



УДК 577.112.6.083.3

## ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА

© 1996 г. Л. В. Оноприенко<sup>#</sup>, И. И. Михалева, В. Т. Иванов,  
Б. О. Войтенков\*, В. Б. Окулов\*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\* НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, 189646, Санкт-Петербург,  
пос. Песочный-2, ул. Ленинградская, 68

Поступила в редакцию 10.08.95 г.

С целью антигенно-функционального изучения интерлейкина-2 человека классическими методами пептидной химии в растворе были синтезированы пептиды из района 60–72 его последовательности. Для увеличения устойчивости пептидов к протеолизу, а также для нейтрализации зарядов на N- и C-концах молекул пептиды были модифицированы ацетилированием и этерификацией метиловым спиртом соответственно. Некоторые из полученных пептидов проявили способность ингибировать цитотоксическую и индуцировать ростстимулирующую активность предварительно активированных макрофагов как *in vitro*, так и *in vivo*. Было показано, что именно эти пептиды обладают выраженным стимулирующим действием на регенеративно-репаративные процессы в печени и коже.

**Ключевые слова:** интерлейкин-2 человека, синтетические пептиды, макрофаги.

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) – белок, секретирующийся активированными Т-клетками, был впервые охарактеризован как Т-клеточный ростовой фактор [1]. Многочисленные исследования последних лет показали, что ИЛ-2 является одним из центральных медиаторов иммунной системы и участвует в инициации и развитии иммунного ответа. ИЛ-2 влияет на активацию, дифференцировку и пролиферацию многих популяций клеток иммунной системы (T-, B-клеток, макрофагов) и проявляет свои биологические свойства посредством взаимодействия с высокоспецифичным рецептором, экспонированным на поверхности активированных клеток.

В последние годы было предпринято множество структурно-функциональных исследований ИЛ-2-рецепторного взаимодействия с помощью различных методов: рентгеноструктурного анализа [2], направленного мутагенеза [3], иммунохимических методов [4]. Уже известна структура рецептора ИЛ-2 и в общих чертах конформация молекулы ИЛ-2, однако многие детали взаимо-

действия ИЛ-2 с рецептором остаются невыясненными.

В Институте биоорганической химии проводится антигенно-функциональное изучение ИЛ-2 человека. С помощью иммунохимических методов удалось установить, что район 59–78 последовательности ИЛ-2 человека включает в себя эпипитоп, который связывается с основным клоном панели моноклональных антител, полученных к молекуле ИЛ-2 [5]. Можно считать, что этот эпипитоп – один из основных в молекуле белка. В дальнейшем взаимодействие ряда синтетических пептидов из района последовательности 59–78 с основным клоном моноклональных антител было исследовано с помощью метода протонного ЯМР. Полученные данные позволили определить вклад отдельных аминокислотных остатков антигенного участка во взаимодействие с антителом, а также определить конформацию эпипитопа в комплексе с антителом [6, 7].

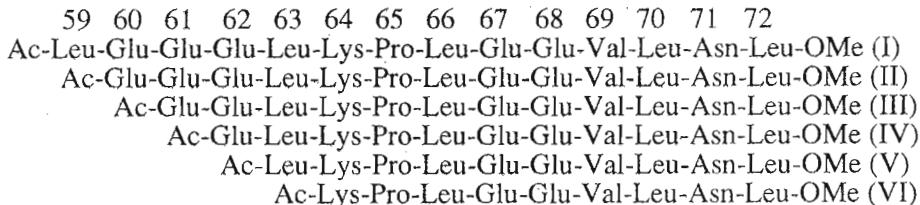
Основываясь на полученных результатах, а также на литературных данных о пространственной организации ИЛ-2 [2, 3], мы предположили, что участок ИЛ-2, связывающийся с моноклональным антителом, может перекрываться с одним из участков контакта молекулы ИЛ-2 с ее рецептором. Это предположение кажется вполне правдоподобным, если учесть, что сравнительно небольшая белковая молекула ИЛ-2

Использованные сокращения: ИЛ-2 – интерлейкин-2, HOBr – 1-гидроксибензотриазол, NMM – N-метилморфолин, -ONp – *n*-нитрофенилокси, OPfp – пентафторморфенилокси, TFE – трифторметанол, WSCD – 4-толуолсульфонат N-циклогексил-N'-[2-(N-метилморфолино)этил]карбодиимида.

\* Автор для переписки.

имеет многоточечный контакт со сложно организованным рецептором, состоящим из трех субъединиц [8]. Поэтому мы исследовали иммуномоду-

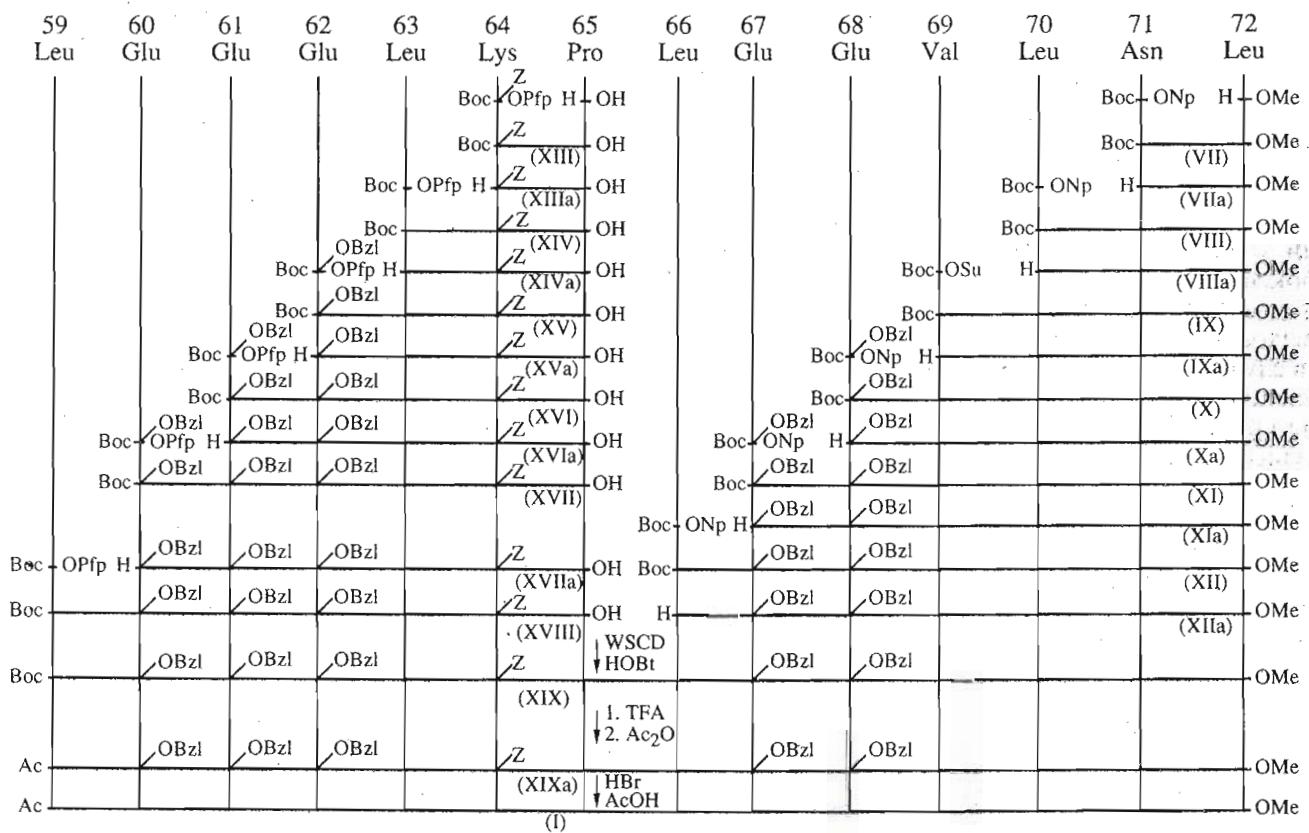
лирующую активность, подобную активности ИЛ-2, для ряда синтетических пептидов из района 59–72 последовательности ИЛ-2 человека:



