



УДК 547.964.4:577.112.6

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ
РАЙОНА 125—131 ИНТЕРФЕРОНА α A*Ритула И. Р., Вегнер Р. Э., Афанасьева Г. А.,
Кукайн Э. М., Чиненс Г. И.**Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Твердофазным методом синтезированы два пептида предполагаемого иммунологически активного участка интерферона α A (IFN): IFN-(125—129) (I) и [Arg¹³¹]IFN-(125—131) (II). Оба пептида в опытах *in vivo* на мышцах угнетают реакцию гиперчувствительности замедленного типа. Пептид (II) в дозах 0,01—0,1 мг/кг угнетает, а в дозах ~1,0 мг/кг стимулирует образование антител у мышей к эритроцитам барана.

Интерфероны принадлежат к двум большим группам медиаторов, к так называемым лимфокинам и монокинам, которые продуцируются клетками лимфоцитарного и моноцитарного ряда. Система интерферонов — своеобразный иммунологический защитный механизм, который функционирует в каждой клетке и обеспечивает нуклеиновый гомеостаз. Кроме того, интерфероны обладают широким спектром иммуномодулирующих эффектов: стимулируют фагоцитоз, повышают активность естественных киллеров, влияют на образование антител и РГЗТ и т. п. [1]. На основе предположения о том, что молекулы интерферонов, обеспечивая эти эффекты, функционируют не только как целые единицы с их активными центрами, расположенными на поверхности молекулы, но и как предшественники низкомолекулярных пептидов посредством так называемого тетипового механизма [2], ранее нами был проведен анализ первичных структур интерферонов с целью предсказания локализации биологически активных участков и фрагментов [3—5]. В результате анализа было выявлено ~20 активных центров — потенциальных регуляторов активности макрофагов и лимфоцитов.

Один из выявленных центров интерферона α A включает эволюционно консервативный район 125—130 (рис. 1). Эквиваленты последовательности 125—129 содержатся также в интерфероне β , спленине, в гормоне тимуса тимопоэтин II и в иммуноглобулинах, например в иммуноглобулине M (рис. 2). Фрагмент 32—36 тимопоэтина II (тимопептин) [7] и фрагмент 451—455 иммуноглобулина M (иммунопоэтин M) [2] являются стимуляторами T-клеточной иммунной системы. Поэтому, учитывая возможную эквивифункциональность аминокислотных остатков с разветвленной боковой цепью — валина и лейцина, а также идентичность двух из трех существенных для биоактивности структурных элементов тимопептина (Arg, Asp и Tyr [8]) и фрагмента IFN-(125—129), можно ожидать, что и пептид с последовательностью IFN-(125—129) будет влиять на активность T-клеточных реакций. На возможную роль фрагмента IFN-(125—129) в регуляции T-клеточного иммунитета указывает также сцепление в молекуле интерферона α A последовательности 125—129 (Arg-Phe-Thr-Leu-Tyr) (предполагаемого T-активного центра) с последовательностью 122—125 (Tyr-Phe-Gln-Arg), которая состоит из двух гидрофобных и двух полярных аминокислотных остатков. Подобные последовательности образуют так называемые A-участки, активирующие

Принятые сокращения: интерферон α A — IFN, DMF — диметилформамид, TFA — трифторуксусная кислота, РГЗТ — реакция гиперчувствительности замедленного типа, Aoc — трет-амилоксикарбонил.

Первые данные биоспытаний свидетельствуют, что синтезированные пептиды (I) и (II) обладают выраженной иммунологической активностью (рис. 3 и 4). Так, в РГЗТ по сравнению с тимопептином оба пептида (как и сам интерферон [13, 14]) показывают дозозависимое ингибирующее действие. Пептид (I) оказывает также слабое угнетающее действие на образование антител у мышей к тимусзависимому антигену — эритроцитам барана (рис. 4). В тех же условиях пептид (II) в малых дозах (0,01—0,1 мг/кг) достоверно снижает титр антител к эритроцитам барана, а в больших дозах (~1 мг/кг) стимулирует образование антител. Эти данные наряду с имеющимися в патентной литературе указаниями [15, 16] о высокой иммунологической активности различных фрагментов интерферонов свидетельствуют в пользу предположения, что молекулы интерферонов различных классов могут функционировать так же, как прегормоны (предшественники), образуя низкомолекулярные биологически активные пептиды в реакциях ограниченного протеолиза. Полученные результаты обосновывают необходимость дальнейшего подробного изучения спектра иммунологического действия пептида (I) и других фрагментов интерферонов [3—5] с использованием соответствующих методов тестирования.

