

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕНТАПЕПТИДНОГО АНАЛОГА ТИРОЛИБЕРИНА

В.И. Поликарпова<sup>1</sup>, В.П. Мартинович<sup>1</sup>, В.П. Голубович<sup>1</sup>, П.С. Пронько<sup>2</sup>

1. *Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, г. Минск*
2. *Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Беларусь, г. Гродно*  
*vermar@iboch.bas-net.by*

Тиролиберин, или тиротропин-рилизинг-гормон (ТРГ), трипептид последовательности GIp-His-Pro-NH<sub>2</sub>, является первым представителем гипоталамических рилизинг-гормонов, для которого в 1969 гг. была установлена первичная структура [1, 2]. Тиролиберин является важным гормональным регулятором, он стимулирует выделение и биосинтез тиротропина и пролактина. Повышенное внимание исследователей привлекли разнообразные эффекты тиролиберина, связанные с его непосредственным влиянием на функционирование центральной нервной системы. Тиролиберин обладает ярко выраженным антидепрессивным действием, которое проявляется в активации ряда функций ЦНС [3, 4]. Он обнаружил противосудорожное, антикаталептическое и антигипотермическое действие, является антагонистом многих веществ, угнетающе действующих на ЦНС. ТРГ устраняет эффекты резерпина и хлорпромазина, галоперидола; обладает аналептическими свойствами, блокируя действие этанола, барбитуратов, некоторые реакции морфина и опиоидных пептидов.

Антидепрессивные и другие ЦНС-активирующие функции ТРГ представляют большой интерес для медицины, однако применение его как аналептика и антидепрессанта лимитируется из-за двух основных обстоятельств: кратковременности действия и проявления эндокринных эффектов высвобождения тиротропина, пролактина и других гормонов аденогипофиза. Поэтому актуальной проблемой является поиск новых аналогов ТРГ с разделением центральных и эндокринных свойств, с повышенной и пролонгированной активностью.

С целью создания эффективного, устойчивого к протеолизу препарата для лечения алкогольной зависимости был предложен пентапептидный аналог тиролиберина, который содержит дополнительный фрагмент Gly-Pro на карбоксильном конце. Такая модификация должна повысить энзиматическую устойчивость пептида, усилить его стимулирующие эффекты в ЦНС.

Основными моментами, которые следовало учитывать при разработке технологии получения пентапептида GIp-His-Pro-Cly-Pro-NH<sub>2</sub>, являются специфические свойства гистидина и пироглутаминовой кислоты: повышенная склонность остатка His к рацемизации и возможность протекания побочных реакций по имидазольному кольцу, лабильность пирролидинового цикла при кислых и сильно щелочных значениях pH. Плохая растворимость С-концевого пролинамида в большинстве органических растворителей и пространственные затруднения при конденсации с азотом иминогруппы создают дополнительные осложнения.

Разработанная схема синтеза GIp-His-Pro-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> включала 7 стадий. Заключительной стадией являлась блочная конденсация пептидов последовательности 1-2 и 3-5 (рис.). Аминоконцевой фрагмент GIp-His был получен в виде метилового эфира карбодииимидным методом, для присоединения его к С-концевому трипептиду был выбран азидный метод, который позволяет избежать рацемизации на стадии конденсации. Промежуточное соединение, гидразид GIp-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>, получен обработкой GIp-His-OMe гидразин-гидратом. Для получения трипептида Pro-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> использовали карбодииимидную конденсацию с добавлением оксибензотриазола. Его синтез включал стадии получения С-концевого дипептида Boc-Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, отщепления Boc-защиты с

аминогруппы, получения трипептида Boc-Pro-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> и его деблокирования. Разработан также альтернативный вариант его синтеза, включающий получение пептида Boc-Pro-Gly-OH методом сукцинимидных эфиров и конденсацию его с пролинамидом. Из-за повышенной гидрофильности пролинсодержащие пептиды плохо растворимы в этилацетате, основном растворителе, используемом для очистки пептидов путем промывок, поэтому для этой цели применяли хлороформ. При получении Boc-Pro-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> необходимо тщательно промыть хлороформом или метанолом осадок, образовавшийся в реакционной смеси, так как кроме дициклогексилмочевины он содержит трипептид.

