



УДК 577.112.6:632.938

СИНТЕЗ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ВЫСОКОАФФИННОГО РЕЦЕПТОРА FcεRI И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВЯЗЫВАНИЯ С АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧНЫМИ ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ КЛАССА E

© 2012 г. О. В. Грибовская*., В. П. Мартинович*, В. П. Голубович*, В. В. Янченко**, Л. Р. Выхристенко**, Д. К. Новиков**

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. акад. Куревича, 5/2

**Витебский государственный медицинский университет, Витебск

Поступила в редакцию 17.06.2011 г. Принята к печати 03.10.2011 г.

Для высокоаффинного рецептора FcεRI, ключевого белка IgE-зависимых аллергических реакций немедленного типа, методами компьютерного анализа была определена минимальная последовательность, связывающаяся с C3- и C4-фрагментами иммуноглобулина E: Arg¹³⁶-Asn-Trp-Asp¹³⁹. В качестве возможных аналогов FcεRI-рецептора, моделирующих его свойства, был предложен ряд пептидных соединений, содержащих последовательность Arg-Asn-Trp-Asp. Показано, что предложенные пептиды обладают иммунобиологическим эффектом и способны связываться с IgE. Доказана способность пептидов связывать специфические антитела E-класса к аллергену *Dermatophagoides pteronyssinus* из раствора сывороток больных аллергической бронхиальной астмой.

Ключевые слова: пептидный синтез, рецептор FcεRI, иммуноглобулин E, иммунобиологическая активность.

ВВЕДЕНИЕ

Имуноглобулин-E-зависимые аллергические реакции протекают при участии высокоспецифичной рецепторной сети, представленной на мембранных поверхностях многих клеток организма. Рецепторы к Fc-фрагментам иммуноглобулинов (Fc-рецепторы) являются основными компонентами этой структуры, избирательно связываясь с антителами, синтезированными плазматическими клетками после поступления антигена в организм [1, 2]. Одним из представителей Fc-рецепторной сети организма является высокоаффинный рецептор для иммуноглобулина E (FcεRI), который в норме экспрессируется на эпидермальных клетках Лангерганса, тучных клетках, моноцитах, эозинофилах, антигенактивированных T- и B-лимфоцитах, нейтрофилах, тромбоцитах, дендритных клетках [3, 4]. FcεRI является ключевым соединением, участвующим в IgE-зависимых аллергических реакциях немедленного типа. Он состоит из

нескольких субъединиц, из которых α-субъединица (FcεRIα) непосредственно участвует в связывании с C2–C4-областями молекулы иммуноглобулина E [5].

Регуляция уровня FcεRI и IgE в организме – важный элемент контроля за развитием и течением аллергии. Для блокирования связывания иммуноглобулина E и его высокоаффинного рецептора были предложены рекомбинантные мышьиные гуманизированные моноклональные антитела E25 (rhu-Mab-E25) [6, 7]. В настоящее время на основе этих антител разработано эффективное лекарственное средство, используемое в основном для лечения тяжелой, неконтролируемой глюкокортикоидными аллергической бронхиальной астмы, которое выпускается под названием XOLAIR® (Genentech; Novartis).

В качестве соединений, регулирующих IgE-зависимые патологические процессы, был исследован ряд пептидов, созданных на основе различных участков молекулы IgE [8–10]. Мы предположили, что пептидные фрагменты последовательности FcεRIα, осуществляющей связывание IgE, могут являться конкурентными ингибиторами иммуноглобулина E и блокировать патологические аллергические процессы, протекающие с его участием. Использование доступных синтетических пептидных соединений представляется перспективным как в научных исследованиях для выяснения осо-

Сокращения: Boc – трет-бутилоксикарбонил; DCC – *N,N*-дициклогексилкарбодиимид; DMF – *N,N*-диметилформамид; DMSO – диметилсульфоксид; HOBT – *N*-гидроксисбензотриазол; NMM – *N*-метилморфолин; TEA – триэтиламин; Pfp – пентафторфенил; DCHA – дициклогексиламмоний; PBS-T – фосфатно-солевой буфер с детергентом Tween 20; TFA – трифторуксусная кислота; TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ПХ – пероксидаза хрена.

Автор для связи (тел.: +375 (17) 267-82-63; эл. почта: olymelnik@yandex.ru).

