БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 12 * № 7 * 1986

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.175.829'17.05:615.212.7

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ КОРОТКИХ АНАЛОГОВ ЭНКЕФАЛИНА

Розенталь Г. Ф., Чипенс Г. И.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Наркотические алкалоиды и опиоидные пептиды оказывают болеутоляющий эффект через активацию общего опиатного рецептора. Критически рассмотрены наиболее распространенные методы определения сродства к опиатным рецепторам и анальгетической активности. Систематизировано около 180 описанных в литературе коротких аналогов энкефалина, и на основе их структурно-функционального взаимоотношения выдвинута концепция о том, что совокупность свойств молекулы, обеспечивающих взаимодействие опиоидных пептидов с μ-подклассом опиатных рецепторов, обусловливается ограниченным N-концевым участком их молекулы. Обсуждаются структурные особенности укороченных производных энкефалина, определяющие их антиноцицептивный эффект при системном введении, и взаимоотношения этого эффекта со сродством пептидов к опиатным рецепторам.

Открытие в 1975 г. двух незатейливых и коротких пентапептидов, получивших название «энкефалины», на первый взгляд было заурядным событием. Однако возникший к ним огромный всеобщий интерес, редко наблюдавшийся в науке к отдельной группе соединений, захватил в последнее десятилетие всех занимающихся изучением жизненных процессов — от биофизиков до практикующих врачей. Появилась надежда, что с их помощью человечество сможет решить многовековую загадку древней медицины. Боль и радость — это чувства, свойственные людям всех времен. Издавна, когда даже неведомо было представление о научном подходе к природным явлениям, были уже найдены средства, помогающие превозмочь боль и заглушить тревогу, приблизить сон и вызвать блаженство. Источником этого чудодейственного снадобья оказался экстракт мака опийного. Ввиду эффективности действия он тысячелетиями служил действенной опорой медицины, став в то же время объектом страшного проклятия, праотцем ныне захлестывающей мир наркомании. Но даже в середине просвещенного XX в. механизм действия опиатных алкалоидов оставался труднодоступной тайной природы. И именно энкефалины могли помочь раскрыть эту тайну.

Структурные основы опиоидной активности

Многолетняя работа по синтезу алкалоидов опиатного ряда привела к созданию их аналогов с тысячекратно повышенной по сравнению с морфином анальгетической активностью. Наличие таких исключительно сильнодействующих наркотических анальгетиков, способных в микрограммовых дозах вызывать значительные биологические эффекты, позволило предположить, что их действие осуществляется через активацию клеточных мембранных рецепторов, так как только таким образом можно объяснить возникновение сильного клеточного ответа на воздействие столь малого количества активного вещества. Этот вывод подтверждается фактом мгновенного снятия действия морфиноподобных веществ маленькими дозами опиатных антагонистов, тоже достоверно объяснимого только механизмом конкурентного блокирования общих специфических рецепторов.

И действительно, в 1973 г. в трех лабораториях было доказано реальное существование клеточных опиатных рецепторов [1—3], хотя осталось малопонятным, чем обусловлено их присутствие в организме. Выделение и идентификация энкефалинов [4] послужили связующим звеном между

фармакологической активностью опиатных алкалоидов и наличием у позвоночных чувствительных к ним рецепторов, так как оказалось, что энкефалины также специфически связываются с этими опиатными рецепторами и являются, таким образом, их эндогенными лигандами.

В связи с этой уникальной ситуацией, когда у высших животных нейропептиды, представляющие продукт поздних ступеней эволюции, и филогенетически очень отдаленные алкалоиды растений имеют одинаковую точку приложения, возник живой интерес к их загадочному структурно-функциональному родству. Вызванная чисто познавательными мотивами заинтересованность достигла беспрецедентных масштабов ввиду чрезвычайной важности морфиноподобных веществ в практической медицине. Появилась надежда, что на основе природных энкефалинов станет возможным создание болеутоляющих средств с силой действия, подобной морфину, но лишенных его отрицательных побочных явлений, в первую очередь болезненного привыкания к ним. В короткое время было синтезировано свыше 1000 всевозможных производных энкефалина, найдено в организме три семейства опиоидных пептидов разной длины, которые происходят от трех различных групп генов [5], и установлено, что представление о едином опиатном рецепторе является упрощением, так как фактически существуют несколько его подклассов [6, 7] с отличительными требованиями к структуре лиганда, обеспечивающей возможность образования специфического лиганд-рецепторного комплекса.

В 1973 г. одним из нас впервые было высказано предположение о том, что многие эмпирически выявленные лекарственные вещества или физиологически активные соединения отображают совокупность свойств природных эндогенных биорегуляторов [8]. Этот тезис получил основательное подтверждение и в применении к энкефалинам. Как и в случае наркотических анальгетиков, их биологическое действие обусловлено взаимодействием с тем специфическим участком поверхности нервной клетки, который продуцирует первичный сигнал, в конечном итоге вызывающий феномен анальгетического действия. По существующим представлениям, вероятнее всего, энкефалин оказывает ингибирующий эффект на передачу восходящего ноцицептивного импульса в нервной системе нейромодуляторным образом, подавляя освобождение возбуждающего нейротрансмиттера путем пресинаптического воздействия на локализованные на терминальных разветвлениях аксона опиатные рецепторы [9]. Надо полагать, большинство более длинных эндогенных опиоидных пептидов имеет в составе молекул дополнительные биологически важные элементы структуры, которые определяют их способность взаимодействовать с другими известными подклассами опиатных рецепторов. Активация последних, вероятно, вызывает такие нейромодуляторные или гормональные эффекты, которые не свойственны морфину вообще или обусловливают его нежелательные с терапевтической точки зрения побочные проявления.

Одним из важнейших выводов анализа данных литературы нам представляется положение о том, что аналогичное морфину действие эндогенных пептидов, или, другими словами, набор свойств, который определяет для них сходные с наркотическими анальгетиками черты биологического эффекта, обусловлен не целостностной структурой пептидов, а только вполне конкретной частью их молекулы — по всей вероятности, N-концевым фрагментом. В литературе предложен ряд обзоров [10—12], посвященных анализу пентапептидной структуры энкефалинов. Однако пятая аминокислота, очевидно, не играет существенной роли в проявлении энкефалинами их опиоидной активности [13, 14], а ее наличие в некоторых случаях приводит к тому, что структурные вариации в других участках молекулы влияют на взаимодействие соединения с рецепторами иначе, чем это происходит при аналогичных изменениях в более коротких пептидах [15—17]. В связи с этим нам представлялось целесообразным предпринять систематический разбор структурно-функциональных соотношений на уровне известных аналогов N-концевых тетра- и более коротких пептидов энкефалина. По нашим сведениям, попытка такого обобщения в мировой литературе пока не делалась.

Определение анальгетической активности энкефалинов и их сродства к рецепторам

Понятие структурно-функциональной зависимости для энкефалинов достаточно сложное. Обычный подход к выяснению данного соотношения заключается в том, что берется широкий набор соединений, различающихся между собой единичными структурными элементами, и сопоставляется, желательно количественным способом, их биологическая активность. Выбор аналогов энкефалина с требуемыми структурными вариациями проблемы не представляет — за прошедшее десятилетие синтезировано больше 1000 таких соединений. Трудности возникают при определении понятия биологической активности энкефалинов. Если проанализировать рассмотренные в литературе системы живых организмов и физиологические эффекты, на которые якобы оказывают воздействие энкефалины, то можно привести внушительный список: влияние на ощущение боли, на дыхание, желудочно-кишечный тракт, сердечно-сосудистую и эндокринную системы, на терморегуляцию, поведенческие реакции, шок и стресс [18]. Даже этот перечень не является исчерпывающим. Ясно, что попытка всеобъемлющей корреляции всех этих фармакологических ответов со структурой энкефалинов представляется явно безнадежной, так как, по всей вероятности, можно по каждому эффекту составить свой, отличный от других преференциальный ряд активностей аналогов.

Единственным разумным выходом представляется попытка найти во всех этих разнообразнейших проявлениях физиологической активности общее связующее звено и основывать на нем сопоставление со структурной организацией энкефалинов. К счастью, подобный объединяющий элемент существует. Как уже отмечалось, энкефалины были впервые выделены по признаку их морфиноподобной характеристики, определяемой как опиоидная активность. Согласно представлению о воздействии энкефалинов на клетку путем активации ее специфических мембранных рецепторов, первичным актом всех последующих морфиноподобных ответов организма должно быть избирательное узнавание опиатным рецептором соответствующего ему лиганда. Универсальной контрольной проверкой может служить возможность конкурентного блокирования этого комплексообразования и, следовательно, подавления рассматриваемого фармакологического эффекта антагонистами опиатного рецептора. Если какая-либо физиологическая реакция организма не подчиняется этому условию, то ее причинная связь с действием опиоидного пептида в лучшем случае может быть лишь косвенной, и неоправданно говорить о настоящей структурно-функциональной зависимости. Согласно вышеизложенной аргументации, все серьезные попытки обсуждения структурно-функциональных соотношений в ряду энкефалинов должны основываться на корреляции структуры аналога с его опиоидной активностью, т. е. со способностью к узнаванию лиганда опиатным рецептором. Подход к решению этой задачи дает известный метод радиорецепторного анализа (РРА), основанный на фиксации специфического комплексообразования меченного радиоактивным изотопом лиганда с находящимися на поверхности плазматических мембран гомогената тканей опиатными рецепторами. Доказательство, что определяемое связывание меченого лиганда с клеточными мембранами действительно представляет собой специфическое взаимодействие с соответствующими рецепторами, требует выполнения целого ряда условий. При изучении опиатных рецепторов такие необходимые тщательные проверки проведены [19]. Так, установлено, что связывание левовращающих стереоизомеров опиатных алкалоидов на 3—4 порядка превышает связывание соответствующих фармакологически неактивных правовращающих изомеров. Основным доказательством соответствия между стереоспецифическим связыванием и образованием функционально активного лиганд-рецепторного комплекса является удовлетворительная корреляция между фармакологической болеутоляющей активностью наркотических анальгетиков нескольких различных групп и их сродством к синаптическим мембранам [20, 21]. Это дает основание предполагать, что стереоспецифическое связыва-

ние пептидов в одних и тех же условиях с целью выявления их биологической активности действительно служит мерой их взаимодействия с опиатными рецепторами.

Определение опиоидной активности по образованию лиганд-рецепторного комплекса несколько осложняется тем, что в настоящее время установлено существование нескольких подклассов опиатных рецепторов [22]. Они довольно близки и частично перекрываются в своих требованиях к соответствующим им веществам [6, 7]. В то же время уже синтезирован целый набор строго избирательных опиоидных лигандов, селективно взаимодействующих только с одним определенным типом опиатных рецепторов. С использованием таких соединений метод радиорецепторного анализа становится тонким инструментом для изучения опиоидных пептидов. Установлено, что опиатные алкалоиды взаимодействуют преимущественно с μ-рецепторами, природные энкефалины — с δ-рецепторами [22], а более длинные динорфины — с κ-рецепторами [23, 24]. Наименее строгие требования к структуре лиганда при специфическом комплексообразовании проявляют μ-рецепторы [6, 25], которые удовлетворительно взаимодействуют также с δ- и κ-специфическими соединениями [26—28], в то время как чувствительность δ- и κ-рецепторов к μ-лигандам крайне ограничена [26]. Другими словами, можно предположить, что δ- и в особенности κ-рецепторы являются более сложными образованиями по сравнению с μ-рецепторами, и для правильного узнавания ими требуется наличие в лигандах дополнительных структурных элементов. Так как задача настоящего обзора — анализ структурно-функциональных соотношений N-концевой области пептидов с целью выяснения структурных особенностей набора свойств, определяющего проявление их морфиноподобной активности, исключительное внимание будет сосредоточено на сродстве рассматриваемых соединений к μ-рецепторам с использованием данных по другим подклассам только в целях сравнительного анализа.

Для определения сродства к μ-рецепторам радиорецепторным методом анализа в его наиболее широко применяемом варианте обычно пользуются фракцией плазматических мембран мозга крысы, так как в данном случае доля опиатных рецепторов μ-подкласса гораздо выше (46%), чем в мозге других обычно используемых экспериментальных животных (например, для морской свинки — 20% [28]). В качестве радиоактивного лиганда используют главным образом меченные тритием опиатные алкалоиды агонистического (дигидроморфин) или антагонистического (налоксон) действия. В последнее время начато применение синтетического производного энкефалина

$$\text{Tyr-}D\text{Ala-Gly} \overset{CH_3}{\text{—}} \text{Phe-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH},$$

который обладает очень избирательным μ-специфическим действием [29]. Так как источником мембранной фракции обычно служит мозговая ткань, то методом радиорецепторного анализа определяется сродство веществ к μ-рецепторам центральной нервной системы, в дальнейшем именуемым центральными μ-рецепторами.

Но опиатные рецепторы найдены и в периферических нервных тканях желудочно-кишечного тракта [1]. Методом радиорецепторного анализа доказано, что характеристики процессов стереоспецифического связывания опиатов в мышечно-кишечном нервном сплетении подвздошной кишки морской свинки (ПКМС) и в мозговой ткани идентичны [30]. Однако для периферийной системы еще до открытия периферических опиатных рецепторов эмпирически был найден сравнительно простой фармакологический тест для определения морфиноподобных веществ. Было выявлено, что наркотические анальгетики уменьшают амплитуду сокращения ПКМС, стимулируемого электрическими импульсами, в зависимости от добавленной дозы. Это обусловлено подавлением освобождения из стимулированного электрическим раздражением нервного волокна ацетилхолина [31, 32].

Использование в этом тесте нескольких соответственно подобранных концентраций морфиноподобного вещества позволяет определить для него

среднюю эффективную дозу (ED_{50}), величина которой обратно пропорциональна сродству данного вещества к периферическим опиатным рецепторам. Сравнительное определение опиоидной активности большого числа наркотических анальгетиков при помощи ПКМС (тест ПКМС) и методом радиорецепторного анализа с использованием гомогенатов той же ткани показало для каждого соединения полное соответствие этих двух величин [30], поэтому ввиду относительной технической простоты в настоящее время для определения периферической μ-рецепторной активности пользуются исключительно тестом ПКМС.

