



УДК 547.964.4.05

ПРИРОДНЫЕ ПЕПТИДЫ И ИХ АНАЛОГИ

XXXI. СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ РЕТРОАНАЛОГА МЕТИОНИН-5-ЭНКЕФАЛИНА

*Швачкин Ю. П., Шишкина А. А., Смирнова А. П.,
Федотов В. П., Иваненко Т. И., Гудошников В. И.,
Бушуева Г. И., Батрамева Л. А.*

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

Осуществлен синтез ретроаналога метионин-5-энкефалина, изомерного природному нейропептиду, по отличающегося от последнего противоположным направлением пептидных связей между аминокислотными остатками. Изучено влияние *ретро*-метионин-5-энкефалина на секрецию пролактина в опытах *in vivo* и *in vitro*. Установлено, что *ретро*-метионин-5-энкефалин вызывает стимуляцию секреции пролактина, превосходя по силе этого эффекта метионин-5-энкефалин.

В последние годы получили интенсивное развитие исследования по химии, биологии и молекулярной фармакологии разнообразных регуляторных пептидов, среди которых пристальное внимание исследователей привлекают нейропептиды, обладающие сродством к опиатым рецепторам [1–3]. Типичным представителем семейства опиоидных пептидов является метионин-5-энкефалин (I) (все асимметрические аминокислоты принадлежат к *L*-ряду) [1].

В связи с изучением закономерностей структурно-функциональной организации метионин-5-энкефалина (I) нами осуществлен синтез и изучены некоторые свойства *ретро*-метионин-5-энкефалина (II) [4], изомерного природному метионин-5-энкефалину (I), но отличающегося от последнего противоположным направлением пептидных связей между всеми аминокислотными остатками:

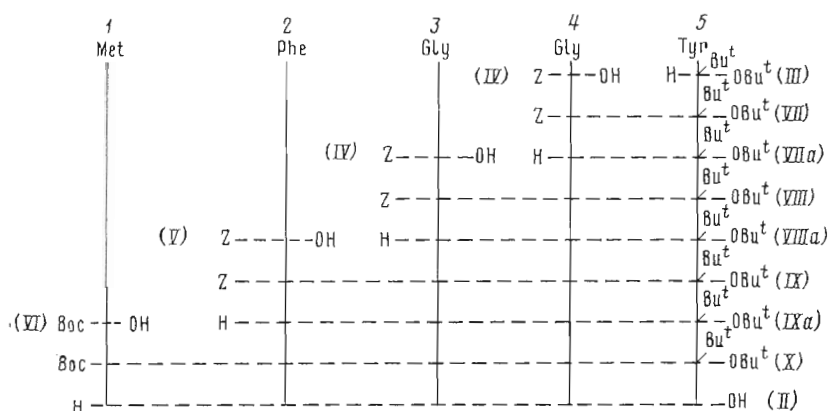


ретро-Метионин-5-энкефалин (II) получен с помощью реакций пептидного синтеза в растворе по ступенчатой схеме, предусматривающей последовательное наращивание пептидной цепи в направлении от C-конца к N-концу. При этом исходными веществами служили *трет*-бутиловый эфир *O*-*трет*-бутил-*L*-тирозина (III), *N*-бензилоксикарбонилглицин (IV), *N*-бензилоксикарбонил-*L*-фенилаланин (V) и *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-метионин (VI) (см. схему).

Промежуточными соединениями являлись *трет*-бутиловые эфиры *N*-бензилоксикарбонилглицил-*O*-*трет*-бутил-*L*-тирозина (VII), глицил-*O*-*трет*-бутил-*L*-тирозина (VIIa), *N*-бензилоксикарбонилглицилглицил-*O*-*трет*-бутил-*L*-тирозина (VIII), глицилглицил-*O*-*трет*-бутил-*L*-тирозина (VIIIa), *N*-бензилоксикарбонил-*L*-фенилаланилглицилглицил-*O*-*трет*-бутил-*L*-тирозина (IX), фенилаланилглицилглицил-*O*-*трет*-бутил-*L*-тирозина (IXa) и *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-метионил-*L*-фенилаланилглицилглицил-*O*-*трет*-бутил-*L*-тирозина (X).

Для образования пептидных связей на всех стадиях синтеза применяли смешанные ангидриды *N*-замещенных аминокислот, получающиеся при взаимодействии последних с *n*-бутилхлоркарбонатом. На промежуточных стадиях синтеза *N*-защитные бензилоксикарбонильные группы удаляли

каталитическим гидрированием в присутствии палладиевой черны. Последняя стадия синтеза заключалась в одновременном удалении всех защитных групп из соединения (X) под действием 10% раствора хлористого водорода в диоксане (45 мин, 20° С). Отсутствие рацемизации на промежуточных и заключительной стадиях синтеза контролировали с помощью ферментативного гидролиза соответствующих образцов [5]. *ретро*-Метионин-5-энкефалин (II) был получен в форме монохлоргидрата в аналитически чистом виде после переосаждения из метанола эфиром.



