



УДК 547.964.4.057 : 615.276.4 : 577.322.7'112.825

**СИНТЕЗ ИММУНОПОЭТИНОВ — НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАГМЕНТОВ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ГРУПП G, M, E и A****Чипенс Г. И., Анцанс Ю. Е., Зариньш П. П.,
Осис Л. П.***Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Предложена модель для последовательных реакций ограниченного протеолиза и квазициклизации молекул белков, на базе которой найдены новые активные участки в молекулах иммуноглобулинов различных классов. Осуществлен химический синтез фрагментов IgG-(345—349) (Glu-Pro-Gln-Val-Tyr), IgM-(451—455) (Arg-Pro-Asp-Val-Tyr), IgA-(347—351) (Arg-Pro-Glu-Val-His) и IgE-(430—435) (Ala-Ala-Pro-Glu-Val-Tyr). Новой группе соединений, проявляющей некоторые общие с активным центром тимопоэтина (тимопептином) биоэффекты, дано название иммунопоэтины.

Иммуноглобулины (Ig) являются полифункциональными соединениями. Как известно, структурные особенности иммуноглобулинов обеспечивают выполнение ими двух главных функций — связывания антигенов и расширения физиологических последствий этого акта (связывание компонента, опсоническая активность и др.) [1]. Кроме обеспечения совокупности реакций по непосредственному удалению и нейтрализации генетически чужеродного материала в последние годы установлена еще одна важная функция иммуноглобулинов — участие в регуляции взаимодействия субпопуляций В- и Т-лимфоцитов и макрофагов.

Так, для индукции синтеза поликлональных антител В-лимфоцитами требуется их кооперация с Т-клетками и макрофагами, которые выделяют фрагмент иммуноглобулина, активирующий В-клетки, — так называемый сигнал пролиферации (молекулярная масса этого фрагмента около 14 000 Да), и другой высокомолекулярный фрагмент — сигнал дифференциации. Эти фрагменты образуются из Fc-части [2] иммуноглобулина G₁. Целая молекула иммуноглобулина G₁ и фрагменты Fab и F(ab')₂ активность не проявляют [3].

Как показывают работы последних лет, активные центры лигандов, участвующие в процессах белок-белкового или пептид-белкового взаимодействия, имеют относительно жестко фиксированную пространственную структуру и включают в среднем 6—8 аминокислотных остатков. Это, по-видимому, отражает некоторую универсальность физико-химических основ узнавания и комплексообразования на молекулярном уровне [4, 5]. Можно предположить, что размеры активных центров молекул иммуноглобулинов, взаимодействующих с клеточными рецепторами, не являются исключениями из этого правила.

Используя ранее установленные закономерности квазициклизации низкомолекулярных пептидных лигандов (пептидных гормонов, кининов и др.) и активных центров белков [4, 6], мы пытались на основе реакций ограниченного протеолиза [7] разработать новые подходы, позволяющие а priori выявить потенциальные биологически активные центры в молекулах иммуноглобулинов и других белков. Нашу рабочую гипотезу коротко можно сформулировать следующим образом: ферментативное расщепление пептидной связи в реакциях ограниченного протеолиза приводит к образованию свободных amino- и карбоксильных групп, которые, взаимодействуя с функциональными группами боковых остатков аминокислот пептид-

Сокращения: DMF — диметилформамид, DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, HOBT — N-гидроксисбензотриазол, ONb — n-нитробензил, Pfp — пентафторфенил.

ной цепи посредством ионных, водородных и других внутримолекулярных связей, могут служить центрами внутримолекулярной квазициклизации молекул (см. примеры образования квазициклических форм пептидных гормонов и кининов [8, 9]). В результате реакций квазициклизации образуются новые пространственные структуры — возможные активные центры молекул, которые могут обеспечить взаимодействие иммуноглобулинов с клеточными рецепторами (появление новой биологической функции) или с новыми ферментными системами (последующее отщепление фрагмента цепи с образованием потенциального биорегулятора и новых центров квазициклизации). Таким образом, можно говорить о рядах или циклах последовательных реакций ограниченного протеолиза и квазициклизации. Следовательно, согласно нашей гипотезе, в первичной структуре молекул иммуноглобулинов закодирована определенная последовательность отщепления фрагментов иммуноглобулинов, выполняющих функции иммунорегуляторов и включающих поэтапно необходимые биохимические реакции, определяющие, например, отдельные стадии кооперации В- и Т-лимфоцитов и макрофагов и ряд других функций. Точки начала реакций последовательного ограниченного протеолиза и квазициклизации в случае молекул иммуноглобулинов могут находиться на поверхностях доменов (как при образовании тафцина [6]), в участках междоменной пептидной цепи (пример биогенеза ригина [6, 10]) или в С-концевых участках цепи, где одним из центров квазициклизации может служить карбоксильная или амидная группа С-концевой аминокислоты.

При проверке высказанной гипотезы интерес вызывает анализ вовлеченных в реакции последовательного ограниченного протеолиза и квазициклизации иммуноглобулинов вблизи участков, обладающих иммунорегулирующими функциями, например вблизи фрагментов, соответствующих тафцину и ригину. Если наши предположения о реакциях последовательного ограниченного протеолиза и квазицикликации верны, то в полипептидной цепи, расположенной с С- или N-конца от аминокислотной последовательности тафцина или ригина в иммуноглобулинах, могут находиться активные центры молекул или фрагменты — потенциальные иммунорегуляторы. Наше внимание привлекла аминокислотная последовательность Glu-Pro-Gln-Val-Tyr (IgG-(345—349)) [2], расположенная в полипептидной цепи рядом с фрагментом, соответствующим ригину (IgG-(341—344)) [6], имеющая общие и предположительно эквивалентные с активным центром тимопептина (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr, тимопептин TP-5) остатки. Как известно [11, 12], один из конформеров тимопептина имеет квазициклическое строение (образование ионной связи между остатками аргинина и аспарагиновой кислоты). Учитывая принципы сигнатур* и эквивокации, можно предположить, что остатки глутаминовой кислоты и глутамин могут выполнять аналогичные функции, фиксируя квазициклическую структуру посредством водородной связи. Этому может способствовать изгиб молекулы остатком пролина (благодаря фиксированному в пятичленной системе углу Φ остаток пролина изгибает пептидную цепь и определяет общую форму молекул [7]). С-Концевые дипептиды у обоих фрагментов имеют одинаковое строение.