Но не следует забывать, что мышечно-кишечное сплетение ПКМС кроме μ-рецепторов содержит также и ϰ-рецепторы [33, 34]. Этим объясняется высокая активность в тесте ПКМС динорфина и его производных [35]. Таким образом, тест ПКМС в классическом виде приемлем для определения μ-рецепторной активности только при условии отсутствия у изучаемых соединений ϰ-специфической активности. Для коротких пептидов N-концевой области эндогенных опиоидных соединений последнее можно считать доказанным, а в общем случае при определении избирательной μ-рецепторной активности малоизученных веществ с помощью теста ПКМС необходимо предварительное функциональное удаление всех изоформ ϰ-рецепторов, чего можно добиться путем развития их селективной толерантности в используемом препарате [36].

Серьезные возражения вызывает широко распространенное использование семявыносящего протока мыши (СПМ) для определения селективной δ-рецепторной активности (тест СПМ) [37, 38]. В настоящее время установлено, что в данном органе действительно преобладают δ-рецепторы, однако имеется, за исключением некоторых специально выведенных пород мышей [39], и немалое количество μ-рецепторов [40]. А так как подавляющее большинство исследованных тестом СПМ морфиноподобных соединений обладает более или менее выраженным сродством к μ-рецепторам, то зачастую приводимые в литературе соотношения активностей по тестам СПМ и ПКМС, рассматриваемые как выражение количественной пропорции сродства к δ- и μ-рецепторам, на самом деле могут дать лишь качественную характеристику испытанных веществ. Для правомерного применения теста СПМ в определении селективной периферической δ-рецепторной активности обязательно должны быть предварительно функционально элиминированы присутствующие в СПМ μ-рецепторы, но это сделано, к сожалению, лишь в немногочисленных исследованиях.

Естественно возникает вопрос о корреляции опиоидных активностей, выявленных на центральных и периферических рецепторах. В литературе широко пользуются предположением о существовании подобного соответствия, которое якобы основывается на сравнительном исследовании достаточно большого числа опиоидных соединений со статистическим анализом результатов. Бедделл [41] показал достоверную корреляцию между данными по тесту СПМ и радиорецепторного анализа на мозге с использованием [^{3}H]налоксона; Аудигер [42] с успехом сопоставил тест ПКМС со специфическим связыванием клеточными мембранами мозга крысы [^{3}H]-эторфина, а Горин [43] доказал соответствие между тестом ПКМС и радиорецепторным анализом с использованием [*D*Ala^2, *D*Leu^5, [^{3}H]Tyr^1]энкефалина. Однако при более тщательном рассмотрении этих работ легко обнаружить, что в них имело место смешение тестов на предпочтительную μ-рецепторную селективность и тестов, определяющих в основном δ-рецепторную активность или вообще не отличающихся избирательностью к типам опиатных рецепторов. Так что можно смело утверждать, что при более критическом подборе исследуемых соединений постулируемое авторами работ [41—43] существование безупречной корреляции будет опровергнуто. Однако на основе доступного в литературе обширнейшего экспериментального материала можно с уверенностью утверждать, что в определенном приближении она существует.

Резюмируя изложенное, следует заключить, что для определения сродства веществ к опиатным рецепторам можно успешно применять как биохимические методы, так и фармакологические тесты на изолированных ор-

ганах; более того, желательно одновременное их использование с целью взаимного дополнения и проверки. В отдельных нижеприведенных случаях отмечаются заметные расхождения в уровне опиоидной активности на центральных и периферических опиатных рецепторах. Эти редкие исключения при общей закономерности совпадения активностей требуют в каждом конкретном случае особого рассмотрения.

Наличие у вещества сродства к опиатным рецепторам — исходное и необходимое требование проявления им всякого морфиноподобного биологического действия, хотя часто это может быть недостаточным условием. Важнейший эффект таких веществ с практической точки зрения — обезболивающее действие. Оно представляет собой мультифакторное явление, которое отдалено от активации опиатных рецепторов целым рядом промежуточных малоизученных ступеней и, следовательно, ввиду своего комплексного характера не может служить непосредственным тестом для структурно-функционального изучения соединений. Поскольку получение эффективного болеутоляющего препарата — открыто провозглашаемая или подразумеваемая цель подавляющего большинства исследований в ряду опиоидных пептидов, тесно переплетающаяся с изучением их структурно-функциональных взаимоотношений, мы считаем оправданным включение в настоящий обзор данных по обезболивающему эффекту рассматриваемых соединений.

В ряду наркотических анальгетиков наблюдается довольно четкая корреляция между их сродством к опиатным рецепторам и проявляемым антиноцицептивным действием [44], что позволяет на основании первой характеристики весьма успешно прогнозировать ожидаемый болеутоляющий эффект соединения. Однако уже начальные исследования производных энкефалинов при их системном введении выявили отсутствие прямого соответствия их обезболивающего действия с аффинностью к рецепторам [45, 46]. Тем не менее, согласно вышеизложенному, только соединения, способные активизировать опиатные рецепторы, в состоянии вызывать анальгезию по сходному с морфином механизму. Поэтому имеет смысл искать болеутоляющие средства с морфиноподобным механизмом действия лишь среди этих соединений. Данный поиск в настоящее время можно осуществлять лишь эмпирическим путем, так как сущность структурных элементов, необходимых соединениям с выраженным сродством к μ-рецепторам для обеспечения их антиноцицептивной способности при их системном введении, практически неизвестна.

При поиске новых болеутоляющих препаратов в ряду опиоидных пептидов необходим рациональный стратегический подход — найти оптимальную структуру молекулы, определяющую взаимодействие с опиатными рецепторами, и лишь на ее основе изыскивать возможности ее дополнения другими элементами, необходимыми для проявления анальгезии. Некоторое представление о природе этих необходимых элементов и призвано дать предпринятое нами обобщение обезболивающих свойств коротких аналогов энкефалина.

К сожалению, ноцицептивный механизм используемых фармакологических тестов пока охарактеризован слабо. Если допустить, что болеутоляющий эффект может быть вызван активированием как μ-, так и κ-рецепторов [47], то уже одно это способно объяснить несоответствие между разными тестами, поскольку μ-специфические лиганды активны в опытах как с термическими, так и с механическими раздражителями, в то время как κ-специфические лиганды в первых почти индифферентны [48]. Однако даже очень близкие по строению аналоги энкефалинов, которые, по всей вероятности, должны взаимодействовать с одним и тем же подклассом опиатных рецепторов, в различных тестах иногда значительно различаются [49, 50]. Наглядным примером огромного различия родственных соединений в двух часто применяемых антиноцицептивных тестах могут служить данные, приведенные в табл. 1 [51].

Из-за отсутствия достаточно обоснованной и строго стандартизированной методики определения обезболивающего действия изучаемых соединений условия его регистрации, а также способы системного введения

Таблица 1

Анальгетическая активность опиоидов в различных антиноцицептивных тестах на животных [51]

Соединение	ED_{50} анальгезии, мг/кг		E_2/E_1
	Корчение от боли (E_1)	Отдергивание хвоста (E_2)	
Tyr-*D*Ala-Gly $\frac{CH_3}{CH_3}$ Phe-NH-CH_2-CH_2OH	$5\cdot10^{-4}$	2,9	5800
Tyr-*D*Ala-Gly $\frac{CH_3}{CH_3}$ Phe-NH-CH_2-CH_2-N$(CH_3)_2$	$3\cdot10^{-3}$	1,4	466
Tyr-*D*Ala-Gly $\frac{CH_3}{CH_3}$ Phe-NH-CH_2-CH_2-N(O)$(CH_3)_2$	$8\cdot10^{-8}$	0,32	$4\cdot10^{6}$
Морфин	$7\cdot10^{-2}$	1,65	23,6

веществ (внутривенный, подкожный или внутрибрюшинный) в большей или меньшей степени различаются почти во всех лабораториях. Поэтому возможности правомерного сопоставления приводимых данных по анальгетическому действию относительно ограничены и, несмотря на якобы наглядную количественную характеристику, взаимное сравнение соединений должно осуществляться с учетом вышесказанного.

Отдельного обсуждения заслуживают довольно широко распространенные опыты по изучению обезболивающего действия опиоидных пептидов при их центральном введении. Аналогично результатам, полученным при системном введении, отсутствует корреляция между μ-рецепторной активностью соединения и его центральным болеутоляющим эффектом [42, 52, 53]. При модификации [Met^5]энкефалина путем замены метионина-5 на фенилаланин или триптофан у полученных аналогов аффинность к рецептору снижается, а центральная анальгетическая способность повышается [54]. Химически весьма близкие пептиды [*D*Met^2,Pro^5]энкефалинамид и [*D*Met^2, Nva^5]энкефалинамид связываются с рецепторами почти одинаково с незначительно повышенной аффинностью у второго [55], в то время как центральная анальгетическая способность у последнего в 24 раза ниже, чем у родственного аналога [56]. Если удалить у этих соединений пятую аминокислоту, то μ-рецепторная активность укороченного аналога повышается, а его анальгетическая способность снижается [25].

Следовательно, центральный анальгетический эффект проявляется по своим, не соответствующим взаимодействию с опиатными рецепторами закономерностям, и возникает вопрос: чем, собственно, он определен? Известно, что центральное болеутоляющее действие можно вызвать введением широкого спектра самых разнообразных пептидов. Активность проявляют как дипептиды Tyr-Arg (киоторфин) [57] и Tyr-*D*Ala [14], имеющие сходство с N-концевой областью эндогенных опиоидных лигандов, так и ряд других известных гормонов, которые по своей структуре совершенно отличаются от данной области, например тиролиберин и тафтсин [58, 59].

Принципы обезболивающего действия части этих соединений остаются загадочными, и не во всех случаях антиноцицептивный эффект предупреждается налоксоном. В связи с этим вызывают удивление попытки некоторых авторов [60—62] судить о структурно-функциональной зависимости вводимых соединений исключительно на основании данных по их центральному анальгетическому эффекту. Из вышеизложенного следует, что обнаруживаемое болеутоляющее действие, вероятнее всего, определяется суммой различных воздействий на мозг, из которых по крайней мере часть совершенно не связана с морфиноподобной структурой изучаемого вещества. Поэтому данные по центральной анальгетической активности ввиду затруднений в их интерпретации вряд ли можно использовать для достоверного суждения о структурно-функциональных зависимостях опиоидных пептидов.

Сродство к опиатному рецептору тетрапептидов энкефалина

При анализе структурной организации молекулы пептида, которая определяет сродство соединения к опиатным рецепторам, согласно изложенной выше аргументации, мы считаем целесообразным ограничиться рассмотрением лишь *N*-концевой области энкефалинов. В опубликованных обзорах по структурно-функциональным соотношениям энкефалинов [11, 12] детально рассмотрен целый ряд вопросов о влиянии определенных элементов молекулы, например роль N-терминальной аминогруппы остатка тирозина-1, структурных особенностей пептидного остова, поэтому нет нужды их дублировать: установленные закономерности характерны и для более коротких пептидов. Однако в частных случаях при укороченной пептидной цепи влияние аналогичных модификаций может быть несколько иным, чем у пентапептидов [15—17], что будет рассмотрено ниже. В основном мы будем анализировать такие структурные аспекты, когда проявляется своеобразие именно укороченной молекулы пептида, позволяющее лучше осознать минимальные требования к структуре лиганда с целью определения его опиоидной активности.

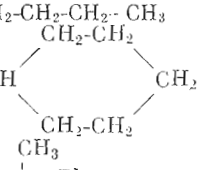
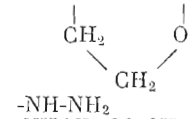
Для более удобного сравнения присущего данным пептидам сродства к опиатным рецепторам необходимо было соответствующие литературные данные, представленные в различных системах отсчета, привести к общему знаменателю. С этой целью мы нормализовали все результаты по отношению к [Met^5]энкефалину, относительная молярная активность которого принята за единицу. Доступные литературные данные объединены в две группы по методу определения μ-рецепторной активности: фармакологический тест ПКМС или радиорецепторный метод анализа с использованием меченых опиатных алкалоидов. По нашему убеждению, погрешности нормализации результатов не выходят за рамки разброса результатов определения активности идентичных соединений в разных лабораториях (табл. 2) или даже одной и той же группой исследователей по истечении некоторого времени [63, 64].

Первые попытки укорочения молекулы энкефалина с целью выявления наименьшего фрагмента, обладающего опиоидной активностью, казалось, указывали на необходимость всех пяти аминокислот [65]. Однако вскоре было установлено, что, хотя относительная опиоидная активность тетрапептида, отвечающего фрагменту 1—4 энкефалина, очень мала, он обладает сравнимой с пентапептидом внутренней активностью [66]. Дополнительное введение минимальных С-концевых модификаций молекулы делает наличие пятой аминокислоты совершенно необязательным [13, 14]. В настоящее время синтезировано большое число тетрапептидных аналогов энкефалина, которые не только сохраняют уровень μ-рецепторной активности пентапептидов, но во многих случаях даже значительно ее превосходят. Обширный набор самых различных таких аналогов представлен в табл. 2.

N-Терминальный тетрапептид (1) * природных энкефалинов со свободной карбоксильной группой имеет очень низкое сродство к опиатным рецепторам, которое существенно не повышает ни этерификация (3), ни амидирование (4) или N-метилирование остатка фенилаланина (7) [64]. Это разительно контрастирует с достаточно высокой активностью родственного соединения (8), в котором остаток глицина-2 замещен на *D*-аланин, в особенности при превращении С-концевой карбоксильной группы соединения (8) в спиртовую (9) или амидную (10). Тетрапептиды (9) и (10) превышают по опиоидной активности [Met^5]энкефалин. Кажется достоверным предположение о том, что указанная замена не столько влияет на стойкость пептида к аминопептидазам, сколько обеспечивает дополнительный вклад в образование лиганд-рецепторного комплекса [16, 64], которым компенсируется удаление пятой аминокислоты природного энкефалина. Это, вероятно, становится возможным при условии, если аминокислотный

* В скобках здесь и далее приведен номер соответствующего модифицированного соединения по табл. 2.