Протокол сравнения Homo sapiens FCεR1α и Homo sapiens FCεR2/CD23α

Homo sapiens FCεR1α (LOCUS NM_002001 1191 bp mRNA)

```
1 mapamesptl lcvallffap dgvlavpqp kvslnppwnr ifkgenvtlt
51 cngnffevs stkwhngsl seetnsslni vnakfedsg ykcqhqqvne
101 sepvylevfs dwlllqasae vvMEGQplfl rchgwrRNWDv ykviyykdge
151 alkywyenh isitnatved sgtyyctgkv wqldyesep nitvikapre
201 kywlqffipl lvvilfavdt glfistqqqv tflkikrtr kgfrllnph
251 kpnpknn
```

Homo sapiens FCεR2/CD23α (LOCUS NM_002002 1652 bp mRNA)

```
1 meegqyseie elprrrccrr gtqivllglv taalwagllt llllwhwdtt
51 qslkqleera arnvsqvskn leshhgdqma qksqstqisq eleelraeqq
101 rlksqdlels wnlnglqadl ssfksqelne rneasdlr lreevtklrm
151 elqvssgfv ntcpekwinf qrkyyfgkg tkqvwarya cddMEGQlvs
201 ihspeeqdfl tkhashtgsw iglrnldkg efiwvdgshv dysnwarpgep
251 tsrsqgedcv mmrgsgRWND afcdrklgaw vcdrlatctp pasegsaesm
301 gpdsrpdpdg rlptpsaplh s
```

Полное совпадение: тетрапептидный фрагмент

FCεR2/CD23α-(194–197) MEGQ FCεR1α-(123–126) MEGQ

Возможное совпадение: тетрапептидный фрагмент

FCεR2/CD23α-(267–270) RWND FCεR1α-(136–139) RNWD

Сравнение аминокислотных последовательностей рецепторов FCεR1α и FCεR2/CD23α человека. Жирным и большими буквами выделены совпадающие и подобные фрагменты в структуре рецепторов, необходимые для связывания с IgE; подчеркнуты аминокислотные остатки, критические для связывания.

бенностей функционирования лиганд-рецепторного комплекса на основе FcεRI, так и для создания новых лекарственных и диагностических средств для нужд практического здравоохранения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью настоящей работы являлся поиск и исследование пептидов — низкомолекулярных фрагментов α-цепи высокоаффинного рецептора FcεR1, которые могут моделировать его биологическую функцию, участвуя в связывании с Fc-фрагментами IgE, что позволит применить их для диагностики, лечения и профилактики IgE-зависимых заболеваний. Этапы исследований включали анализ структуры комплекса FcεR1-рецептор-иммуноглобулин E и выбор возможных участков связывания, синтез отобранных соединений, изучение их биологической активности.

На первом этапе работы с использованием программы Биоскан 9.14 (ОДО “НИКП Ресан”, Витебск, Беларусь) мы сравнили аминокислотные последовательности Homo sapiens high affinity immunoglobulin epsilon receptor I, alpha-subunit (FCεR1α) (LOCUS NM_002001 1191 bp mRNA) и Homo sapiens low affinity immunoglobulin epsilon receptor II (CD23α) (LOCUS NM_002002 1652 bp mRNA), взятые из базы данных известных структур протеинов и нуклеиновых кислот Национального центра биотехнологической информации

США (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). С использованием компьютерной программы визуализации пространственной структуры белков 3D-Mol Viewer Vector NTI Suite 7.0 (InforMax Incorporated) банка данных 3-D-структур белков и нуклеиновых кислот (RCSB PDB, www.rcsb.org), файл 1F6A [11] мы провели анализ C3- и C4-фрагментов иммуноглобулина E и FcεRI. По результатам анализов в структуре обоих рецепторов, низкоаффинного и высокоаффинного, были обнаружены два фрагмента: идентичный (MEGQ) и подобный (RNWD в FcεRIα и RWND в CD23α), принимающие участие в связывании с C3- и C4-фрагментами IgE (рисунок). Мы предположили, что разница в положении остатков N и D, необходимых для связывания с IgE, и обуславливает различную аффинность рецепторов, а Arg-Asn-Trp-Asp (последовательность 136–139 FcεRIα рецептора) является минимальным пептидным фрагментом, участвующим в связывании с IgE.