В литературе имеются сведения об отсутствии у *ретро*-метионин-5-энкефалина (II) анальгетической активности [4]. Мы изучили влияние *ретро*-метионин-5-энкефалина (II) на процессы секреции пролактина. С этой целью были выполнены специальные эксперименты, которые включали исследование в условиях опытов *in vivo* и *in vitro*.

Исследования *in vivo* проводили на крысах (самцы линии Вистар и беспородные), используя группу из 10 животных. Исследования *in vitro* выполняли на монослойных клеточных культурах аденогипофиза крыс (самцы линии Вистар). Концентрацию пролактина в крови экспериментальных животных определяли радиоиммунологическим методом [6]. Для определения пролактина в инкубационных средах культивируемых клеток аденогипофиза применяли радиоиммунологический [6] и электрофоретический [7] методы. Во всех опытах в качестве стандарта сравнения использовали метионин-5-энкефалин (I) [8].

В результате исследований *in vivo* установлено, что *ретро*-метионин-5-энкефалин (II) при подкожном введении крысам вызывает статистически достоверную стимуляцию секреции пролактина, причем по силе указанного эффекта *ретро*-аналог (II) превосходит метионин-5-энкефалин (I) примерно в 2,2 раза, повышая в дозе 1 мг/кг живого веса уровень пролактина с $16,4 \pm 1,1$ до $61,5 \pm 14,8$ нг/мл.

Эффект стимуляции секреции пролактина, вызываемый аналогом (II) в опытах *in vivo* (доза 1 мг/кг), может быть блокирован налорфином (доза 10 мг/кг).

В опытах *in vitro* обнаружено, что при прямом контакте с культивируемыми клетками аденогипофиза крыс *ретро*-метионин-5-энкефалин (II), как и метионин-5-энкефалин (I), стимуляции секреции пролактина не вызывает (таблица).

Эти экспериментальные данные приводят к заключению, что обнаруживаемые в опытах *in vivo* эффекты стимуляции секреции пролактина под действием метионин-5-энкефалина (I) или *ретро*-метионин-5-энкефалина (II) не являются результатом прямого воздействия соединений (I) или (II) на клетки аденогипофиза, а представляют собой сложные эффекты, которые опосредуются через гипоталамус или другие области мозга.

Влияние метионин-5-энкефалина (I) и *ретро*-метионин-5-энкефалина (II) на секрецию пролактина клеточной культурой аденогиофиза крысы

| Соединение | Доза, мкг/мл | Концентрация пролактина в среде | |
|------------|--------------|---------------------------------|---------------------|
| | | нг/мл * | имп/мин/мг белка ** |
| (I) | 0 | 1287±206,4 | 23,65±4,04 |
| | 0,5 | 1152,4±109,1 | 18,19±1,78 |
| | 2,5 | 1104,0±56,1 | 18,74±0,65 |
| (II) | 0 | 1287,3±206,4 | 23,65±4,04 |
| | 0,5 | 1005,4±69,8 | 22,34±4,07 |
| | 2,5 | 932,4±133,5 | 18,39±3,30 |

* Определение радиоиммунологическим методом.

** Определение электрофоретическим методом после преникубации клеток с [¹⁴C] лейцином.

Экспериментальная часть

Хроматографию всех соединений в тонком слое проводили на стандартных пластинках Silufol UV₂₅₄ (Kavalier, СССР) с использованием следующих систем растворителей: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (А); пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 30 : 3 : 12 (Б); хлороформ — метанол, 25 : 1 (В). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидрина или обработкой хроматограмм парами йода.

Для аминокислотного анализа пептиды подвергали кислотному гидролизу в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 110°C, 20 ч), после чего количественное содержание аминокислот в гидролизатах определяли с помощью автоматического аминокислотного анализатора типа TSM (Technicon, США). Ферментативный гидролиз проводили по методике Хилла и Смита [5].

