



УДК 577.175.82.05+612.112.94

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА *ретро*-АНАЛОГА МИЕЛОПЕПТИДА 2

© 2005 г. Л. А. Фонина^{*,#}, М. В. Овчинников^{**}, С. А. Гурьянов^{*}, С. В. Сычев^{*},
Р. Г. Белевская^{*}, Е. М. Трещалина^{***}

^{*}Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

^{**}НИИ экспериментальной кардиологии Российского кардиологического
научно-производственного комплекса МЗ РФ;

^{***}НИИ экспериментальной терапии и диагностики опухолей РОНЦ РАМН

Поступила в редакцию 30.09.2004 г. Принята к печати 15.10.2004 г.

Проведен синтез и изучены свойства костно-мозгового пептида Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp (МП-2), обладающего противоопухолевой активностью, и его *ретро*-аналога Trp-Pro-Tyr-Val-Val-Leu. Активность *ретро*-МП-2 в тестах *in vitro* и *in vivo* практически не отличается от активности природного пептида. Оба пептида в равной степени восстанавливают функциональную активность Т-лимфоцитов, подавленную токсинами клеток линии HL-60; оба пептида на 70–82% подавляют рост различных типов перевиваемых солидных опухолей: аденокарциномы молочной железы Ca 755, аденокарциномы легкого Lewis, саркомы S 180. Положение и интенсивности эффектов Коттона в спектрах КД пептида МП-2 и его *ретро*-аналога в различных растворителях существенно не различаются. Положение экстремумов и интегральная интенсивность полос амид I и амид A в ИК-спектрах обоих пептидов практически идентичны.

Ключевые слова: миелопептид МП-2, *ретро*-аналог, синтез, противоопухолевая активность; КД-спектроскопия; ИК-спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы стала очевидной важная роль пептидов костного мозга (миелопептидов) в осуществлении иммунорегуляторных функций в организме. Детальное изучение миелопептидов показало, что они обладают широким спектром биологических активностей: иммунокорректирующей, противоопухолевой и дифференцировочной, а также влияют на функциональную активность системы мононуклеарных фагоцитов [1].

Изучение взаимосвязи между строением и биологической активностью эндогенных регуляторных пептидов в течение ряда лет привлекает пристальное внимание химиков, биологов и фармакологов. Это обусловлено, в первую очередь, тем, что короткие линейные пептиды, обладающие биологической активностью, являются перспективными кандидатами для создания на их основе терапевтических препаратов. Выявление структурных элементов молекулы пептида, ответственных за проявление биологической активности, дает возможность на качественно новом

уровне перейти к созданию аналогов с заранее заданными свойствами.

Определенный интерес с точки зрения конструирования молекул, имеющих топохимическое сходство с исходными пептидами, представляют *ретро*-аналоги, изомерные природным пептидам, но отличающиеся от них противоположным направлением одной или нескольких пептидных связей. Такие модифицированные молекулы могут обладать биологической активностью, присущей исходному соединению [2, 3], в то же время обращение ацилирования пептидной цепи может повышать устойчивость модифицированных пептидов к биодеградации.

Цель настоящей работы – синтез и изучение биологической активности гексапептида Trp-Pro-Tyr-Val-Val-Leu – *ретро*-аналога миелопептида Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp (МП-2), отличающегося от природного пептида противоположным направлением амидных связей между всеми аминокислотными остатками. Ранее было показано, что пептид МП-2 обладает противоопухолевой активностью, на 70–80% подавляя рост различных типов перевиваемых солидных мышечных опухолей: лимфолейкоза Р-388, аденокарциномы молочной железы Ca 755, аденокарциномы легкого Lewis, меланомы В 16, саркомы S 180 [4].

Сокращения: DMF – диметилформамид; TFE – трифторэтанол; THF – тетрагидрофуран; РНА – фитогемагглютинин; КС – кондиционная среда.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 330-72-56; факс: (095) 330-72-10; эл. почта: stas@ibch.ru).