В качестве возможных аналогов высокоаффинного рецептора FcεR1, способных связываться с Fc-участком IgE, были выбраны следующие пептидные соединения: Arg-Asn-Trp-Asp (FcεRIα-(136–139)), Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys (FcεRIα-(137–142)), Arg-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys (FcεRIα-(136–142)).

Синтез пептидов осуществляли с использованием классических методов пептидного синтеза в растворе. При получении тетрапептида Arg-Asn-

Trp-Asp (FсeRIα-(136–139)) (V) использовали тактику минимальной защиты боковых функциональных групп: гуанидиновую группу аргинина защищали протонированием, амидную группу аспарагина и индольное кольцо триптофана не блокировали (схема 1). При синтезе Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys (XIV) и Arg-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys (XII) (схема 2) боковые функции аргинина, аспарагиновой кислоты и лизина блокировали соответственно нитро-, бензильной, бензилоксикарбонильными группами, удаляемыми каталитическим гидрогенолизом. Основным методом образования пептидной связи был выбран карбодиимидный, в качестве противорацемической добавки использовали *N*-гидроксисбензотриазол. Для блокирования α-аминогрупп применяли *tert*-бутилоксикарбонильную защитную группу. Ее отщепление проводили обработкой пептидов 3.3 М HCl в уксусной кислоте, поскольку этот реагент, согласно литературным данным, в наи-

большей степени подавляет побочную реакцию *tert*-бутилирования индольного кольца триптофана [12]. Гидрохлориды пептидов после отщепления Boc-защитной группы, которое протекало с выходами, близкими к количественным (93–98%), использовали в синтезе после определения их однородности хроматографическими методами (тонкослойной хроматографией или высокоэффективной жидкостной). Полной их характеризации в качестве индивидуальных соединений не проводилось, так как кислотный гидролиз Boc-группы протекает, как правило, без рацемизации и изменения структуры пептидной цепи [13]. C-Концевые карбоксильные группы блокировали путем образования метиловых эфиров. Защитные группы с боковых функциональных групп аргинина, аспарагиновой кислоты и лизина удаляли гидрированием пептида над катализатором – палладиевой чернью, в растворе уксусной кислоты.

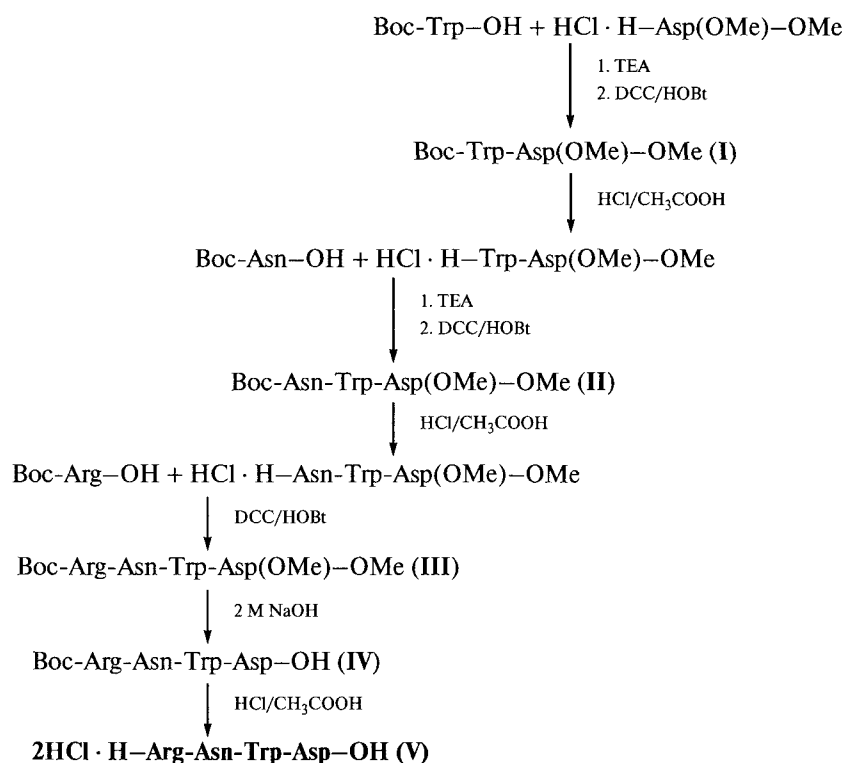


Схема 1. Схема синтеза тетрапептида FсeRIα-(136–139) (V).