Все пептиды были получены классическими методами пептидного синтеза в растворе конденсацией двух защищенных блоков, выбранных таким образом, чтобы активируемый в ходе конденсации блок имел на С-конце остаток практически не рацемизующегося в ходе активации пролина (схема). В ходе синтеза применялась тактика максимальной защиты. Для блокирования боковых цепей остатков глутаминовой кислоты и лизина были выбраны защитные группировки бензильного типа и для временной защиты N<sup>α</sup>-функции – Вос-группа.

Нам представлялось целесообразным модифицировать получаемые нами пептиды ацетилированием и этерификацией метанолом по N- и C-концам молекулы соответственно. Такая моди-

фикация увеличивает устойчивость пептидов к протеолизу, а также способствует созданию конформации, необходимой для проявления их биологических свойств за счет нейтрализации зарядов на N- и C-концах молекулы, как это и имеет место в природном белке. С-Концевой остаток лейцина вводился на первой стадии синтеза защищенного семичленного фрагмента 66–72 в виде его метилового эфира, который выполнял функцию блокирующей группы в ходе всего синтеза. Однако эту защитную группу не удаляли в процессе конечного деблокирования, а использовали в качестве модифицирующей группы для целевых пептидов. Напротив, ацетильная группа на N-конце пептидов вводилась перед конечным деблокированием и использовалась только в целях модификации (схема).



### Схема. Синтез пептида (I).

Каждый блок был получен ступенчатым наращиванием пептидной цепи методом активированных *n*-нитрофениловых или пентафторфениловых эфиров, причем в первом случае реакции присоединения катализировали HOBr.

Вос-защитные группы удаляли с помощью смеси уксусной и трифтормукусной кислот в соотношении 3 : 7; в этих условиях не наблюдалась побочная реакция отщепления Z-группы с N<sup>ε</sup>-функции остатка лизина.

Фрагмент (XII) получали ступенчатым наращиванием цепи методом *n*-нитрофениловых эфиров, катализируя реакцию ацилирования HOBr, исключением был остаток валина, который присоединяли с помощью его N-оксисукцинимидного эфира. Единственной трудностью в синтезе защищенного фрагмента (XII) оказалась низкая растворимость пептидов, начиная с Вос-Leu-Asn-Leu-OMe (VIII), в органических растворителях; реакции конденсации приходилось проводить в довольно разбавленных растворах в DMF с добавлением тетраметилмочевины или *N*-метилпирролидона.

Фрагмент (XVIII) получали с помощью пентафторфениловых эфиров. С-Концевую карбоксильную группу пролина защищали солеобразованием с N-метилморфоролином. Дипептид (XIII) и трипептид (XIV) получались в виде масел, что затрудняло их очистку. Для выделения этих соединений в чистом виде пришлось прибегнуть к адсорбционной колоночной хроматографии на силикагеле в градиенте растворителей этилацетат-1% уксусная кислота в этаноле. Остальные промежуточные пептиды при синтезе фрагмента (XVIII) удалось закристаллизовать и очистить перекристаллизацией.

Защищенные пептиды (XIX)-(XXIV) получали конденсацией двух фрагментов, причем карбоксильный компонент брали в избытке. При использовании для конденсации DCC/HOBr-метода выход конечных продуктов не превышал 42% (в случае нонапептида) и уменьшался по мере увеличения длины получаемого пептида (данные не приведены). Замена DCC на WSCD привела к существенному увеличению выхода (табл. 1). Полученные пептиды (XIX)-(XXIV) деблокировали HBr/CH<sub>3</sub>COOH или трифторметансульфоникислотой в присутствии анизола и очищали с помощью ВЭЖХ. Выходы и физико-химические характеристики полученных соединений приведены в табл. 1 и 2.

При изучении иммуномодулирующих свойств полученных пептидов мы в первую очередь уделяли внимание тем из них, которые характерны также и для самого ИЛ-2. Наряду с способностью индуцировать и поддерживать пролиферацию Т- и В-лимфоцитов ИЛ-2 также стимулирует естественную киллерную активность мононуклеарных клеток крови и специфически активирует

макрофаги. Мы изучали ростстимулирующую активность [9] пептидов (I), (VI), их способность индуцировать естественную киллерную активность и влиять на активность макрофагов, используя в качестве положительного контроля рекомбинантный ИЛ-2.