Таблица 1. Влияние МП-2 и *ретро*-МП-2 на восстановление РНА-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов человека, сниженной под воздействием КС HL-60

Вещества, добавленные к Т-лимфоцитам			Уровень пролиферации, %
РНА (контроль)			100
РНА + КС HL-60			28 ± 9
РНА + КС HL-60 +	МП-2	100*	61 ± 15*
	(мкг/мл)	10**	48 ± 9**
	<i>ретро</i> -МП-2	100*	62 ± 13*
	(мкг/мл)	10*	49 ± 10*

* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пептид МП-2 синтезировали классическими методами пептидной химии. Для блокирования α -аминогрупп использовали Z-группу, карбоксильные группы аминокислот защищали, превращая их в *трет*-бутиловые и бензиловые эфиры. Конденсации проводили методом активированных эфиров и карбодимидным методом. *ретро*-МП-2 синтезировали твердофазным методом, используя в качестве полимерного носителя хлорметилированный сополимер стирола с дивинилбензолом. Целевые гексапептиды МП-2 и *ретро*-МП-2 выделяли и очищали методом обращенно-фазовой хроматографии, они охарактеризованы данными ВЭЖХ, масс-спектрометрии и секвенирования.

Биологическую активность пептидов МП-2 и *ретро*-МП-2 оценивали по степени восстановления РНА-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов человека (*in vitro*) и по их способности тормозить рост различных перевиваемых мышечных опухолей (*in vivo*).

Известно, что Т-лимфоциты являются одним из главных факторов противоопухолевой защиты организма. Опухолевые клетки, независимо от их природы, выделяют токсические вещества, угнетающие функциональную активность Т-лимфоцитов [5, 6]. В частности, клетки линии HL-60 продуцируют белок, подавляющий пролиферативную способность Т-лимфоцитов [5]. Было показано, что пептид МП-2 обладает способностью восстанавливать функциональную активность Т-лимфоцитов, подавленную токсинами клеток линии HL-60 [7], что, как полагают, и лежит в основе его противоопухолевого действия.

Функциональное состояние лимфоцитов, подвергнутых действию опухолевых токсинов, определялось по их способности к бласттрансформации в присутствии фитогемагглютина. Данная модель базируется на оценке пролиферации Т-лимфоцитов периферической крови человека, культивируемых при субоптимальной концентрации митогена, что является характеристикой функциональной активности этих клеток [8].

Таблица 2. Влияние МП-2 и *ретро*-МП-2 на рост трансплантированных мышечных опухолей

Тип опухоли	Режим введения	Дни после трансплантации	Торможение роста опухоли, %	
			МП-2	<i>ретро</i> -МП-2
Аденокарцинома молочной железы Са 755	0.5 мг/кг, пятикратно, через 24 ч	7	78	72
		14	69	82
		18	62	67
Аденокарцинома легкого Lewis	2 мг/кг, двукратно, через 96 ч	7	69	59
		14	71	66
		18	74	73
Саркома S 180	1 мг/кг, двукратно, через 96 ч	7	69	76
		14	75	68
		18	65	64

В работе использовали Т-лимфоциты периферической крови здоровых доноров. Для подавления функциональной активности Т-лимфоцитов использовали кондиционную среду лейкозной линии клеток HL-60. Пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на введение фитогемагглютина оценивали по включению [3 H]тимидина в ДНК как описано в сообщении [8]. Результаты экспериментов приведены в табл. 1.

Из таблицы видно, что в присутствии кондиционной среды клеток HL-60 наблюдается значительное (на 72%) снижение пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на присутствие фитогемагглютина. Оба исследуемых пептида практически в равной степени восстанавливают функциональную активность Т-лимфоцитов, подавленную продуктами опухолевых клеток линии HL-60. Степень восстановления РНА-индуцированной пролиферации зависит от дозы пептидов: максимальный эффект (уровень пролиферации 61%) наблюдается при дозе пептидов 100 мкг/мл, снижение дозы до 10 мкг/мл приводит к снижению эффекта (48%).