Экспериментальная часть

В работе использовали производные *L*-аминокислот (Reanal, ВНР) Aoc-Arg-(Tos)-OH (Beckman, США) и полимерный носитель Bio-Beads™ S-X1 (Bio-Rad, США), содержащий 4,2 мэкв. хлора на 1 г полимера. Твердофазный синтез проводили в синтезаторе пептидов модели 990В фирмы Beckman. При работе с безводным HF использовали аппаратуру из политрифтормоноклорэтилена (Protein Research Foundation, Япония). Индивидуальность полученных соединений контролировали аналитической ВЭЖХ, а также ТСХ на пластинках DC-Fertigplatten Kieselgel 60F₂₅₄ (ФРГ) и Silufol (ЧССР). Электрофоретическую подвижность соединений определяли на бумаге Filtrak FN-17 (ГДР) при градиенте напряжения 20 В/см в 2 М СН₃СООН при рН 1,9 и выражали по отношению к подвижности гистидина (E_{HIS}). Свободные пептиды обнаруживали на пластинках и бумаге ингибированным реагентом и реагентами Паули и Сакагучи. Очистку пептидов проводили на хроматографе Du-Pont 830 (США) с колонкой Zorbax C₈ (2,12×25 см). Растворители упаривали в вакууме при температуре не выше 40°С. Для характеристики хроматографической подвижности (R_f) пептидов использовали системы растворителей: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (А), пиридин — уксусная кислота — вода — этилацетат, 20:60:11:120 (В), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин, 15:3:12:10 (В). Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Labotron Liquidmat IV (ФРГ) после 24-часового гидролиза пептидов в 6 н. НСl в запаянной ампуле при 110°С. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer 141 (США). спектры НМР при частоте 360 МГц снимали на приборе Brucker WM-360 (ФРГ).

Твердофазный синтез пептидов. Присоединение первой аминокислоты к полимерному носителю осуществляли по методике, приведенной в работе [17]. Из 12 г (32 ммоль) Вос-Тур(Bzl)-ОН и 8 г полимерного носителя получили 18,2 г защищенного тирозил-полимера, емкость которого, согласно аминокислотному анализу и привесу, составляла 3,44 ммоль/г. Из 9 г (24 ммоль) Aoc-Arg(Tos)-OH и 6 г полимера получили 8,7 г защищенного аргинил-полимера с емкостью 1,21 ммоль/г.

Наращивание пептидной цепи проводили согласно программе (таблица), используя двукратный относительно начальной емкости полимера избыток Вос-аминокислот и *N,N'*-дипицклогексилкарбодиимида. растворы которых вводили в реакционный сосуд синтезатора охлажденными до 0°С. Полноту отщепления Вос-группы и протекания реакции конденсации контролировали качественно ингибированным реагентом. В случае неполной конденсации ее повторяли 1 или 2 раза. Повторная конденсация была необходима для производных тирозина и треонина в соединении (II), а трехкратная — для производного треонина в соединении (I). В итоге из 1,5 г Вос-Тур(Bzl)-полимера получили 4,2 г Z-Arg(Z₂)-He-Thr(Bzl)-Leu-Tyr(Bzl)-полимера и из 3 г Aoc-Arg(Tos)-полимера получили 5 г Z-Arg(Z₂)-He-Thr(Bzl)-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-Arg(Tos)-полимера.

Отщепление пептидов от полимерного носителя и удаление остальных защитных групп проводили безводным HF. Около 5 г пептидил-полимера и 1 мл анизолата при 0°С перемешивали 1 ч с 30 мл перегнанного HF. HF удаляли в вакууме (ловушка с СаО), остаток выдерживали в вакууме 24 ч над NaOH, промывали этилацетатом (3×30 мл) и пептид экстрагировали 1% водным раствором уксусной кислоты (4×50 мл). Раствор пептида частично упаривали и лиофилизировали.