Результаты этих исследований показывают, что пептиды (I) и (VI) обладают способностью поддерживать пролиферацию предварительно активированных лимфобластов и стимулировать естественную киллерную активность мононуклеарных клеток периферической крови человека, хотя их активность была гораздо слабее активности ИЛ-2 (табл. 3, 4). Однако пептиды (II)-(VI), а особенно тетрадекапептид (I) проявили способность не только ингибиовать цитотоксическую активность предварительно активированных перитонеальных макрофагов или моноцитов человека, но и индуцировать или существенно усиливать ростстимулирующую активность этих клеток, оставаясь нейтральными по отношению к нестимулированным клеткам (табл. 5). Интересно, что такие классические индукторы цитотоксичности, как бестатин или липополисахарида, также блокируют цитотоксичность преактивированных макрофагов, однако уровень индуцируемой ими ростстимулирующей активности гораздо меньше, чем в случае пептида (I), и они не способны потенцировать уже существующую ростстимулирующую активность макрофагов. Кроме того, в отличие от бестатина или липополисахаридов исследуемые пептиды практически не индуцируют ростстимулирующую активность в неактивированных макрофагах. Такие свойства являются скорее антагонистическими, чем подобными свойствам ИЛ-2, который стимулирует цитотоксическую активность активированных макрофагов. Однако пептиды, обладающие такими свойствами, могут представлять существенный интерес для биологии и медицины, так как, согласно последним данным, ростстимулирующая активность макрофагов не менее важна, чем цитотоксическая, и может играть важную роль в процессах регенерации и репарации различных органов и тканей организма [10].

Таким образом, полученные данные послужили основанием для проведения новой серии экспериментов *in vivo*. Ниже приводится краткое изложение полученных результатов. Более полно они будут рассмотрены в последующих публикациях в медицинских журналах. Влияние исследуемых пептидов на регенеративно-репаративные процессы изучалось на моделях токсического повреждения печени четыреххлористым углеродом, частично гепатэктомии и полнослойных кожных ран.

Модель токсического повреждения печени позволяет исследовать в основном репаративные процессы, протекающие в клетках печени. Известно,

Таблица 1. Характеристики полученных соединений

Соединение	Структура	Т. пл., °C	$\alpha_{28}^D$ , %	$\alpha_{28}^D$ , TFE	$R_f$ (система)*
(VII)	Boc-Asn-Leu-OMe	161–162	91	–21.02 (1.05)	0.75(Б); 0.45(А)
(VIII)	Boc-Leu-Asn-Leu-OMe	184–185	72	–36.63 (1.17)	0.66(Б); 0.37(А)
(IX)	Boc-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	>250	91	–40.11 (1.32)	0.63(Б); 0.32(А)
(X)	Boc-Glu(OBzI)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	>250	77	–39.81 (1.20)	0.74(Б); 0.35(А)
(XI)	Boc-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	>250	85	–38.46 (1.11)	0.65(Б); 0.33(А)
(XII)	Boc-Leu-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	>250	69	–42.11 (1.25)	0.60(Б); 0.31(А)
(XIII)	Boc-Lys(Z)-Pro	Масло	87	–38.00 (0.27)	0.62(Б); 0.47(В)
(XIV)	Boc-Leu-Lys(Z)-Pro	»	95	–65.30 (0.24)	0.67(Б); 0.45(В)
(XV)	Boc-Glu(OBzI)-Leu-Lys(Z)-Pro	66–68	92	–60.40 (0.27)	0.47(Б); 0.35(Г)
(XVI)	Boc-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Leu-Lys(Z)-Pro	83–84	70	–52.25 (0.31)	0.73(Б); 0.50(Г)
(XVII)	Boc-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Leu-Lys(Z)-Pro	157–160	88	–42.60 (0.21)	0.60(Б); 0.36(В)
(XVIII)	Boc-Leu-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Leu-Lys(Z)-Pro	164–166	68	–69.10 (0.32)	0.62(Б); 0.41(В)
(XIX)	Boc-Leu-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	>250	64	–32.40 (0.30)	0.53(Б); 0.46(В)
(XX)	Boc-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Asn-Leu-OMe	>250	70	–17.51 (0.74)	0.49(Б); 0.37(Г)
(XXI)	Boc-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	>250	67	–14.56 (0.57)	0.42(Б); 0.20(В)
(XXII)	Boc-Glu(OBzI)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	>250	72	–13.77 (1.02)	0.49(Б); 0.44(В)
(XXIII)	Boc-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	>250	88	–18.33 (0.27)	0.46(Б); 0.41(В)
(XXIV)	Boc-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzI)-Glu(OBzI)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	>250	78	–19.99 (0.53)	0.43(Б); 0.43(В)
(VI)	Ac-Lys-Pro-Leu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	Аморф.	60	–36.45 (1.45)	0.25(Д); 0.66(Е)
(V)	Ac-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	»	74	–44.99 (1.68)	0.41(Ж); 0.43(Д)
(IV)	Ac-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	»	55	–22.66 (1.03)	0.48(Д); 0.39(Е)
(III)	Ac-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	»	56	–23.55 (1.27)	0.47(Д); 0.38(Е)
(II)	Ac-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	»	60	–48.59 (1.07)	0.43(Д); 0.25(Е)
(I)	Ac-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe	»	53	–41.00 (1.76)	0.46(Д); 0.37(Е)

\* Для ТСХ использовали следующие хроматографические системы: этилацетат–этанол, 10 : 1 (А), хлороформ–этанол–уксусная кислота, 9 : 3 : 2 : 1 (Б), хлороформ–триптофанол–уксусная кислота, 7 : 3 (Г), изопропанол–вода, 2 : 1 (Д), *n*-бутанол–уксусная кислота–вода, 75 : 15 : 10 (Е), *n*-бутанол–уксусная кислота–вода, 12 : 3 : 5 (Ж).

**Таблица 2.** Данные аминокислотных анализов

Соединение	Asp	Glu	Leu	Lys	Pro	Val
(VII)	0.98		1.00			
(VIII)	1.00		2.10			
(IX)	1.00		2.20		0.99	
(X)	0.98	1.20	2.11		0.98	
(XI)	1.05	2.30	2.16		1.00	
(XII)	0.99	2.22	3.21		1.00	
(XIII)				1.00	1.05	
(XIV)			1.00	1.20	1.02	
(XV)		1.09	0.94	1.05	1.00	
(XVI)		2.14	0.96	0.92	1.00	
(XVII)		3.11	1.00	1.09	0.98	
(XVIII)		3.21	2.10	1.00	1.07	
(XIX)	1.00	5.12	4.90	0.94	1.02	1.04
(XX)	1.03	2.10	3.09	0.98	1.00	1.05
(XXI)	1.03	2.12	3.99	0.99	1.03	1.01
(XXII)	1.06	5.15	4.03	1.02	1.04	1.00
(XXIII)	1.03	4.14	3.99	1.01	0.98	0.99
(XXIV)	1.05	3.09	4.08	1.03	1.00	1.00
(VI)	1.03	2.04	3.06	1.00	1.01	1.02
(V)	1.03	2.02	3.99	0.99	1.03	1.01
(IV)	1.01	4.10	4.09	0.99	0.98	1.00
(III)	1.03	5.07	4.08	1.04	1.02	1.03
(II)	1.00	5.12	4.11	1.06	1.02	1.04
(I)	1.02	5.09	5.00	1.00	1.10	1.08

Примечание. Гидролиз пептидов проводился 6 н. HCl при 110°C в течение 24 ч.