Для оценки противоопухолевого эффекта пептидов использовали три типа перевиваемых мышечных опухолей: аденокарциному молочной железы Са 755, аденокарциному легкого Lewis, саркому S 180 и две схемы введения пептидов МП-2 и *ретро*-МП-2: двукратное подкожное – в дозах 1 или 2 мкг/кг с 96-часовым интервалом между инъекциями и пятикратное ежедневное – в дозах 0.5 мг/кг. Размеры опухолей измеряли через различные сроки после их трансплантации.

Данные по изучению противоопухолевой активности суммированы в табл. 2, из которой видно, что *ретро*-аналог, как и исходный пептид МП-2, оказывает выраженный ингибирующий эффект на рост всех исследованных типов опухолей. Процент торможения роста опухолей ретро-

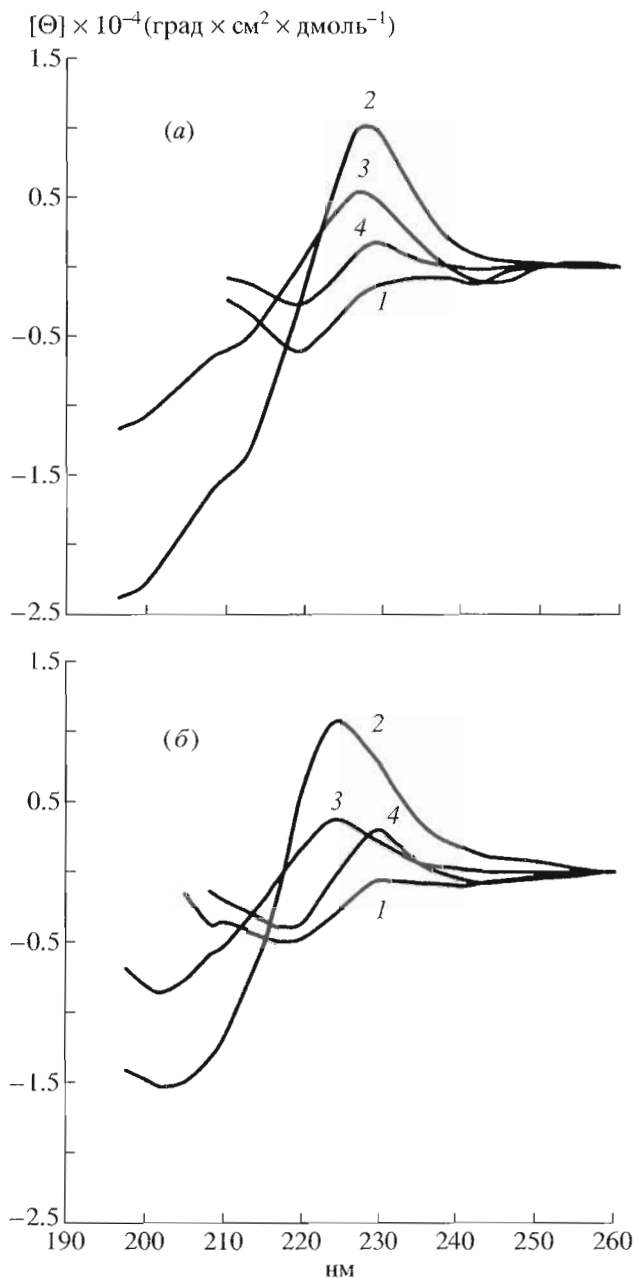


Рис. 1. Спектры КД гексапептидов МП-2 (а) и *ретро*-МП-2 (б) в ТНФ (1), воде (2), ТФЕ (3), диоксане (4).

пептидом через разные сроки после их трансплантации практически не отличается от такового для пептида МП-2.

Результаты изучения биологической активности пептидов МП-2 и *ретро*-МП-2 в тестах *in vitro* и *in vivo* позволяют предположить, что обращение направления ацилирования пептидной цепи пептида МП-2 не влияет на структуру его активного центра, т.е. не нарушает пространственную организацию молекулы этого пептида.