Идентификацию целевых соединений (V), (XII) и (XIV) выполняли методом масс-спектрометрии, гомогенность подтверждали методами ТСХ и аналитической ВЭЖХ.

Ранее в диагностической системе с сорбированным гептапептидом FсeRIα-(136–142) Arg-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys (XII) обнаружена более

высокая корреляция между концентрацией IgE и оптической плотностью раствора после внесения моноклональных антител, меченных пероксидазой хрена, и субстрат-хромогенной смеси (r 0.99), чем в диагностической системе с сорбированным Arg-Asn-Trp-Asp (V) (FсeRIα-(136–139)) (r 0.94) [14].

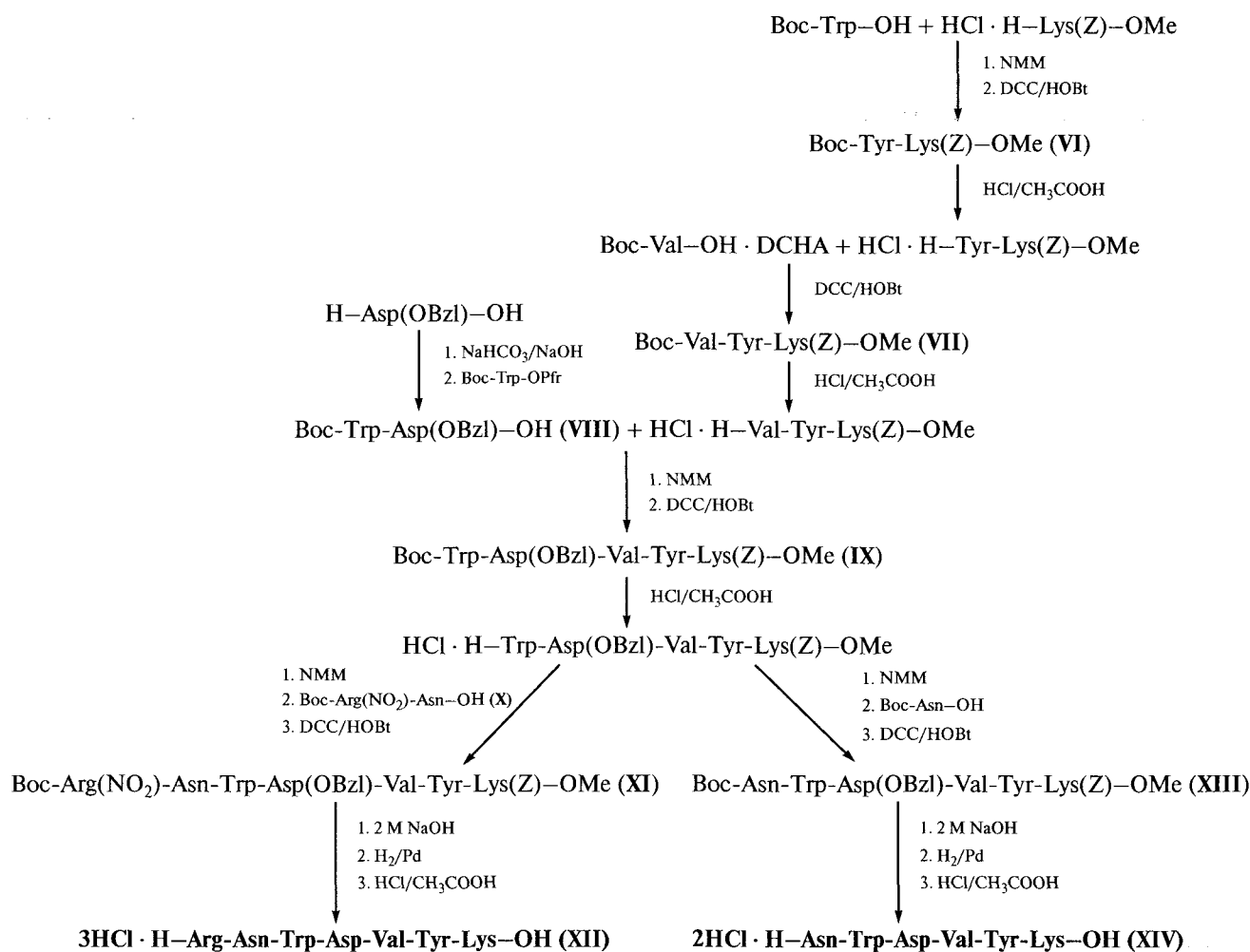


Схема 2. Схема синтеза гептапептида FcεRIα-(136–142) (XII) и гексапептида FcεRIα-(137–142) (XIV).

