



УДК 547.964.4

ПРИРОДНЫЕ ПЕПТИДЫ И ИХ АНАЛОГИ

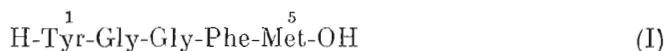
XXVII. СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МЕТИОНИН-5-ЭНКЕФАЛИНА

**Швачкин Ю. П., Смирнова А. П., Завалишина Н. П.,
Шшикина А. А., Бабичев В. Н., Игнатков В. Я.,
Мионов С. Ф.**

*Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Осуществлен синтез метионин-5-энкефалина по новой схеме, предусматривающей использование *n*-нитробензиловых и пентафторфениловых эфиров *N*-защищенных аминокислот и присоединение *L*-метионинового остатка к промежуточному тетрапептиду в виде либо соли, либо эфира. Изучено действие синтетического метионин-5-энкефалина на одиночные нейроны различных областей головного мозга крысы.

Важным достижением последнего времени явилось выделение из мозга животных особой группы пептидов, обладающих сродством к опиатным рецепторам [1–5]. Один из этих нейропептидов, получивший название «метионин-5-энкефалин» [1], представляет собой пентапептид строения (I)



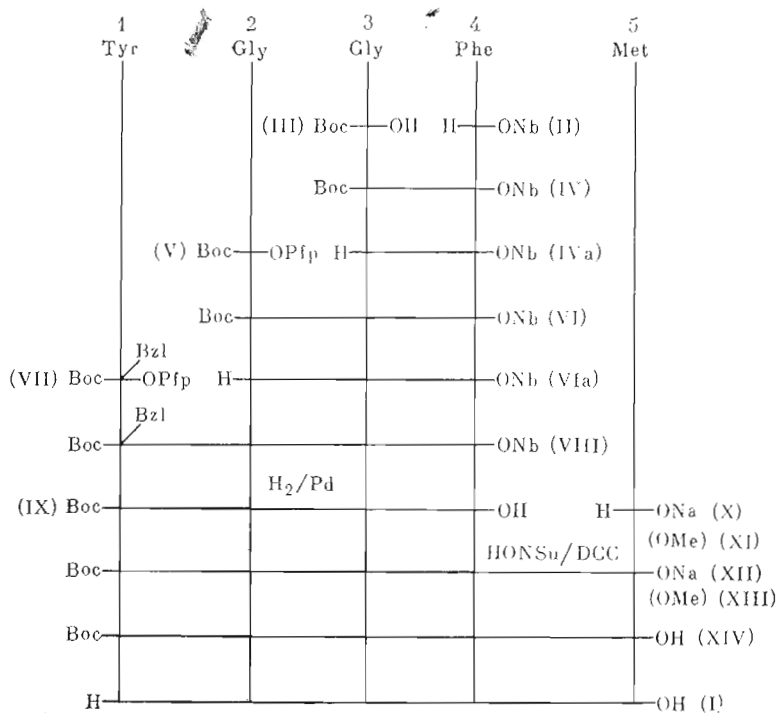
Структура метионин-5-энкефалина (I) доказана полным аминокислотным анализом, расщеплением природного нейропептида по Эдману и масс-спектрометрическими данными [1], а также подтверждена синтезом [6–9].

Нами разработан новый метод синтеза метионин-5-энкефалина (I) по схеме 4+1, предусматривающий использование в качестве исходных веществ *n*-нитробензинового эфира фенилаланина (II), *N*-*трет*-бутилоксикарбонилглицина (III), пентафторфенилового эфира *N*-*трет*-бутилоксикарбонилглицина (V), пентафторфенилового эфира *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*O*-бензилтирозина (VII), а также натриевой соли метионина (X) либо метилового эфира метионина (XI) (см. схему).