Для проверки этого предположения было проведено изучение пространственного строения пептида МП-2 и его *ретро*-аналога. Конформационный по-

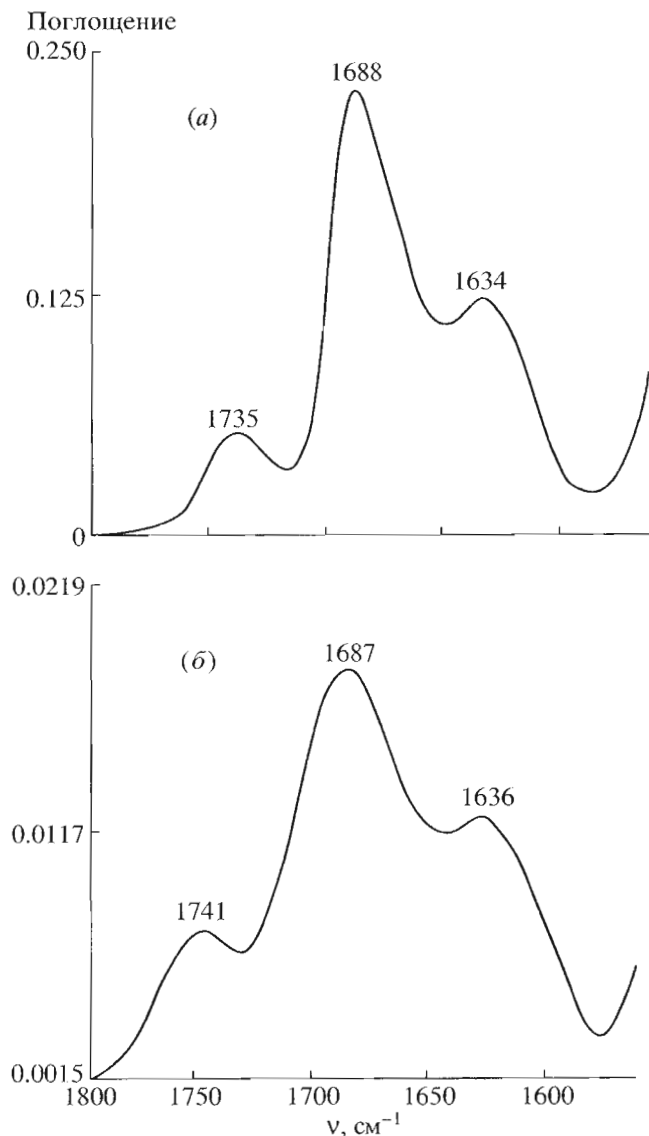


Рис. 2. ИК-спектры гексапептидов МП-2 (а) и *ретро*-МП-2 (б) в ТНФ. Приведена область валентных колебаний С=О-групп (амид I).

лиморфизм пептидных цепей оценивался методом кругового дихроизма (КД), для регистрации КД-спектров использовался набор растворителей с различными физико-химическими параметрами: вода, трифторэтанол, диоксан и тетрагидрофуран. Анализ полученных результатов показал, что положение и интенсивности эффектов Коттона в спектрах КД пептидов МП-2 и *ретро*-МП-2 во всех исследованных растворителях практически одинаковы (рис. 1), что свидетельствует о сходстве конформационных возможностей обоих соединений.

Другим методом, подтверждающим структурное сходство изучаемых пептидов, является метод ИК-спектроскопии. Данный метод позволяет получить информацию о наличии Н-связей, поскольку частоты валентных колебаний NH- и С=О-групп амид-