Аналогичные исследования были проведены с диагностическими системами с сорбированными пептидами Arg-Asn-Trp-Asp (FcεRIα-(136–139)) и Arg-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys (FcεRIα-(136–142)), но вместо моноклональных антител, меченных пероксидазой хрена, против иммуноглобулинов E использовали тетрапептид Arg-Asn-Trp-Asp (FcεRIα-(136–139)), конъюгированный с пероксидазой хрена. Установлена четкая зависимость между концентрацией IgE в стандартных сыворотках и сыворотках больных аллергией с известной концентрацией IgE и оптической плотностью раствора после внесения конъюгата Arg-Asn-Trp-Asp (V) с пероксидазой хрена и субстрат-хромогенной смеси. Для диагностической системы с сорбированными гептапептидом Arg-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys (XII) – r 0.91, для системы с сорбированным Arg-Asn-Trp-Asp (V) – r 0.90. Следует отметить, что в сыворотках больных аллергией гептапептид связывал на 23.79% больше IgE, чем тетрапептид [14].

Иммунологическое тестирование пептидов (V) и (XII) включало также исследование их связывания с IgE-антителами, специфичными к аллергенам клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*. Оценку связывания пептидов с IgE проводили с использованием 24 образцов сыворотки крови больных бронхиальной астмой легкой и средней тяжести с разной степенью сенсibilизации к аллергенам *D. pteronyssinus*. Диагноз аллергической бронхиальной астмы был документально подтвержден на основе критериев “Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention” [15] и кожных тестов с аллергеном *D. pteronyssinus*. Концентрацию IgE определяли методом ИФА с использованием меченных пероксидазой хрена антител к IgE.

В табл. 1 и 2 приведены значения оптического поглощения, отражающие связывание с пептидами и анти-IgE-антителами специфических IgE к аллергену *D. pteronyssinus* из сывороток больных.

Таблица 1. Связывание специфических IgE к аллергену *D. pteronyssinus* из раствора сывороток больных аллергической бронхиальной астмой ($n = 24$) с пептидом Arg-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys и анти-IgE-антителами (индивидуальные показатели)*

Номер сыворотки	DP	DI	DP/DI	Номер сыворотки	DP	DI	DP/DI
1	0.753	0.829	90.8	13	1.004	1.386	72.4
2	0.980	0.806	121.6	14	1.175	1.260	93.3
3	0.772	0.864	89.4	15	1.730	1.323	130.7
4	1.256	0.446	281.3	16	1.188	1.155	102.9
5	0.769	0.848	90.7	17	1.365	1.532	89.1
6	1.028	0.965	106.5	18	1.018	1.077	94.6
7	1.182	0.760	155.5	19	1.038	1.285	80.8
8	0.914	1.031	88.7	20	1.722	2.012	85.6
9	0.883	1.229	71.8	21	1.472	1.719	85.6
10	1.748	1.745	100.2	22	0.592	1.177	50.3
11	1.297	1.391	93.3	23	1.482	1.495	99.2
12	0.854	1.435	59.5	24	1.116	1.675	66.6

* Приведено оптическое поглощение (λ 450 нм) для конъюгата пептид–ПХ (DP) и для конъюгата анти-IgE–ПХ (DI) – средние значения двух параллельных измерений одной пробы.

Таблица 2. Связывание специфических IgE к аллергену *D. pteronyssinus* из раствора сывороток больных аллергической бронхиальной астмой ($n = 24$) с пептидом Arg-Asn-Trp-Asp и анти-IgE-антителами (индивидуальные показатели)*

Номер сыворотки	DP	DI	DP/DI	Номер сыворотки	DP	DI	DP/DI
1	0.676	0.829	81.5	13	1.017	1.386	73.3
2	1.163	0.806	144.3	14	1.079	1.260	85.7
3	1.018	0.864	117.8	15	1.411	1.323	106.7
4	1.089	0.446	243.8	16	1.363	1.155	118.0
5	1.068	0.848	126.0	17	1.299	1.532	84.8
6	1.156	0.965	119.8	18	1.168	1.077	108.5
7	1.046	0.760	137.6	19	1.201	1.285	93.5
8	1.289	1.031	125.0	20	1.718	2.012	85.4
9	1.371	1.229	111.5	21	1.208	1.719	70.2
10	1.384	1.745	79.3	22	0.593	1.177	50.4
11	1.479	1.391	106.3	23	1.453	1.495	97.2
12	0.728	1.435	50.7	24	1.080	1.675	64.4

* См. примечание к табл. 1.