**Таблица 3.** Влияние синтетических пептидов на рост мононуклеарных клеток периферической крови человека\*

Дозы пептидов, мкг/мл	Уровень включения [ <sup>3</sup> H]тимидина, имп/мин	
	Пептид (VI)	Пептид (I)
0.1	5466 ± 1555	16433 ± 3270**
1.0	8620 ± 1125	9777 ± 1376**
10.0	8855 ± 1190	8300 ± 881
100.0	10266 ± 1555**	9271 ± 456**

\* Рекомбинантный ИЛ-2 (МНТК "Биоген") с удельной активностью 1000 Ед/мл, использованный в концентрации 500 Ед/мл (0.05 мкг/мл), вызывал увеличение включения [<sup>3</sup>H]тимидина до уровня 18675 ± 1987 имп/мин, фитогемаглютинин в концентрации 10 мкг/мл – до уровня 8155 ± 714 имп/мин.

\*\* Повышение уровня включения [<sup>3</sup>H]тимидина по сравнению с контролем (6416 ± 628) достоверно.

что сам CCl<sub>4</sub> нетоксичен, но в микросомальных системах печени, осуществляющих детоксикационную функцию, метаболизирует в течение 24–36 ч с выделением свободных радикалов, повреждающих паренхиму органа в местах их образования [11, 12]. Эффективность исследуемых препаратов оценивали по их влиянию на длительность тиопенталового наркоза. Тиопентал – барбитурат короткого действия, который метаболизирует исключительно в микросомальных системах гепатоцитов. Длительность тиопенталового наркоза наряду с функциональной бромсульфолеиновой пробой является адекватным интегральным критерием, позволяющим оценить функциональное состояние гепатоцитов. Из шести исследованных пептидов (табл. 6) четыре обладают способностью быстро восстанавливать функцию печени, причем один из них практически до интактного уровня (по тесту "тиопенталового сна").

Более глубокие исследования были проведены для самого активного пептида (I). По изменению уровня содержания нескольких клеточных ферментов в крови: аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2), аспартатаминотрансферазы (КФ 2.6.1.1), щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) и лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.28) – определялась степень повреждения мембран основных функциональных клеток печени – гепатоцитов. В случае разрушения мембран клеток уровень содержания этих ферментов в крови существенно повышается. Полученные экспериментальные данные показывают, что на фоне трехдневного лечебного применения пептида (I) уровень содержания вышеуказанных ферментов существенно снижается по сравнению с контрольными животными, которым препарат не вводился (табл. 7). В ходе экспериментов определяли также содержание общего белка в крови – показателя белоксинтезирующей функции гепатоцитов. Под действием четыреххлористого углерода содержание общего белка существенно снижалось, в то время как при введении животным пептида (I) восстанавливалось до нормы (табл. 7).

Таким образом, очевидно, что пептид (I) обладает выраженным стимулирующим влиянием на reparативные процессы в печени.

Модель частичной гепатэктомии является наиболее подходящей для изучения процессов регенерации в печени. В этом случае показателями функционального состояния печени были митотический индекс и индекс меченых ядер основных функциональных клеток печени – гепатоцитов. Оба эти показателя в контрольной группе животных через 24 ч после гепатэктомии увеличены по сравнению с интактными животными на 20 и 24% соответственно, а через 48 ч снижались до 14 и 10% от интактного уровня соответственно. При введении пептида (I) наблюдалось снижение обоих показателей через 24 ч после гепатэктомии

**Таблица 4.** Влияние рекомбинантного ИЛ-2 и синтетических пептидов на естественную киллерную активность мононуклеарных клеток периферической крови человека\*

Рекомбинантный ИЛ-2 в концентрации 0.05 мкг/мл	Пептид (VI) в концентрации (мкг/мл)				Пептид (I) в концентрации (мкг/мл)			
	0.1	1	10	100	0.1	1	10	100
69 ± 3.38	19.0 ± 4.38	15.1 ± 4.7	19.5 ± 7.2	23.1 ± 9.7**	13.8 ± 4.69	17.1 ± 3.48	28.2 ± 3.92**	4.5 ± 5.7

\* Представлены отличия от исходного уровня естественной киллерной активности, выраженные в %. Исходный уровень естественной киллерной активности, принятый за нулевой, составлял 46 ± 4.51%.

\*\*  $p < 0.01$ , в остальных случаях  $p > 0.05$ .

**Таблица 5.** Влияние синтетических пептидов на ростстимулирующую активность перитонеальных макрофагов по отношению к клеткам-мишениям K-562\*

K-562 (кон- троль)	К-562 без пептидов, без кле- ток-эффе- кторов	Клетки- эфекторы	Пептиды в концентрации 1 мкг/мл					
			(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)
4870 ± 430	5640 ± 370	Моно- циты	6620 ± 540**	7040 ± 760**	6290 ± 300**	6510 ± 580	6950 ± 320**	—
3340 ± 450	3240 ± 420	Супер- натан- ты***	3620 ± 400	4220 ± 360	3070 ± 540	3980 ± 270	4500 ± 360	—
3050 ± 250	3470 ± 250	Мак- рофаги	4390 ± 290**	4400 ± 440**	3810 ± 330	4650 ± 540	4040 ± 690	—
Пептиды в концентрации 1 мг/мл								
4870 ± 380	5640 ± 350	Моно- циты	6990 ± 540**	6800 ± 140**	6160 ± 370	6130 ± 320	6870 ± 120**	6950 ± 270**
3340 ± 450	3240 ± 420	Супер- натан- ты	4500 ± 290	4390 ± 170	3910 ± 300	3500 ± 300	4000 ± 260	3000 ± 190
3050 ± 250	3470 ± 250	Мак- рофаги	4510 ± 320**	4290 ± 390**	3730 ± 100**	4330 ± 160**	4240 ± 160**	4250 ± 1036

\* Ростстимулирующую активность оценивали по включению  $[^3\text{H}]$ тимидина и выражали в имп/мин. Все данные представлены как среднее по результатам 7 опытов.