ных связей чувствительны к участию этих групп в образовании водородных связей. По интегральной интенсивности полос можно оценить количество свободных и участвующих в образовании водородных связей групп NH. Из рис. 2 видно, что ИК-спектры пептида МП-2 и его *retro*-аналога в области полосы амид I весьма сходны. Полосы валентных колебаний C=O-групп амидных связей (амид I) содержат по два компонента: 1688 и 1634 см^{-1} (МП-2) и 1688 и 1636 см^{-1} (*retro*-МП-2), которые мы относим к свободным (экспонированным в растворителе) и участвующим в образовании Н-связей C=O-группам соответственно. Отнесение полос проводилось с учетом данных литературы для модельных линейных [9] и циклических [10] пептидов сходного строения. Отношение интегральных интенсивностей полос, соответствующих свободным и связанным C=O-группам в обоих пептидах, составляет $\sim 3 : 2$, что может указывать на формирование β -изгибов, стабилизированных двумя внутримолекулярными водородными связями [9, 10]. Полосы валентных колебаний NH-групп амидных связей (амид A) в спектрах МП-2 и *retro*-МП-2 (на рисунке не приводятся) имеют максимумы при 3320 и 3330 см^{-1} соответственно, что свидетельствует об образовании сильных водородных связей в обоих пептидах. Слабые полосы при 1735 (МП-2) и 1741 см^{-1} (*retro*-МП-2) соответствуют полосе валентных колебаний COOH-групп.

Результаты изучения иммунорегуляторного пептида МП-2 и его *retro*-аналога четко показали, что оба исследованных пептида проявляют практически одинаковую биологическую активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Данные изучения пространственных структур пептидов МП-2 и *retro*-МП-2 спектральными методами позволяют сделать вывод о сходстве пространственной организации пептидных цепей обоих пептидов.

Таким образом, полученные в ходе выполнения данной работы экспериментальные данные показали, что обращение направления ацилирования всех аминокислотных остатков в молекуле эндогенного пептида МП-2 практически не отразилось ни на его специфической биологической активности, ни на пространственной организации пептидной цепи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия, Fluka, Швейцария) или производные, полученные по стандартным методикам. Индивидуальность полученных соединений на промежуточных стадиях синтеза проверяли с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем фирмы "Merk" (Германия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 60 : 45 : 20 (А); хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 5 : 3 : 1 (Б); хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 15 : 4 : 1 (В);

n-бутанол–уксусная кислота–вода, 3 : 1 : 1 (Г); хлороформ–метанол–уксусная кислота, 9 : 1 : 0.5 (Д). Вещества обнаруживали с помощью нингидрина или *o*-толидина.

Аналитическую ВЭЖХ проводили с использованием хроматографической системы LC-10ADvp (Shimadzu, Япония) на колонке Ультрасфера C18 (4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте (0–80%, 32 мин). Скорость элюции 1.6 мл/мин, детектирование при длине волн 214 и 280 нм.

Препаративную ВЭЖХ конечных и промежуточных пептидов выполняли на колонке (50 × 250 мм) Диасорб С 16-Т в градиенте буфера В в буфере А (10–50%, 120 мин; буфер А – 0.01 н. $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, буфер В – 80% ацетонитрила в буфере А). Скорость потока 50 мл/мин, детекция при 226 нм. Фракции, соответствующие основному пику, объединяли, ацетонитрил упаривали, полученный раствор разбавляли водой и лиофилизировали.

Синтез *Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp*

Z-Val-Val-OH. К раствору 2.56 г (22 ммоль) валина в 70 мл DMF при перемешивании (18°C) добавляли 22 мл 1 н. NaOH и 7.45 г (0.020 моль) Z-Val-ONp. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 18°C, растворитель упаривали. Полученный остаток растворяли в 100 мл воды, водный раствор промывали эфиром (3 × 30 мл) и подкисляли 10% H_2SO_4 до pH 2.0. Выпавший маслообразный осадок экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл), этилацетатный раствор промывали водой (3 × 50 мл). Органический слой высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и упаривали. К полученному маслообразному остатку добавляли 50 мл сухого эфира, осадок тщательно растирали, отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали в вакуумном эксикаторе. Выход 6.2 г (88%). R_f 0.71 (В), 0.54 (Г).

