

## 强啡肽 A-(1-13)类似物的合成及生物活性

陈亚利\* 钟明霖 聂忠贞 董玉轩

(\*南京军区总医院临床分子生物学实验室, 南京 210002; 中国人民解放军药物化学研究所, 北京 102205)

**摘要** 用固相多肽合成方法, 合成了强啡肽 A-(1-13) (I) 及其类似物 [Ala<sup>8</sup>, D-Pro<sup>10</sup>]-DYN A-(1-13)-NH<sub>2</sub> (II) 和 [D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>8</sup>, D-Pro<sup>10</sup>]-DYN A-(1-13)-NH<sub>2</sub> (III), 并对其进行了镇痛活性试验和 MVD 及 RVD 试验。结果表明, 合成产物均有镇痛活性, 其中类似物 III 的镇痛活性是 I 的 3.6 倍, RVD 试验活性比 I 强 135 倍, 比已知的 κ-受体强激动剂 U500488 强 11 倍。

**关键词** 强啡肽 A-(1-13); 阿片活性; 固相多肽合成

阿片肽是高活性的小分子神经肽中的一大类, 作用强度最大的万倍于吗啡。它们不仅有吗啡样镇痛作用, 对中枢神经系统也有很广泛的生理功能和调节作用。天然存在的强啡肽有多种片断结构, 有强啡肽 1-32, 1-24, 1-17, 1-8 和 20-32。强啡肽 1-17 称为强啡肽 A, 于 1979 年由 Goldstein 等从猪脑分得。在 GPI 试验中, 强啡肽的活性比亮脑啡肽 (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH) 强 700 倍, 比 β-内啡肽强 50 倍<sup>[1]</sup>。非天然强啡肽 A-(1-13) [H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-OH] 与强啡肽 A [H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH] 有相同的生物活性和作用性质<sup>[2]</sup>。

本文报道 DYN A-(1-13) (I), [Ala<sup>8</sup>, D-Pro<sup>10</sup>]-DYN A-(1-13)-NH<sub>2</sub> (II) 和 [D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>8</sup>, D-Pro<sup>10</sup>]-DYN A-(1-13)-NH<sub>2</sub> (III) 的合成及其生物活性。其中 I 为已知的高强度 κ-受体激动剂, 合成该化合物的目的既用作参比物, 在等同条件生物活性试验中与合成产物 II 及 III 的活性进行比较, 又是先导物, 便于结构活性关系的探讨。Lemaire<sup>[3]</sup> 和 Turcotte<sup>[4]</sup> 等曾以 Ala<sup>8</sup> 替换 DYN A-(1-13) 中的 Ile<sup>8</sup>, 或以 D-Pro<sup>10</sup> 替换 DYN A-(1-13) 中的 Pro<sup>10</sup>, 生成的两种类似物对 κ-受体的选择性均有提高, 且在 MVD 试验中的抑制活性也有增强。受其启发我们设计合成了以 Ala<sup>8</sup>, D-Pro<sup>10</sup> 同时取代 I 中的 Ile<sup>8</sup> 和 Pro<sup>10</sup> 的 C-末端酰胺化合物 II, 这种变换是以 C-端八肽序列的变化为主, 未涉及 N-端五肽 (相当于亮脑啡肽) 序列。另外, Ronai<sup>[5]</sup>, Herman<sup>[6]</sup> 和 Paterson<sup>[7]</sup> 等的研究表明, 亮脑啡肽或 DYN A-(1-9), DYN A-(1-11) 中的 Gly<sup>2</sup> 以 D-Ala<sup>2</sup> 取代, 生成的类似物不但对代谢稳定, 而且活性大幅度提高。我们将 I 中的 Gly<sup>2</sup>, Ile<sup>8</sup>, Pro<sup>10</sup> 同时以 D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>8</sup>, D-Pro<sup>10</sup> 取代合成了 C-末端酰胺化合物 III。考虑到 C-端以酰胺形式存在可使活性增强和作用持久的特点, 故将 II 及 III 的 C-末端均设计成酰胺。