Из представленных в таблицах результатов видно, что пептиды эффективно связывали специфические IgE-антитела. Для уровня связывания специфических IgE к аллергену *D. pteronyssinus* гептапептидом FcεRIα-(136–142) (XII) и антителами против IgE характерна умеренно прямая корреляция (r 0.575, $n = 24$), наблюдались высокие значения оптического поглощения растворов. Для тетрапептида FcεRIα-(136–139) (V) величина корреляции несколько ниже (r 0.45, $n = 24$), но значения оптического поглощения растворов после ферментативной реакции субстрата с пероксидазой хрена также высоки. Мы предполагаем, что большой разброс в параметрах связывания специфических IgE к аллергену *D. pteronyssinus* пептидами и антителами против IgE связан с тем, что данные пептиды имеют лектиноподобные свой-

ства и их связывание с IgE зависит от степени гликозилирования последнего. Это предположение требует дополнительного исследования.

Результаты проведенного тестирования свидетельствуют о связывании пептидами FcεRIα-(136–142) (XII) и FcεRIα-(136–139) (V) специфических антител E-класса.

Тестирование третьего представителя исследованных пептидов, гексапептида FcεRIα-(137–142) (XIV), было проведено в объеме доклинических исследований и включало исследования биологической эффективности и токсичности [16]. На мышках с экспериментальной моделью аллергической бронхиальной астмы установлено, что гексапептид (XIV) индуцировал формирование иммунологической толерантности к аллерги-

нам у сенсibilизированных животных: он предупреждал аллергическое воспаление в тканях бронхов и легких; ингибировал специфическую кожную реакцию на аллерген; снижал специфическую дегрануляцию тучных клеток под влиянием причинно-значимых аллергенов.

На экспериментальной модели аллергической бронхиальной астмы доказано, что синтетический гексапептид обладал высокой безопасностью, поскольку при подкожном введении в изученном диапазоне доз не вызывал гибели животных и отклонений состояния животных от физиологической нормы; не изменял морфологический состав крови животных; не вызывал анафилактической реакции; не вызывал морфологических изменений органов и тканей животных [16].

Таким образом, проведенные биохимические эксперименты позволяют считать доказанным связывание синтезированных пептидов – фрагментов рецептора FcεRI с иммуноглобулином E, а биологические исследования показали формирование иммунологической толерантности к аллергенам при введении гексапептидного фрагмента. Мы предполагаем, что на основе исследованных соединений возможно создание эффективного и безопасного лекарственного средства для иммунотерапии IgE-зависимых аллергических болезней.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов

В работе были использованы аминокислоты, реагенты, растворители (Sigma, США, Fluka, Швейцария, Acros Organics, Бельгия). Процессы синтеза соединений, удаления защитных групп контролировали методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Sorbfil, Россия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–20%-ный аммиак, 60 : 40 : 10 (А); бутанол–уксусная кислота–вода, 40 : 10 : 10 (Б), этилацетат–пиридин–уксусная кислота–вода, 50 : 30 : 30 : 10 (В); бутанол–пиридин–уксусная кислота–вода; 45 : 30 : 9 : 18 (Г); хлороформ–метанол–20%-ный аммиак–уксусная кислота, 60 : 45 : 15 : 3 (Д). Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлор-бензидинового реагента.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе фирмы Waters (Millenium³², 966 фотодиодный детектор, колонка Vydac 201HS52 RP C18 (2.1 × 250 мм)). Использовали градиент концентраций ацетонитрила от 10 до 40% в 0.1% TFA. Скорость потока 1 мл/мин.

Масс-спектры с химической ионизацией при атмосферном давлении (APCI-MS) регистрировали на масс-хроматографе Accela-LCQ Fleet (Thermo Scientific, США).

Температуры плавления (некорректируемые) определяли на приборе Кофлера. Удельное вращение соединений измеряли на спектрополяриметре J-20 (“Jasco”, Япония).