При этом промежуточными соединениями были *n*-нитробензиловые эфиры *N*-*трет*-бутилоксикарбонилглицил-фенилаланина (IV), глицил-фенилаланина (IVa), *N*-*трет*-бутилоксикарбонилглицил-глицил-фенилаланина (VI), глицил-глицил-фенилаланина (VIa), *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*O*-бензилтирозил-глицил-глицил-фенилаланина (VIII), *N*-*трет*-бутилоксикарбонилтирозил-глицил-глицил-фенилаланин (IX), натриевая соль *N*-*трет*-бутилоксикарбонилтирозил-глицил-глицил-фенилаланил-метионина (XII), метиловый эфир *N*-*трет*-бутилоксикарбонилтирозил-глицил-глицил-фенилаланил-метионина (XIII) и *N*-*трет*-бутилоксикарбонилтирозил-глицил-глицил-фенилаланил-метионин (XIV).

Преимуществом и важным достоинством указанной схемы синтеза является высокая степень ее общности. Применение схемы 4+1 позволяет использовать основные исходные и промежуточные соединения, включая частично защищенный тетрапептид (IX), для синтеза не только метионин-5-энкефалина (I), но и лейцил-5-энкефалина, а также разнообразных структурных аналогов энкефалинов, отличающихся от природных нейропептидов структурой аминокислотного остатка в положении 5 пептидной цепи.

Использованы следующие сокращения: -ONb – *n*-нитробензокси-, -Pfr – пентафторфенил-, DCC – *N,N'*-дициклогексилкарбодимид, HONSu – *N*-оксисукцинимид, DMF – диметилформамид. Все асимметрические аминокислоты – *L*-ряда.



При синтезе промежуточного защищенного дипептида (IV) реакцию образования пептидной связи осуществляли методом смешанных ангидридов, применяя для активации карбоксильного компонента (III) бутилхлорформат. Бензильную и *n*-нитробензильную защитные группы из защищенного тетрапептида (VIII) удаляли каталитическим гидрогенолизом в присутствии палладиевой черни. При реакциях конденсации производных *L*-метионина с частично защищенным тетрапептидом (IX) карбоксильную группу последнего активировали *N,N'*-дициклогексилкарбодимидом с прибавлением эквимольных количеств *N*-оксисукцинимид. Для превращения метилового эфира пентапептида (XIII) в пентапептид (XIV) применяли методику щелочного омыления 2 н. водным раствором едкого натра в среде диоксана и метанола. *N*-*tert*-бутилоксикарбонильную группу удаляли на заключительной стадии синтеза, для чего *N*-защищенный пентапептид (XIV) обрабатывали 40 мин 15% раствором хлористого водорода в диоксане при 20° С. Отсутствие рацемизации на перечисленных промежуточных стадиях синтеза было доказано определением оптических характеристик, а также ферментативным гидролизом образцов синтезированного метионин-5-энкефалина (I).

Выделение синтетического метионин-5-энкефалина (I) из реакционной смеси осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефадексом А-25 (ацетатная форма), используя в качестве элюента пиридин-ацетатный буферный раствор с рН 6,0 [6]. В результате синтетический метионин-5-энкефалин был получен в аналитически чистом состоянии и по своим константам и биологической активности [10] не отличался от природного пентапептида.

Представляло интерес исследовать физиологическую активность синтетического препарата метионин-5-энкефалина (I). С этой целью было проведено экспериментальное изучение нейрональной импульсной активности различных областей центральной нервной системы (паритетальная кора, гиппокамп, медиальный таламус, перегородка мозга, преоптическая область, перивентрикулярное и аркуатное ядра гипоталамуса) в ответ на введение синтетического метионин-5-энкефалина. Ранее аналогичные эксперименты, проведенные как с природным образцом, так и с синтетическими препаратами метионин-5-энкефалина, обычно ограничивались изучени-

ем чувствительности к исследуемому нейронептиду клеток лишь какой-либо одной нервной структуры [10].