本文于 1994 年 11 月 23 日收到。

本文曾于 1990 年 8 月在上海召开的“第四次全国多肽学术讨论会”交流。

简写符号如下: κ; Kappa; DYN A; 强啡肽 A; GPI; 豚鼠回肠; Boc; 叔丁氧羰基; Br(Cl)-Z; 2-溴(氯)苄氧羰基; Tos; 对甲苯磺酰基; TFA; 三氟醋酸; DCM; 二氯甲烷; DMF; N,N-二甲基甲酰胺; HOBT; 1-羟基苯并三氮唑; DCC; N,N-二环己基碳二亚胺; DCU; N,N-二环己基脲; TEA; 三乙胺; MVD; 小鼠输精管; RVD; 兔输精管; FAB-MS; 快原子轰击质谱; Nal; 纳络酮; TLC; 薄层色谱。

## 实验部分

## 合成

**试剂** Boc Arg(Tos), Boc Pro(华美生物工程公司), Boc Tyr(Br-Z), Boc Lys(Cl-Z)及 Boc Leu(Peninsula Laboratories), 其余 N-Boc 保护氨基酸为 Sigma 试剂; DCM(北京化工厂, 分析纯), 经无水  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  干燥后重蒸; DMF 经 NaOH 干燥, 减压重蒸得 bp  $40^\circ\text{C}/1.33\text{ kPa}$  馏分; DCC(上海余山化工厂)减压蒸馏收集 bp  $122\sim 124^\circ\text{C}/0.267\text{ kPa}$  馏分; N-甲基吗啡啉(北京化工厂, 化学纯)加 NaOH 浸泡后与茚三酮回流 3 h, 蒸馏收集 bp  $113.5\sim 115^\circ\text{C}$  馏分; TFA(Merck), HOBt(Aldrich)等。

**方法** DYN A-(1-13)及其类似物均采用 Merrifield 固相多肽合成之“逐个接长法”合成。

化合物 I 的合成选用 Merrifield 树脂(交联度 1%, 取代当量  $0.32\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 1.67 g 在  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  0.5 mmol 存在下加入 DME 7.5 ml 及 Boc Lys(Cl-Z) 1 mmol 于  $50^\circ\text{C}$  反应 48 h, 接入第一个氨基酸。以 DMF 与 MeOH 交替洗涤, 再以水快速洗涤两次, 最后仍用 DMF 与 MeOH 交替洗涤几次。其余氨基酸的接肽均按下列步骤依次循环进行; (1) 脱保护基 50% TFA  $1\times 1\text{ min}$ ,  $1\times 20\text{ min}$ ; (2) 洗涤 DCM  $6\times 1\text{ min}$ ; (3) 中和 5% N-甲基吗啡啉  $3\times 2\text{ min}$ ; (4) 洗涤 DCM  $6\times 1\text{ min}$ ; (5) 偶合以 DCM 溶解 1 mmol 保护氨基酸, 用尽可能少的 DMF 溶解 HOBt 1.5 mmol, 将前两者混匀后加入 DCC 1 mmol,  $0^\circ\text{C}$  反应 45 min, 然后滤去白色 DCU 沉淀, 将滤液加入肽树脂反应管, 室温振荡反应 4~6 h; (6) 洗涤 DCM  $6\times 1\text{ min}$ ; (7) 中和 5% N-甲基吗啡啉  $1\times 2\text{ min}$ ; (8) 洗涤 DCM  $6\times 1\text{ min}$ ; (9) 茚三酮反应检测。

如第一次偶合不理想则重复步骤(5)~(9), 但步骤(5)有所改变[接 Arg 和 Gly 肽链(5)不变]: 将保护氨基酸 0.6 mmol 加入反应管, 振荡平衡 5 min 后, 加入 DCC 0.6 mmol, 反应 1~2 h。待茚三酮反应检测结果符合要求, 再按步骤(1)~(9)接入下一个氨基酸。