Arg-He-Thr-Leu-Tyr (I). Из 4,20 г защищенного пептапептидил-полимера после обработки HF и очистки препаративной ВЭЖХ (ацетонитрил ~ 0,1 М ацетат аммония, 10:90) получили 0,31 г пептида (I). R_f 0,18 (А), 0,46 (В); E_{HIS} 0,72. Аминокислотный анализ: Thr 1,14 (I), He 0,85 (I), Leu 1,0 (I), Tyr 1,08 (I), Arg 0,97 (I). $[\alpha]_D^{20}$ -39,2° (с 0,5; 1 М СН₃СООН).

Программа для твердофазного синтеза пептидов (I) и (II)

Стадия	Операция	Используемый реагент	Объем реагента, мл	Время перемешивания, мин
1	Промывка	CH ₂ Cl ₂	50×2	1,5
2	»	50% TFA в CH ₂ Cl ₂	50	5
3	Деблокирование	50% TFA в CH ₂ Cl ₂	50	30
4	Промывка	CH ₂ Cl ₂	50×6	1,5
5	Нейтрализация	CH ₂ Cl ₂ +Et ₃ N	45+5	1,5
6	»	CH ₂ Cl ₂ +Et ₃ N	45+5	3
7	Промывка	CH ₂ Cl ₂	50×8	1,5
8	Дозировка и перенос Вос-аминокислоты	Вос-аминокислота в CH ₂ Cl ₂ – DMF, 9:1	40	5
9	Внесение N,N'-дихлорогексилкарбодимиды	1 M DCC – CH ₂ Cl ₂	5	–
10	Реакция конденсации			60
11	Промывка	CH ₂ Cl ₂	50×5	1,5
12	Переход к первой стадии программы (присоединение следующей аминокислоты) или к шестой стадии программы (в случае повторной конденсации)			

При ВЭЖХ (ацетонитрил – 0,1 M ацетат аммония, 15 : 85) выделили 0,13 г побочного продукта, который, согласно ПМР-спектру, является [Tyr(3-Bzl)⁵]пептидом (I).

Arg-Ile-Thr-Leu-Tyr-Leu-Arg (II). Из 5,0 г защищенного гексапептидил-полимера после обработки HF и ВЭЖХ (ацетонитрил – 0,1 M ацетат аммония, 20 : 80) получили 0,23 г пептида (II). R, 0,26 (Б), 0,66 (В); E_{His} 0,88. Аминокислотный анализ: Thr 1,13 (1), Ile 0,77 (1), Leu 2,0 (2), Tyr 1,08 (1), Arg 2,03 (2). [α]_D²⁰ – 50° (с 0,5; 1 M CH₃COOH).

Так же как в предыдущем случае при ВЭЖХ (ацетонитрил – 1 M ацетат аммония, 40 : 60), выделили побочный продукт – [Tyr(3-Bzl)⁵]пептид (II) (0,02 г).

Определение биологической активности пептидов (I) и (II) в РГЗТ [18]. Мышей (беспородные, вес 18–20 г) сенсibilизировали эритроцитами барана, которые вводили в хвостовую вену в количестве 10⁷ эритроцитов, суспендированных в 0,4 мл физиологического раствора. Через 7 сут в подкожные ткани левой задней стопы вводили повторно эритроциты барана (10⁸ эритроцитов в 0,04 мл физиологического раствора, доведенного до pH 7,4 фосфатным буфером) и одновременно в ту же лапку раствор пептида (0,04 мл) в интервале доз от 0,01 до 10 мг/кг. Силу местной воспалительной реакции определяли через 20 ч по разнице степени набухания опытной и контрольной лап. Измерения проводили круговым микрометром с делением шкалы 0,01 мм. Индекс РГЗТ для каждого животного оценивали в процентах (рис. 3).

Влияние пептидов (I) и (II) на образование антител. Мышам линии BALB/c в хвостовую вену вводили пептиды в 0,2 мл физиологического раствора в дозах от 0,01 до 10 мг/кг веса животных. Мышам контрольной группы вводили только физиологический раствор. Через 3 сут мышам одной группы внутривенно вводили нативные эритроциты барана в количестве 5·10⁷, а мышам второй группы – липополисахарид (LPS, Calbiochem) в дозе 1 мг/кг. Титр антител определяли в реакции гемагглютинации через 7 сут после введения эритроцитов барана мышам первой группы и эритроцитов, конъюгированных при помощи глутаральдегида с липополисахаридом по методу [19], мышам второй группы (рис. 4). Статистическую обработку экспериментального материала проводим с вероятностью 95%.