Вос-Trp-Asp(OMe)–OMe (I). К раствору 0.86 г (3.7 ммоль) гидрохлорида диметилового эфира аспарагиновой кислоты в 3.5 мл DMF прибавляли 0.57 мл (4.1 ммоль) ТЕА. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и затем добавляли 0.97 г (3.2 ммоль) Вос-Trp–ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд прибавляли последовательно 0.46 г (3.4 ммоль) НОВт и 0.78 г (3.8 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 4 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 1.0 мл DMF. В фильтрат добавляли 10.0 мл этилацетата и полученный раствор промывали 9% раствором лимонной кислоты, 5% раствором NaHCO₃, насыщенным раствором NaCl, водой, затем сушили над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся маслообразный остаток переосаждали из эфира гексаном и сушили над P₂O₅. После сушки в эксикаторе продукт закристаллизовался. Получили 1.07 г (76%) пептида (I) с т. пл. 55–57°C; $[\alpha]_D^{20} + 4.0^\circ$ (с 1, MeOH), R_f 0.36 (Б), 0.97 (В).

Вос-Asn-Trp-Asp(OMe)–OMe (II). К раствору 0.64 г (1.6 ммоль) HCl · H–Trp-Asp(OMe)–OMe (получен обработкой соединения (I) HCl в уксусной кислоте) в 2.5 мл DMF добавляли 0.29 г (2.1 ммоль) ТЕА. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и вносили 0.35 г (1.5 ммоль) Вос-Asn–ОН. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд прибавляли последовательно 0.22 г (1.6 ммоль) НОВт и 0.37 г (2.1 ммоль) DCC. Время прохождения реакции – 6 ч. Обработку синтеза проводили по методике, описанной для соединения (I). Выход соединения (II) – 0.68 г (81%) с т. пл. 79–82°C; $[\alpha]_D^{20} - 46.8^\circ$ (с 1, MeOH), R_f 0.33 (Б), 0.95 (В).

Вос-Arg-Asn-Trp-Asp(OMe)–OMe (III). К раствору 0.39 г (0.8 ммоль) HCl · H–Asn-Trp-Asp(OMe)–OMe (получен обработкой соединения (II) HCl в уксусной кислоте) в 2.0 мл DMF добавляли 0.19 г (0.7 ммоль) Вос-Arg–ОН и перемешивали полученный раствор в течение 30 мин. Охладив реакционную колбу до 0°C, в реакционный сосуд вносили последовательно 0.09 г (0.7 ммоль) НОВт и 0.19 г (0.9 ммоль) DCC. После окончания реакции осадок отфильтровывали, а к фильтрату добавляли 10.0 мл безводного эфира. Полученное масло переосаждали из метанола эфиром и сушили в эксикаторе над P₂O₅. Получили 0.43 г (81%) соединения (III) с т. пл. 100–104°C; $[\alpha]_D^{20} - 28.0^\circ$ (с 1, MeOH), R_f 0.58 (А), 0.71 (В). APCI-MS, m/z: 718.65 [M + H]⁺.

Вос-Arg-Asn-Trp-Asp—OH (IV). К раствору 0.36 г (0.5 ммоль) соединения (III) в 6.2 мл метанола добавляли 0.6 мл 2 М NaOH и перемешивали полученный раствор в течение часа. После окончания гидролиза реакционную смесь нейтрализовывали до pH 2–3 3.3 М раствором HCl в уксусной кислоте, растворитель упаривали в вакууме досуха, а к образовавшемуся остатку добавляли 2.0 мл DMF. Нерастворившийся осадок NaCl отфильтровывали, в фильтрат приливали 6.0 мл безводного эфира. После пересадки из метанола эфиром и сушки в эксикаторе над P₂O₅ получили 0.32 г (89%) соединения (IV), $[\alpha]_D^{20}$ –18.0° (*c* 1, MeOH), *R_f* 0.47 (A), 0.27 (B).