类似物 II 和 III 的合成选用 MBHA·HCl 树脂(交联度 1%, 取代当量  $0.41\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 0.8 g 经下列步骤洗涤, 脱盐: (1) 10% TEA  $4\times 2\text{ min}$ ; (2) DMF  $1\times 2\text{ min}$ ; (3) DCM  $6\times 1\text{ min}$ ; 再以 Boc Lys(Cl-Z) 0.66 mmol 按 HOBt-DCC 法接入第一个氨基酸。为防止下面接肽过程中“缺端肽”的产生, 加入醋酐 0.47 ml(5 mmol)和 TEA 0.7 ml(5 mmol)与 DMF 15 ml 反应 45 min, 对树脂上的游离氨基进行乙酰化封闭。其余氨基酸接肽均按化合物 I 合成步骤中的(1)~(9)进行。

合成中除用茚三酮反应定量检测每步偶合反应的完全程度外, 还分段水解分析氨基酸组成。全保护肽树脂以“低-高 HF”程序裂解, 粗品肽以  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HOAc 提取, 并经 HPLC 在  $\text{C}_{18}$  反相半制备柱上分离纯化, 紫外检测波长为 280 nm, 洗脱剂为 MeOH-H<sub>2</sub>O(70:30), 内含 0.05% TFA 或 0.05%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , HPLC 图谱见图 1。纯品经氨基酸组成分析, 旋光测定, 不同条件下的 TLC 测定及 FAB-MS 鉴定。测定结果见表 1 和表 2。

**Tab 1 Amino acid analysis of synthetic dynorphin A-(1-13) (I), [Ala<sup>4</sup>, D-Pro<sup>10</sup>] DYN A-(1-13) (NH<sub>2</sub>) (II) and [D-Ala<sup>3</sup>, Ala<sup>4</sup>, D-Pro<sup>10</sup>] DYN A-(1-13)(NH<sub>2</sub>) (III)**

Peptides	Lys	Leu	Pro	Arg	Ile	Phe	Gly	Tyr	Ala
I	2.20(2)	2.00(2)	1.00(1)	3.07(3)	0.98(1)	0.96(1)	1.91(2)	0.64(1)	
II	2.00(2)	2.02(2)	1.10(1)	2.90(3)		0.95(1)	1.81(2)	0.33(1)	0.89(1)
III	2.00(2)	2.00(2)	0.95(1)	3.00(3)		0.96(1)	0.92(1)	0.47(1)	1.93(2)

Theoretical values in parentheses.

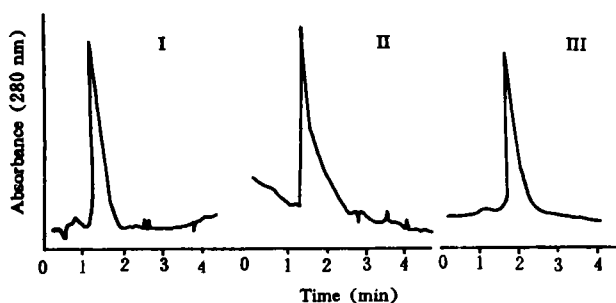


Fig 1 HPLC of DYN A-(1-13) (I),  $[\text{Ala}^8, \text{D-Pro}^{10}]$  DYN A-(1-13)( $\text{NH}_2$ ) (II) and  $[\text{D-Ala}^2, \text{Ala}^8, \text{D-Pro}^{10}]$  DYN A-(1-13)( $\text{NH}_2$ ) (III). Conditions: Waters  $\text{C}_{18}$  reverse-phase column (0.78 cm  $\times$  30 cm); Eluent, 70% MeOH containing 0.05% TFA; Flow rate, 1.0 ml  $\cdot$  min $^{-1}$ ; UV monitor, 280 nm, 13788 kPa.