\*\*  $p < 0.05$  по сравнению с ростом клеток K-562 в отсутствие клеток-эфекторов.

\*\*\* В экспериментах были использованы супернатанты макрофагов, обработанных *in vitro* соответствующими пептидами.

**Таблица 6.** Влияние синтетических пептидов на восстановление детоксикационной функции печени у мышей после повреждения ее тетрахлорметаном\*

Контрольные животные	Животные, получавшие пептид					
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)
29.2 ± 6.3	5.2 ± 1.1	12.2 ± 2.4	8.3 ± 1.4	11.6 ± 2.8	33.3 ± 7.1	27.8 ± 5.8
113.6 ± 10.9	39.9 ± 10.4	59.0 ± 11.1	75.3 ± 11.6	83.5 ± 9.8	106.1 ± 8.8	101.4 ± 10.5

\* Доза тетрахлорметана составляла 5 мл/кг (верхняя строка) или 7.5 мл/кг (нижняя строка).

\*\* Длительность тиопенталового наркоза у интактных животных 5.5 ± 0.7 мин.

**Таблица 7.** Влияние пептида (I) на активность гепатоспецифичных ферментов и содержание общего белка в крови у мышей с острым токсическим гепатитом, вызванным тетрахлорметаном

Активность, ед. акт./л	Интактные животные	После введения тетрахлорметана	
		Контрольные животные	Животные, получавшие пептид (I)
Аспартатаминотрансфераза	132.4 ± 7.3	232.1 ± 17.3	148.5 ± 11.1
Аланинаминотрансфераза	39.8 ± 1.8	180.8 ± 19.7	107.1 ± 19.5
Лактатдегидрогеназа	813.5 ± 38.5	1405.4 ± 129.5	876.0 ± 40.2
Щелочная фосфатаза	92.5 ± 4.1	85.2 ± 6.8	72.4 ± 5.8
Общий белок, г/л	65.5 ± 0.5	61.4 ± 0.9	68.4 ± 2.9

(т.е. торможение регенерации) и последующее их увеличение через 48 ч в 2.5 и 2 раза по сравнению с контролем соответственно. Кроме того, в первые 24 ч после гепатэктомии наблюдалось значительное по сравнению с контролем накопление в клетках гликогена – основного энергетического субстрата гепатоцитов. Полученные данные позволяют предположить, что в первые сутки после гепатэктомии пептид (I) способствует мобилизации углеводных ресурсов в гепатоцитах, что обеспечивает ускорение пролиферации на более поздних стадиях восстановления печени, и наблюдаемый на фоне введения пептида (I) более поздний пик пролиферации – биологически обусловленный адаптивный процесс, являющийся следствием стимуляции функциональной активности гепатоцитов в условиях выраженной печеночной недостаточности (табл. 8).

Изучение влияния пептида (I) на регенерацию полнослойных кожных ран проводилось при местном и внутрибрюшинном введении. Наблюдалось значительное ускорение процесса регенерации по сравнению с контролем, особенно при местном введении. Однако процесс заживления ран протекает гораздо медленнее, чем восстановление печени. Одной из причин относительного запаздывания стимулирующего эффекта пептида (I) является тот факт, что при нанесении полнослойных

кожных ран количество макрофагов в зоне дефекта определяется лишь степенью кровоснабжения поврежденного участка кожи. Капиллярная сеть в печени более развита, чем в коже, и удельный кровоток значительно выше, что создает условия для более интенсивной миграции макрофагов в зону повреждения.

Биологический эффект пептида (I) опосредован стимуляцией макрофагов, выделяющих ряд факторов роста в ответ на введение пептида. Супернатанты макрофагов, обработанных *in vitro* пептидом (I), обладают *in vitro* (табл. 5) и *in vivo* такой же активностью, как и сам пептид.

Таким образом, синтезированные нами фрагменты ИЛ-2 человека проявляют слабую ИЛ-2-подобную ростстимулирующую активность по отношению к моноцитам периферической крови человека.

По отношению к макрофагам синтезированные пептиды, напротив, проявляют активность антагонистическую по сравнению с ИЛ-2. Они выступают как инактиваторы цитотоксической активности макрофагов, причем в зависимости от фазы иммунного ответа пептиды либо “переключают” цитотоксическую активность макрофагов на ростстимулирующую, либо потенцируют уже экспрессированную макрофагами ростстимулирующую активность.

Основываясь на данных предварительных экспериментов, мы предполагаем, что иммуномодулирующее действие пептидов проявляется благодаря их взаимодействию с рецепторами ИЛ-2, экспонирующимися на поверхности лимфоцитов или макрофагов после их активации. Для уточнения механизма иммуномодулирующего действия пептидов мы исследуем взаимодействие радиоактивно меченых производных пептида (I) с клетками-мишениями для ИЛ-2.

Ярко выраженная иммуномодулирующая активность исследованных пептидов представляет значительный интерес для медицинской коррекции избыточных цитодеструктивных процессов, сопровождающихся генерализованной активацией макрофагов.

**Таблица 8.** Влияние пептида (I) на некоторые показатели регенерации после частичной гепатэктомии у крыс\*

Срок после операции, ч	Индекс меченых ядер, %		Митотический индекс, %	
	Контрольные животные	Животные, получавшие пептид	Контрольные животные	Животные, получавшие пептид
24	23.9 ± 3.6	13.2 ± 2.3	21.1 ± 4.1	5.2 ± 0.9
48	10.2 ± 2.1	20.4 ± 4.5	13.7 ± 3.4	33.7 ± 3.2

\* Митотический индекс и индекс меченых ядер выражены в процентах по отношению к значениям этих величин для интактных животных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали аминокислоты и их производные фирм Reanal (ЧСФР) и Serva (Германия). ТСХ осуществляли на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Merck, Германия). Для жидкостной колоночной хроматографии использовали силикагель L 40/100 мкм (Chemapol, ЧСФР). Препартивную ВЭЖХ осуществляли на приборе Beckman (США) в режиме градиентного элюирования от 0 до 100% ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте на колонке (21.2 × 250 мм) SynChropak RP-4 (SynChrom, Inc., США) при 226 нм. Физико-химические константы полученных соединений приведены в табл. 1. Удельное вращение измеряли на поляриметре Jasko DIP-360 (Jasko, Япония). Температуру плавления определяли на приборе Boetius (ГДР); все приведенные точки плавления не исправлены. Количество аминокислотный анализ осуществляли на приборе D-500 (Durrum, США) (табл. 2). Для проведения реакций конденсации и деблокирования использовали растворители фирм Serva и Merck (Германия), перегнанные и абсолютизованные обычным образом [13].