Сродство к μ-рецепторам тетрапептидных аналогов энкефалина

Номер	Пептид *	Относительное сродство [2]*		Литература
		Тест ПКМС	PPA	
1	Tyr-Gly-Gly-Phe	0,01		[65]
		0,001		[66]
		0,012		[64]
2	-ol	0,02		[67]
3	$-OCH_3$	⩽0,015		[64]
4	$-NH_2$	⩽0,015		[64]
5	$-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$	0,27		[68]
6		0,42		[68]
7	Tyr-Gly-Gly—Phe (CH_3)	⩽0,015		[64]
8	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe		0,15	[14]
		0,66	0,08	[69]
		0,67	0,11	[70]
		0,91		[64]
		0,19		[71]
9	-ol	1,1		[67]
		1,2		[72]
10	$-NH_2$	5,1		[13]
			2,0	[14]
		8,0		[64]
		1,4	8,9	[73]
11	$-NH-CH_2-CH_2-CH(CH_3)_2$	6,2	0,86	[69]
		8,2	0,78	[70]
		9,4		[49]
12	$-N(CH_3)-CH_2-CH_2-CH(CH_3)_2$	8,0		[49]
			4,5	[74]
13	$-N(CH_2-CH_2-C_6H_5)-CH_2-CH(CH_3)_2$	0,92	0,06	[74]
14		3,4		[45]
15	$-NH-NH_2$	1,6		[71]
16	$-NH-NH-CO-CH_2-CH_2-CH_3$		2,5	[50]
17	-NH-NH ← Gly	1,3		[71]
18	-NH-NH ← Leu	1,7		[73]
19	-NH-NH ← His	0,91		[73]
20	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe(α-CH_3)	0,74	0,01	[43]
21	Tyr-*D*Ala-Gly-Leu-NH_2		0,08	[14]
22	Tyr-*D*Ala-Gly-Trp-NH_2		0,89	[14]
23	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe(NO_2)	1,8	5,7	[73]
24	$-NH_2$	25	29	[73]
25	$-NH-NH_2$	0,28		[71]
	Tyr-*D*Ala-Gly—Phe (CH_3)			
26	$-NH_2$		3,2	[14]
27	$-NH-CH_2-CH_2-CH(CH_3)_2$	5,0		[49]
			2,9	[74]
28	$-NH-CH_2-CH_2OH$	6,8		[51]
29	$-NH-CH_2-CH_2-CH_2-S-CH_3$		5,1	[74]
30	$-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$	8,5		[49]
		9,8		[51]
31	$-NH-CH_2-CH_2-N(O)(CH_3)_2$	6,5		[49]
		13		[51]
32	$-N(CH_3)-CH_2-CH_2-CH(CH_3)_2$	6,5		[49]
33	$-N-(CH_3)-CH_2-CH_2-C_6H_5$	0,01	0,42	[74]
34	$-N(CH_2-CH_2-C_6H_5)-CH_2-CH(CH_3)_2$	0,04		[74]

Номер	Пептид *	Относительное сродство [2]*		Литература
		Тест ПКМС	PPA	
35	-N-CH_2-CH_2-CH(CH_3)$_2$ | CH_2-CH_2-CH_2-C_6H_5	<0,001		[74]
36	-NH-NH-CO-CH_2-CH_3 CH_3-Tyr-*D*Ala-Gly-Phe		3,8	[50]
37	-NH-CH_2-CH_2-CH(CH_3)$_2$	3,7 3,8 5,2	0,25 0,22	[69] [70] [49]
38	-N(CH_3)-CH_2-CH_2-CH(CH_3)$_2$ CH_3 CH_3-Tyr-*D*Ala-Gly —— Phe	10		[49]
39	-NH-CH_2-CH_2-CH(CH_3)$_2$	2,3		[49]
40	-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)$_2$	4,5		[49]
41	-NH-CH_2-CH_2-N(O)(CH_3)$_2$	7,9		[49]
42	-N(CH_3)-CH_2-CH_2-CH(CH_3)$_2$ CH_3 CH_2 \ CH-Tyr-*D*Ala-Gly —— Phe | / CH_2	7,1		[49]
43	-NH-CH_2-CH_2-CH(CH_3)$_2$	0,02		[74]
44	Tyr-*D*Arg-Gly-Phe		1,3	[75]
45	Tyr-*D*Lys-(For)-Gly-Phe -NH-CH_2-CH(OH)-CH_3	12		[76]
46	CH_2—CH_2 -N / \ | CH_2—CH_2	0,69		[76]
47	CH_2 -NH—CH / \ CH_2 | | CO CH_2 \ / NH	18		[76]
48	-NH—CH——CH_2 | | CO CH_2 \ / S	160		[76]
49	Tyr-ΔAla-Gly-Phe-OCH_3		0,05	[77]
50	Tyr-*D*Met-Gly-Phe-NH_2	18		[15]
51	H_2N-CH(NH)-Tyr-*D*Met-Gly-Phe-NH_2	220		[15]
52	Tyr-*D*Nle-Gly-Phe-NH_2	23		[15]
53	H_2N-CH(NH)-Tyr-*D*Nle-Gly-Phe-NH_2	130		[15]
54	Tyr-*D*MetO-Gly-Phe -ol	2,7		[72]
55	-NH-NH-CO-CH_2-CH_3		3,2	[50]
56	CH_3-Tyr-*D*MetO-Gly-Phe-ol CH_3 Tyr-*D*MetO-Gly —— Phe	0,9		[72]
57	-ol	18 500		[72]
58	-NH-NH-CO-CH_2-CH_3		4,7 4,2	[78] [50]
59	CH_3-Tyr-*D*MetO-Gly —— Phe-ol CH_3	21 700		[72]
60	Tyr-Gly-Phe-Met	0,004		[17]
61	-NH_2	0,02		[17]
62	Tyr-*D*Ala-Phe-Met	0,02		[17]
63	-OCH_3	0,4		[17]
64	-ol	0,5		[17]
65	-NH_2	1,2		[17]
66	-NH-CH_2-CH_3	0,2		[17]
67	-NH-CH_2-CH_2OH	0,1		[17]
68	Tyr-*D*Ala-Phe-MetO-ol	0,2		[17]
69	Tyr-βAla-Phe-Met-OCH_3	<0,03		[68]
70	Tyr-*D*Ala-Phe-Leu-NH_2	1,2		[17]
71	Tyr-*D*Ala-Thi-Leu-NH_2	0,18		[79]
72	Tyr-*D*Ala-Trp-Leu-NH_2	0,93		[79]

Таблица 2 (окончание)

Номер	Пептид *	Относительное сродство [2*]		Литература
		Тест ПКМС	РРА	
73	Tyr-*D*Ala-ΔPhe-Met-NH_2	0,02		[17]
74	Tyr-Ala-Phe-Leu-NH_2	0,04		[16]
75	Tyr-Ala-Phe-Met-NH_2	0,09		[16]
76	Tyr-Aib-Phe-Leu-NH_2	0,06		[16]
77	Tyr-Aib-Phe-Met-NH_2	0,10		[16]
78	Tyr-Pro-Phe-Met-NH_2	0,37		[16]
79	Tyr-*D*Pro-Phe-Met-NH_2	0		[16]

* В таблице использованы сокращения нестандартных аминокислот и их производных в соответствии с рекомендациями NC IUPAC-IUB (Eur. J. Biochem., 1984, т. 138, № 1, p. 9—37): MetO — метионин-S-оксид, Phe(NO_2) — *n*-нитрофенилаланин; βAla — β-аланин (3-аминопропионовая кислота; Aib — α-аминоизомасляная кислота; Nva — норвалин (2-аминовалериановая кислота; Nle — норлейцин (2-аминокапроновая кислота); Thi — β-2-тиенилаланин (2-амино-3-(2′-тиенил)пропионовая кислота); ΔAla, ΔPhe — соответствующие α, β-дегидроаминокислоты Z-конфигурации, т. е. с боковыми радикалами аминокислоты и карбонильной группы в *транс*-положении. В пептидах, отличающихся от предыдущего лишь модификацией карбоксильной группы С-концевого остатка, представлена только эта модификация: -ol — карбоксильная группа восстановлена до спиртовой; For — формил. Gly—$\overset{CH_3}{}$Phe — обозначение пептидной связи, образованной N^{α}-метилзамещенным фенилаланином. В других подобных случаях обозначение аналогично.

[2*] Сродство [Met^5]энкефалина принято за единицу.

остаток во втором положении имеет *D*-конфигурацию. Увеличения аффинности к рецепторам у тетрапептидов природной последовательности можно добиться и другим способом — введением достаточно длинного гидрофобного заместителя в С-конец (5, 6).

Удачная С-терминальная модификация тетрапептида амидной группой с изоамиловым радикалом (11—13, 32—35, 38, 39) фактически представляет собой декарбоксилирование [Leu^5]энкефалина. Она сильно снижает δ-рецепторную активность соединений, делая их более селективными по отношению к μ-рецепторам [69]. Можно предположить, что единственным элементом пятой аминокислоты, имеющим значение при активации μ-рецепторов, является ее боковой радикал, а удлиняющая остов пептидная связь в этом процессе несущественна. Это подтверждается высоким сродством к рецепторам соединения (29) — декарбоксилированного производного [Met^5]энкефалина, сходного с (11).

Об участии бокового радикала остатка лейцина-5 во взаимодействии с опиатными рецепторами свидетельствует также то, что обмен его изопропильной части на фенильный радикал (33) заметно снижает опиоидную активность. Наличие разветвленной алкильной структуры не является критическим условием, так как замена третичного углерода азотом (30) или даже его окисью (31) приводит к дальнейшему повышению опиоидной активности. В некоторых случаях приемлемо циклическое строение амидного производного (14, 47), а при использовании тиолактонового кольца (48) μ-рецепторная активность достигает очень высокого уровня.

Чтобы получить представление о желательной структуре С-концевой амидной группировки, был осуществлен синтез соединений с третичным амидным азотом. Использование метильного радикала (12, 32) не вызывает заметных изменений опиоидной активности по сравнению с соответствующими вторичными амидами (11, 27), введение же арилрадикалов (13, 34, 35) приводит к ее внушительному снижению.

Большего внимания в плане повышения активности заслуживают данные по метилированию -NH-группы, как N-концевой, так и в составе пептидного остова молекулы, главным образом в четвертом положении (см. ниже). N^{α}-Метилирование остатков аминокислот во втором и третьем положениях вызывает значительное подавление активности соответствующих аналогов, по-видимому, в связи с лишением пептидной молекулы возможности принять необходимую для взаимодействия с опиатными рецепторами конформацию [80]. Была попытка N-метилированием пептидной связи Gly^3-Phe^4 придать тетрапептидным аналогам стойкость по отношению к пептидилдипептидазам. Последние предположительно являются

основными катаболическими ферментами энкефалинов в организме, мишенью действия которых служит данная пептидная связь [81]. Важным фактором является то, что такое N-метилирование (26, 27) не снижает ощутимо опиоидную активность по сравнению с исходными соединениями (10, 11). Более того, у соединения (57) отмечено чрезвычайное ее повышение по тесту ПКМС по сравнению с неметилированным аналогом (54) [72]. Этот феномен вернее все-таки отнести к числу пока загадочных, так как опиоидная активность соединения (57) по радиорецепторному анализу гораздо слабее [78]. Не исключено, что в данном случае имеет место более выраженное разделение центральной и периферической опиоидных активностей, которое намечается также у аналога (48) [76].

Здесь уместно сказать, что N-метилирование N-концевой аминогруппы или остатка фенилаланина-4 способно частично защищать пептиды от действия протеиназ плазмы или мозга, но не сообщает подобную устойчивость к важным при системном введении вещества почечным протеолитическим ферментам. Этого, однако, можно добиться одновременным метилированием обеих этих позиций [82], причем двойное метилирование не изменяет заметно μ-рецепторную активность соединений (39—42). Метилирование только N-концевой аминогруппы (37, 56) может незначительно снижать μ-рецепторную активность по сравнению с неметилированными соединениями (11, 54), но это происходит не всегда (ср. (12) и (38)). Первичная аминогруппа на N-конце молекулы аналогично свободной С-концевой карбоксильной группе определяет повышенное сродство природных энкефалинов к δ-рецепторам. Ее метилирование в тетрапептидамидах приводит преимущественно к взаимодействию с μ-рецепторами [69].

Алкилирование N-концевой аминогруппы другими радикалами вызывает различные последствия. Если использование циклопропильного радикала (43) практически инактивирует тетрапептид, то появление гуанидиновой группы (51, 53) способно десятикратно повышать опиоидную активность аналогов. Высказано мнение, что гуанидиновые аналоги лучше связываются с опиатными рецепторами, так как могут образовывать дополнительные лиганд-рецепторные водородные связи [15], но это остается пока на уровне экспериментально не подтвержденных догадок.

При превращении С-концевой амидной группы тетрапептида (10) в гидразидную (15) не происходит ощутимого изменения μ-рецепторной активности. Допустимо без ущерба для последней дальнейшее присоединение к гидразидной группе дополнительных аминокислот (17—19) или ацилрадикалов (16, 36, 55, 58), что оказывает благотворное влияние на анальгетическую активность этих аналогов (см. ниже).

Ограничение конформационной подвижности пептидного остова на С-конце молекулы путем C^{α}-метилирования фенилаланина-4 (20) существенно не влияет на определенную тестом ПКМС опиоидную активность аналога по сравнению с исходным тетрапептидом (8). Однако наметившееся уже у аналога (8) несоответствие между периферической и центральной опиоидными активностями с отчетливо пониженной последней еще более выражено у соединения (20).

Вариации в довольно широких пределах допустимы во втором положении молекулы. Наиболее широко в работах по синтезу использован *D*-аланин, но, по-видимому, он не является самой оптимальной аминокислотой, так как более высоким сродством к μ-рецепторам отличаются тетрапептиды, у которых во второе положение введены другие аминокислоты *D*-конфигурации, такие, как *D*-аргинин (44), *D*-норлейцин (52), *D*-метионин (50) или *D*-метиониноксид (54). Очень высокой активности можно достичь введением во второе положение *D*-лизина с формилированной N^{ε}-аминогруппой (45—48). Если боковому радикалу второй аминокислоты искусственно придается жесткость (например, как у дегидроаланина), такое соединение (49) практически неактивно. В случае пентапептида [*D*Ala^2,Leu^5]-энкефалина введение дегидроаланина-2 не понижает опиоидную активность аналога [77]. Это является доказательством того, что неактивность аналога (49) определяется отсутствием конформационной подвижности остатка дегидроаланина, а не несоответствием его опиатному рецептору.