Tab 2 Characterization of synthetic dynorphin A-(1-13) (I),  $[\text{Ala}^8, \text{D-Pro}^{10}]$  DYN A-(1-13) ( $\text{NH}_2$ ) (II) and  $[\text{D-Ala}^2, \text{Ala}^8, \text{D-Pro}^{10}]$  DYN A-(1-13)( $\text{NH}_2$ ) (III)

Peptides	$[\alpha]_D^{27}$	TLC(Rf)		FAB-MS
		A	B	(M+H) $^+$
I	-62.1	0.53	0.71	1605
II	-56.9	0.55	0.66	1563
III	-62.4	0.55	0.65	1576

A. BuOH—Pyr—HOAc—H $_2$ O (6 : 6 : 12 : 4); B. BuOH—HOAc—H $_2$ O (4 : 2 : 5).

## 生物活性试验

### 镇痛活性试验

材料 18~23 g 昆明种小鼠, 雌雄不限。

方法 腹腔注射 0.6% HOAc 引起小鼠扭体反应, 5 min 后经脑室给予合成阿片肽 10  $\mu$ l, 测其 ED $_{50}$  值。结果见表 3。

Tab 3 Effects of icv synthetic peptides (10  $\mu$ l) on writhing response in mice 5 min after ip acetic acid,  $n = 8$

Peptides	ED $_{50}$ ( $\mu$ M)	Rel. ratio
DYN A-(1-13)	1.44	100
$[\text{Ala}^8, \text{D-Pro}^{10}]$ DYN A-(1-13)( $\text{NH}_2$ )	1.39	103.6
$[\text{D-Ala}^2, \text{Ala}^8, \text{D-Pro}^{10}]$ DYN A-(1-13)( $\text{NH}_2$ )	0.399*	361

ED $_{50}$  is the concentration which inhibits writhing response by 50 percent. \*  $P < 0.01$ .

给药后大多数动物出现典型的阿片样镇痛活性。给类似物 III 后, 多数动物在 20~30 min 内未恢复扭体反应。

### 体外组织试验

材料 30~40 g 昆明种雄性小鼠; 青紫蓝种雄兔。

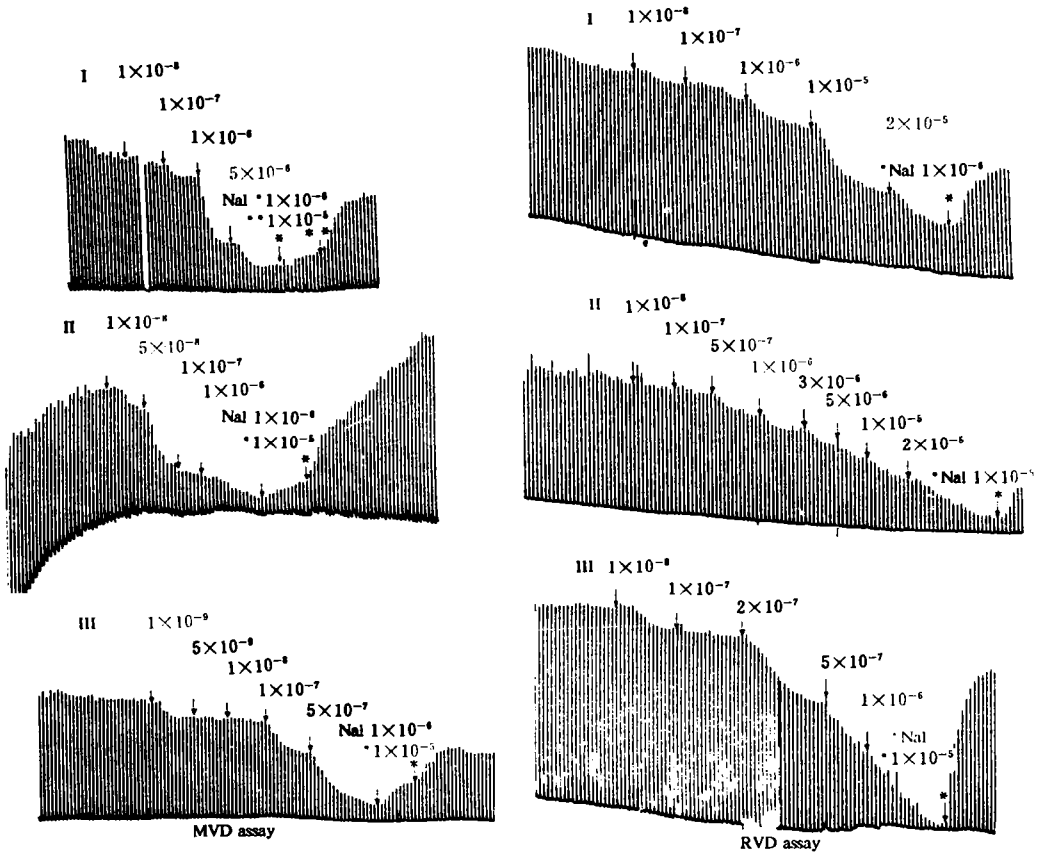
方法 电刺激诱发小鼠或兔输精管收缩, 然后测定药物抑制作用的 IC $_{50}$  值。结果见表 4