Исследование показало, что при микроионофоретическом подведении соединения (I) нейроны давали как активационный, так и тормозной ответ. Активационный ответ наиболее часто отмечался в гиппокампе и коре мозга, а тормозной — в перивентрикулярном ядре гипоталамуса. В остальных исследованных областях мозга количества нейронов с активационной и тормозной реакцией на метионин-5-энкефалин статистически не различались ($p > 0,05$). Высокая частота активационного ответа в гиппокампе согласуется с имеющимися литературными данными [11, 12].

Наиболее чувствительными к метионин-5-энкефалину (I) оказались нейроны перивентрикулярного ядра гипоталамуса. Высокой чувствительностью к соединению (I) характеризовалась также область перегородки мозга. Наибольшей ареактивностью к метионин-5-энкефалину (I) отличались преоптическая область и аркуатное ядро гипоталамуса.

Чтобы выявить специфичность действия метионин-5-энкефалина (I), проводились исследования с микроионофоретическим подведением к одиночным нейронам различных областей мозга палорфина — конкурентного оппозитного антагониста метионин-5-энкефалина [1]. В результате установлено, что в подавляющем большинстве случаев (87—100%) палорфин блокирует тормозной эффект, вызываемый соединением (I). В гиппокампе и перегородке мозга активационный эффект соединения (I) также специфически блокировался палорфином. Эти экспериментальные данные свидетельствуют, что действие метионин-5-энкефалина (I) на активность нейронов указанных выше различных областей головного мозга крысы реализуется через оппозитные рецепторы.

Экспериментальная часть

ТСХ всех соединений проводили на стандартных пластинках «Silufol UV₂₅₄» (Kavalier, ЧССР) с использованием следующих систем растворителей: хлороформ — метанол, 25 : 1 (А), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Б); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 120 : 20 : 6 : 11 (В); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 60 : 20 : 6 : 11 (Г); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 240 : 20 : 6 : 11 (Д); хлороформ — метанол, 25 : 4 (Е). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидрина или обработкой хроматограмм парами воды.

Для аминокислотного анализа пептиды подвергали кислотному гидролизу в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 110° С, 20 ч), после чего количественное содержание аминокислот в гидролизатах определяли с помощью автоматического аминокислотного анализатора типа TSM (Technicon, США). Ферментативный гидролиз пептидов проводили с применением лейцинаминопептидазы (кристаллический препарат фирмы «Koch-Light») по методике Хилла и Смита [13].

Удельное вращение исследуемых соединений измеряли на поляриметре типа MA-510-0 (Hilger-Watts, Англия).

Элементный анализ (С, Н, N) пептидов (IV), (VI), (VIII), (IX) удовлетворительно совпал с вычисленным элементным составом.

Boc-Gly-Phe-ONb (IV). К охлажденному до -15° С раствору 1,56 г (8,9 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонилглицина в 10 мл безводного тетрагидрофурана прибавляли 1 мл (8,9 ммоль) *N*-метилморфолина, а затем 1,1 мл (10 ммоль) *n*-бутилхлорформиата. Раствор перемешивали 15 мин при -15° С, после чего прибавляли предварительно охлажденный до -15° С раствор 3,4 г (8,9 ммоль) бромидрата *n*-нитробензильного эфира *L*-фенилаланина [14] и 1,25 мл (8,9 ммоль) *N*-метилморфолина в 12 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 2 ч при 0° С и 18 ч при 20° С, выпавший осадок отфильтровывали, вещество на фильтре промывали DMF и тетрагидрофураном, промывную жидкость присоединяли к основному фильтрату и объединенный раствор упаривали в вакууме до полного удаления растворителей. Остаток растворяли в 100 мл этилацетата и получен-

ный раствор последовательно промывали 5% раствором KHSO_4 , водой, 5% раствором KHCO_3 , снова водой, высушивали безводным Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Получили 3,1 г (77%) дипептида (IV) в виде белого аморфного порошка с т. пл. 153–154° С, R_f 0,52 (A), 0,81 (B), $[\alpha]_D^{22}$ –8,9 (c 1,0; DMF).