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

Z-Gly-Tyr(Bu^t)-OBu^t (VII). К охлажденному до -15°С раствору 1,25 г (6 ммоль) *N*-бензилоксикарбонилглицина (IV) в 10 мл тетрагидрофурана прибавляли 0,66 мл (6 ммоль) *N*-метилморфолина, а затем 0,72 мл (6 ммоль) *n*-бутилхлоркарбоната. Раствор перемешивали 10 мин при -15°С, после чего прибавляли предварительно охлажденный до -15°С раствор 2 г (6 ммоль) хлоргидрата *трет*-бутилового эфира *O-трет*-бутил-*L*-тирозина (III) и 0,66 мл (6 ммоль) *N*-метилморфолина в 10 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь выдерживали 18 ч при 20°С, выпавшее в осадок вещество отфильтровывали, промывали тетрагидрофураном, промывную жидкость присоединяли к основному фильтрату и объединенный раствор упаривали в вакууме до полного удаления растворителя. Остаток растворяли в этилацетате и полученный раствор последовательно промывали 5% водным раствором KHSO₄, водой, 5% водным раствором K₂CO₃, снова водой, высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Маслообразный остаток растирали с гексаном, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали гексаном и высушивали в вакуум-эксикаторе. Получили 2,5 г (85%) дипептида (VII) в виде мелкокристаллического порошка с т. пл. 47–48°С, *R_f* 0,77 (А), 0,71 (Б). $[\alpha]_D^{25} +14,0$ (с 1,0; MeOH). Найдено, %: С 66,93; Н 7,52; N 5,79. C₂₇H₃₆N₂O₆. Вычислено, %: С 66,92; Н 7,49; N 5,78.

H-Gly-Tyr(Bu^t)-OBu^t (VIIa). Растворили 3 г (8,5 ммоль) соединения (VII) в 20 мл этанола и полученный раствор гидрировали 5 ч при атмосферном давлении и 20°С в присутствии палладиевой черни. После отделения катализатора фильтрат упаривали в вакууме. Выход 2,16 г (100%), *R_f* 0,33 (А).

Z-Gly-Gly-Tyr(Bu^t)-OBu^t (VIII) синтезировали в условиях получения соединения (VII), исходя из 1,1 г (5,2 ммоль) *N*-бензилоксикарбонилглицина (IV), 0,57 мл (5,2 ммоль) *N*-метилморфолина, 0,63 мл (5,2 ммоль)

n-бутилхлоркарбоната и 1,8 г (5,2 ммоль) соединения (VIIa). Получили 2,5 г (75%) трипептида (VIII) в виде густого бесцветного масла с R_f 0,55 (A), 0,63 (B).

H-Gly-Gly-Tyr(Bu^t)-OBu^t (VIIIa) получали аналогично соединению (VIIa), исходя из 2,5 г (3,9 ммоль) соединения (VIII). Выход 1,85 г (100%), R_f 0,20 (A).

Z-Phe-Gly-Gly-Tyr(Bu^t)-OBu^t (IX) получали аналогично соединению (VII), исходя из 1,23 г (3,7 ммоль) *N*-бензилоксикарбонил-*L*-фенилаланина (V), 0,41 мл (3,7 ммоль) *N*-метилморфолина, 0,44 г (3,7 ммоль) *n*-бутилхлоркарбоната и 1,5 г (3,7 ммоль) соединения (VIIa). Выход 2 г (70%), т. пл. 97–98° С, R_f 0,58 (A), 0,30 (B), $[\alpha]_D^{22} +4,0$ (*c* 1,0; MeOH). Найдено, %: С 66,15; Н 6,98; N 8,04. $C_{28}H_{48}N_4O_8$. Вычислено, %: С 66,26; Н 7,02; N 8,13.

H-Phe-Gly-Gly-Tyr(Bu^t)-OBu^t (IXa) получали аналогично соединению (VIIa), исходя из 2 г (2,6 ммоль) соединения (IX). Выход 1,6 г (100%), R_f 0,20 (A).

Boc-Met-Phe-Gly-Gly-Tyr(Bu^t)-OBu^t (X) получали аналогично соединению (VII), исходя из 0,63 г (2,5 ммоль) *tert*-бутилоксикарбонил-*L*-метионина (VI), 0,28 мл (2,5 ммоль) *N*-метилморфолина, 0,3 мл (2,5 ммоль) *n*-бутилхлоркарбоната и 1,4 г (2,5 ммоль) соединения (IXa). Выход 1,5 г (76%), т. пл. 164–166° С, R_f 0,69 (A), 0,65 (B), 0,68 (B), $[\alpha]_D^{20} -11,0$ (*c* 1,0; MeOH). Найдено, %: С 61,26; Н 7,43; N 8,96; S 4,04. $C_{40}H_{59}N_5O_9S$. Вычислено, %: С 61,13; Н 7,57; N 8,91; S 4,08.