H-Tyr(Bu')-Pro-OBu'. 16.58 г (30 ммоль) дициклогексиламмониевой соли Z-Tyr(Bu')-OH суспендировали в 200 мл этилацетата и промывали 5% H_2SO_4 (2 × 50 мл), затем водой (3 × 50 мл) до pH 5.0. Этилацетатный раствор высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и упаривали. Остаток растворяли в 160 мл сухого этилацетата, к этому раствору при перемешивании добавляли 3.33 мл *N*-метилморфолина, охлаждали до –25°C и прибавляли 30 мл изобутилхлорформиата. Реакционную смесь перемешивали 10 мин при –25°C, затем к ней добавляли охлажденный до –20°C раствор 6.85 г (33 ммоль) $\text{HCl} \cdot \text{H-Pro-Bu}'$ и 50 мл *N*-метилморфолина в 70 мл этилацетата. Перемешивали 1 ч, постепенно доводя температуру реакционной смеси до 18°C. Реакционную смесь промывали водой, 5% NaHCO_3 (2 × 50 мл), водой (1 × 50 мл), 5% H_2SO_4 (2 × 50 мл) и водой (2 × 50 мл). Органический слой высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали

вали и упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 150 мл метанола, добавляли 1 г 10% Pd/C и гидрировали в атмосфере H₂ при 18°C до исчезновения исходного вещества (контроль методом ТСХ в системе хлороформ-метанол, 9 : 1), остаток высушивали в вакуумном эксикаторе. Выход целевого вещества в виде масла 7.63 г (65%). R_f 0.77 (B), 0.64 (Г).

H-Val-Val-Tyr(Bu^t)-Pro-OBu^t. К раствору 6.2 г (17.7 ммоль) Z-Val-Val-OH в 100 мл DMF при перемешивании добавляли 2.22 мл *N*-метилморфолина. Реакционную смесь охлаждали до -25°C и при перемешивании постепенно добавляли 2.34 мл изобутилхлорформиата. Реакционную смесь перемешивали 10 мин при -25°C и к ней добавляли охлажденный до -20°C раствор 7.93 г (19.5 ммоль) H-Tyr(Bu^t)-Pro-OBu^t в 100 мл DMF. Перемешивали 2 ч, постепенно доводя температуру реакционной смеси до 20°C. Растворитель упаривали в вакууме при 40°C, остаток растворяли в 200 мл этилацетата, промывали 5% NaHCO₃ (2 × 50 мл), водой (1 × 50 мл), 5% H₂SO₄ (2 × 50 мл), водой (2 × 50 мл). Этилацетатный раствор сушили над MgSO₄ и упаривали в вакууме. Полученный маслообразный остаток растворяли в 20 мл смеси этилацетат-гексан (3 : 7) и наносили на колонку (30 × 200 мм) с силикагелем Silica Gel 60 Angstrom (90–130 мкм), уравновешенным смесью этилацетат-гексан (3 : 7). Целевое вещество элюировали той же смесью растворителей (500 мл). Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и упаривали в вакууме. Маслообразный остаток растворяли в 100 мл этанола, добавляли 1 г 10% Pd/C и гидрировали в атмосфере H₂ при 18°C до исчезновения исходного вещества (контроль методом ТСХ в системе хлороформ-метанол, 9 : 1). Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали на роторном испарителе при температуре не выше 30°C. Полученный маслообразный остаток растирали с сухим эфиром (2 × 30 мл), растворитель отфильтровывали, аморфный порошок промывали холодным эфиром и высушивали в вакуумном эксикаторе. Выход 7.62 г (73%). R_f 0.61 (B), 0.32 (Г).

Z-Leu-Val-Val-Tyr-Pro. К раствору 7.62 г H-Val-Val-Tyr(Bu^t)-Pro-OBu^t в 150 мл DMF при перемешивании добавляли 5.8 г (16 ммоль) Z-Leu-ONSu. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 18°C и упаривали. Полученный маслообразный остаток растворяли в 200 мл этилацетата и промывали последовательно водой (1 × 50 мл), насыщенным раствором NaHCO₃ (2 × 50 мл), водой, 2% H₂SO₄ (2 × 50 мл), водой (2 × 50 мл) и высушивали над MgSO₄. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 70 мл трифторуксусной кислоты и перемешивали при 18°C в течение 1 ч. Кислоту отгоняли на роторном испарителе при 18°C, маслообразный остаток растирали с сухим эфиром (2 × 50 мл), аморфный порошок отфильтровывали и высуши-