Структурное сходство фрагмента IgG-(345—349) и тимопептина позволяет высказать предположение, что в этом участке молекулы иммуноглобулина может быть расположен функционально активный центр молекулы. Это предположение подтвердилось: при анализе первичных структур иммуноглобулинов классов М, А и Е в гомологичных фрагментах IgG-(345—349) районах (как известно, иммуноглобулины имеют до 40% гомологии первичных структур, что отражает их эволюцию из общего предшественника [13]) были выявлены аналогичные структуры (таблица). Новым соединениям было дано условное обозначение иммунопептина (IP).

Структура IgM-(451—455) отличается от тимопептина лишь одной заменой $Lys^2 \rightarrow Pro^2$, структура IgA-(347—351) — тремя, т. е. дополнитель-

* Сигнатуры — наборы свойств, определяющие функцию, которые, согласно принципу эквивокации, в некоторых ситуациях могут быть общими у различных аминокислотных остатков (см. [4]).

Номер пептида	Пептид	Фрагмент иммуноглобулина	Обозначение
(I)	Glu-Pro-Gln-Val-Tyr	IgG-(345-349)	IPG-5
(II)	Arg-Pro-Asp-Val-Tyr	IgM-(451-455)	IPM-5
(III)	Arg-Pro-Glu-Val-His	IgA-(347-351)	IPA-5
(IV)	Ala-Ala-Pro-Glu-Val-Tyr	IgE-(430-435)	IPE-6

но Asp³ → Glu³ и Tyr⁵ → His⁵, а в IgE-(430-435) α-аминогруппа дипептида Ala-Ala предположительно выполняет функции гуанидиновой группы остатка Arg.

Синтез предполагаемых активных фрагментов иммуноглобулинов был осуществлен классическими методами пептидной химии в растворе. Так, IPG-5 синтезировали последовательным наращиванием пептидной цепи (схема 1). Схема синтеза IPM-5 и IPA-5 включала в себя конденсацию двух пептидных блоков — защищенного аргинилпролина и соответствующего защищенного трипептида (схемы 2, 3). Гексапептид IPE-6 синтезировали конденсацией двух трипептидов (схема 4). Для блокирования боковых цепей тирозина и гистидина выбрана бензильная (Bzl), а аргинина — бензилоксикарбонильная (Z) группы. β-Карбоксильная функция аспарагиновой кислоты и γ-карбоксильная группа глутаминовой кислоты блокированы Bzl-группой, а карбоксильная функция тирозина или гистидина защищалась переводом в *n*-нитробензиловый эфир (ONb). Временная защита N^α-аминофункции осуществлялась Z- или Boc-группами. Конденсацию проводили методами активированных эфиров (*n*-нитрофенилового и пентафторфенилового) и карбодимидным в присутствии *N*-гидроксисбензотриазола. Снятие Boc-группы осуществлялось насыщенными растворами HCl в этилацетате или уксусной кислоте. Остальные защитные группы удаляли в одну стадию каталитическим гидрогенолизом в водно-спиртовом растворе над Pd-чернью в присутствии уксусной кислоты. За ходом реакций следили с помощью ТСХ. При необходимости промежуточные продукты подвергали хроматографической очистке на силикагеле. Целевые вещества очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ. Чистота и индивидуальность целевых соединений подтверждена ТСХ, электрофорезом, элементарным анализом, а также данными спектров ¹H-ЯМР.

Предварительные данные исследования * биологических свойств синтезированных соединений в опытах *in vitro* в тесте спонтанного Е-розеткообразования Т-лимфоцитов человека показали, что иммунопоэтины G и M подобно тимопентину TP-5 и левамизолу в сопоставимых районах концентраций оказывают нормализующий эффект на Т-лимфоциты, имеющие повышенную или пониженную активность, но мало влияют на активность «нормальных» лимфоцитов. Эффект зависит как от функционального состояния лимфоцитов, так и от структуры и концентрации соединений. Например, при активности лимфоцитов выше нормы при концентрациях 10⁻⁸—10⁻⁶ М активности IPM-5 и TP-5 одинаковы, а IPG-5 в 1,5 раза менее активен, чем TP-5. При активности лимфоцитов ниже нормы в том же районе концентраций IPM-5 показывает 60—80% активности TP-5. Активность IPG-5 при концентрации 10⁻⁸ М составляет 120%, а при 10⁻⁶ М — лишь 30% активности TP-5, т. е. кривая доза — активность для IPG-5 другая, чем для TP-5.

Значение квазициклических типов структур (взаимодействие аминокислот в положениях 1 и 3, см. выше) для узнавания и активации рецепторов иммунопоэтинов покажет дальнейший синтез и изучение модельных соединений, в том числе циклических. Учитывая структурное сходство иммунорегуляторов и ингибиторов протеиназ [14], альтернативным является квадрупольный тип лиганд-рецепторного взаимодействия, согласно

* Опыты были проведены в лаборатории молекулярной биологии и фармакологии пептидов Института органического синтеза АН ЛатвССР под руководством канд. биол. наук Г. А. Афанасевой.