Остаток фенилаланина-4 в молекуле тетрапептида имеет важное значение, но существенны лишь отдельные его структурные элементы. Подробнее этот вопрос рассмотрен в разделе о трипептидных производных энкефалина. Замена этого остатка на аминокислоту с гидрофобным боковым радикалом (21) сильно снижает опиоидную активность, триптофан дает почти одинаковое по активности соединение (22). Введение *n*-нитрогруппы в ароматическое кольцо фенилаланина способно заметно повысить μ-рецепторную активность аналогов, в особенности для тетрапептидамида (24). Интересно, что соответствующее гидразидное производное (25) имеет неожиданно низкую активность.

Установлено, что тетрапептиды с высокой опиоидной активностью можно получить из нативных энкефалинов также делецией среднего глицина. Простое выщепление глицина-3 приводит к инактивации [Leu^5]энкефалина, и активное соединение, как и для N-концевого тетрапептида, можно получить лишь при введении во второе положение укороченной молекулы аминокислоты *D*-конфигурации и амидировании С-конца молекулы (70) [17]. С равным успехом подобную делецию можно произвести и у [Met^5]энкефалина (65). У этой группы тетрапептидов также возможна замена фенилаланина на триптофан (72) без заметного ущерба в опиоидной активности (но не на β-тиенилаланин (71)).

Ограничение конформационной подвижности бокового радикала фенилаланина путем введения дегидрофенилаланина (соединение (73)) инактивирует тетрапептид (65), в то время как в случае пентапептида подобная модификация повышает сродство аналога к опиатным рецепторам [83]. Как отмечено выше, сходная закономерность была установлена при замене *D*-аланина-2 на дегидроаланин.

Аналог des-Gly^3-[Met^5]энкефалина с весьма высокой опиоидной активностью получен при замене Gly^2 → Pro^2 (ср. (61) и (78)), нежелательной для пентапептидов [41]. Введение *D*-пролина-2 дает совершенно неактивное соединение (79). Таким образом, пролин является единственной известной стандартной аминокислотой, для которой *L*-конфигурация в дез-Gly^3-энкефалинах предпочтительнее, поскольку даже *L*-аланин-2 в этом положении неприемлем (74, 75). Попытки применения β-аланина (69) или α-аминоизомасляной кислоты вместо остатка глицина-2 (76, 77) дали отрицательные результаты.

Обычно тетрапептидные аналоги энкефалина предпочитают μ-рецепторы [25, 51, 69], отличаясь этим почти от всех более родственных природным энкефалинам пентапептидных аналогов, которые лучше взаимодействуют с δ-рецепторами [22]. К интересным результатам привела димеризация тетрапептидамидов соединением их С-концевых амидных групп посредством метиленового мостика:

$$\text{Tyr} \rightarrow \textit{D}\text{Ala} \rightarrow \text{Gly} \rightarrow \text{Phe} \rightarrow \text{NH-(CH}_2)_n\text{-NH} \leftarrow \text{Phe} \leftarrow \text{Gly} \leftarrow \textit{D}\text{Ala} \leftarrow \text{Tyr}$$

При короткой метиленовой цепи димер, образованный из пептида (10), имеет неплохую μ-рецепторную активность, однако при $n \simeq 12$ она резко снижается. По утверждению авторов из Национальных институтов здоровья [84], последнее соединение обнаруживает высокое сродство к δ-рецепторам и, таким образом, является очень избирательным к ним лигандом с соотношением активностей δ/μ, равным 91. Ввиду определенных экспериментальных погрешностей это заключение вряд ли соответствует истине; другие исследователи [85] отрицают его выраженную δ-селективность и на основе радиорецепторного анализа доказывают, что сродство к δ-рецепторам относительно слабое. С этим хорошо согласуются и результаты работы [86] о слабой активности данного димера в тесте СПМ.

Из приведенных данных тем не менее следует, что димеризация тетрапептидамидов снижает их μ-рецепторную активность гораздо сильнее, чем δ-рецепторную. Высказано мнение, что это обусловлено способностью таких соединений при определенной длине метиленового мостика связываться одновременно с двумя δ-рецепторами; возможно, взаиморасположение μ-рецепторов в синаптической мембране препятствует такому взаимодействию [84, 86].

С прикладной точки зрения создание опиоидных антагонистов на пептидной основе является не менее важной задачей, чем изыскание новых селективных агонистов. Синтезированные до сих пор чистые антагонисты на основе наркотических анальгетиков отличаются или практически полным отсутствием избирательности к подклассам опиатных рецепторов (дипренорфин), или относительным предпочтением к μ-рецепторам (налоксон) [87]. Такое положение ставит в затруднительное положение физиологов и фармакологов при выяснении четкой роли опиатных рецепторов конкретного типа в организме и попытке целенаправленного воздействия на них в терапевтических целях. Сами антагонисты имеют непосредственное лечебное значение в случаях острого отравления наркотическими анальгетиками, а также являются потенциальным поддерживающим средством при лечении наркомании.

Попытки создания антагонистов на основе апробированного на опиоидных алкалоидах эффективного приема алкилирования N-концевой аминогруппы аллильным [88—90] или циклопропилметильным [74] остатком были тщетными, так как соединения данного типа оказались очень слабыми агонистами, лишенными заметного антагонистического действия. Однако производным [Leu^5]энкефалина можно придавать антагонистические свойства введением в N-концевую аминогруппу не одного, а двух аллильных радикалов [91]. Синтезированные вещества такого типа обладали избирательным δ-рецепторным антагонистическим действием, но, к сожалению, очень слабым. Значительный прогресс на этом пути был достигнут при обращении к более коротким пептидам. $(CH_2{=}CH{-}CH_2)_2$-Tyr-Aib-Phe-Leu оказался исключительно избирательным δ-рецепторным антагонистом с близкой к налоксону активностью [92]. Полученные результаты позволяют надеяться, что остроощутимая потребность в δ-селективных антагонистах будет удовлетворена в самое ближайшее время.

Некоторый сдвиг наметился также в области создания на пептидной основе μ-специфических антагонистов, более селективных, чем налоксон и налтрексон. И здесь весьма обнадеживающим стало обращение к тетрапептидным аналогам энкефалина. Было установлено, что замещение в амидной группе тетрапептидамидов обоих водородных атомов определенными радикалами, один из которых должен быть 2-фенилэтильным, приводит к аналогам с четко выраженным μ-рецепторным антагонистическим эффектом [74]. Опиоидная активность соединений типа

$$\text{Tyr-}D\text{Ala-Gly}\overset{CH_3}{\text{—}}\text{Phe-NR-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}C_6H_5$$

меньше 0,001, а их способность подавлять действие норморфина в тесте СПМ по сравнению с налоксоном в зависимости от структуры радикала R следующая: $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)_2$ — 0,012; $-CH_2-CH_2-C_6H_5$ — 0,006; $-CH_2-CH_2-CH_2-S-CH_3$ — 0,010. Эти величины сравнительно малы, но важно то, что для достижения подавления действия [Met^5]энкефалина в тесте СПМ требуется десятикратная по отношению к нему концентрация данных пептидов. Таким образом, доказана принципиальная возможность создания μ-избирательных пептидных антагонистов и появилась надежда, что определено правильное направление для их дальнейшего плодотворного поиска.

Анальгетическая активность тетрапептидов энкефалина

Как и следовало ожидать на основании результатов по взаимодействию с μ-рецепторами, некоторые тетрапептидные аналоги энкефалина обладают ярко выраженным анальгетическим эффектом. Если природные энкефалины при системном введении не оказывают болеутоляющего действия ввиду их быстрого метаболического расщепления в организме, то сообщенная молекуле пептида путем ее целенаправленной модификации стойкость к действию протеиназ привела к созданию тетрапептидных производных энкефалина, которые по своей молярной активности заметно

Таблица 3

Анальгетическая активность тетрапептидных аналогов энкефалина при системном введении

Номер	Пептид	Относительная молярная анальгетическая активность *	Литература
8	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe	<0,16	[14]
		0,09	[95]
		0,24	[71]
		0,19	[96]
9	-ol	⩽0,01	[72]
10	-NH_2	0,8	[14]
		0,7	[97]
		1,0	[71]
		0,82	[96]
80	Tyr-*D*Ala-Gly-*D*Phe-NH_2	0,25	[96]
21	Tyr-*D*Ala-Gly-Leu-NH_2	0,16	[14]
22	Tyr-*D*Ala-Gly-Trp-NH_2	0,16	[14]
15	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe-NH-NH_2	0,14	[98]
		0	[71]
23	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe(NO_2)	2,1	[71]
24	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe(NO_2)-NH_2	2,6	[71]
		2,1	[96]
25	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe(NO_2)-NH-NH_2	1,7	[71]
		1,4	[96]
81	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe-NH-NH-CO-CH_2-CH_3	0,78	[98]
16	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe-NH-NH-CO-CH_2-CH_2-CH_3	1,1	[50]
		0,78	[98]
18	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe-NH-NH ← Leu	0,54	[71]
17	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe-NH-NH ← Gly	1,5	[71]
82	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe(NO_2)-NH-NH ← Met	2,1	[96]
83	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe(NO_2)-NH-NH ← Leu	1,3	[96]
84	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe(NO_2)-NH-NH ← Gly	2,5	[96]
14	Tyr-*D*Ala-Gly-Phe-NH-CH—CO | | CH_2 O \ / CH_2	0,1	[45]
26	Tyr-*D*Ala-Gly-CH(CH_3)—Phe-NH_2	0,8	[14]
		1,3	[99]
85	Tyr-*D*Ala-Gly-C(CH_2CH_3)(CH_2=CH=CH_2)—Phe-NH_2	220	[99]
86	Tyr-*D*Ala-Gly-C(|CH_2—CH_{CH_2}|)—Phe-NH_2	65	[99]
87	Tyr-*D*Ala-Gly-C(CH_2CH_2F)—Phe-NH_2	54	[99]
88	Tyr-*D*Ala-Gly-C(CH_2CH_3)—Phe-NH_2	50	[99]
89	Tyr-*D*Ala-Gly-C(CH_2CH_3)—Phe(F)-NH_2	3600	[99]
90	CH_3-Tyr-*D*Ala-Gly-C(CH_3)—Phe(F)-NH_2	57	[99]
28	Tyr-*D*Ala-Gly-C(CH_3)—Phe-NH-CH_2-CH_2OH	1,0	[51]
30	Tyr-*D*Ala-Gly-C(CH_3)—Phe-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)$_2$	2,1	[51]
31	Tyr-*D*Ala-Gly-C(CH_3)—Phe-NH-CH_2-CH_2-N(O)(CH_3)$_2$	9,6	[51]
36	Tyr-*D*Ala-Gly-C(CH_3)—Phe-NH-NH-CO-CH_2-CH_3	3,9	[50]
91	CH_3-Tyr-*D*Ala-Gly-C(CH_3)—Phe-NH-NH-CO-CH_2-CH_3	3,3	[80]
44	Tyr-*D*Arg-Gly-Phe	0,37	[75]

Номер	Пептид	Относительная молярная анальгетическая активность *	Литература
48	Tyr-*D*Lys(For)-Gly-Phe-NH-CH(CO)—CH_2-CH_2-S	1,1	[76]
52	Tyr-*D*Nle-Gly-Phe-NH_2	1,2	[15]
50	Tyr-*D*Met-Gly-Phe-NH_2	2,2	[15]
54	Tyr-*D*MetO-Gly-Phe-ol	1,4	[72]
		1,1	[90]
56	CH_3-Tyr-*D*MetO-Gly-Phe-ol	1,2	[72]
92	Tyr-*D*MetO-Gly-Phe-NH_2	1,6	[100]
93	Tyr-*D*MetO-Gly-Phe-NH-NH_2	3,2	[100]
55	Tyr-*D*MetO-Gly-Phe-NH-NH-CO-CH_2-CH_3	7,6	[50]
94	CH_3-Tyr-*D*MetO-Gly-Phe-NH-NH-CO-CH_2-CH_3	1,8	[80]
95	Tyr-*D*MetO-Gly-Phe-NH-NH-CO-CH_2-CH_2-CH_3	1,8	[100]
57	Tyr-*D*MetO-Gly-CH(CH)—Phe-ol	9,1	[72]
		9,4	[90]
59	CH_3-Tyr-*D*MetO-Gly-C(CH_3)(CH_3)—Phe-ol	7,1	[72]
58	Tyr-*D*MetO-Gly-C(CH_3)—Phe-NH-NH-CO-CH_2-CH_3	10	[50]
51	H_2N-CH(NH)-Tyr-*D*Met-Gly-Phe-NH_2	4,4	[15]
53	H_2N-CH(NH)-Tyr-*D*Nle-Gly-Phe-NH_2	8,0	[15]

* За единицу принята активность морфина.

превосходят даже морфин. Наличие стойкости к катаболическим ферментам хотя и является необходимым условием для проявления пептидом анальгетического действия, не может быть определяющим фактором последнего, так как антиноцицептивная способность пептидов не коррелирует с их периодом полураспада в организме даже при наличии у этих пептидов близкого сродства к опиатным рецепторам [51, 93].

Очевидно, пептиды как болеутоляющие средства должны обладать способностью к проникновению, возможно и ограниченному, через гематоэнцефалический барьер и, вероятно, какими-то другими, пока еще неясно представляемыми свойствами. В настоящее время совокупность данных по анальгетической активности опиоидных пептидов напоминает эмпирически собранный каталог фактов, где весьма еще нечетко лишь намечаются некоторые закономерности (табл. 3). С целью облегчения сравнения активности разных соединений все литературные данные по обезболивающей активности пептидов нормализованы по отношению к морфину, использованному в качестве стандартного вещества почти во всех исследованиях, и выражены в относительной молярной активности, т. е. в способности пептида вызывать определенный уровень анальгетического эффекта по сравнению с морфином при равных молярных дозах на единицу массы животного.