与图 2。

**Tab 4 Mouse vas deferens(MVD) and rabbit vas deferens(RVD) assays of DYN A-(1-13) and analogs**

Peptides	IC <sub>50</sub> (μm)		MVD/RVD	Rel. ratio in RVD
	MVD	RVD		
DYN A-(1-13)	0.74	19	3.9 × 10 <sup>-2</sup>	11.7
[Ala <sup>8</sup> , D-Pro <sup>10</sup> ]-	0.20	21	9.5 × 10 <sup>-2</sup>	1.2
[D-Ala <sup>2</sup> , Ala <sup>8</sup> , D-Pro <sup>10</sup> ]-	0.059	0.14	42.0 × 10 <sup>-2</sup>	0.028
U50488		1.70	1	1

IC<sub>50</sub> is the concentration which suppresses the electrically stimulated muscle contraction by 50 percent.



**Fig 2 DYN A-(1-13) and its analogs caused inhibition of electrically evoked contractions of mouse vas deferens(MVD) and rabbit vas deferens(RVD). This effect is blocked by naloxone(Nal).**

在 MVD 及 RVD 试验中, DYN A-(1-13)及其合成类似物 II 和 III 均能抑制电刺激诱发的输精管收缩, 且这种抑制作用均能被纳络酮逆转。

### 结果与讨论

本实验采取 DCC-HOBt 法, DCC 法联用接肽, 共合成了 3 个十三肽。其中 DYN A-(1-13)

为已知肽, [Ala<sup>8</sup>, D-Pro<sup>10</sup>]-DYN A-(1-13)-NH<sub>2</sub> 与 [D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>8</sup>, D-Pro<sup>10</sup>]-DYN A-(1-13)-NH<sub>2</sub> 为新肽, 未见报道。

镇痛活性试验及两种动物离体组织的试验结果均表明: 3个合成产物均有阿片样活性, 类似物 II 与母体 DYN A-(1-13) 的镇痛活性及离体抑制强度相当, 类似物 III 的镇痛活性为 DYN A-(1-13) 的 3.6 倍, 离体 RVD 试验中活性为 DYN A-(1-13) 的 136 倍, 为 U50488 的 12 倍, 而且, 从 MVD/RVD 值可看出, III 比 I 对  $\kappa$ -受体有更高的选择性。另外, I 和 U50488 是已知的  $\kappa$ -受体强效激动剂, 因此, III 也极有可能是  $\kappa$ -受体的强激动剂。