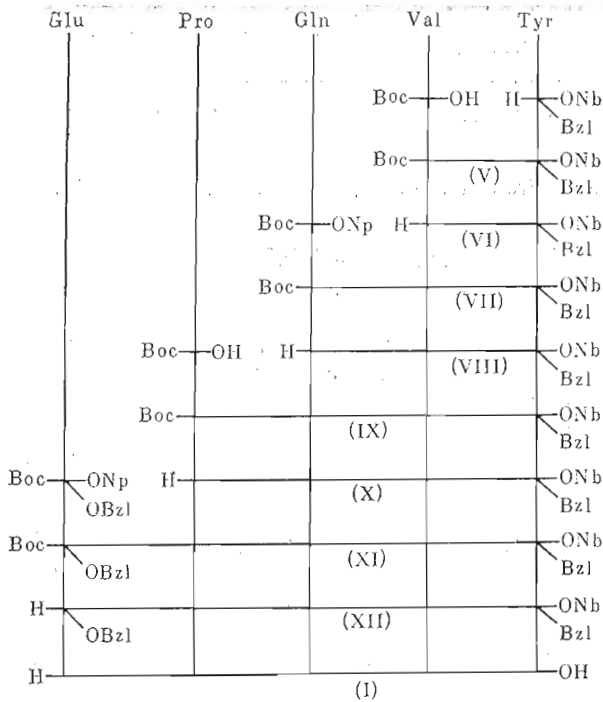


Схема 1. Синтез иммунопоэтина IPG-5 (I), фрагмента 345–349 IgG человека

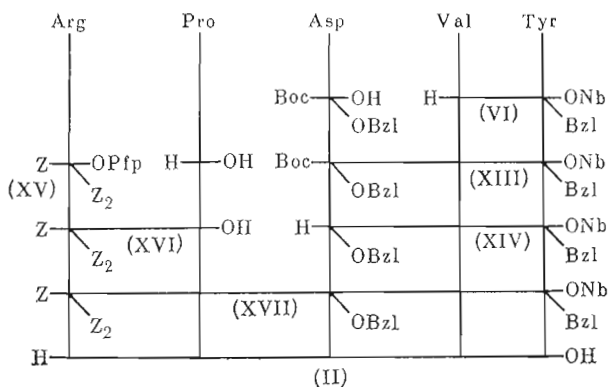


Схема 2. Синтез иммунопоэтина IPM-5 (II), фрагмента 451–455 IgM человека

которому остатки в положениях 1 и 3 образуют «вилку», взаимодействующую с «розеткой» клеточного рецептора.

Важно, что остаток Pro², изгибающий молекулу и ограничивающий подвижность предстоящего аминокислотного остатка [4], обуславливает специфические конформационные особенности молекул иммунопоэтинов. Поэтому весьма вероятно, что иммунопоэтины имеют другие типы клеточных рецепторов, отличные от таковых для тимопентина TP-5. Об этом свидетельствуют различные структурно-функциональные соотношения в рядах TP-5 и IP-5. Полученные результаты исследования биологических эффектов этих соединений будут опубликованы отдельно.

В заключение необходимо отметить, что в настоящее время известно ~15 типов различных субпопуляций T- и B-лимфоцитов (эффекторы, супрессоры, хелперы и т. п.). Несмотря на большое число лимфоидных клеток (~10¹² у человека) и их потенциальных клонов (~10⁸), учитывая их общее происхождение из одного предшественника — стволовой клетки,

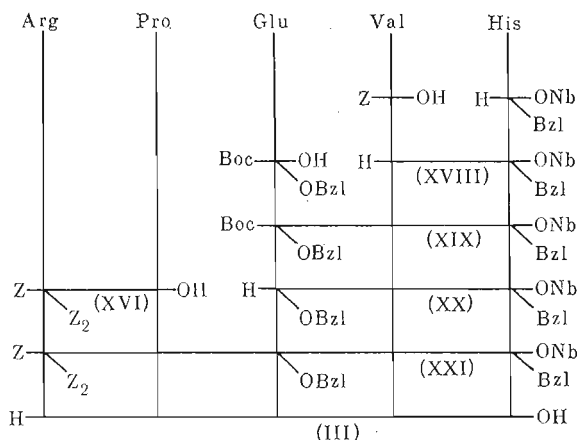


Схема 3. Синтез иммунопептина IPA-5 (III), фрагмента 347-351 IgA человека

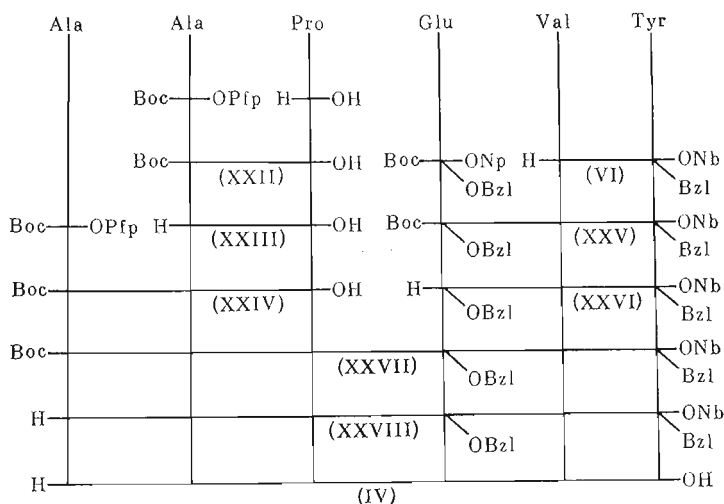


Схема 4. Синтез иммунопептина IPE-6 (IV), фрагмента 430-435 IgE человека

следует предполагать, что основные механизмы регуляции их функциональной активности одинаковы или по крайней мере однотипны. Это поднимает весьма важный вопрос: какими факторами в таком случае обеспечивается специфичность и селективность действия природных иммунорегуляторов? Если механизмы регуляции одинаковы или однотипны, то в кровяном русле иммунорегулятор будет действовать неселективно на лимфоидные клетки самых различных субпопуляций и клонов, что исключает целенаправленность регуляции.