Несколько неожиданным оказалось то, что простое амидирование *D*Ala[2]-содержащего тетрапептида (8), который проявляет едва уловимую анальгетическую активность [71], приводит к соединению (10), близкому по своей активности к морфину [14, 94]. При наличии в молекуле пятой аминокислоты соответствующий пентапептид с *D*-лейцинамидом в качестве С-концевого остатка обладает гораздо более слабым обезболивающим эффектом [14]. Вызывает удивление относительно высокая антиноцицептивная способность пептида, содержащего *D*-фенилаланин-4 (80), поскольку [*D*Phe[4], Met[5]]энкефалин μ-рецепторной активностью не обладает [41]. К сожалению, авторами работы [41] не сообщена величина последней у пептида (80), которая позволила бы более доказательно судить о том, имеет ли место в данном случае еще одно существенное отличие в структурно-функциональной зависимости между тетра- и пентапептидами.

В полном согласии со структурными требованиями к проявлению тетрапептидами сродства к μ-рецепторам для наличия у них анальгетической активности также необходима *D*-конфигурация остатка второй аминокислоты. При этом тетрапептидамиды, имеющие во втором положении *D*-аланин (10), *D*-аргинин (44), *D*-норлейцин (52), *D*-метионин (50), обладают сходной антиноцицептивной активностью, тогда как для тетрапептидов с аминоспиртом на С-конце природа *D*-аминокислотного остатка во втором положении имеет более жесткие требования (ср. (9) и (54)). Анальгетическая активность пептида (54) может быть значительно повышена соответствующими манипуляциями с С-концевой областью молекулы: активность соединений (57), (58) десятикратно превышает активность морфина. Продолжительность обезболивающего действия аналога (57) также превосходит соответствующий показатель морфина [72, 101]. Установлено, что антиноцицептивное действие опиоидного тетрапептида (57) и эффект морфина аддитивны [101]. При более детальном изучении возможностей модификации бокового радикала *D*-метиониноксида было выяснено [100], что как размер этого радикала, так и степень его гидрофильности являются критическими для обеспечения наивысшего анальгетического эффекта. Важна даже хиральность атома серы, так как соединение с *S*-диастереоизомером *D*-метиониноксида в 2 раза активнее его изомера с *R*-конфигурацией [100].

Повышенный болеутоляющий эффект тетрапептидов по сравнению с *D*Ala^2-содержащими аналогами обеспечивают кроме *D*-метиониноксида также и некоторые другие аминокислоты во втором положении: *D*-глутамин, метиламид *D*-глутаминовой кислоты и *D*-треонин. Введение в это положение аминокислот кислого характера, например *D*-глутаминовой кислоты, лишает вещества обезболивающей активности, но остатки основных аминокислот *D*-аргинина и *D*-лизина вполне приемлемы [100]. Хорошей обезболивающей активностью обладает также пептид (48), в котором ε-аминогруппа *D*-лизина формилирована, но введение в остаток *D*-лизина более объемного N^2-заместителя, такого, как 2-хлоркарбобензоксигруппа, явно снижает болеутоляющий эффект [100], вероятно, в связи со стерическим затруднением образования лиганд-рецепторного комплекса.

В случае тетрапептидов со свободной карбоксильной группой аналог (44), содержащий *D*-аргинин, активнее соединения (8) с *D*-аланином. Следует отметить, что повышенный болеутоляющий эффект пептида (44) никоим образом не связан с его сходной с киторфином N-концевой структурой, так как соединение (44) обладает не свойственной киторфину высокой μ-рецепторной активностью (табл. 2), и притом ни один из известных производных киторфина не проявляет анальгетическую активность при системном введении [57].

Существенное значение для проявления тетрапептидом болеутоляющего эффекта имеет структура аминокислоты в четвертом положении. Если присутствующий в природном энкефалине фенилаланин-4 заменить на лейцин (21) или триптофан (22), то анальгетическая активность снижается, хотя и не исчезает полностью, в то время как нитрование фенилаланина приводит к ее заметному повышению (24). Введение в ароматическое кольцо *n*-нитрогруппы оказывает столь значительное влияние на проявление анальгетического эффекта, что роль С-концевого заместителя в этом случае становится малозначительной — соединения, превосходящие по активности морфин, получены как при наличии у тетрапептида свободного С-конца (23), так и при введении в него амидной (24) или гидразидной (25) группы. К еще более значительному повышению обезболивающей активности приводит использование в качестве заместителя в *n*-положении ароматического кольца фенилаланина атома фтора (89).

При незамещенном бензольном кольце фенилаланина-4 присутствие С-концевой гидразидной группы заметно снижает или вообще устраняет анальгетический эффект у аналога (15), дополнительные модификации гидразидной группы способны вызывать значительное его повышение. Введение в качестве заместителя гидразидной группы дополнительной аминокислоты [71] при наличии в пептиде фенилаланина-4 сообщает аналогам (17, 18) повышенную обезболивающую способность по сравнению

с незамещенным тетрапептидгидразидом (15); в $Phe^4(NO_2)$-аналогах ее прирост выражен значительно слабее (82—84). В обоих случаях введение в гидразидную группу глицина (17, 84) наиболее выгодно.

Другие ацилгидразидные аналоги с короткими неразветвленными ацильными радикалами (16, 81) также проявляют антиноцицептивную способность [94], в то время как разветвление или заметное удлинение ацильного остатка приводит к снижению анальгетической активности [98]. Прямое алкилирование гидразидной группы, в особенности затрагивающее проксимальный азот, дает неутешительные результаты [80].

Выше были рассмотрены попытки метилирования молекул тетрапептидных аналогов энкефалина с целью сообщения им устойчивости по отношению к протеиназам организма. Концепция некоторых авторов [49, 80], состоящая в том, что главным, если не единственным, эффектом N-метилирования является защита от протеолитического расщепления, кажется сомнительной. Придерживаясь такой точки зрения, трудно объяснить то, что даже двукратно метилированные соединения (59, 91) с высокой стойкостью к разным протеиназам организма [82] уступают по болеутоляющей способности менее стабильным родственным соединениям (36, 57) с одним метильным радикалом. Анальгетическая активность тетрапептидов с метилированной N-терминальной аминогруппой (56, 94) ниже активности соответствующих неметилированных соединений (54, 55) по крайней мере при их парэнтеральном введении. Данная модификация оказывает благоприятное влияние лишь в отдельных слабоизученных случаях их приема внутрь [99].

Эти данные позволяют предположить, что защита пептида против протеолитического расщепления — лишь второстепенный фактор N-метилирования остатка фенилаланина-4, приводящего в указанных случаях к значительному приросту анальгетической активности. Основным выигрышным моментом является придача пептидной молекуле более подходящей вторичной структуры с целью улучшения взаимодействия с опиатными рецепторами. Доводом в пользу этого допущения может служить то, что гуанидинирование тетрапептидамидов (см. 51, 53) приводит к заметному увеличению их анальгетической активности (так же как и их сродства к μ-рецепторам (табл. 2)), в то время как в случае пентапептидов гуанидинирование влечет за собой значительное снижение антиноцицептивного эффекта [15]. Болеутоляющее действие $DNle^2$-содержащего пептида (53), имеющего гуанидиногруппу, повышается по сравнению с исходным соединением (52) сильнее, чем в случае пептидов (50, 51), имеющих во втором положении *D*-метионин, что достоверно можно объяснить лишь различием в их взаимодействии с опиатными рецепторами, поскольку структуры аналогов слишком близки, чтобы различаться по стойкости к протеиназам.

Несколько неожиданным оказалось то, что у соединений с метилированной аминогруппой остатка фенилаланина-4 увеличение гидрофильности С-концевой области молекулы (30, 31) придает ей повышенную анальгетическую активность, что находится в противоречии с наблюдаемой у наркотических анальгетиков закономерностью [102] и общим представлением о том, что способность веществ к проникновению через гематоэнцефалический барьер при отсутствии механизма активного транспорта увеличивается с увеличением липофильности [103].

Самым убедительным аргументом в пользу предположения о первостепенной роли N-метилирования остатка фенилаланина-4 в изменении вторичной структуры тетрапептида служат данные по алкилированию амидной группы пептидной связи Gly^3-Phe^4 [99]. Стойкость к расщепляющим ферментам у аналогов с метильным (26) и этильным (85) заместителями должна быть примерно одинаковой, однако их анальгетическая активность различается в ~170 раз. По данным теста СПМ можно сделать ориентировочный вывод о таком же различии данных соединений во взаимодействии с опиатными рецепторами [99]. По всей вероятности, этильная группа существенно облегчает образование лиганд-рецепторного комплекса. При других модификациях амидной группы пептидной связи с использованием аллильного (86), циклопропилметильного (87) или 2-фторэтиль-

ного (88) радикала болеутоляющая активность ухудшается по сравнению с пептидом (85), но остается еще относительно высокой.

При объединении в молекуле тетрапептидамида двух благоприятных модификаций: введение фтора в *п*-положение ароматического кольца фенилаланина-4 и N-этилирование его остатка — был синтезирован супераналог (89), превосходящий при подкожном введении мышам морфин по анальгетической активности в 3600 раз [99]. Возможно, что дополнительные ресурсы дальнейшей оптимизации структуры пептида (89) заложены в более выгодной по сравнению с *D*-аланином модификации второго положения. Метилирование N-концевой аминогруппы (соединение 90) катастрофически снижает болеутоляющую активность при подкожном введении, подтверждая еще раз отрицательный эффект такой модификации (см. выше). Перспективность соединения (89) для терапевтических целей, однако, пока неясна, так как известно, что фторсодержащие ароматические соединения отличаются сильно выраженной токсичностью [104].

В ходе поиска веществ с высокой анальгетической активностью в ряду пентапептидных производных энкефалина была выявлена неблагоприятная прямая корреляция между болеутоляющим эффектом и способностью вызывать физическое пристрастие [105]. Это свойственно и высокоанальгетическому тетрапептиду (57) [101]. Однако у соединения (36) установлено частичное нарушение прямой зависимости между антиноцицептивной активностью и вызывающим наркотическое привыкание потенциалом [106]. Показано разделение этих активностей также на примере опиоидного пентапептида меткефамида [107], поэтому есть основания надеяться, что принципиальных преград к созданию на пептидной основе болеутоляющего препарата, лишенного самых пагубных побочных явлений морфина, не существует.

Опиоидная активность ди- и трипептидов энкефалина

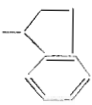
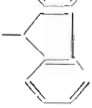
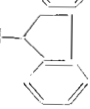
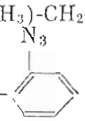
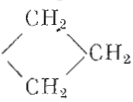
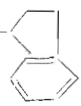
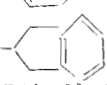
Удаление одной аминокислоты из пептидной цепи энкефалина при определенной модификации конечного тетрапептида не отражается пагубно на его опиоидной активности. Это наблюдение стимулировало исследования по дальнейшему укорочению молекулы. Хотя оказавшиеся успешными в случае тетрапептидов незатейливые модификации С-конца, например его амидирование (103, табл. 4), были безрезультатными, принцип сопутствующих замещений в С-терминальной карбоксильной группе фрагмента природного энкефалина, в особенности комбинированный с введением во второе положение аминокислоты *D*-конфигурации, дал положительные результаты и на уровне трипептидов.

Первым высокоактивным *D*Ala^2-содержащим трипептидом стал его β-фенилэтиламид (109), который синтезирован и изучен во многих лабораториях; его μ-рецепторная активность установлена в пределах от 0,57 до 4,4 (табл. 4). С целью лучшей унификации данных по обсуждаемым трипептидам это соединение выбрано нами в качестве вспомогательного отправного соединения в тех случаях, когда в публикациях не приведено их прямое сравнение с [Met^5]энкефалином. Величина относительной μ-рецепторной активности пептида (109) принята равной 0,88 согласно наиболее тщательно проведенным опытам в Абердинском университете [69].

Трипептидный аналог (109) можно рассматривать как производное высокоактивного тетрапептида (10) с отщепленной карбоксиамидной группой. Установлено, что удаление последней несколько понижает аффинность соединения к рецепторам, что верно также и для структурно очень близкого амида с левовращающим 1-бензилэтильным радикалом (111). Ясно, что присутствие этой группы не является критическим условием при взаимодействии пептидов с опиатными рецепторами. Однако трипептиды (109) и (111) лишены присущей тетрааналогу (10) анальгетической активности при системном введении [14]. Сродство к μ-рецепторам у пептида (109), по данным радиорецепторного анализа, даже в 1,7 раза выше, чем у родственного тетрапептида со свободной карбоксильной группой (8), а с δ-рецепторами аналог (109) взаимодействует слабее [69]. Таким об-

Таблица 4

Сродство к μ-рецепторам по тесту ПКМС ди- и трипептидных аналогов энкефалина *

Номер	Пептид	Относительное сродство **	Литература
96	Tyr-Gly-Gly	0	[66]
97	-NH-CH_2-CH_2-C_6H_5	≤0,015	[64]
	Tyr-*D*Ala		
98	-NH-CH_2-C_6H_5	0,08	[108]
99	-NH-CH_2-CH_2-C_6H_5	0,06	[108]
100	-NH-CH_2-CH_2-CH_2-C_6H_5	0,77	[108]
101	-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-C_6H_5	0,13	[108]
102	Tyr-*D*Ala-Gly	0	[43]
103	-NH_2	0	[14]
104	Tyr-Gly-Gly-NH— 	0,03 0,03	[64] [43]
105	Tyr-Aib-Gly-NH— 	0.06	[43]
106	Tyr-Gly-Aib-NH— 	0,01	[43]
	Tyr-*D*Ala-Gly		
107	-NH-CH_2-C_6H_5	0.62	[43]
108	-NH-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_3)$_2$	0,32 1,1	[63] [64]
109	-NH-CH_2-CH_2-C_6H_5	4,4 0,79 4,4 0.88 0,72 0,57 1,3	[13] [14] [63] [69] [109] [43] [64]
110	-N(CH_3)-CH_2-CH_2-C_6H_5	5,3 6,2	[13] [110]
111	-(−)-NH-CH(CH_3)-CH_2-C_6H_5	0,76	[14]
112	-NH-CH_2-CH_2— 	0,01	[109]
113	-NH-CH_2-CH_2— —N_3	0,003	[109]
114	-NH-CH_2-CH	0,18	[43]
115	-NH-CH_2-CH 	0,27	[43]
116	-NH— 	2,2	[43]
117	-NH— 	0,01	[43]
118	CH_3-Tyr-*D*Ala-Gly-NH-CH_2-CH_2-C_6H_5	0.50	[69]
119	Tyr-*D*Ala-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-C_6H_5	0,01	[64]
120	Tyr-*D*Ala-Gly-O-CH_2-C_6H_5	0,39	[43]
	Tyr-*D*Met-Gly		
121	-NH-CH(CH_3)-CH_2-CH(CH_3)$_2$	0,62 2,0	[63] [64]
122	-N(CH_3)-CH_2-CH_2-C_6H_5	31	[110]
123	Tyr-*D*MetO-NH-CH_2-CH_2-CH_2-C_6H_5	3,9	[110]
	Tyr-*D*MetO-Gly		