вали в вакуумном эксикаторе над NaOH. Полученное аморфное вещество растворяли в 10 мл смеси хлороформ-метанол (9 : 1) и наносили на колонку (30 × 200 мм) с силикагелем Silica Gel 60 Angstrom (90–130 мкм), уравновешенным той же смесью растворителей. Элюцию проводили ступенчато смесью хлороформа и метанола в соотношении 9 : 1, 9 : 2 и 9 : 3 (по 200 мл на каждой ступени). Фракции, содержащие по данным хроматографии целевой продукт, объединяли и упаривали. Выход Z-Leu-Val-Val-Tyr-Pro 6.55 г (70%). R_f 0.45 (A), 0.31 (B).

Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-OH. К раствору 6.55 г (9 ммоль) Z-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-OH в 80 мл DMF добавляли 3.63 г (11 ммоль) хлоргидрата H-Trp-OBzl, 1.35 г (10 ммоль) *N*-гидроксibenзтриазола и 1.70 мл *N*-метилморфолина. Реакционную смесь охлаждали до -20°C и к ней при перемешивании добавляли 2.06 г (10 ммоль) дициклогексилкарбодимида. Перемешивали 1 ч при -20°C, 12 ч при 20°C, затем растворитель отгоняли на роторном испарителе. Остаток растворяли в 100 мл смеси бутанол-этилацетат (1 : 1), промывали последовательно водой (1 × 30 мл), насыщенным раствором NaHCO₃ (2 × 50 мл), водой, 2% H₂SO₄ (2 × 50 мл) и водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, остаток растворяли в 100 мл метанола, добавляли 9 мл 1 н. NaOH и гидрировали в атмосфере водорода над 10% Pd/C до исчезновения исходного соединения по ТСХ. Катализатор отфильтровывали, к фильтрату добавляли 9 мл 1 н. H₂SO₄. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой и высушивали в вакуумном эксикаторе. Аморфный порошок, содержащий целевой продукт, растворяли в 10 мл буфера A и подвергали ВЭЖХ на Диасорб С 16-Т. Фракции, содержащие целевой пептид, объединяли и упаривали на роторном испарителе до объема 10 мл. Полученный раствор разбавляли водой до 50 мл и лиофилизировали. Выход 3.2 г (46%). R_f 0.61 (A), 0.48 (B), 0.64 (Г).

Синтез *ретро*-МП-2 осуществляли твердофазным методом, используя в качестве полимерного носителя хлорметилированный сополимер стирола с 1% дивинилбензола с содержанием хлора 1 ммоль на 1 г. Вос-аминокислоты присоединяли карбодимидным методом, для подавления рацемизации добавляли эквимольные количества гидроксibenзтриазола. После окончания синтеза пептид отщепляли от полимера 70% трифторуксусной кислотой.

Аминокислотные последовательности пептидов МП-2 и *ретро*-МП-2 определяли на газофазном секвенаторе (Applied Biosystem 477A, США), соединенным с автоматическим анализатором фенилтиогидантоинов аминокислот.

Молекулярные массы гексапептидов, определенные масс-спектрометрически на приборе Thermo Bioanalysis Vision 2000 (Англия), составляли 776.

Спектры КД регистрировали на дихрографе Jasco 500 С (Япония) при температуре 20°C в разборных кварцевых кюветах (Hellma) толщиной 10^{-2} см, концентрация раствора пептида 1 мг/мл. Приводимые спектры являются усредненными по трем сканированиям.

ИК-спектры измеряли на спектрофотометре Perkin-Elmer 1725 X с разрешением 4 см^{-1} при 20°C. Спектрометр предварительно продували сухим азотом для удаления паров воды. Измерения проводили в кюветах из CaF_2 толщиной 0.2 мм, число сканирований 300.

Пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на действие митогена фитогемагглютинаина оценивали по методике, описанной в сообщении [8].