Согласно разрабатываемой нами модели, взаимодействие субпопуляций В- и Т-лимфоцитов и макрофагов регулируется не только гормонами и центральной нервной системой, но и особым классом биорегуляторов — тетинами (франц. tête-à-tête) — низкомолекулярными фрагментами иммуноглобулинов. Они образуются на поверхности клеточных мембран в реакциях протеолиза согласно вышеизложенному механизму реакций последовательного ограниченного протеолиза и квазициклизации и непосредственно передаются другим клеткам во время их контакта, т. е. кооперации (здесь можно провести аналогию нейромедиатор — синаптическая щель). Это, учитывая огромное количество лимфоцитов и их клонов, имеет исключительное значение для обеспечения селективности действия иммунорегуляторов — тетингов.

Иммунопоэтины, тафцин и ригин — первые кандидаты на включение в предполагаемый класс новых биостимуляторов — тетинов. Для доказательства реального существования тетинов необходимо установить их образование и функционирование в живых организмах, что является задачей будущего.

Экспериментальная часть

Для синтеза соединений (I) — (IV) использовали аминокислоты и некоторые их производные фирмы Reanal. Температуру плавления всех соединений определяли в открытых капиллярах (приведена без исправления). Удельное оптическое вращение измеряли на цифровом поляриметре Perkin — Elmer 141 (США) при 20° С, электрофорез проводили на бумаге FN-16 (ГДР) в 1 М уксусной кислоте (рН 2,4) при градиенте потенциала 18 В/см. Электрофоретическая подвижность соединений приведена по отношению к гистидину (E_{HIS}). ТСХ осуществляли на пластинках Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ в хроматографических системах: хлороформ — этилацетат — этанол — уксусная кислота — вода, 17:0,8:0,5:0,2:0,03 (А); хлороформ — этилацетат — этанол — уксусная кислота — вода, 85:8:5:2:0,25 (Б); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 85:10:5 (В); *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 4:1:1:2 (Г); *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 10:15:3:12 (Д); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 5:3:1:2 (Е); хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 120:41:6:6 (Ж); хлороформ — метанол, 9:1 (З); бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (И). Вещества обнаруживали в УФ-свете, нингидрином, реактивами Сакагучи, Бартона и хлорбензидином. Спектры ¹H-ЯМР получали на приборе WM-360 (Bruker, ФРГ). Аналитическую и препаративно обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на приборе Du Pont 830 (колонка Zorbax C₈ размером 2,12××25 см). Для хроматографической очистки промежуточных соединений на силикагеле использовали препаративный хроматограф Chromatopac. prep. (Jobin Ivon, Франция). Легколетучие растворители упаривали в вакууме водоструйного насоса, а DMF — при 0,5–1,0 мм рт. ст. и температуре не выше 25–35° С. Вещества высушивали в вакууме над P₂O₅/KOH.

Woc-Val-Tyr(Bzl)-ONb (V). К охлажденному до 0° С раствору 15,94 г (40 ммоль) Woc-Val в 100 мл DMF последовательно добавляли 5,4 г (40 ммоль) НОВТ и 16 г (36 ммоль) Tyr(Bzl)-ONb·HCl, 8,25 г (40 ммоль) DCC и 6,2 мл (36 ммоль) диизопропилэтиламина. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0° С, выдерживали 15 ч при 4° С и 4 ч при 20° С. Дихлоргексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 5% раствором NaHCO₃, водой, 10% раствором KHSO₄, водой, высушивали над MgSO₄ и упаривали. Полученное масло кристаллизовали растиранием в эфире. Выход 20,5 г (94%); т. пл. 122–123° С; $[\alpha]_D^{20}$ –13,6° (с 0,5, DMF); R_f 0,66 (А), 0,91 (Б).

Val-Tyr(Bzl)-ONb·HCl (VI). 20 г (33 ммоль) дипептида (V) растворяли в 60 мл ледяной уксусной кислоты, приливали 50 мл насыщенного раствора HCl в ледяной уксусной кислоте, выдерживали 20 мин, упаривали и полученное масло кристаллизовали растиранием в сухом этилацетате. Выход 17,1 г (95%); т. пл. 172–173° С; $[\alpha]_D^{20}$ +28,2° (с 1, DMF); E_{HIS} 0,62; R_f 0,72 (Г), 0,68 (Д), 0,55 (Ж). Найдено, %: С 62,24; Н 6,13; N 7,80. C₂₈H₃₂N₃O₆Cl. Вычислено, %: С 62,04; Н 5,90; N 7,76.

Woc-Gln-Val-Tyr(Bzl)-ONb (VII). К раствору 5,4 г (10 ммоль) соединения (VI) в 50 мл DMF последовательно добавляли 4,4 г (12 ммоль) Woc-Gln-ONp и 1,71 мл (10 ммоль) диизопропилэтиламина. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 25° С, растворитель упаривали, остаток растворяли в этилацетате и последовательно промывали 5% раствором NaHCO₃, водой, 10% раствором KHSO₄, водой и высушивали над MgSO₄. Перекристаллизовывали из этанола (~600 мл). Выход 5,7 г (77,7%); т. пл. 187–189° С; $[\alpha]_D^{20}$ –8,5° (с 1, DMF); R_f 0,78 (Ж). Найдено, %: С 62,28; Н 6,64; N 9,65. C₃₈H₄₇N₅O₁₀. Вычислено, %: С 62,21; Н 6,41; N 9,55.