Boc-Gly-Gly-Phe-ONb (VI). Растворяли 3,1 г (6,8 ммоль) соединения (IV) в 15 мл 15% HCl в диоксане, раствор выдерживали 40 мин при 20° С, затем упаривали в вакууме до полного удаления растворителя, остаток растирали с безводным эфиром, образовавшийся осадок отфильтровывали, вещество на фильтре тщательно промывали эфиром и высушивали в вакуум-эксикаторе над гранулированным KOH . Полученный хлоргидрат дипептида (IVa) в количестве 2,06 г (5,2 ммоль) растворяли в 10 мл DMF, прибавляли 0,7 мл (5,2 ммоль) триэтиламина, раствор охлаждали до –10° С, перемешивали 5 мин и затем прибавляли охлажденный раствор 1,6 г (4,7 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-глицина (V) [13] в 5 мл DMF. Смесь перемешивали 2,5 ч при 20° С, выпавшее в осадок вещество отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растирали с 100 мл этилацетата и 50 мл воды, этилацетатный слой отделяли и последовательно промывали 5% раствором KHSO_4 , водой, 5% KHCO_3 и снова водой. Промытый раствор высушивали безводным Na_2SO_4 и упаривали в вакууме досуха. Получили 2,35 г (98%) трипептида (VI) с т. пл. 109–111° С, R_f 0,16 (A), 0,80 (B), $[\alpha]_D^{22}$ –6° (c 1,0; DMF).

Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-ONb (VIII). К 2,35 г (4,5 ммоль) соединения (VI) прибавляли 10 мл 15% HCl в диоксане, полученный раствор выдерживали 40 мин при 20° С, затем упаривали в вакууме и остаток растирали с эфиром. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали в вакууме над гранулированным KOH . Полученный хлоргидрат трипептида (VIa) в количестве 1,9 г (4,2 ммоль) растворяли в 5 мл DMF, прибавляли 0,58 мл (4,2 ммоль) триэтиламина, раствор охлаждали до 10° С, перемешивали 5 мин и прибавляли предварительно охлажденный раствор 2,04 г (3,8 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*O*-бензил-*L*-тирозина (VII) [15] в 5 мл DMF. Смесь выдерживали 2,5 ч при 20° С, выпавшее в осадок вещество отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в 100 мл этилацетата и полученный раствор последовательно промывали 5% раствором KHSO_4 , водой, 5% раствором KHCO_3 , снова водой, сушили безводным Na_2SO_4 и упаривали в вакууме досуха. Остаток растирали с безводным эфиром, смесь фильтровали, вещество на фильтре промывали дополнительно эфиром и высушивали в вакууме над фосфорным ангидридом. Получили 2,4 г (85%) тетрапептида (VIII) с т. пл. 170–172° С, R_f 0,12 (A), 0,82 (B), $[\alpha]_D^{22}$ –7° (c 1,0; DMF).

Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-OH (IX). Растворяли 2,4 г (3,1 ммоль) соединения (VIII) в 40 мл смеси метанол – уксусная кислота – вода (2 : 1 : 1) и полученный раствор гидрировали 48 ч при атмосферном давлении в присутствии палладиевой черни. Затем катализатор отделяли фильтрованием, фильтрат упаривали в вакууме до полной отгонки растворителя, остаток растворяли в 50 мл 5% NaHCO_3 , полученный раствор промывали этилацетатом и затем pH водного слоя доводили до 7,0 прибавлением 5% раствора KHSO_4 , нейтральный раствор упаривали в вакууме до объема 20 мл, прибавлением 5% раствора KHSO_4 доводили pH концентрированного раствора до 3,0 и полученный кислый раствор экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный экстракт промывали насыщенным при 20° С водным раствором NaCl , сушили безводным Na_2SO_4 , упаривали в вакууме до полной отгонки этилацетата, остаток растирали с 50 мл безводного эфира, смесь высушивали в вакууме над фосфорным ангидридом. Получили 1,4 г (86%) соединения (IX) с R_f 0,40 (B), 0,38 (E), $[\alpha]_D^{22}$ –5,7° (c 1,0; DMF).

Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OMe (XIII). К охлажденному до 0° С раствору 0,44 г (2,2 ммоль) хлоргидрата метилового эфира метионина в 5 мл DMF прибавляли 0,33 мл (2,2 ммоль) триэтиламина, смесь перемешивали 15 мин при 0° С, затем прибавляли к ней охлажденный раствор 1,1 г

(2 ммоль) соединения (IX) в 10 мл DMF, охлажденный раствор 0,25 г (2,2 ммоль) N-оксисукцинимида в 5 мл DMF, а также охлажденный до 0° С раствор 0,45 г N,N'-дициклогексилкарбодимида в 5 мл DMF. Полученную реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0° С и 19 ч при 20° С. Выпавшую в осадок N,N'-дициклогексилмочевину отделяли фильтрованием, промывали DMF, промывную жидкость присоединяли к основному фильтрату и объединенный раствор упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 100 мл этилацетата и полученный раствор последовательно промывали 5% раствором KHSO₄, водой, 5% KHSO₃ и насыщенным при 20° С водным раствором NaCl. Промытый раствор высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали в вакууме до полной отгонки этилацетата. Остаток растирали с 30 мл безводного эфира. Образовавшийся осадок белого аморфного вещества отделяли фильтрованием, промывали эфиром и высушивали в вакууме над фосфорным ангидридом. Получили 0,96 г (68%) соединения (XIII) с т. пл. 111–113° С, R_f 0,78 (Б), 0,73 (В), 0,45 (Д). $[\alpha]_D^{22}$ –12,4 (с 0,85; MeOH). Литературные данные [9]: т. пл. 112–114° С, R_f 0,80 (Б) $[\alpha]_D^{20}$ –8,8 (с 0,85; MeOH).

Вос-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH (XIV). а) Растворяли 0,71 г (1 ммоль) соединения (XIII) в 18 мл смеси диоксан – метанол (2 : 1), к раствору прибавляли 4,5 мл 2 н. NaOH, полученную смесь перемешивали 10 мин при 0° С, затем нейтрализовали прибавлением 4,5 мл 2 н. HCl, раствор упаривали в вакууме, маслообразный остаток растворяли в 100 мл этилацетата, промывали водой (2×50 мл) и высушивали безводным Na₂SO₄. После отделения осушителя этилацетат удаляли отгонкой в вакууме, остаток растирали с безводным эфиром. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали в вакууме над фосфорным ангидридом. Получили 0,62 г (88%) соединения (XIV) с т. пл. 150–152° С (разл.), R_f 0,34 (В), 0,62 (Г). Аминокислотный анализ: Tyr 1,17 (1); Gly 2,00 (2); Phe 1,17 (1); Met 0,89 (1). Литературные данные: т. пл. 150–152° С (разл.) [9], 149–151° С (разл.) [16], R_f 0,52–0,57 (Г) [16].

б) К раствору 0,54 г (1 ммоль) соединения (IX) и 0,11 г (1 ммоль) N-оксисукцинимида в 4 мл диоксана прибавляли при охлаждении до 5° С 0,21 г (1 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимида, полученную смесь перемешивали 16 ч при 20° С, выпавшую в осадок N,N'-дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в 5 мл этилацетата и полученный раствор прибавляли по каплям к 100 мл безводного эфира. Выпавшее в осадок вещество отделяли фильтрованием и высушивали в вакууме над фосфорным ангидридом. Получили 0,5 г (88%) N-оксисукцинимидного эфира тетрапептида (IX) с т. пл. 140–142° С (разл.), R_f 0,80 (В), 0,62 (Е).