H-Met-Phe-Gly-Gly-Tyr-OH (II). Растворяли 300 мг (0,38 ммоль) соединения (X) в 2,5 мл 10% раствора хлористого водорода в диоксане, полученный раствор выдерживали 45 мин при 20° С, затем упаривали в вакууме, к остатку прибавляли 5 мл эфира и упаривание в вакууме повторяли. Остаток растворяли в 3 мл метанола и полученный раствор прибавляли по каплям к 70 мл сухого эфира. Выпавшее в осадок вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме над гранулированным КОН. Получили 230 мг (95%) монохлоргидрата соединения (II) в виде мелкокристаллического белого вещества с т. пл. 141–144° С, R_f 0,20 (A), 0,32 (B), $[\alpha]_D^{22} +10,0$ (*c* 1,0; MeOH). Найдено, %: С 53,04; Н 5,98; N 11,08; S 4,98. $C_{27}H_{35}N_5O_8 \cdot HCl$. Вычислено, %: С 53,15; Н 5,95; N 11,48; S 5,25. Аминокислотный анализ: Met 1,00 (1); Phe 1,00 (1); Gly 2,03 (2); Tyr 0,94 (1).

Изучение влияния ретро-метионин-5-энкефалина (II) на секрецию пролактина. Опыты *in vivo* проводили на самцах крыс линии Вистар и на самцах беспородных крыс с массой тела 160–200 г (группа из 10 животных). Препараты ретро-метионин-5-энкефалина (II) и применявшегося в качестве стандарта сравнения метионин-5-энкефалина (I) вводили подкожно в физиологическом растворе. Крыс забивали декапитацией. Сывотку крови хранили при –20° С. Концентрацию пролактина в крови определяли радиоиммунологическим методом с использованием крысиного пролактина для подирования и в качестве стандарта, а также высокоспецифичной сывотки к пролактину [6].

Опыты *in vitro* проводили на 4-суточных монослойных клеточных культурах аденогипофиза крыс (самцы линии Вистар). Приготовление и ведение клеточных культур описано ранее [9]. Содержание пролактина в инкубационной среде культивируемых клеток аденогипофиза определяли радиоиммунологическим методом [6] и методом электрофореза в полиакриламидном геле после преинкубации клеток с [¹⁴C]лейцином [7]. Радиометрические определения проводили с использованием гамма-счетчика Searle и бета-счетчика Intertechnique. Результаты всех определений оценивали с применением критерия Стьюдента [10].

ЛИТЕРАТУРА

- Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B., Morris H. R. Nature, 1975, v. 258, № 5536, p. 577–580.
- Hughes J. Brain Res., 1975, v. 88, № 2, p. 259–308.

3. Pasternak G. W., Goodmann R., Shyder S. H. Life Sci., 1975, v. 16, № 12, p. 1765-1769.
4. Morley J. S. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1980, v. 20, p. 81-110.
5. Hill R. L., Smith E. L. J. Biol. Chem., 1957, v. 228, № 2, p. 577-585.
6. Абрамова В. В., Федотов В. П. Пробл. эндокринолог., 1982, т. 28, № 2, с. 68-73.
7. Федотов В. П., Комолов И. С., Плужникова Г. Н. Бюл. Экспер. биол. и мед., 1978, т. 86, № 10, с. 491-493.
8. Швачкин Ю. П., Смирнова А. П., Черкашина Н. И., Шишкина А. А. Химия природн. соедин., 1979, т. 14, № 4, с. 590.
9. Комолов И. С., Морозова Л. Г., Фазекаш И., Фекеге М., Раннау Д., Федотов В. П. Бюл. Экспер. биол. и мед., 1978, т. 85, № 2, с. 215-217.
10. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика, 1976, с. 135.

Поступила в редакцию

9.III.1983

После доработки

3.V.1983

**NATURAL PEPTIDES AND THEIR ANALOGS. XXXI. SYNTHESIS AND
PROPERTIES
OF *RETRO*-ANALOG OF THE METHIONINE-5-ENKEPHALIN**

SHVASHKIN Yu. P., SHISHKINA A. A., SMIRNOVA A. P.,
FEDOTOV V. P., IVANENKO T. I., GUDOSHNIKOV V. I.,
BUSHUEVA G. I., BATRAMEEVA L. A.

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

The synthesis of *retro*-analog of methionine-5-enkephalin was performed. This peptide is an isomer of the natural methionine-5-enkephalin, but differs from it by opposite direction of peptide linkages between the amino acid residues. The influence of *retro*-analog on prolactin secretion was studied both *in vivo* and *in vitro*. The *retro*-analog was found to stimulate the prolactin secretion more effectively than methionine-5-enkephalin.