Gln-Val-Tyr(Bzl)-ONb·HCl (VIII) получали из 5,6 г (7,6 ммоль) соединения (VII) аналогично соединению (VI). Выход 4,5 г (86,5%); т. пл. 200–202° С; $[\alpha]_D +9,2^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,47 (Ж), 0,07 (И). Найдено, %: С 59,24; Н 6,23; N 10,16. $C_{33}H_{40}N_3O_8Cl$. Вычислено, %: С 59,15; Н 6,02; N 10,45.

Woc-Pro-Gln-Val-Tyr(Bzl)-ONb (IX) получали аналогично соединению (V) из 1,08 г (5 ммоль) Woc-Pro, 0,68 г (5,2 ммоль) НОВТ, 3,35 г (5 ммоль) соединения (VIII), 1,13 г (5,5 ммоль) DCC и 0,86 мл (5,1 ммоль) диизопропилэтиламина и кристаллизовали из метанола. Выход 3,15 г (75,9%); т. пл. 190–192° С; $[\alpha]_D -31,6^\circ$ (с 0,5, DMF); R_f 0,59 (В), 0,53 (Б). Найдено, %: С 61,07; Н 6,64; N 9,82. $C_{43}H_{55}N_6O_{11}$. Вычислено, %: С 62,16; Н 6,62; N 10,12.

Pro-Gln-Val-Tyr(Bzl)-ONb·HCl (X) получали из 3,15 г (3,7 ммоль) соединения (IX) аналогично соединению (VI). Выход 2,7 г (95%); т. пл. 178–180° С; $[\alpha]_D -17,3^\circ$ (с 1, DMF); E_{N18} 0,54; R_f 0,52 (Е), 0,47 (Ж). Найдено, %: С 60,55; Н 7,10; N 11,04. $C_{39}H_{48}N_6O_9Cl$. Вычислено, %: С 60,03; Н 6,16; N 10,77.

Woc-Glu(OBzl)-Pro-Gln-Val-Tyr(Bzl)-ONb (XI). К раствору 2,6 г (3,4 ммоль) соединения (X) в 50 мл DMF добавляли 3,0 г (5,0 ммоль) Woc-Glu(OBzl)-ONp и 0,6 мл (3,5 ммоль) диизопропилэтиламина. Перемешивали 40 ч при 20° С, после чего реакционную смесь обрабатывали как описано в синтезе соединения (VII). Выход 3,3 г (93%); т. пл. 122–123° С; $[\alpha]_D -26^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,60 (В), 0,17 (Б). Найдено, %: С 62,70; Н 5,70; N 9,20. $C_{55}H_{59}N_7O_{14}$. Вычислено, %: С 62,90; Н 5,66; N 9,33.

Glu(OBzl)-Pro-Glu-Val-Tyr(Bzl)-ONb·HCl (XII) получали из 3,2 г (3,0 ммоль) соединения (XI) аналогично соединению (VI). Выход 2,93 г (98,9%); т. пл. 130–133° С; $[\alpha]_D -18,3^\circ$ (с 1, DMF); E_{N18} 0,46; R_f 0,44 (Ж), 0,67 (Б). Найдено, %: С 60,78; Н 6,32; N 10,04. $C_{50}H_{61}N_7O_{12}Cl$. Вычислено, %: С 60,82; Н 6,18; N 9,93.

Glu-Pro-Gln-Val-Tyr (I). 2,93 г (~3 ммоль) защищенного пентапептида (XII) суспендировали в 100 мл смеси метанол — уксусная кислота — вода (10 : 1 : 1), прибавляли ~0,5 г Pd-черни и гидрировали 10 ч. Катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали и к остатку добавляли 50 мл абсолютного спирта и снова упаривали. Последнюю обработку повторяли 3 раза до полной кристаллизации пентапептида (I). Сырой продукт (I) отфильтровывали и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Элюент — ацетонитрил — 0,1 М ацетат аммония (3 : 97). Выход 1,41 г (~75%); т. пл. 170–174° С; $[\alpha]_D -79^\circ$ (с 1, H₂O); E_{N18} 0,54; R_f 0,26 (И), 0,32 (Г), 0,17 (Е). Найдено, %: С 52,02; Н 6,62; N 12,63. $C_{25}H_{32}N_6O_{10} \cdot 2H_2O$. Вычислено, %: С 51,93; Н 6,31; N 12,53.

Woc-Asp(OBzl)-Val-Tyr(Bzl)-ONb (XIII). К охлажденному до 0° С раствору 3,3 г (10,2 ммоль) Woc-Asp(OBzl), 1,37 г (10,2 ммоль) НОВТ и 5,41 г (10 ммоль) Val-Tyr(Bzl)-ONb·HCl (VI) в 75 мл DMF добавляли 2,1 г (10,2 ммоль) DCC и 1,7 мл (10 ммоль) диизопропилэтиламина. Полученный в условиях опыта синтеза пептида (V) трипептид (XIII) перекристаллизовывали из этилацетата. Выход 7,5 г (92%); т. пл. 146–148° С; $[\alpha]_D -17,8^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,63 (А), 0,86 (Б), 0,96 (В).

Asp(OBzl)-Val-Tyr(Bzl)-ONb·HCl (XIV) получали из 7,5 г (9,2 ммоль) соединения (XIII) аналогично соединению (VI). Выход 6,87 г (99,3%); т. пл. 178–180° С; $[\alpha]_D +2,8^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,17 (Б), 0,85 (Ж), 0,43 (В); E_{N18} 0,59 (рН 2,4). Найдено, %: С 62,17; Н 6,32; N 7,78. $C_{28}H_{34}N_4O_9Cl$. Вычислено, %: С 62,29; Н 5,76; N 7,50.