Это соединение растворяли в 5 мл DMF, прибавляли предварительно приготовленный раствор 0,12 г (0,86 ммоль) метионина и 0,09 г (0,86 ммоль) Na₂CO₃ в 10 мл воды, полученную смесь перемешивали 12 ч при 20° С, затем охлаждали до 10° С и подкисляли до pH 6,0 прибавлением 5% раствора KHSO₄. Раствор упаривали в вакууме, маслообразный остаток обрабатывали 10 мл этилацетата и 10 мл воды, этилацетатный слой отделяли, промывали 5% раствором KHSO₄, насыщенным при 20° С водным раствором NaCl и сушили безводным Na₂SO₄.

После отделения осушителя и удаления этилацетата отгонкой в вакууме маслообразный остаток растворяли в 2 мл метанола и полученный раствор прибавляли по каплям к 50 мл безводного эфира. Выпавшее в осадок вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме над фосфорным ангидридом. Получили 0,37 г (64%) соединения (XIV), которое по всем константам и аналитическим характеристикам было тождественно образцу, полученному по предыдущей методике.

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH (I). Растворяли 0,4 г (0,59 ммоль) соединения (XIV) в 10 мл 15% HCl в диоксане, полученный раствор перемешивали 40 мин при 20° С, упаривали в вакууме, остаток растирали с безводным эфиром, нерастворившееся вещество отфильтровывали, тщательно промывали эфиром и высушивали в вакууме над гранулированным KOH. Получили 0,37 г хлоридрата соединения (I). Это вещество растворяли в

1 мл пиридин-ацетатного буферного раствора с рН 6,0 и полученный раствор вводили в колонку (1×30 см) с ДЕАЕ-сефадексом А-25 (ацетатная форма), уравновешенным указанным буферным раствором, и промывали этим же буферным раствором, собирая с помощью автоматического коллектора фракции по 3 мл. Фракции 25–45 объединяли и упаривали в вакууме досуха. Получили 0,17 г (50%) соединения (I) с т. пл. 190–194°С (разл.), R_f 0,40 (Б), 0,32 (Г), $[\alpha]_D^{20} +32^\circ$ (с 1,0; MeOH). Найдено, %: С 56,51; Н 6,21; N 12,17; S 5,52. $C_{27}H_{35}N_3O_7$. Вычислено, %: С 56,55; Н 6,15; N 12,21; S 5,59. Аминокислотный анализ (кислотный гидролиз): Туг 1,06(1), Gly 2,00(2), Phe 1,10(1), Met 0,96(1). Аминокислотный анализ (ферментативный гидролиз) [13]: Туг 1,04(1); Gly 2,40(2); Phe 1,00(1); Met 1,05(1).