Для биологических тестов использовали рекомбинантный ИЛ-2 производства МНТК ("Биоген"), отечественный липополисахарид ("Мосхимпрепарат"), фитогемагглютинин (Sigma, США), пластиковые планшеты и чащки Петри фирмы Nunc (Дания). Радиоактивность клеток, меченых [ $^3\text{H}$ ]тимидином или [ $^3\text{H}$ ]уридином (Sigma, США), измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Delta-300 (Nuclear Chicago, США). Для математической обработки полученных экспериментальных данных используют общепринятые методы параметрической и непараметрической статистики [14].

**1. Boc-Asn-Leu-OMe (VII).** К раствору 10.00 г (0.055 моль) HCl · Leu-OMe в 35 мл DMF прибавляли 6.00 мл (0.055 моль) NMM, 7.26 г (0.55 ммоль) HOBr и 20.00 г (0.057 моль) Boc-Asn-ONp. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 24°C, упаривали до объема 10 мл и выливали в 1 л 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при перемешивании. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , водой, насыщенным раствором  $\text{KHCO}_3$ , снова водой, смесью растворителей эфир–метанол (5 : 1, 50 мл), этанолом (100 мл). Выход дипептида (VII) 18 г (91%).

**2. Boc-Leu-Asn-Leu-OMe (VIII).** Раствор 18.00 г (0.050 моль) Boc-Asn-Leu-OMe в 200 мл смеси уксусной и трифторуксусной кислот (3 : 7) выдерживали 1.5 ч при 20°C, упаривали, остаток кристаллизовали из гексана, промывали эфиром (500 мл). Выход трифторацетата (VIIIa) 18.65 г (количествоственный).

К раствору 18.65 г (0.050 моль) трифторацетата (VIIIa) в 100 мл диоксана прибавляли 5.49 мл

(0.050 моль) NMM, 6.80 г (0.050 моль) HOBr и 19.38 г (0.055 моль) Boc-Leu-ONp. Реакционную смесь интенсивно перемешивали 1 ч при 20°C, прибавляли 100 мл DMF, снова перемешивали 12 ч при 20°C. Диоксан упаривали, остаток разбавляли 2% раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$  до объема 1.5 л. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре последовательно: 2% раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (200 мл), водой (500 мл), насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (250 мл), водой (500 мл). Осадок высушивали в вакууме и промывали 50 мл смеси метанол–эфир (1 : 5) и 200 мл этанола, снова высушивали в вакууме. Выход трипептида (VIII) 18.34 г (63%).

Соединения (IX)–(XII) получали по методике 2, выходы реакций и физико-химические характеристики см. в табл. 1 и 2.

**3. Boc-Lys(Z)-Pro-OH (XIII).** К раствору 6.9 г (60.0 ммоль) пролина в 14 мл пиридина прибавляли 6.6 мл (60.0 ммоль) NMM. Раствор 16.4 г (30.0 ммоль) Boc-Lys(Z)-OPfp и 4.0 г (30.0 ммоль) HOBr в 20 мл диоксана прибавляли к реакционной смеси по каплям в течение 2 ч при 10°C при энергичном перемешивании. После этого реакционную смесь перемешивали еще 12 ч при 25°C и выливали в 1.5 л 2% раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Выпавшее масло экстрагировали этилацетатом, промывали 2% раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3 × 300 мл), водой, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , осушитель. Отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в 20 мл насыщенного раствора  $\text{KHCO}_3$ , промывали эфиром. Водный слой подкисляли лимонной кислотой до pH 5, выпавшее масло экстрагировали этилацетатом, промывали водой, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток хроматографировали на колонке (35 × 100 мм) с силикагелем, используя элюцию в градиенте растворителей этилацетат–этанол с 10% уксусной кислоты. Выход дипептида (XIII) 10.7 г (75%).

**4. Boc-Leu-Lys(Z)-Pro-OH (XIV).** Раствор 10.7 г (22.0 ммоль) дипептида (XIII) в 50 мл смеси уксусной и трифторуксусной кислот (3 : 7), охлажденной до 10°C, выдерживали 30 мин при 20°C, упаривали при 30°C. Остаток промывали гексаном, высушивали в вакууме. Выход трифторацетата (XIIIa) 10.8 г (количествоственный).

К раствору 10.8 г (22.0 ммоль) трифторацетата (XIIIa) в 20 мл диоксана прибавляли 4.8 мл (44.0 ммоль) NMM и 11.9 г (30.0 ммоль) Boc-Leu-OPfp. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 25°C, выливали в 1.5 л 2% раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Выпавший осадок экстрагировали этилацетатом и промывали последовательно 2% раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (100 мл), водой (300 мл), насыщенным раствором  $\text{NaCl}$  с 10%  $\text{NaHCO}_3$  (150 мл), водой (300 мл) и высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Осушитель отфильтровывали,

фильтрат упаривали. Остаток высушивали в вакууме. Выход трипептида (XIV) 12.3 г (95%).

Соединения (XV)–(XVIII) получали по методике 4, выходы реакций и физико-химические характеристики см. в табл. 1 и 2.

**5. Boc-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (XIX).** При постоянном перемешивании к раствору 114 мг (0.10 ммоль) трифторацетата (XIIa), 204 мг (0.15 ммоль) гептапептида (XVIII) и 22 мг (0.16 ммоль) HOEt в 1 мл DMF прибавляли 11 мкл (0.10 ммоль) NMM, охлаждали до  $-10^{\circ}\text{C}$  и прибавляли охлажденный до  $0^{\circ}\text{C}$  раствор 42.4 мг (0.10 ммоль) WSCD в 200 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0... $-5^{\circ}\text{C}$ , 12 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ , затем снова охлаждали до  $-10^{\circ}\text{C}$  и прибавляли охлажденный до  $0^{\circ}\text{C}$  раствор 20 мг (0.047 ммоль) WSCD в 100 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при  $-5\text{--}0^{\circ}\text{C}$  и 48 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ , разбавляли 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в 10 раз. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $3 \times 6$  мл), водой, насыщенным  $\text{NaHCO}_3$ , водой, высушивали в вакууме, промывали этилацетатом (10 мл), этанолом (10 мл), снова высушивали в вакууме. Выход тетрадекапептида (XIX) 150 мг (64%).