Z-Arg(Z₂)-OPfp (XV). К охлажденному до 0° С раствору 28,8 г (50 ммоль) Z-Arg(Z₂) и 10,1 г (55 ммоль) пентафторфенола в 1000 мл этилацетата прибавляли 10,1 г (55 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С и выдерживали 20 ч при 20° С. Выпавшую в осадок дидиклогексилмочевину отфильтровывали, растворитель упаривали и осадок промывали гексаном. Выход 32 г (87%); т. пл. 75–76° С; $[\alpha]_D -10,2^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,73 (система Б — хлороформ, 1 : 1), 0,84 (система В — хлороформ, 1 : 3). Найдено, %: С 57,98; Н 4,82; N 7,34. $C_{38}H_{30}N_4O_3F_5$. Вычислено, %: С 58,29; Н 4,05; N 7,56.

Z-Arg(Z₂)-Pro(XVI): К суспензии 11,5 г (100 ммоль) пролина в 100 мл DMF приливали 12,8 мл (100 ммоль) тетраметилгуанидина и (при интенсивном перемешивании) H₂O до растворения пролина (2–3 мл). Потом прибавляли раствор 30 г (40 ммоль) соединения (XV) в 80 мл DMF и перемешивали 30 ч при 20° С. Растворитель упаривали, к остатку добавляли 200 мл 10% раствора KHSO₄ и экстрагировали этилацетатом. Экстракт промывали последовательно водой, 5% раствором NaHCO₃ в насыщенном растворе NaCl, водой, 10% раствором KHSO₄, водой, высушивали над MgSO₄, и растворитель упаривали. Полученное масло кристаллизовали растираньем в гексане. Выход 23 г (84%); т. пл. 81–83° С; $[\alpha]_D$ –17,8° (с 1, DMF); R_f 0,37 (А), 0,60 (Б), 0,68 (В). Найдено, %: С 63,12; Н 6,10; N 10,86. C₃₅H₅₀N₅O₈. Вычислено, %: С 62,30; Н 5,97; N 10,38.

Z-Arg(Z₂)-Pro-Asp(OBzl)-Val-Tyr(Bzl)-ONb(XVII). К охлажденному до 0° С раствору 2,36 г (3,5 ммоль) соединения (XVI) в 30 мл DMF добавляли 0,47 г (3,5 ммоль) НОВТ, 0,78 г (3,8 ммоль) DCC, 2,62 г (3,5 ммоль) соединения (XIV) и 0,6 мл (3,5 ммоль) диизопропилэтиламина. Полученный в условиях синтеза пептида (V) пентапептид (XVII) перекристаллизовывали из метанола. Выход 3,96 г (82%); т. пл. 162–163° С; $[\alpha]_D$ –24,0° (с 1, DMF); R_f 0,59 (А), 0,74 (Б). Найдено, %: С 64,53; Н 5,74; N 9,14. C₇₁H₉₀N₉O₁₇. Вычислено, %: С 65,05; Н 5,86; N 9,23.

Arg-Pro-Asp-Val-Tyr(II). 3,9 г (2,8 ммоль) соединения (XVII) суспендировали в 100 мл смеси метанол — уксусная кислота — вода (10 : 1 : 1), прибавляли 0,2 г Pd-черни и гидрировали 6 ч. Реакционную смесь обрабатывали и сырой продукт очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ как описано для соединения (I). Выход 1,85 г (94%); т. пл. 235–238° С; $[\alpha]_D$ –47° (с 1, H₂O); R_f 0,22 (Г), 0,08 (Е), 0,10 (И); E_{lit} 0,78. Найдено, %: С 50,21; Н 6,83; N 16,01. C₂₉H₄₉N₈O₉·2H₂O. Вычислено, %: С 50,87; Н 7,06; N 16,36.

Val-His(Bzl)-ONb·2HBr(XVIII). К охлажденному до 0° С раствору 2,26 г (9 ммоль) Z-валина, 1,21 г (9 ммоль) НОВТ и 3,94 г (8,7 ммоль) His(Bzl)-ONb·2HCl в 50 мл DMF добавляли 1,86 г (9 ммоль) DCC и 3 мл (17,4 ммоль) диизопропилэтиламина. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 4° С и обрабатывали как описано для пептида (V). Полученное масло растворяли в 80 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли 80 мл 40% раствора HBr в уксусной кислоте. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при 20° С и выливали в 800 мл сухого эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали сухим эфиром и высушивали над P₂O₅/KOH. Выход 4,14 г (72%); т. пл. 162–164° С; $[\alpha]_D$ +84,8° (с 1, DMF); E_{lit} 0,94; R_f 0,72 (Д). Найдено, %: С 47,03; Н 5,01; N 10,67. C₂₅H₃₁N₅O₅Br₂. Вычислено, %: С 46,81; Н 4,87; N 10,91.

Woc-Glu(OBzl)-Val-His(Bzl)-ONb(XIX) получали аналогично соединению (V) из 3,2 г (5 ммоль) соединения (XVIII), 0,67 г (5 ммоль) НОВТ, 1,24 г (6 ммоль) DCC, 2,02 г (6 ммоль) Woc-Glu(OBzl) и 2 мл (11,6 ммоль) диизопропилэтиламина и перекристаллизовывали из метанола. Выход 2,1 г (52%); т. пл. 101–103° С; $[\alpha]_D$ –10,3° (с 1, DMF); R_f 0,35 (Б).

Glu(OBzl)-Val-His(Bzl)-ONb·2HCl(XX) получали из 1,67 г (2,1 ммоль) соединения (XIX) аналогично соединению (VI). Выход 1,59 г (98%); т. пл. 120–122° С; $[\alpha]_D$ –2,3° (с 1, DMF); R_f 0,08 (Б). Найдено, %: С 56,99; Н 5,64; N 10,48. C₃₇H₄₄N₆O₈Cl₂. Вычислено, %: С 57,51; Н 5,73; N 10,87.