Изучение действия метионин-5-энкефалина (I) на одиночные нейроны различных областей головного мозга крысы. Исследования проводили на 39 белых крысах (самцы массой 200–220 г), содержащихся в стандартных условиях освещения и питания. Животных, подвергнутых уретановому наркозу (120 мг на 100 г массы), обездвиженных тубарином (0,3 мг на 100 г массы) и переведенных на искусственное дыхание, фиксировали в стереотаксическом приборе СЭЖ-2. Для изучения импульсивной активности одиночных нейронов применяли многоканальные стеклянные микроэлектроды с диаметром кончика 3–5 мкм. Центральный канал микроэлектрода заполняли 2% раствором красителя «пентамин лазурный» в 2 М водном NaCl. Три боковых канала заполняли соответственно растворами 2,6 мМ метионин-5-энкефалина и 50 мМ налорфина в 0,15 М водном NaCl (рН 7,4) и 0,15 М раствором NaCl (рН 7,4). Центральный ствол микроэлектрода использовали для регистрации импульсной активности одиночных нейронов и ионофоретического подведения красителя с целью последующего гистологического контроля точной локализации кончика микроэлектрода в исследуемых структурах головного мозга экспериментальных животных. Микроионофорез осуществляли через боковые стволы при силе тока 60 нА. Введение микроэлектрода в исследуемую область мозга осуществляли в соответствии с атласом стереотаксических координат [15]. Активность одиночных нейронов регистрировали с помощью усилителя биопотенциалов УБП2-03, осциллографа С1-16, снабженного фоторегистратором ФОР-2, и магнитографа НО-36. Для микроионофореза применяли микроионофореометр, изготовленный в экспериментально-производственных мастерских АН СССР. Для анализа функционирования нейронов использовали многоканальный анализатор импульсов типа LF-4840 (Nokia, Финляндия). Полученные данные обрабатывали на ЭВМ ЕС-1022. Результаты вычислений оценивали с применением критерия Стьюдента (p) [18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B., Morris H. R. *Nature*, 1975, v. 258, № 5536, p. 577–580.
2. Terenius L., Wahlstrom A. *Acta pharm. tox.*, 1974, v. 35, Suppl. 1, p. 55–57.
3. Hughes J. *Brain Res.*, 1975, v. 88, № 2, p. 295–308.
4. Pasternak G. W., Goodman R., Snyder S. H. *Life Sci.*, 1975, v. 16, № 12, p. 1765–1769.
5. Hughes J., Smith T., Morgan B., Fothergill L. *Life Sci.*, 1975, v. 16, № 12, p. 1753–1758.
6. Bower J. D., Guest K. P., Morgan B. A. *J. Chem. Soc.*, 1976, № 23, p. 2488–2492.
7. Voelter W., Burvenich C., Horn H., Kalbacher A., Pietrzik E. *Angew. Chem.*, 1976, v. 88, № 10, p. 332–333.
8. Pietrzik E., Kalbacher A., Voelter W. *Lieb. Ann.*, 1977, № 4, p. 609–613.
9. Loss G., Wehrstedt K. D. *J. pract. chem.*, 1978, B. 320, S. 963–966.
10. Бабичев В. Н., Миронов С. Ф. *Пробл. эндокрипол.*, 1981, т. 27, № 3, с. 78–85.
11. Hill R. G., Mitchell J. F., Pepper C. M. *J. Physiol.*, 1977, v. 272, № 2, p. 50P–51P.
12. Davies J., Dray A. *Nature*, 1976, v. 262, № 5569, p. 603–604.
13. Hill R. L., Smith E. L. *J. Biol. Chem.*, 1957, v. 228, № 2, p. 577–585.
14. Maclaren J. A. *Austral. J. Chem.*, 1972, v. 25, p. 1293–1299.
15. Kisfaludy L., Low M., Nyeki O., Scirtes T., Schon F. *Lieb. Ann.*, 1973, № 9, S. 1421–1429.
16. Graf L., Ronai A. Z., Bajusz S., Cseh G., Szekely J. I. *FEBS Lett.*, 1976, v. 64, № 1, p. 181–184.

17. *Konig J. F. R., Klippel R. A.* The rat brain. Stereotaxis atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1963.
18. *Закс Л.* Статистическое оценивание. М.: Статистика, 1976, с. 135.

Поступила в редакцию
27.XI.1981

**NATURAL PEPTIDES AND THEIR ANALOGS. XXVII. SYNTHESIS
AND PROPERTIES OF METHIONINE-5-ENKEPHALIN**

**SHVACHKIN Yu. P., SMIRNOVA A. P., ZAVALISHINA N. I.,
SHISHKINA A. A., BABICHEV V. N., IGNATKOV V. Ya., MIRONOV S. F.**

*Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

A chemical synthesis of methionine-5-enkephalin has been performed by a new scheme which permits the use of *p*-nitrobenzyl and pentafluorophenyl esters of N-protected amino acids and attachment to intermediate tetrapeptide of methionine residue as a salt or ester. The action of synthetic methionine-5-enkephalin on single neurons of different regions of rat brain has been investigated.