以上结果表明, 在 DYN A-(1-13) 中, 将 Ile<sup>8</sup>, Pro<sup>10</sup> 同时以 Ala<sup>8</sup>, D-Pro<sup>10</sup> 替换并改造成酰胺, 对受体的选择性及镇痛活性均无明显影响; 而将 Gly<sup>2</sup>, Ile<sup>8</sup>, Pro<sup>10</sup> 同时以 D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>8</sup>, D-Pro<sup>10</sup> 替换并改造成酰胺, 无论是对镇痛活性还是对受体的选择性均产生明显影响。由此认为, DYN A-(1-13) 中的 2-位残基对肽段的活性与选择性都很重要, D-Ala<sup>2</sup> 取代不仅可以提高脑啡肽类似物的活性, 而且还提高了 DYN A-(1-13) 类似物的活性, 似乎是 N-端五肽即脑啡肽段在其中起更重要的作用。至于 III 是否在提高活性与对  $\kappa$ -受体选择性的同时还提高了在体内对代谢的稳定性, 还有待于进一步的实验证实。

**致谢** 本文工作得到中国医学科学院药物研究所鲁桂琛研究员及王德心副研究员的热心指教。

### 参 考 文 献

- 1 龚岳亭. 生物活性肽结构与功能. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 141~162
- 2 Goldstein A, Fichli W, Lowney L *et al.* Porcine pituitary dynorphin; Complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 7219
- 3 Lemaire S, Lafrance L, Dumont Me. Synthesis and biological activity of dynorphin-(1-13) and analogs substituted in position 8 and 10. *Int J Peptide Protein Res*, 1986, **27**: 300
- 4 Turcotte A, Lalonde JM, Serge SP *et al.* Dynorphin-(1-13) I. Structure-function relationships of Ala-containing analogs. *Int J Peptide Protein Res*, 1984, **23**: 361
- 5 Ronai AZ, Berzetei I, Bajusz S. Differentiation between opioid peptides by naltrexone. *Eur J Pharmacol*, 1977, **45**: 393
- 6 Herman BH, Leslle FM, Goldstein A. Behavioral effects and *in vivo* degradation of intraventricularly administered Dynorphin-(1-13) and D-Ala-Dynorphin-(1-11) in rats. *Life Sci*, 1980, **27**: 883
- 7 Paterson SJ, Kosterlitz HW, Vavrek RJ *et al.* Effects of D-amino acid substitution in dynorphin A (1-9) on binding at the  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -sites. *Neuropeptides*, 1984, **5**: 177
- 8 Tam JP, Heath WF, Merrifield RB. SN2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide; Evidence and application in peptide synthesis. *J Am Chem Soc*, 1983, **105**: 6442

## SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF DYNORPHIN A-(1-13) ANALOGS

YL Chen\*, MN Zhong, ZZ Nie and YX Dong

(\* Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002;  
Institute of Pharmaceutical Chemistry, PLA, Beijing, 102205)

**ABSTRACT** Dynorphin A-(1-13) (1) and its two analogs were synthesized by solid-phase method. Fully-protected peptides were cleaved from the resin with HF. The three products were purified and their analgesic activity (antiwrithing response in mouse) and receptor affinity in mouse vas deferens (MVD) and rabbit vas deferens (RVD) were measured. The biological and pharmacological results showed that the replacement of  $\text{Gla}^2$ ,  $\text{Ile}^8$  and  $\text{Pro}^{10}$  by  $\text{D-Ala}^2$ ,  $\text{Ala}^8$  and  $\text{D-Pro}^{10}$  caused an increase in analgesic activity, receptor affinity and selectivity. In analgesia and RVD assay, its activity is 2.6 times and 135 times respectively higher than dynorphin A-(1-13). The structure-activity relationships were briefly discussed.

**Key words** Dynorphin A-(1-13); Peptides synthesis; Opioid activity