Z-Arg(Z₂)-Pro-Glu(OBzl)-Val-His(Bzl)-ONb(XXI). К охлажденному до 0° С раствору 1,55 г (2,3 ммоль) соединения (XVI) в 30 мл DMF добавляли 0,3 г (2,3 ммоль) НОВТ, 0,47 г (2,3 ммоль) DCC, 1,45 г (1,9 ммоль) соединения (XX) и 0,7 мл (4,0 ммоль) диизопропилэтиламина. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 4° С, потом 4 ч при 20° С и обрабатывали в условиях синтеза пептида (V). Сырой продукт хроматографировали на силикагеле (система 3 — хлороформ, 1 : 4). Выход 1,85 г (72%); т. пл. 70–72° С; $[\alpha]_D$ –18,7° (с 1, DMF); R_f 0,45 (З).

Arg-Pro-Glu-His(III). 1,7 г (1,2 ммоль) защищенного пентапептида (XXI) суспендировали в 80 мл смеси метанол — уксусная кислота — вода (10 : 1 : 1), прибавляли 0,2 г Pd-черни и гидрировали 8 ч. Реакцион-

ную смесь обрабатывали аналогично соединению (I), полученный сырой продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ. Элюент — ацетонитрил — 0,1 М ацетат аммония (2:98). Выход 0,71 г (93%); т.пл. 168—170°С; $[\alpha]_D - 27^\circ$ (с 1, CH_3COOH); E_{HIS} 0,85; R_f 0,09 (Д), 0,08 (Е). Найдено, %: С 46,99; Н 7,06; N 19,62. $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_{10}\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$. Вычислено, %: С 47,88; Н 7,17; N 19,93.

Boc-Ala-Pro (XXII). К суспензии 8,06 г (70 ммоль) пролина в 75 мл DMF прибавляли 8,07 г (70 ммоль) тетраметилгуанидина и (при интенсивном перемешивании) 1—2 мл H_2O до растворения пролина, потом раствор 9,94 г (28 ммоль) *Boc-Ala-OPfp* в 50 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 24 ч при 20°С, после чего обрабатывали в условиях опыта 13 и полученный продукт кристаллизовали растиранием в эфире. Выход 6,0 г (74,9%); т.пл. 82—84°С; $[\alpha]_D - 91^\circ$ (с 0,5, DMF); R_f 0,21 (Б).

Ala-Pro-HCl (XXIII). 20 г (33 ммоль) дипептида (XXII) растворяли в 100 мл этилацетата, добавляли 30 мл насыщенного раствора HCl в этилацетате и выдерживали 30 мин при 20°С. Реакционную смесь упаривали в вакууме и полученное вещество закристаллизовывали растиранием в эфире. Выход 3,8 г (81,72%); т.пл. 154—156°С; $[\alpha]_D - 97,9^\circ$ (с 1, CH_3COOH); E_{HIS} 0,68; R_f 0,17 (Д).

Boc-Ala-Ala-Pro (XXIV). К 3,8 г (17 ммоль) *Ala-Pro-HCl (XXIII)* в 100 мл DMF прибавляли 6,04 г (17 ммоль) *Boc-Ala-OPfp*, 2,9 мл (17 ммоль) диизопропилэтиламина и перемешивали 30 ч при 20°С. Обработкой реакционной смеси в условиях синтеза пептида (XVI) получали гидрокопическое масло. Выход 4,25 г (70%); R_f 0,66 (Б). $^1\text{H-NMP}$ (диметилсульфоксид, δ , м.д.): 1,37 (с, 9H, *Boc*), 6,92 (д, 1H, $^3J_{\text{NHCH}^\alpha}$ 7,3 Гц, NH Ala¹), 4,51 (дк, 1H, $^3J_{\text{NHCH}^\alpha}$ 7,3 Гц, $^3J_{\text{H}^\alpha\text{H}^\beta}$ 7,3 Гц, H ^{α} Ala¹), 1,18 (д, 3H, $^3J_{\text{H}^\alpha\text{H}^\beta}$ 7,3 Гц, H ^{β} Ala¹), 7,88 (д, 1H, $^3J_{\text{NHCH}^\alpha}$ 7,3 Гц, NH Ala²), 3,96 (дк, 1H, $^3J_{\text{NHCH}^\alpha}$ 7,3 Гц, $^3J_{\text{H}^\alpha\text{H}^\beta}$ 7,3 Гц, H ^{α} Ala²), 1,14 (д, 3H, $^3J_{\text{H}^\alpha\text{H}^\beta}$ 7,3 Гц, H ^{β} Ala²), 4,22 (дк, 1H, $^3J_{\text{H}^\alpha\text{H}^\beta}$ 6,8 Гц, $^3J_{\text{H}^\alpha\text{H}^\beta}$ 5,0 Гц, H ^{α} Pro), 2,14 (м, 1H, H ^{β} Pro), 1,82 (м, 1H, H ^{β} Pro).

Boc-Glu(OBzl)-Val-Tyr(Bzl)-ONb (XXV). К раствору 2,13 г (3,9 ммоль) дипептида (VI) в 30 мл DMF добавляли 2,0 г (4,3 ммоль) *Boc-Glu(OBzl)-ONp*, 0,26 г (3,9 ммоль) нмидазола и 6,9 мл (4,0 ммоль) диизопропилэтиламина. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 25°С, после чего обрабатывали в условиях синтеза пептида (VII) и полученный продукт перекристаллизовывали из этанола. Выход 2,9 г (90%); т.пл. 124—126°С; R_f 0,56 (А), 0,87 (В).