Нонапептид (XX), декапептид (XXI), ундекапептид (XXII), додекапептид (XXIII) и тридекапептид (XXIV) получали конденсацией двух защищенных фрагментов: дипептида (XIII), трипептида (XIV), тетрапептида (XV), пентапептида (XVI) и гексапептида (XVII) соответственно с гептапептидом (XIIa) аналогично получению тетрадекапептида (XIX) (см. методику 5).

**6. Ac-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (XIXa).** Раствор 88 мг (0.037 ммоль) тетрадекапептида (XIX) в 3 мл смеси уксусной и трифторуксусной кислот (3 : 7) выдерживали 1.5 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ , упаривали. Остаток кристаллизовали из эфира, высушивали в вакууме. Выход трифторацетата тетрадекапептида (XIX) 88 мг (количествоенный).

К раствору 88 мг (0.037 ммоль) трифторацетата тетрадекапептида (XIX) в 2 мл трифторэтанола прибавляли 8.0 мкл (0.074 ммоль) NMM и 352 мкл (0.37 ммоль) уксусного ангидрида. Реакционную смесь выдерживали 30 мин при  $20^{\circ}\text{C}$ , растворитель упаривали, остаток промывали водой (10 мл), высушивали в вакууме. Выход тетрадекапептида (XIXa) 86 мг (99%).

Соединения (XXa)–(XXIVa) получали как описано в методике 6, деблокированием с последующим ацетилированием пептидов (XX)–(XXIV) соответственно.

**7. Ac-Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (I).** Раствор 86 мг (0.037 ммоль) тетрадекапептида (XIXa) в

$\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$  (37%) выдерживали 1 ч при  $25^{\circ}\text{C}$ , упаривали при температуре не выше  $35^{\circ}\text{C}$ , многократно промывали эфиром, растворяли в воде, доводили pH до 7–7.5 раствором аммиака, лиофилизовали. Полученный пептид в виде порошка подвергали очистке с помощью ВЭЖХ на колонке ( $21.2 \times 250$  мм) SynChropak RP-4. Выход тетрадекапептида (I) 27 мг (43%).

**8. Ac-Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (I).** К раствору 92 мг (0.040 ммоль) тетрадекапептида (XIXa) в 400 мкл трифторуксусной кислоты прибавляли 12 мкл (0.114 ммоль) анизола и 17 мкл (0.190 ммоль) трифторметансульфонилкислоты, выдерживали 1 ч при  $25^{\circ}\text{C}$  и обрабатывали как в методике 7. Выход тетрадекапептида (I) 37 мг (53%).

Нона- (VI), дека- (V), ундека- (IV), додека- (III), тридекапептиды (II) получали деблокированием защищенных нона- (XXa), дека- (XXIa), ундека- (XXIIa), додека- (XXIIIa) и тридекапептида (XXIVa) соответственно как описано в методике 7 или 8.

**9. Влияние пептидов (VI) и (I) на пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека.** В качестве источника мононуклеарных клеток использовали кровь 60 практически здоровых доноров. Мононуклеарные клетки в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл культивировали в течение 72 ч в пластиковых чашках Петри в присутствии 100 мкг/мл фитогемагглютинина в стандартных культуральных условиях. Затем клетки отмывали и сuspendировали в растворе Хэнкса и помещали в лунки 96-луночного планшета в объеме 100 мкл. Исследуемые пептиды в 100 мкл физиологического раствора в концентрациях 200, 20, 2, 0.2 мкг/мл добавляли к опытным культурам клеток и инкубировали 48 ч в стандартных культуральных условиях. Основным контролем служили клетки, к которым была добавлена полная культуральная среда. Положительным контролем были культуры клеток, к которым добавляли рекомбинантный ИЛ-2 или фитогемагглютинин в объеме 100 мкл физиологического раствора. К каждой культуре добавляли 10 мкл раствора [ $^3\text{H}$ ]тимидина с активностью 1.5 мКи/мл и после 2 ч инкубации клетки собирали на бумажные фильтры при помощи харвестера и определяли содержание в них изотопа на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Каждый тест проводили в трех параллельных культурах. Влияние препаратов на пролиферацию клеток определяли по формуле

$$(O - K)/K \times 100\%,$$

где  $O$  – средний уровень включения изотопа в трех параллельных культурах клеток в присутствии пептидов, а  $K$  – тот же показатель для

контрольных клеток, к которым была добавлена только полная культуральная среда (табл. 3).

**10. Определение влияния синтетических пептидов (VI) и (I) на активность естественных киллеров.** Мононуклеарных клетки ( $2 \times 10^6$  клеток/мл) культивировали 48 ч в присутствии пептидов (VI) и (I) в концентрациях, указанных в табл. 4. Положительным контролем служили мононуклеарные клетки, инкубированные с рекомбинантным ИЛ-2 (500 Ед/мл, 0.5 мкг/мл), отрицательным – клетки, инкубуемые без добавления препаратов. После инкубации к мононуклеарным клеткам добавляли клетки-мишени (К-562), предварительно меченные [ $^{3}\text{H}$ ]уридином, в концентрации  $1 \times 10^4$  клеток/мл в объеме 100 мкл полной культуральной среды. После 18 ч инкубации клетки собирали харвестером и количество изотопа определяли как в эксперименте 9 (табл. 4).

**11. Определение ростстимулирующей активности перитонеальных макрофагов.** Перитонеальные макрофаги получали от мышей BALB/c и СЗН разводки питомника Рапполово (Ленинградская область) путем промывания брюшной полости средой Хэнкса при 4°C. Макрофаги и моноциты человека выделяли из периферической крови путем отбора ее из локтевой вены у практически здоровых доноров [15].

Для постановки экспериментов по оценке влияния препаратов на способность макрофагов и моноцитов производить факторы роста использовали клетки-мишени К-562 в концентрации  $1 \times 10^4$  клеток/мл, субоптимальной для спонтанной пролиферации (табл. 5). Пептидные препараты (I)–(VI) непосредственно перед исследованием растворяли в физиологическом растворе, стерилизовали путем фильтрации и разводили в полной культуральной среде в концентрациях, указанных в табл. 5. Макрофаги инкубировали в присутствии пептидов (в указанном выше диапазоне доз) или без них в течение 24 ч, в полный культуральной среде. Оценку ростстимулирующей активности макрофагов проводили по методике [15]. В качестве дополнительного контроля проводили инкубацию клеток К-562 без клеток-эффекторов, но с добавлением еще 100 мкл полной культуральной среды. Влияние моноцитов и макрофагов на пролиферацию клеток К-562 оценивали по включению [ $^{3}\text{H}$ ]тимидина и выражали в имп/мин.