Оценку противоопухолевой активности пептидов проводили на различных типах перевиваемых мышинных опухолей (аденокарцинома легкого Lewis, аденокарцинома молочной железы Ca 755, саркома S 180). Опухоли были получены из банка опухолевых штаммов РОНЦ и дважды пассированы на линейных мышцах. Линейные и гибридные мышцы-самки массой тела 18–20 г были получены из питомника РАМН “Столбовая”. Солидные опухоли перевивали введением взвеси клеток в среде 199 по 50 мг/мышь. На 3-и сут после перевивки начинали введение МП-2 или *ретро*-МП-2. Пептиды растворяли в физиологическом растворе и вводили подкожно в режимах: 0.5 мг/кг пятикратно с интервалом 24 ч, 1 или 2 мг/кг двукратно с интервалом 96 ч; контрольной группе мышей вводили физиологический раствор. Противоопухолевый эффект оценивали по динамике торможения роста опухолевого узла (ТРО) на 7-е, 14-е и 18-е сут

после трансплантации опухоли. ТРО рассчитывали как отношение разницы средних объемов опухолей в контрольной и леченой группах к объему опухоли в контрольной группе.

Работа выполнена при поддержке гранта “Молекулярная и клеточная биология” программы фундаментальных исследований Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фомина Л.А., Степаненко Р.Н. Миелопептиды. М.: Наука, 2000. С. 133–144.
2. Швачкин Ю.П., Шишкина А.А., Смирнова А.П., Федотов В.П., Иваненко Т.И. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. С. 1492–1496.
3. Subbalakshmi C., Nagaraj R., Sitaram N. // J. Peptide Res. 2001. V. 57. P. 59–67.
4. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фомина Л.А. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 811–815.
5. Chiao J.W., Heil M., Arlin Z., Lutton J.D., Choi Y.S., Leung K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 3432–3436.
6. Miescher S., Whiteside T.L., Carrel S., von Fliedner V. // J. Immunol. 1986. V. 136. P. 1899–1907.
7. Стрелков Л.А., Михайлова А.А., Фомина Л.А., Петров Р.В. // Докл. АН. 1994. Т. 338. С. 125–127.
8. Белевская Р.Г., Калужная М.В., Ляшенко В.А., Ефремов М.А., Михайлова А.А. // Аллергия, астма и клиническая иммунология. 2003. Т. 7. С. 63–67.
9. Hollosi M., Majer Z.S., Ronai A.Z., Magyar A., Medzihradsky K., Holly S., Perczel A., Fasman G.D. // Biopolymers. 1994. V. 34. P. 177–185.
10. Mantsch H.H., Perczel A., Hollosi M., Fasman G.D. // Biopolymers. 1993. V. 33. P. 201–207.

Synthesis and Properties of the *retro*-Analogue of Myelopeptide MP-2

L. A. Fonina^{##}, M. V. Ovchinnikov^{**}, S. A. Gur'yanov^{*},
S. V. Sychev^{*}, P. G. Belevskaya^{*}, and E. M. Treshchalina^{***}

[#]Phone: +7 (095) 330-7256; fax: +7 (095) 330-7210; e-mail: stas@ibch.ru

^{*}Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**}Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiological Research and Production Complex,
Ministry of Public Health of the Russian Federation, Russia

^{***}Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Blokhin Cancer Research Center,
Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia

The bone marrow myelopeptide MP-2 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp), exhibiting antitumor activity, and its *retro*-analogue (Trp-Pro-Tyr-Val-Val-Leu) were synthesized, and their properties were studied. The *in vitro* and *in vivo* activities of *retro*-MP-2 were comparable with those of MP-2. Both peptides equally restored the functional activity of T-lymphocytes inhibited by toxins released by HL-60 cells and inhibited by 70–82% the growth of various types of transplantable solid tumors: Ca-755 adenocarcinoma of the mammary gland, Lewis adenocarcinoma of the lung, and S180 sarcoma. The positions and intensities of the Cotton effects in CD spectra of the MP-2 peptide and its *retro*-analogue in various solvents are almost indistinguishable. The positions of extrema and integral intensities of the amide I and amide A bands in IR spectra of both peptides were practically identical. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: myelopeptide MP-2, *retro*-analogue, synthesis, antitumor activity, CD spectroscopy; IR spectroscopy