Glu(OBzl)-Val-Tyr(Bzl)-ONb-HCl (XXVI) получали из 2,55 г (3,1 ммоль) соединения (XXV) аналогично соединению (XXIII). Выход 2,32 г (97%); т.пл. 143—145°С; R_f 0,55 (система Б — изопропанол, 1:3). Найдено, %: С 63,16; Н 5,20; N 7,96. $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_6\text{Cl}$. Вычислено, %: С 63,10; Н 5,95; N 7,36.

Boc-Ala-Ala-Pro-Glu(OBzl)-Val-Tyr(Bzl)-ONb (XXVII). К охлажденному до 0°С раствору 1,0 г (2,4 ммоль) пептида (XXIV), 0,27 г (2,0 ммоль) НОВТ и 1,52 г (2,0 ммоль) трипептида (XXVI) в 100 мл DMF добавляли 0,49 г (2,4 ммоль) DCC и 0,7 мл (2,4 ммоль) диизопропилэтиламина. Реакционную смесь выдерживали 30 ч при 4°С и 5 ч при 20°С, после чего обрабатывали как в синтезе пептида (V) и полученный гексапептид (XXVII) закристаллизовывали растиранием в эфире. Выход 1,73 г (78%); т.пл. 127—129°С; $[\alpha]_D - 31,7^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,87 (Б), 0,84 (система Б — изопропанол, 1:3).

Ala-Ala-Pro-Glu(OBzl)-Val-Tyr(Bzl)-ONb-HCl (XXVIII) получали из 1,6 г (1,4 ммоль) соединения (XXVII) аналогично соединению (XXIII). Выход 1,44 г (98%); т.пл. 130—132°С; $[\alpha]_D - 28,5^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,12 (Б).

Ala-Ala-Pro-Glu-Val-Tyr (IV). 1,35 г (1,3 ммоль) соединения (XXVIII) суспендировали в 70 мл смеси метанол — уксусная кислота — вода (10:1:1), прибавляли 0,3 г Pd-черни и гидрировали 10 ч. Реакционную смесь обрабатывали как описано для соединения (I), полученный гексапептид очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ. Элюент — ацетонитрил — 0,1 М ацетат аммония (4:6). Выход 0,82 г (98%); т.пл. 200—205°С;

$[\alpha]_D - 32,6^\circ$ (c 1, H_2O); $E_{H_{15}}$ 0,38; R_f 0,40 (Д), 0,13 (Е). Найдено, %: С 52,62; Н 7,06; N 12,27. $C_{30}H_{44}N_6O_{10} \cdot 2H_2O$. Вычислено, %: С 51,94; Н 6,82; N 12,45.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кихоу Дж. В кн.: Иммуноглобулины/Ред. Литмен Г., Гуд Р. М.: Мир, 1981, с. 235–265.
2. Low T. L. K., Liu Y.-S. V., Putnam F. W. Science, 1976, v. 191, p. 390–392.
3. Morgan E. L., Rugli T. E., Weigle O. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 9, p. 5385–5391.
4. Чипенс Г. И. В кн.: Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980, с. 1–124.
5. Чипенс Г. И., Полевая Л. К. В кн.: Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980, с. 125–141.
6. Чипенс Г. И., Веретенникова Н. И. В кн.: Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980, с. 178–226.
7. Лошкина Л. Н. Успехи биол. химии, 1977, т. 28, с. 162–164.
8. Chipens G., Nikiforovich G., Mutulis F., Veretennikova N., Vosekalna I., Sosnov A., Polevaia L., Ancans J., Mishlyakova N., Liepinsh E., Sekacis I., Breslav M. In: Proc. VI Amer. Pept. Sympos./Eds Gross E., Meienhofer J. Rockford, Illinois: Pierce Chem. Comp., 1979, p. 567–570.
9. Chipens G., Mutulis F., Galactionov S. In: Frontiers of bioorganic chemistry and molecular biology/Ed. Ananchenko S. N. Y. — Oxford: Pergamon Press, 1980, p. 99–103.
10. Chipens G. I., Veretennikova N. I., Nikiforovich G. V., Atare Z. A. In: Proc. XVI Eur. Pept. Sympos./Ed. Brunfeldt K. Copenhagen: Scriptor, 1981, p. 445–450.
11. Goldstein G., Andhya T., Heavner G. A. In: Proc. VII Amer. Pept. Sympos./Eds Rich D. H., Gross E. Rockford, Illinois: Pierce Chem. Comp., 1981, p. 535–539.
12. Touvre D., De Coen J. L., Hallenga H., Van Binst G. Int. J. Peptide and Protein Res., 1984, v. 23, № 1, p. 84–93.
13. Файнштейн А., Бил Д. В кн.: Структура и функции антител/Ред. Глинна Л., Стьюард М. М.: Мир, 1983, с. 148–199.
14. Чипенс Г. И. Влоорган. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1265–1276.

Поступила в редакцию

15.VIII.1984

После доработки

5.XI.1984

SYNTHESIS OF IMMUNOPOIETINS, NOVEL BIOLOGICALLY ACTIVE LOW-MOLECULAR FRAGMENTS OF IMMUNOGLOBULINS G, M, E, AND A

CHIPENS G. I., ANCANS J. E., ZARINS P. P., OSIS L. P.

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

Low-molecular fragments of immunoglobulins IgG-(245–349) (Glu-Pro-Gln-Val-Tyr), IgM-(451–455) (Arg-Pro-Asp-Val-Tyr), IgA-(347–351) (Arg-Pro-Glu-Val-His), and IgE-(430–435) (Ala-Ala-Pro-Glu-Val-Tyr), potentially active immunoregulators of a novel type, have been synthesised by classical methods of peptide chemistry. This group of compounds, which in biological effects are similar to thymopoietin, was given the name of immunopoietins.