**12. Регенеративно-репаративные свойства пептидов (I)–(VI) на моделях токсического повреждения печени и гепатэктомии.** В работе использовали белых мышей-самцов линии НР массой 22–25 г и белых беспородных крыс-самцов массой 180–200 г. Исследуемые пептиды вводили внутрибрюшинно в 0.2 мл физиологического раствора в течение 3 дней, начиная через 36–40 ч после токсического повреждения или за три дня до гепатэктомии.

**12а. Изучение регенеративно-репаративных свойств синтетических пептидов (I)–(VI) на модели токсического повреждения печени.** Токсическое повреждение печени осуществляли однократным подкожным (в шейную складку) введением тетрахлорметана в виде 50% раствора в оливковом масле в дозах 5 и 7.5 мл/кг веса. Исследуемые пептиды начинали применять через 40 ч после инъекции гепатотоксина и вводили ежедневно в течение 3 дней в дозе 2.5 мг/кг.

Тиопентал в эмпирически подобранной дозе 31–34 мг/кг при введении мышам внутривенно, в латеральную вену хвоста, вызывает у интактных животных наркотический сон длительностью 5–6 мин. Введение тиопентала осуществляли через сутки после последней инъекции исследуемых пептидов. Продолжительность наркотического сна определяли по длительности бокового положения животных (табл. 6).

Для анализа механизмов гепатозащитного действия пептида (I) изучали его влияние на активность гепатоспецифических ферментов – аланин-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.2), аспартатамино-трансферазы (КФ 2.6.1.1), щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) и лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.28), а также на белоксинтезирующую функцию печени (табл. 7). Активность ферментов и содержание общего белка в крови определяли колориметрически на биохимическом анализаторе Expren-550 с использованием стандартных коммерческих наборов Ciba Corning [16].

**12б. Для изучения влияния пептида (I) на процессы регенерации использовали классическую модель частичной гепатэктомии [17].** Пептид (I) в дозе 2.0 мг/кг вводили ежедневно в течение 3 дней до операции. Печень для гистологического исследования брали через 24 или 48 ч после операции, фиксировали в 20% формалине и окрашивали гематоксилин-эозином. Митотический индекс подсчитывали на 3000 гепатоцитов и выражали в промилле. В некоторых экспериментах определяли влияние пептида (I) на индекс меченых ядер гепатоцитов. Для этого крысам за 1 ч забоя вводили [ $^{3}\text{H}$ ]тимидин. Включение изотопа оценивали авторадиографически (табл. 8).

**13. Изучение влияния пептида (I) на заживание полнослойных кожных ран у мышей проводили по методике, предложенной О.Д. Барнауловым [18].** Пептид (I) вводили внутрибрюшинно или местно с 1-го по 10-й день после операции в дозе 2.5 мг/кг веса тела. При оценке эффективности препарата учитывали площадь ран (условно принимая ее равной произведению продольного и поперечного диаметров), а также количество мышей в группе, раны которых к данному сроку полностью зажили.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gillis S., Ferm M.M., Ou W., Smith K.A. // J. Immunol. 1978. V. 120. P. 2027.
2. Brandhuber B.J., Boone T., Kenney W.C., McKay D.B. // Science. 1987. V. 238. P. 1707–1709.
3. Berndt W.J., Chang D.Z., Smith K.A., Ciardelli T.L. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 6571–6577.
4. Roessler E., Grant A., Grace Ju., Tsudo M., Sugamura K., Waldmann T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 3344–3347.
5. Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Лунев В.Е., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 908–921.
6. Балашова Т.А., Пашков В.С., Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Мареева Т.Ю., Петрова Е.Э., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 1470–1486.
7. Балашова Т.А., Пашков В.С., Нольде Д.Е., Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Самохвалова Л.В., Малахова Г.В., Арсеньев А.С. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 21–32.
8. Taniguchi T., Minami Y. // Cell. 1993. V. 73. P. 5–8.
9. Ушморов А.Г., Оноприенко Л.В., Войтенков Б.О., Михалева И.И. // Вопр. онкологии. 1991. Т. 37. С. 826–830.
10. Rappolee I.A., Mark D., Banda M.J., Werb Z. // Science. 1988. V. 241. P. 708.
11. Венгеровский А.И., Саратиков А.С. // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1988. С. 52–55.
12. Венгеровский А.И., Седых И.М., Новожеева Т.П., Саратиков А.С. // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1990. С. 37–39.
13. Органикум. Т. 2. М.: Мир, 1992. С. 402–427.
14. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976.
15. Okulov V.B., Voytenkov B.O., Ushmorov A.G., Polischuk N.D., Gromov S.A. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1992. V. 118. P. 537–541.
16. Саратиков А.С., Венгеровский А.И., Паульс О.В., Седых И.М. // Фармакология и токсикология. 1990. Т. 53. С. 42–43.
17. Higgins G.M., Anderson R.M. // Arch. Pathol. 1931. V. 12. P. 186–202.
18. Барнаулов О.Д. // Растительные ресурсы. 1981. Т. 17. С. 462–469.

## Immunomodulating Properties of Synthetic Fragments of Human Interleukin 2

L. V. Onoprienko,<sup>1</sup> I. I. Mikhaleva, V. T. Ivanov, B. O. Voitenkov\*, and V. B. Okulov\*

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia

\*Petrov Research Institute of Oncology, ul. Leningradskaya 68, pos. Pesochnyi-2, St. Petersburg, 189646 Russia

**Abstract**—For the study of the antigenic structure and function of human interleukin 2, the peptides corresponding to its 60–72 sequence were synthesized by conventional methods of peptide chemistry in solution. To enhance the stability of the synthetic peptides towards the proteolysis and to remove their terminal charges, we acetylated their NH<sub>2</sub> groups and esterified with methanol their carboxyls. Some of these peptides were converted from being cytotoxic to possessing strong growth-stimulating activity for the preliminarily activated macrophages both *in vitro* and *in vivo*. The biologically active peptides were also shown to enhance regeneration-reparation processes in liver and skin.

**Key words:** human interleukin 2; synthetic peptides; macrophages.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.