ЛИТЕРАТУРА

- Zarling J. M. // Interferons and their application (Handbook of experimental pharmacol. V. 71)/Eds Came P. E., Carter W. A. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag, 1984. P. 403–431.
- Чипенс Г. И. // Изв. АН ЛатвССР. 1984. № 12. С. 93–102.
- Чипенс Г. И., Шевина Н. Г., Паскуевич О. С., Вегнер Р. Э., Розенталь Г. Ф. // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим. 1985. № 3. С. 366–368.
- Chipens G., Vegners R., Papsuevich O., Ievina N., Rosenthal G., Petrova T., Rituma I., Ajanasyeva G., Krikis A. // Chemistry of peptides and proteins. V. 3./Eds Voelter W., Bayer E., Ovchinnikov Y. A., Ivanov V. T. B.–N. Y.: Walter de Gruyter, 1986. P. 221–234.
- Чипенс Г. И., Шевина Н. Г. // Научно-методологические аспекты биологических исследований новых лекарственных препаратов/Отв. ред. Лукевиц Э. Я. Рига: Зинатне, 1987. С. 247–271.
- Langer J. A., Pestka S. // Pharmac. Ther. 1985. V. 27. P. 371–401.

7. Goldstein G., Scheid M. P., Boyse E. A., Schlesinger D. H., Van Wauwe J. // *Science*. 1979. V. 204. № 4399. P. 1309-1310.
8. Goldstein G., Audhya T., Heavner G. A. // *Peptides: Synth., Struct., Funct., Proc. Amer. Pept. Symp.*, 7th. Rockford, Illinois: Pierce Chem. Co., 1981. P. 535-539.
9. Пансуевич О. С., Чипенс Г. И., Михайлова С. В. Неирогнофизарные гормоны. Рига: Зинатне, 1986. С. 127-135.
10. Пансуевич О. С., Чипенс Г. И., Крушинская И. И., Петрова Т. А. // *Химия белков и пептидов. Тез. докл. VI Всесоюз. симпозиум*. Рига, 1983. С. 282-283.
11. Стюарт Дж., Янг Дж. // *Твердофазный синтез пептидов*. М.: Мир, 1971. С. 77-104.
12. Erickson B. W., Merrifield R. B. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1973. V. 95. № 11. P. 3750-3756.
13. De Maeyer E., De Maeyer-Guignard J. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1980. V. 350. P. 4-11.
14. Кноп J., Stremmer R., Neumann C., De Maeyer E., Macher E. // *Nature*. 1982. V. 296. P. 757-759.
15. Koenig W., Geiger R., Obermeier R., Muellner H. *Герм. пат.*, 1984, № 3224379.
16. Nestor J. J., Jr., Moffatt J. G., Sims J. M. *Пат. США*, 1984, № 4473555.
17. Cisin B. F. // *Helv. chim. acta*. 1975. V. 56. № 5. P. 1476-1482.
18. Mackaness G. B., Auclair D. J., Lagrange P. H. // *J. Nat. Cancer Inst.* 1973. V. 51. № 5. P. 1655-1667.
19. Avrameas S., Ternynck T. // *Immunochemistry*. 1969. V. 6. № 1. P. 53-66.

Поступила в редакцию
6.V.1986
После доработки
20.II.1987

THE SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE INTERFERON αA 125-131 REGION PEPTIDES

RITUMA I., VEGNERS R., AFANASYEVA G., KUKAIN E.,
CHIPENS G.

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

Two peptides, IFN-(125-129) (RITLY-I) and [Arg⁷]IFN-(125-131) (RITLYLR-II), belonging to the putative immunologically active region of interferon αA (IFN) were synthesised by the solid-phase method. Both peptides suppress the delayed-type hypersensitivity reaction in vivo as assayed in mice. The peptide (II) either suppresses (0,01-0,1 mg/kg) or stimulates (~1,0 mg/kg) antibody production in mice in response to sheep red blood cells.