Номер	Пептид	Относительное сродство **	Литература
124	-NH-CH_2-CH_2-C_6H_5	5,5	[72]
125	-N(CH_3)-CH_2-C_6H_5	6,7	[110]
126	-N(CH_3)-CH_2-CH_2-C_6H_5	7,2	[72]
127	-N(CH_3)-CH<(CH_2-CH_2)>CH_2	0,29	[110]
128	CH_3-Tyr-*D*MetO-Gly-N(CH_3)-CH_2-CH_2-C_6H_5	47	[110]
129	Tyr-*D*Leu-Gly-N(CH_3)-CH_2-CH_2-C_6H_5	1,6	[110]
130	Tyr-*D*Ala-Phe	0	[108]
131	**-ol**	0,24	[108]
132	-NH_2	0,25	[108]
133	Tyr-*D*Ala-*D*Phe	0,001	[108]
134	-NH_2	0,02	[108]
135	Tyr-Ala-Phe-NH_2	0	[108]
136	Tyr-*D*Ala-Phe(Cl)-NH_2	0,01	[79]
137	Tyr-*D*Ser-Phe-NH_2	0,20	[79]
138	Tyr-Aib-Phe-NH_2	0,02	[108]
139	Tyr-*D*Arg-Phe-NH_2	0,44	[79]
140	Tyr-*D*Arg-Phe(Cl)-NH_2	0,08	[79]
141	Tyr-*D*Lys-Phe-NH_2	0,07	[79]
142	Tyr-*D*Met-Phe-NH_2	0,47	[79]
143	Tyr-*D*MetO_2-Phe-NH_2	0,28	[79]
144	Tyr-*D*MetO_2-Phe(Cl)-NH_2	0,01	[79]
145	Tyr-*D*Phe-Phe	0,001	[108]
146	-NH_2	0,23	[108]
147	Tyr-*D*Phe(Cl)-Phe-NH_2	0,44	[79]
148	Tyr-*D*Trp-Phe-NH_2	0,03	[79]
149	Tyr-*D*Thi-Phe-NH_2	0,03	[79]
150	Tyr-Pro-Phe-NH_2	0,19	[108]
151	Tyr-Pro-Phe(Cl)-NH_2	0,01	[79]
152	Tyr-*D*Pro-Phe-NH_2	0,001	[108]
153	Tyr-Hyp-Phe-NH_2	0	[79]
154	Tyr-ΔPro-Phe-NH_2	0,04	[79]
155	Tyr-Thz-Phe-NH_2	0,15	[79]
156	Tyr-Azt-Phe-NH_2	0,08	[79]
157	Tyr-Phe-Leu-NH_2	0	[108]
158	Tyr-Phe-Met-NH_2	0	[108]
159	Tyr-*D*Phe-NH_2	0,001	[108]
160	Tyr-*D*Phe-Leu-NH_2	0,04	[108]
161	Tyr-*D*Phe-*D*Leu-NH_2	0,002	[108]
162	Tyr-*D*Phe-Met-NH_2	0,09	[108]
163	Tyr-*D*Phe-*D*Met-NH_2	0,01	[108]
164	Tyr-*D*Phe-*D*Phe-NH_2	0,01	[108]
165	Tyr-*D*Phe-Trp-NH_2	0,22	[79]
166	Tyr-*D*Trp-Trp-NH_2	0,01	[79]
167	Lys-Tyr-*D*Ala-NH-CH_2-CH_2-CH_2-C_6H_5	0,39	[111]
168	Lys-Tyr-*D*Ala-Phe-NH_2	0,23	[111]
169	Lys-Tyr-*D*Arg-Phe-NH_2	0,27	[111]
170	Lys-Tyr-*D*Ser-Phe-NH_2	0,79	[111]

* В таблице дополнительно к разъясненным при табл. 2 сокращениям нестандартных аминокислот использованы следующие обозначения: MetO_2 — метионин-S-диоксид; Phe(Cl) — *n*-хлорфенилаланин; Hyp — 4-оксипролин; ΔPro — 3,4-дегидропролин; Thz — тиазолидин-4-карбоновая кислота; Azt — азетидин-2-карбоновая кислота.

** За единицу принято сродство [Met^5]энкефалина.

разом, данный трипептид можно сравнить с морфином в своем предпочтении к μ-рецепторам, которое можно усилить метилированием N-концевой аминогруппы (118) [70]. Использование в этой позиции аллильного радикала в случае трипептидов, так же как у тетрапептидов, лишь уменьшает их активность, но не способно сообщить им антагонистические свойства [90]. Метилирование С-концевого амидного азота несколько повышает (соединение (110)) опиоидную активность соединения (109), но снижает избирательность по отношению к μ-рецепторам [13].

Введение в бензольное кольцо β-фенилэтильного радикала азидной группы заметно инактивирует трипептид (109), причем *n*-положение (113)

более чувствительное, чем *о*-положение (112). Влияние таких эффективных в случае тетрапептидов *пара*-заместителей, как фтор или нитрогруппа, по нашим сведениям, в ряду трипептидов не изучено.

Исключительно важное значение имеет то, что близкую к [Met^5]энкефалину μ-рецепторную активность имеют трипептиды с чисто алкильным 2,4-диметилбутиламидным заместителем (108, 121) [63]. Данное наблюдение убедительно опровергает широко распространенные попытки [112, 113] проведения аналогии между структурой опиатных алкалоидов и энкефалинов, согласно которым ароматическое кольцо фенилаланина-4 или соответствующего элемента в С-концевой группе более коротких пептидов является непременным условием для обеспечения узнавания их опиатным рецептором. Результаты французских исследователей [63] неоспоримо доказывают, что ароматическая структура в С-терминальной области молекулы необходима только для взаимодействия с δ-рецепторами, а для проявления пептидами характерной для наркотических анальгетиков μ-рецепторной активности она не обязательна. Даже наоборот, ее отсутствие обусловливает возможность создания очень селективных μ-специфических лигандов. Например, соединение (108) обладает 50-кратно превышенной способностью ингибировать стереоспецифическое связывание [^{3}H]дигидроморфина по сравнению с [*D*Ala^2, *D*Leu^5, [^{3}H]Tyr] энкефалином [64]. На то, что для проявления анальгезии достаточна активация лишь μ-рецепторов, указывает тот факт, что высокоизбирательный μ-лиганд (121) проявляет при внутрижелудочковом введении устраняемый налоксоном болеутоляющий эффект, который в 3—4 раза сильнее, чем у морфина [114].

Избирательность трипептидов данного типа к μ-рецепторам можно повысить введением во второе положение *D*-метионина (121). Кроме 2,4-диметилбутилрадикала для получения активных трипептидамидов можно применять и некоторые другие заместители амидной группы алкильного характера, такие, как циклопропилметильный (114) или циклобутилметильный (115) радикал. Однако эти аналоги уступают по активности соединению (108).

Наиболее детально изучены допустимые вариации в структуре β-фенилэтильного радикала. Полученное при укорочении его длины на одну метиленовую группу бензилпроизводное (107) сохраняет μ-рецепторную активность неизменной. Весьма интересно, что ограничение конформационной подвижности бензиламида (107) посредством его циклизации в 1-аминоиндановую структуру (116) путем введения метиленового мостика способствует сродству к рецепторам. Причем 2-аминоиндановый изомер (117) практически неактивен, как полагают, ввиду стерических препятствий образованию лиганд-рецепторного комплекса [115]. Необходимое условие высокой активности 1-аминоиндановых производных — наличие остатка аминокислоты *D*-конфигурации во втором положении, так как соединения с природным глицином (104) или заменяющим его остатком α-аминоизомасляной кислоты (105) слабоактивны. α-Аминоизомасляная кислота не является приемлемым заместителем глицина и в третьем положении (106).

Следует отметить, что пригодность амидного заместителя оценивают его ван-дер-ваальсовым объемом (V_w). На основе анализа ряда приведенных в табл. 4 соединений для них предложено количественное соотношение этого показателя с μ-рецепторной активностью [115]:

$$\lg \text{ИК}_{50} = -1,583\, V_w + 2,698,$$

где ИК_{50} — молярная концентрация соединения, при которой вытесняется 50% специфически связанного меченого μ-лиганда в РРА. Так как V_w коррелирует с константой гидрофобности вещества, предлагаемая гипотеза фактически представляет собой попытку связать опиоидную активность трипептидамидов с их липофильностью.

Заслуживает внимания тот факт, что амидная структура трипептидов не является единственной возможной для придания им опиоидных свойств, бензиловый эфир (120) мало уступает по опиоидной активности соответствующему амиду (107).

В начале 80-х годов японские исследователи [116] синтезировали производное трипептида энкефалина (126), который проявляет при подкожном введении активность, превышающую молярную анальгетическую активность морфина в 1,14 раза. Продолжительность обезболивающего действия соединения (126) также близка к морфину [117]. Системный антиноцицептивный эффект у трипептидамида появляется только после метилирования β-фенилэтиламидогруппы, хотя аффинность к опиатным рецепторам соответствующего неметилированного соединения (124) мало отличается от таковой для (126). Кстати, в случае трипептидных производных энкефалина, как и в случае более длинных опиоидных пептидов, отмечается, что сродство к μ-рецепторам не коррелирует с обезболивающей способностью. Например, аналог с неокисленным *D*-метионином-2 (122) имеет очень высокую μ-рецепторную активность, но болеутоляющего действия не проявляет. С другой стороны, метилирование N-концевой аминогруппы соединения (126) приводит к аналогу (128) с повышенными как μ-рецепторной (в 47 раз активнее [Met^5]энкефалина), так и анальгетической (в 1,77 раза активнее морфина) активностями [110]. Это отличается от вышерассмотренного типичного влияния такого замещения на уровне тетрапептидов и оставляет открытым вопрос о роли метилирования N-концевой аминогруппы как возможного приема повышения антиноцицептивного действия опиоидных пептидов.

При изыскании способов придания трипептидам обезболивающей способности важно учитывать роль метионин-S-оксида-2 (126), так как вещества аналогичной структуры с *D*-аланином-2 (110), *D*-лейцином-2 (129) и *D*-метионином-2 (122) при выраженном сродстве к μ-рецепторам антиноцицептивным эффектом не обладают.

Укорочение β-фенилэтильного амидного радикала у соединения (126) на одну метиленовую группу (125) мало влияет как на μ-рецепторную, так и на анальгетическую активность, что хорошо согласуется с отмеченным ранее подобным влиянием у *D*Ala^2-содержащих трипептидов. Разветвление алкильной цепи введением дополнительной метильной группы у β-углеродного атома амидного заместителя анальгетическую активность снижает, а замена азотного метилрадикала на изопропильный у соединения (126) слегка ее повышает [90]. Лишение амидной группы ароматической структуры заменой β-фенилэтильной группы на циклогексильную (127) снижает обе активности, но не устраняет их полностью [110]. Таким образом, приведенное выше заключение о том, что взаимодействие с μ-рецепторами не требует присутствия ароматической структуры в С-конце молекулы, еще раз подтверждается примером положительного антиноцицептивного эффекта у соединений данного типа.

В Медицинской школе Колорадского университета систематически изучалась обширная группа трипептидов, которые можно представить как делеционные аналоги природного энкефалина. Соединения (157, 158), полученные совместным выщеплением второй и третьей аминокислот, полностью неактивны как в свободной, так и в амидированной форме [108]. Более многообещающими являются трипептиды, которые образованы посредством удаления третьей и пятой аминокислот. Дальнейшее укорочение дез-Gly^3-тетрапептидамидов показало, что дополнительное изъятие пятой аминокислоты существеннно не изменяет μ-рецепторную активность получаемых трипептидов и этим подтверждает отмеченную незначительную роль С-концевой аминокислоты нативных энкефалинов в их взаимодействии с опиатными рецепторами.

Допустимо удлинение делеционных трипептидов присоединением лизина к N-концу молекулы. Такая модификация либо мало влияет на их определяемую в тесте ПКМС активность (168, 169), либо несколько повышает ее (170) (ср. (132)). Но пока неясно, как это соотносить с данными по μ-специфическому радиорецепторному анализу, которые свидетельствуют о том, что опиоидная активность тетрапептида (168) в 100 раз меньше, чем активность аналога (132) [111]. Можно отметить, что N-терминальное удлинение трипептидов еще более уменьшает их и так ничтожное сродство к δ-рецепторам.

Аланин и другие аминокислоты *L*-конфигурации во втором положении делеционных трипептидов неприемлемы (135, 157, 158), за исключением пролина (150) и родственных ему структур: тиазолидин-4-карбоновой кислоты (155) и азетидин-2-карбоновой кислоты (156). α-Аминоизомасляная кислота-2 образует слабоактивное соединение (138). Только использование аминокислот *D*-конфигурации во втором положении сообщает трипептидамидам заметную опиоидную активность. Наиболее приемлемы *D*-метионин (142) и *D*-аргинин (139), но возможно использовать также *D*-аланин (134), *D*-серин (137), *D*-метионин-S-диоксид (143), *D*-фенилаланин (146) или лучше его *n*-хлорпроизводное (147). Худшие результаты получены при использовании *D*-лизина (141), *D*-триптофана (148) или β-2-тиенилаланина (149). Необходимое условие для проявления трипептидами опиоидной активности — наличие в молекуле амидной группы, так как соответствующие соединения со свободной карбоксильной группой (130, 145) неактивны. В единственном исследованном случае восстановления карбоксильной группы до спиртовой для *D*Ala^2-содержащего трипептида получено равное амиду по активности соединение (131).

