценки статистически значимых различий между экспериментальными и контрольными группами животных использовали непараметрический критерий “Mann Whitney U-test”. Результаты оценивались как значимые при величинах *P* < 0,05.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-04-49047а).

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, Л. Б. Колик и др, Патент РФ 2227144 (2004); *Бюл. изобрет.*, № 11 (2004).
2. М. М. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **8**(7), 492 – 499 (1969).
3. Т. А. Gudasheva, E. P. Philippova, V. K. Briling, et al., in: *Peptides 2002*, E. Benedetti and C. Pedone (eds.), Edizioni Ziino, Sorrento (2002) pp. 508 – 509.
4. P. Y. Chou and G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.*, **115**, 135 – 175 (1977).
5. G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, and F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5012 – 5017 (1967).
6. S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, and M. Briley, *J. Neurosci. Methods*, **14**, 149 – 167 (1985).
7. G. Boussard and M. Marraud, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 1825 – 1828 (1985).
8. Н. И. Зайцева, В. П. Лезина, А. Н. Игнашин и др., *Хим.-фарм. журн.*, **35**(7), 35 – 38 (2001).
9. J. B. Ball, R. A. Hughes, P. F. Alewood, and P. R. Andrews, *Tetrahedron*, **49**(17), 3467 – 3478 (1993).
10. В. Ф. Быстров, *Биоорган. химия*, **10**(8), 997 – 1043 (1984).
11. B. N. N. Rao, A. Kumar, H. Balaram, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 7423 – 7428 (1983).
12. G. Pietrzynski, Z. Kubica and B. Rzeszotarska, in: *Peptides 1990*, E. Giralt, D. Andrew (eds.), ESCOM Sci. Pub. B. V. (1991), pp. 462 – 464.
13. A. Aubry, M. T. Cung, and M. Marraud, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7640 – 7647 (1985).
14. A. Bax and R. Freeman, *J. Magn. Res.*, **44**, 542 – 547 (1981).

Поступила 11.11.04

SYNTHESIS, CONFORMATION ANALYSIS, AND ANXIOLYTIC ACTIVITY OF RETROPEPTIDE ANALOGS OF 4-CHOLECYSTOKININ

T. A. Gudasheva, V. P. Lezina, E. P. Kir'yanova, V. S. Troitskaya, L. G. Kolik, and S. B. Seredenin

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

A series of potential dipeptide anxiolytics with the general formula Ph(CH₂)₅CO-X-L-Trp-NH₂ (X = Gly, β-Ala, GABA, L-Pro) have been synthesized on the basis of the 4-cholecystokinin structure. These compounds exhibit anxiolytic activity in elevated plus maze test in rats at doses of 0.01 – 0.5 mg/kg (i.p.). The activity among these derivatives increases in the following order: GABA → β-Ala → Gly → L-Pro. Conformation analysis of dipeptides in solution by ¹H NMR method with the use of nuclear Overhauser effect and peptide vicinal ³J(H-NC^α-H) coupling constants has been carried out. It is established that percentage of bi-turn conformation stabilized by hydrogen bonds with the participation of C-end amide group proton also increases in the order β-Ala → Gly → L-Pro derivatives. It is concluded that a bi-turn conformation is probably the biologically active one in the synthesized substituted dipeptides.