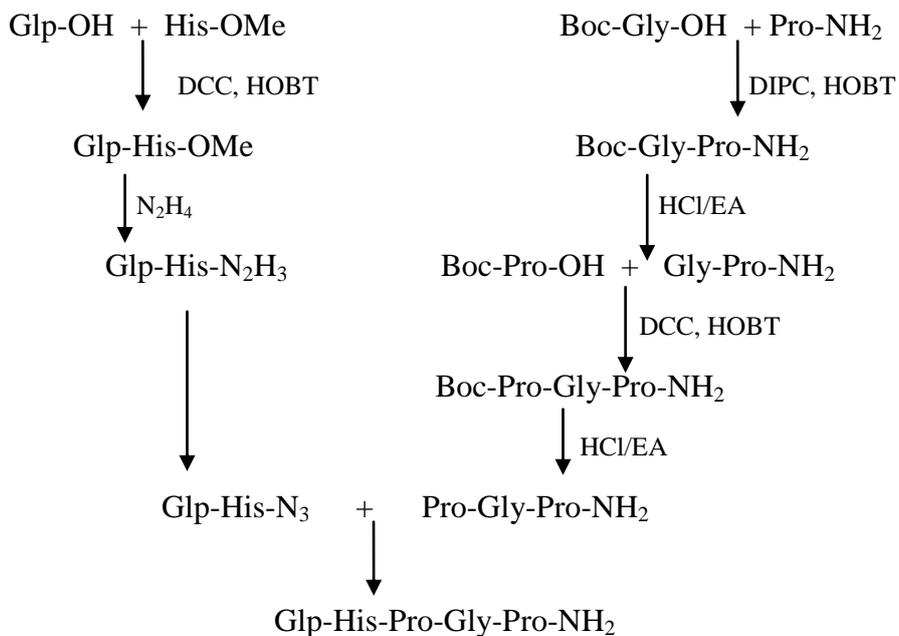


Схема синтеза аналога тиролиберина Glp-His-Pro-Gly-Pro-NH<sub>2</sub>

Азидную конденсацию Glp-His-N<sub>3</sub> и Pro-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> проводили в диметилформамиде – растворителе, обеспечивающем хорошую растворимость всех компонентов и способствующем протеканию реакции. Для перевода гидразида в азид использовали изоамилнитрит, необходимую реакцию среды создавали добавлением HCl в этилацетате и триэтиламина. Реакцию проводили при температуре -15 – (-20) °C.

Для получения хроматографически однородного пептида проводили очистку путем многократных переосаждений на первом этапе, заключительной стадией являлась колоночная хроматография на силикагеле с использованием в качестве элюэнта смеси хлороформ-метанол 2:1. Пентапептид был получен с суммарным выходом 16%. Разработан комплекс методов исследования его чистоты и однородности, включающий масс-спектрометрию, определение удельного оптического вращения, тонкослойную хроматографию в нескольких элюэнтных системах, элементный анализ.

Разработанная технология получения пентапептидного аналога тиролиберина, характеризующаяся высокими выходами соединений на промежуточных стадиях синтеза, обеспечивающая отсутствие рацемизации на стадиях конденсации, может служить основой для промышленного получения субстанции Glp-His-Pro-Gly-Pro-NH<sub>2</sub>.

### Литература

1. Boler, J. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide / J. Boler, F. Enzmann, K. Folkers, C.Y. Bowers, A.V. Schally // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1969. – Vol. 37, N 4: – P. 705–710.

2. Burgus, R, Molecular structure of the hypothalamic hypophysiotropic TRF factor of ovine origin: mass spectrometry demonstration of the PCA-His-Pro-NH<sub>2</sub> sequence / R. Burgus, T.F. Dunn, D. Desiderio, R. Guillemin // C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat. (in French). – 1969. – Vol. 269, N 19: p.1870–1873.
3. Чепурнов. С.А. Нейропептид тиролиберин – эндогенный антиконвульсант в головном мозге / С. А. Чепурнов, Н.Е. Чепурнова, К.Р.Аббасова, О.В.Гончаров // Успехи физиол. наук – 2002. – Т. 33, № 1 – С. 29-39.
4. Monga, V. Chemistry and biology of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its analogs / V. Monga, C.L. Meena, N. Kaur, R. Jain // Curr Med Chem. – 2008. – Vol. 15. – P. 2718-2733.

## **DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR PENTAPEPTIDE ANALOG THYROLIBERIN**

<sup>1</sup>Polikarpova V.I., <sup>1</sup>Martsinovich V.P., <sup>1</sup>Golubovich V.P., <sup>2</sup>Pronko P.S.

1. *Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*
2. *Institute of Biochemistry of biologically active compound, National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus*

The developed technology of thyrotropin-releasing hormone analogue pentapeptide provides high yields of compounds at intermediate stages of the synthesis, ensures the absence of racemization in the condensation step.