Пролин, очевидно в силу своей циклической структуры, представляет исключение из отмеченной закономерности предпочтения наличия во втором положении аминокислот *D*-конфигурации. Трипептидамид с *D*-пролином-2 (152) практически неактивен, в то время как его аналог с *L*-энантиомером (150) обладает заметной опиоидной активностью. Дегидрогенизация 3,4-метиленовой связи в пирролидиновом кольце пролина (154) снижает активность, а введение гидроксильной группы в четвертое положение этого кольца (153) полностью инактивирует аналог. Применение других родственных пролину циклических аминокислот (155, 156) во втором положении сохраняет опиоидную активность трипептидов приблизительно на том же уровне.

Как уже отмечалось, трипептидные аналоги энкефалина, отвечающие его N-концевой последовательности, обладают сильно выраженным предпочтением к μ-рецепторам. Это характерно и для делеционных трипептидов. Определенное радиорецепторным анализом сродство к μ-рецепторам у соединения (139) в 89 раз превышает таковое к δ-рецепторам, несколько меньшее предпочтение проявляют соединения (132) и (137) [111].

Если введение хлора в *n*-положение ароматического кольца фенилаланина-2 благоприятно отражается на сродстве к μ-рецепторам соответствующих пептидов, то для Phe^3-аналогов (140), (144), (151) оно явно уменьшается. Неприемлемо использование и *D*-фенилаланина-3 (134).

Особого внимания заслуживает *D*-фенилаланин во втором положении. По-видимому, такое расположение позволяет проявлять ему двойственную функцию при образовании лиганд-рецепторного комплекса: роль второй аминокислоты *D*-конфигурации и свойственное С-концевой области молекулы энкефалина взаимодействие с рецепторной областью, которое обычно обеспечивается фенилаланином в четвертом или в делеционных аналогах — в третьем положении [108]. Данное предположение основано на том, что при наличии в трипептидамиде *D*-фенилаланина-2 (146) к положительному эффекту приводит замена фенилаланина-3 другими *L*-аминокислотами, например лейцином (160), метионином (162) и триптофаном (165). Другая ароматическая аминокислота — *D*-триптофан — не способна полноценно заменить *D*-фенилаланин в этой его функции (ср. (148) и (166)). Использование в *D*Phe^2-содержащих трипептидах аминокислот *D*-конфигурации в третьем положении менее желательно, хотя слабая опиоидная активность сохраняется (163, 164). Даже при удалении третьей аминокислоты *D*Phe^2-содержащий дипептидамид (159) имеет незначительную опиоидную активность, которая тем не менее свидетельствует о наличии в структуре молекулы всех необходимых элементов для полноценного взаимодействия с опиатными рецепторами; при достаточно высокой концентрации пептид (159) проявляет аналогичное [Met^5]энкефалину устраняемое налоксоном действие в тесте ПКМС [108]. Таким образом, Tyr-*D*Phe-NH_2 (159) является самым простым из известных соединений пептидной природы, обладающим опиоидной активностью. Отмечают, что Tyr-*D*Ala-NH_2

проявляет болеутоляющее действие при интрацистернальном введении [14], но нами ранее уже обсуждена сомнительность использования этих данных применительно к взаимодействию с опиатными рецепторами.

На пути к дипептидным производным с более значительной опиоидной активностью не оправдал себя прием, которым удалось осуществить переход от активных тетрапептидов к трипептидам (см. (10) → (109)): восстановление карбонильной группы С-концевого глицина в трипептиде (109) привело к практически неактивному амиду дипептида (119). Однако другой подход к синтезу, успешный в случае активных трипептидов, оказался таковым и при его применении к дипептидам. Систематическим подбором оптимальной длины метиленовой цепи, присоединяющей бензольное кольцо к амидному азоту, был синтезирован 3-фенилпропиламид *D*Ala²-содержащего дипептида (100), который лишь слегка уступает по опиоидной активности [Met⁵]энкефалину. Более близкое (98, 99) или отдаленное (101) расположение бензольного кольца дает худшие результаты. Относительно высокое сродство аналога (100) к μ-рецепторам подтверждается также радиорецепторным анализом [111]. Неожиданностью следует считать то, что этот дипептидамид обладает меньшей селективностью по отношению к μ-рецепторам по сравнению с ранее рассмотренными трипептидами. Удлинение дипептидамида с N-конца дополнительным остатком лизина (167) несколько снижает опиоидную активность аналога (100) и вряд ли является целесообразной модификацией, поскольку избирательность пептида (167) к μ-рецепторам по сравнению с дипептидамидом (100) заметно не улучшается [111].

Дипептидамид (100) обладает близким к [*D*Ala², Met⁵] энкефалинамиду устраняемым налоксоном антиноцицептивным эффектом при внутрижелудочковом введении [108]. Замена в этом дипептидамиде *D*-аланина на *D*-метиониноксид (123) способствует дальнейшему росту μ-рецепторной активности, причем и при системном введении у (123) отмечено уже слабое болеутоляющее действие [110]. Есть все основания полагать, что при тщательной оптимизации структуры амидного заместителя в сочетании с наиболее подходящей *D*-аминокислотой во втором положении удастся создать на уровне дипептидов соединения, которые будут по своему сродству к опиатным рецепторам превосходить природные энкефалины и обладать эффективным обезболивающим действием.

Критически обобщая изложенный анализ данных литературы по коротким аналогам энкефалина, можно заключить, что начальное представление, согласно которому для морфиноподобного действия молекула энкефалина должна иметь все пять аминокислот природного соединения, сугубо ошибочно. Структурная организация участка молекулы, который обеспечивает полноценное взаимодействие с μ-специфическим подклассом опиатных рецепторов, гораздо проще. Это позволяет при выборе стратегического направления поиска новых болеутоляющих препаратов пептидного характера смело отходить от структуры природных энкефалинов и вести целенаправленные исследования на основе теоретически обоснованно выбранных более коротких пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pert C. B., Snyder S. H.* Science, 1973, v. 179, № 4077, p. 1011—1014.
2. *Terenius L.* Acta pharmacol. et toxicol., 1973, v. 33, № 5—6, p. 377—384.
3. *Simon E. J., Hiller J. M., Edelman I.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, № 7, p. 1947—1949.
4. *Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R.* Nature, 1975, v. 258, № 5536, p. 577—579.
5. *Civelli O., Birnberg N., Comb M., Douglass J., Lissitzky J. C., Uhler M., Herbert E.* Peptides, 1983, v. 4, № 5, p. 651—656.
6. *Paterson S. J., Robson L. E., Kosterlitz H. W.* Brit. Med. Bull., 1983, v. 39, № 1, p. 31—36.
7. *Zukin R. S., Zukin S. R.* Trends in Neurosci., 1984, v. 5, № 5, p. 160—164.
8. *Чипенс Г. И.* Синтез и исследование структурной и функциональной организации некоторых пептидных гормонов и кининов: Дис. ... д-ра хим. н. Рига: ИХ АН ЛатвССР, 1973, с. 78.
9. *Snyder S. H., Childers S. R.* Annual Rev. Neurosci., 1979, v. 2, p. 35—64.

10. *Miller R. J.*, *Cuatrecasas P.* In: Vitamins and hormones/Ed. Munson P. L. N. Y.: Acad. Press, 1978, v. 36, p. 297—382.
11. *Coy D. H.*, *Kastin A. J.* Pharmacol. and Ther., 1980, v. 10, № 3, p. 657—668.
12. *Morley J. S.* Annual Rev. Pharmacol. and Toxicol., 1980, v. 20, p. 81—110.
13. *Morgan B. A.*, *Bower J. D.*, *Guest K. P.*, *Handa B. K.*, *Metcalf G.*, *Smith C. F.* In: Peptides: Proc. of the 5-th Amer. Pept. Symp./Eds Goodman M., Meienhofer J. N. Y.: J. Wiley and Sons, 1977, p. 111—113.
14. *McGregor W. H.*, *Stein L.*, *Belluzzi J. D.* Life Sci., 1978, v. 23, № 13, p. 1371—1376.
15. *Bajusz S.*, *Rònai A. Z.*, *Szèkely J. I.*, *Miglècz E.*, *Berzètei I.* FEBS Lett., 1980, v. 110, № 1, p. 85—87.
16. *Vavrek R. J.*, *York E. J.*, *Stewart J. M.* In: Peptides. Chemistry, structure and function: Proc. of the 7-th Amer. Pept. Symp./Eds Rich D. H., Gross E. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company, 1981, p. 629—631.
17. *Chipkin R. E.*, *Morris D. H.*, *English M. G.*, *Rosamond J. D.*, *Stammer C. H.*, *York E. J.*, *Stewart J. M.* Life Sci., 1981, v. 28, № 13, p. 1517—1522.
18. *Булаев В. М.* В кн.: Опиоидные пептиды и их рецепторы/Ред. Ашмарин И. П. (Итоги науки и техники. Серия: Фармакология, химиотерапевтические средства, т. 13). М.: ВИНИТИ, 1982, с. 101—184.
19. *Pert C. B.*, *Snyder S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, № 8, p. 2243—2247.
20. *Wilson R. S.*, *Rogers M. E.*, *Pert C. B.*, *Snyder S. H.* J. Med. Chem., 1975, v. 18, № 3, p. 240—242.
21. *Stahl K. D.*, *van Bever W.*, *Janssen P.*, *Simon E. J.* Eur. J. Pharmacol., 1977, v. 46, № 3, p. 199—205.
22. *Lord J. A.*, *Waterfield A. A.*, *Hughes J.*, *Kosterlitz H. W.* Nature, 1977, v. 267, № 5611, p. 495—499.
23. *Chavkin C.*, *James I. F.*, *Goldstein A.* Science, 1982, v. 215, № 4531, p. 413—415.
24. *Corbett A. D.*, *Paterson S. J.*, *McKnight A. T.*, *Magnan J.*, *Kosterlitz H. W.* Nature, 1982, v. 299, № 5878, p. 79—81.
25. *Rònai A. Z.*, *Szèkely J. I.*, *Berzètei I.*, *Miglècz E.*, *Bajusz S.* Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1979, v. 91, № 4, p. 1239—1249.
26. *Kosterlitz H. W.*, *Paterson S. J.*, *Robson L. E.* Brit. J. Pharm., 1981, v. 73, № 4, p. 939—949.
27. *Zajac J. M.*, *Gacel C.*, *Petit F.*, *Dodey P.*, *Rossignol P.*, *Roques B. P.* Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1983, v. 111, № 2, p. 390—397.
28. *Gillan M. G.*, *Kosterlitz H. W.* Brit. J. Pharm., 1982, v. 77, № 3, p. 461—468.
29. *Kosterlitz H. W.*, *Paterson S. J.* Brit. J. Pharm., 1981, v. 73, № 1, p. 299P.
30. *Creese I.*, *Snyder S. H.* J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1975, v. 194, № 1, p. 205—219.
31. *Paton W. D.* Brit. J. Pharm., 1957, v. 12, № 1, p. 119—127.
32. *Waterfield A. A.*, *Smokcum R. W.*, *Hughes J.*, *Kosterlitz H. W.*, *Henderson G.* Eur. J. Pharmacol., 1977, v. 43, № 2, p. 107—116.
33. *Schulz R.*, *Wüster M.*, *Rubini A.*, *Herz A.* J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1981, v. 219, № 2, p. 547—550.
34. *Vaught J. L.* Eur. J. Pharmacol., 1981, v. 76, № 4, p. 453—456.
35. *Chavkin C.*, *Goldstein A.* Nature, 1981, v. 291, № 5816, p. 591—593.
36. *Wüster M.*, *Schulz R.*, *Herz A.* J. Receptor Res., 1983, v. 3, № 1—2, p. 199—214.
37. *Gacel G.*, *Fournie-Zaluski M. C.*, *Roques B. P.* FEBS Lett., 1980, v. 118, № 2, p. 245—247.
38. *DiMaio J.*, *Nguyen T. M.*, *Lemieux C.*, *Schiller P. W.* J. Med. Chem., 1982, v. 25, № 12, p. 1432—1438.
39. *Waterfield A. A.*, *Lord J. A.*, *Hughes J.*, *Kosterlitz H. W.* Eur. J. Pharmacol., 1978, v. 47, № 2, p. 249—250.
40. *Wüster M.*, *Schulz R.*, *Herz A.* Life Sci., 1980, v. 27, № 2, p. 163—170.
41. *Beddell C. R.*, *Clark R. B.*, *Hardy G. W.*, *Lowe L. A.*, *Ubatuba F. B.*, *Vane J. R.*, *Wilkinson S.*, *Chang K. J.*, *Cuatrecasas P.*, *Miller R. J.* Proc. R. Soc. London, Ser. B, 1977, v. 198, № 1132, p. 249—265.
42. *Audigier Y.*, *Mazarguil H.*, *Gout R.*, *Cros J.* Eur. J. Pharmacol., 1980, v. 63, № 1, p. 35—46.
43. *Gorin F. A.*, *Balasubramanian T. M.*, *Cicero T. J.*, *Schwietzer J.*, *Marshall G. R.* J. Med. Chem., 1980, v. 23, № 10, p. 1113—1122.
44. *Kosterlitz H. W.*, *Waterfield A. A.* Annual Rev. Pharmacol., 1975, v. 15, p. 29—47.
45. *Dutta A. S.*, *Gormley J. J.*, *Hayward C. F.*, *Morley J. S.*, *Shaw J. S.*, *Stacey G J.*, *Turnbull M. T.* Life Sci., 1977, v. 21, № 4, p. 559—562.
46. *Shaw J. S.*, *Turnbull M. J.*, *Dutta A. S.*, *Gormley J. J.*, *Hayward C. F.*, *Stacey G. J.* In: Characteristics and functions of opioids /Eds van Ree J. M., Terenius L. Amsterdam: Elsevier — North-Holland Biomedical Press, 1978, p. 185—195.
47. *Tyers M. B.* Brit. J. Pharm., 1980, v. 69, № 3, p. 503—512.
48. *Upton N.*, *Sewell R. D.*, *Spenser P. S.* Eur. J. Pharmacol., 1982, v. 78, № 4, p. 421—429.
49. *Bower J. D.*, *Handa B. K.*, *Lane A. C.*, *Lord J. A.*, *Metcalfe G.*, *Morgan B. A.*, *Rance M. J.*, *Richards P. M.*, *Smith C. F.* In: Endogenous and exogenous opiate agonists and antagonists/Ed. Way E. Oxford — New York: Pergamon Press, 1980, p. 29—32.
50. *Kawai K.*, *Ishii H.*, *Doi T.*, *Tamura S.*, *Shinagawa S.*, *Fujino M.* Eur. J. Pharmacol., 1981, v. 72, № 4, p. 297—304.

51. *Handa B. K., Lane A. C., Lord J. A., Morgan B. A., Rance M. J., Smith C. F.* Eur. J. Pharmacol., 1981, v. 70, № 4, p. 531—540.
52. *Rònai A. Z., Berzètei I., Szèkely J. I., Gràf L., Bajusz S.* Pharmacology, 1979, v. 18, № 1, p. 18—24.
53. *Rònai A. Z., Berzètei I. P., Szèkely J. I., Miglècz E., Kurgyis J., Bajusz S.* Eur. J. Pharmacol., 1981, v. 69, № 3, p. 263—271.
54. *Nàdasdi L., Yamashiro D., Li C. H., Huidobro-Toro P.* Int. J. Peptide and Prodein Res., 1983, v. 21, № 4, p. 344—351.
55. *Audigier Y., Mazarguil H., Cros J.* FEBS Lett., 1980, v. 110, № 1, p. 88—90.
56. *Audigier Y., Gout R., Mazarguil H., Cros J.* Eur. J. Pharmacol., 1980, v. 64, № 2—3, p. 187—189.
57. *Takagi H., Shiomi H., Ueda H. Amano H.* Nature, 1979, v. 282, № 5737, p. 410—412.
58. *Webster V. A., Griffiths E. C., Slater P.* Neuroscience Lett., 1983, v. 42, № 1, p. 67—70.
59. *Клуша В. Е., Абиссова Н. А., Кукайн Э. М., Афанасьева Г. А., Мисиня И. П., Мышлякова Н. В., Муцениеце Р. К., Свирскис Ш. В.* В кн.: Целенаправленный поиск новых нейротропных препаратов/Ред. Вальдман А. В. Рига: Зинатне, 1983, с. 21—30.
60. *Kliś W. A., Nawrocka E., Siemion I. Z., Plech A., Stachura Z., Herman Z. S.* Bioorganic Chem., 1979, v. 8, № 2, p. 255—262.
61. *Mastalerz P., Kupczyk-Subotkowska L., Herman Z. S., Laskawiec G.* Naturwissenschaften, 1982, v. 69, № 1, p. 46—47.
62. *Kawasaki K., Maeda M.* Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1982, v. 106, № 1, p. 113—116.
63. *Roques B. P., Gacel G., Fournie-Zaluski M. C., Senault B., Lecomte J. M.* Eur. J. Pharmacol., 1979, v. 60, № 1, p. 109—110.
64. *Fournie-Zaluski M. C., Gacel G., Maigret B., Premilat S., Roques B. P.* Mol. Pharmacol., 1981, v. 20, № 3, p. 484—491.
65. *Morgan B. A., Smith C. F., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W.* J. Pharm. and Pharmacol., 1976, v. 28, № 8, p. 660—661.
66. *Ling N., Guillemin R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 9, p. 3308—3310.
67. *Moritoki H., Kiso Y., Kageyama T., Matsumoto K.* J. Pharm. and Pharmacol., 1981, v. 33, № 1, p. 54—55.
68. *Knoll J., Illès P., Medzihradszky K.* J. Pharm. and Pharmacol., 1978, v. 30, № 6, p. 394—395.
69. *Kosterlitz H. W., Lord J. A., Paterson S. J., Waterfield A. A.* Brit. J. Pharm., 1980, v. 68, № 2, p. 333—342.
70. *Kosterlitz H. W.* In: Endogenous peptides and centrally acting drugs/Eds Levy A., Heldman E., Vogel Z., Gutman Y. (Progress in Biochemical Pharmacology, v. 16). Basel: S. Karger AG, 1980, p. 3—10.
71. *Беспалова Ж. Д., Коробов Н. В., Тимов М. И., Чиченков О. Н.* Фармакол. и токсикология, 1982, т. 45, № 2, с. 39—44.
72. *Kiso Y., Yamaguchi M., Akita T., Moritoki H., Takei M., Nakamura H.* Naturwissenschaften, 1981, B. 68, № 4, S. 210—212.
73. *Zaslavsky B. Yu., Mestechkina N. M., Mineeva L. M., Rogozhin S. V., Bakalkin G. Ya., Rjazhsky G. G., Chetverina E. V., Asmuko A. A., Bespalova J. D., Korobov N.V., Chichenkov O. N.* Biochem. Pharmacol., 1982, v. 31, № 23, p. 3757—3762.
74. *Bower J. D., Handa B. K., Lane A. C., Morgan B. A., Rance M. J., Smith C. F., Wilson A. N.* In: Peptides. Chemistry, structure and function: Proc. of the 7-th Amer. Pept. Symp./Eds Rich D. H., Gross E. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company, 1981, p. 607—612.
75. *Takagi H., Amano H., Nakamura A., Kubota M., Nagase O., Yajima H.* Life Sci., 1982, v. 31, № 20—21, p. 2245—2248.
76. *Geiger R., Bickel M., Teetz V., Alpermann H. G.* Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1983, B. 364, № 11, S. 1555—1562.
77. *Shimohigashi Y., Costa T., Stammer C. H.* FEBS Lett., 1981, v. 133, № 2, p. 269—271.
78. *Quirion R., Kiso Y., Pert C. B.* FEBS Lett., 1982, v. 141, № 2, p. 203—206.
79. *Vavrek R. J., Cui R. L., Stewart J. M.* Life Sci., 1982, v. 31, № 20—21, p. 2249—2252.
80. *Shinagawa S., Fujino M., Ishii H., Kawai K.* Chem. Pharm. Bull., 1981, v. 29, № 12, p. 3639—3645.
81. *Schwartz J. C., Malfroy B., de la Baume S.* Life Sci., 1981, v. 29, № 17, p. 1715—1740.
82. *Metcalf G.* Pharm. J., 1979, v. 223, № 6042, p. 356—358.
83. *Chipkin R. E., Stewart J. M., Stammer C. H.* Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1979, v. 87, № 3, p. 890—895.
84. *Shimohigashi Y., Costa T., Chen H. C., Rodbard D.* Nature, 1982, v. 297, № 5864, p. 333—335.
85. *Roques B. P., Gacel G., Dodey P., Zajac J. M., Fournie-Zaluski M. C.* In: Peptides 1982: Proc. of the 17-th Eur. Pept. Symp./Eds Blaha K., Malon P. B.— N. Y.: Walter de Gruyter, 1983, p. 475—480.
86. *Rodbard D., Costa T., Shimohigashi Y., Krumins S.* J. Receptor Res., 1983, v. 3, № 1—2, p. 21—33.

87. *Magnan J., Paterson S. J., Tavani A., Kosterlitz H. W.* Naunyn-Schmiedoberg's Arch. Pharmacol., 1982, v. 319, № 33, p. 197—205.
88. *Pert C. B., Bowie D. L., Pert A., Morell J. L., Gross E.* Nature, 1977, v. 269, № 5623, p. 73—75.
89. *Hahn E. F., Fishman J., Shiwaku Y., Foldes F. F., Nagashima H., Duncalf D.* Res. Communs in Chem. Pathol. and Pharmacol., 1977, v. 18, № 1, p. 1—9.
90. *Kamei C., Mio M., Tasaka K.* Experientia, 1983, v. 39, № 9, p. 1025—1026.
91. *Shaw J. S., Miller L., Turnbull M. J., Gormley J. J., Morley J. S.* Life Sci., 1982, v. 31, № 12—13, p. 1259—1262.
92. *Cotton R., Giles M. G., Miller L., Shaw J. S., Timms D.* Eur. J. Pharmacol., 1984, v. 97, № 3—4, p. 331—332.
93. *Bajusz S., Patthy A., Kenessey A., Gràf L., Szèkely J. I., Ròhai A. Z.* Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1978, v. 84, № 4, p. 1045—1053.
94. *Fujino M., Shinagawa S., Kawai K., Ishii H.* Naturwissenschaften, 1979, B. 66, № 12, S. 625—626.
95. *Gesellchen P. D., Frederickson R. C., Tafur S., Smiley D.* In: Peptides. Chemistry, structure and function: Proc. of the 7-th Amer. Pept. Symp./Eds Rich D. H., Gross E. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company, 1981, p. 621—624.
96. *Чиченков О. Н., Коробов Н. В.* Фармакол. и токсикология, 1984, т. 47, № 1, с. 23—26.
97. *Frederickson R. C., Smithwick E. L., Shuman R.* In: Characteristics and functions of opioids/Eds van Ree J. M., Terenius L. Amsterdam: Elsevier — North-Holland Biomedical Press, 1978, p. 215—216.
98. *Shinagawa S., Fujino M., Ishii H., Kawai K.* Chem. Pharm. Bull., 1981, v. 29, № 12, p. 3630—3638.
99. *Shuman R. T., Gesellchen P. D., Smithwick E. L., Frederickson R. C.* In: Peptides. Chemistry, structure and function: Proc. of the 7-th Amer. Pept. Symp./Eds Rich D.H., Gross E. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company, 1981, p. 617—620.
100. *Shinagawa S., Fujino M., Wakimasu M., Ishii H., Kawai K.* Chem. Pharm. Bull., 1981, v. 29, № 12, p. 3646—3659.
101. *Nakamura H., Kiso Y., Motoyoshi S., Yoshida N., Ishii K., Yokoyama Y., Kadokawa T., Shimizu M.* Eur. J. Pharmacol., 1982, v. 85, № 2, p. 133—142.
102. *Jacobson A. E., Klee W. A., Dunn W. J.* Eur. J. Med. Chem., 1977, v. 12, № 1, p. 49—52.
103. *Rapoport S. I.* In: Cerebral metabolism and neuronal function/Eds Passonneau J. V., Hawkins R. A., Lust W. D., Welsh F. A. Baltimore — London: Williams and Wilkins, 1980, p. 96—105.
104. *Frederickson R. C., Smithwick E. L., Shuman R., Gesellchen P. D.* Psychopharmacol. Bull., 1981, v. 17, № 3, p. 106—108.
105. *Wei E. T.* J. Pharmacol. and Exp. Ther., 1981, v. 216, № 1, p. 12—18.
106. *Kawai K., Ishii H., Okanishi S., Doi T., Tamura S., Kuzuna S., Fujino M.* Eur. J. Pharmacol., 1983, v. 29, № 1—2, p. 125—130.
107. *Frederickson R. C., Smithwick E. L., Shuman R., Bemis K. G.* Science, 1981, v. 211, № 4482, p. 603—605.
108. *Vavrek R. J., Hsi L. H., York E. J., Hall M. E., Stewart J. M.* Peptides, 1981, v. 2, № 3, p. 303—308.
109. *Smolarsky M., Koshland D. E.* J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 15, p. 7244—7249.
110. *Kiso Y., Miyazaki T., Satomi M., Inai M., Akita T., Moritoki H., Takei M., Nakamura H.* In: Peptide chemistry 1981/Ed. Shioiri T. Osaka: Protein Research Foundation, 1982, p. 65—70.
111. *Vavrek R. J., Cui R. L., York E. J., Stewart J. M., Paterson S., Kosterlitz H. W.* Life Sci., 1983, v. 33, suppl. 1, p. 451—454.
112. *Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R.* Nature, 1976, v. 260, № 5547, p. 165 — 166.
113. *Gorin F. A., Balasubramanian T. M., Barry C. D., Marshall G. R.* J. Supramol. Structure, 1978, v. 9, № 1, p. 27—39.
114. *Gacel G., Fournie-Zaluski M. C., Fellion E., Roques B. P.* J. Med. Chem., 1981, v. 24, № 10, p. 1119—1124.
115. *Maysinger D., Movrin M., Ljubič M.* Acta Pharm. Jugoslavica, 1982, v. 32, № 3, p. 177—184.
116. *Kiso Y., Miyazaki T., Akita T., Nakamura H.* Eur. J. Pharmacol., 1981, v. 71, № 2—3, p. 347—348.
117. *Kiso Y., Miyazaki T., Akita T., Moritoki H., Takei M., Nakamura H.* FEBS Lett., 1981, v. 136, № 1, p. 101—104.

Поступила в редакцию
3.I.1985
После доработки
9.VII.1985

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS IN SHORT ENKEPHALIN ANALOGUES

ROSENTHAL G. F., CHIPENS G. I.

Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

The similarity of action of narcotic analgesics and opioid peptides is due to activation of a common opiate receptor as the primary step in initiating biochemical chains responsible for diverse morphine-like effects. The most widely used assays for opioid and analgesic activities are presented and evaluated. Approximately 180 short enkephalin analogues (di-, tri- and tetrapeptides), described in the literature, are systematized and their opioid and systemic analgesic activities compared with methionine-enkephalin and morphine as the reference compounds, respectively. The analysis of structure-opioid activity relationships among these enkephalin analogues substantiates the hypothesis that only a limited N-terminal region of the peptide molecule is essential for the binding of opioid peptides to the subclass of opiate receptors interacting with narcotic alkaloids (μ-receptors). An attempt has been made to identify minimal structural elements responsible for the μ-receptor activation. Shortening of the molecule and modification of its elements are examined with regard to the μ- and δ-receptor selectivity. It is emphasized that the aromatic structure of the C-terminal region of the peptide is not obligatory for the μ-receptor binding. Modifications of short enkephalin analogues which might confer them antagonistic properties are reviewed. The correlation between the ability of short enkephalin analogues to interact with μ-receptors and their antinociceptive properties is discussed along with some structural features pertinent to the analgesic effect after systemic administration of peptides. On the basis of this analysis, peptides containing no more than four amino acids are considered as the most probable morphine-like analgesics.