2HCl · H-Arg-Asn-Trp-Asp—OH (V). К суспензии 0.30 г (0.4 ммоль) соединения (IV) в 2.0 мл этилацетата добавляли 2.1 мл 3.3 М HCl в уксусной кислоте. Реакционную смесь перемешивали ~1 ч, растворитель упаривали, а остаток промывали этилацетатом и эфиром. После сушки в эксикаторе над NaOH получили 0.27 г (96%) соединения (V); т. пл. 128–131°C, $[\alpha]_D^{20}$ –56.0° (*c* 1, MeOH), *R_f* 0.81 (Д), 0.20 (B). По данным ВЭЖХ содержание целевого пептида (V) – 92%. APCI-MS, *m/z*: 590.3 [*M* + H]⁺, 612.3 [*M* + Na]⁺. Суммарный выход 2HCl · H-Arg-Asn-Trp-Asp—OH составил 32.5%.

Вос-Tyr-Lys(Z)—OMe (VI). К раствору 0.79 г (2.4 ммоль) гидрохлорида метилового эфира N^ε-бензилоксикарбониллизина в 5.0 мл DMF прибавляли 0.28 мл NMM (2.5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, затем прибавляли 0.68 г (2.4 ммоль) Вос-Tyr—OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд вносили последовательно 0.27 г (2.4 ммоль) HOBt и 0.53 г (2.5 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 5 ч при комнатной температуре. Обработку синтеза проводили по методике, описанной для соединения (I). Получили 1.07 г (80%) соединения (VI) с т. пл. 63–67°C, $[\alpha]_D^{20}$ –7.0° (*c* 1, MeOH), *R_f* 0.76 (B), 0.77 (Д).

Вос-Val-Tyr-Lys(Z)—OMe (VII). Раствор 0.51 г (1.5 ммоль) DCHA · Вос-Val—OH и 0.74 г (1.5 ммоль) HCl · H-Tyr-Lys(Z)—OMe (получен обработкой соединения (VI) HCl в этилацетате) в 5.0 мл DMF, охлаждали до 0°C и к нему прибавляли последовательно 0.22 г (1.6 ммоль) HOBt и 0.32 г (1.5 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при охлаждении и 6 ч при комнатной температуре. Очистку и выделение трипептида Вос-Val-Tyr-Lys(Z)—OMe проводили по методике, описанной для соединения (I). Выход продукта составил 0.72 г (73%), т. пл. 79–82°C; $[\alpha]_D^{20}$ –25.0° (*c* 1, MeOH); *R_f* 0.78 (Д), 0.63 (A). APCI-MS, *m/z*: 657.6 [*M* + H]⁺.

Вос-Trp-Asp(OBzl)—OH (VIII). Смесь 0.42 г (2.0 ммоль) аспарагиновой кислоты β-бензилово-

го эфира и 0.08 г (10.0 ммоль) NaHCO₃ растворяли в 2.0 мл 1 М NaOH (pH ~ 9) при интенсивном перемешивании, затем приливали раствор 0.94 г (2.0 ммоль) Вос-Trp-OPfp [17] в 3.0 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали около 40 мин, затем разбавляли 7.0 мл 9% лимонной кислоты и 15.0 мл этилацетата. Полученные слои разделяли, водный слой промывали два раза этилацетатом, этилацетатные слои объединяли, промывали 9% лимонной кислотой, затем водой до нейтральной реакции и сушили над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, остаток пересаждали из эфира гексаном, пересадки повторяли дважды. Выход соединения (VIII) 0.86 г (68%), $[\alpha]_D^{20}$ +1° (*c* 0.5, MeOH), *R_f* 0.43(A), 0.62 (B).

Вос-Trp-Asp(OBzl)-Val-Tyr-Lys(Z)—OMe (IX). К раствору 0.51 г (1.0 ммоль) HCl · H-Val-Tyr-Lys(Z)—OMe (получен обработкой соединения (VII) HCl в этилацетате) в 5.0 мл DMF прибавляли 0.28 мл NMM (2.5 ммоль), все перемешивали в течение 20 мин, затем охлаждали до 0°C и прибавляли последовательно 0.56 г (1.1 ммоль) Вос-Trp-Asp(OBzl)—OH, 0.16 г (1.2 ммоль) HOBt и 0.23 г (1.1 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 12 ч при комнатной температуре. Очистку и выделение защищенного пентапептида (IX) проводили по методике, описанной для соединения (I). Выход продукта составил 0.60 г (57%) с т. пл. 143–145°C; $[\alpha]_D^{20}$ –31.0° (*c* 1, MeOH), *R_f* 0.71 (B), 0.33 (B). APCI-MS, *m/z*: 1048.9 [*M* + H]⁺.

Вос-Arg(NO₂)-Asn—OH (X). В 2.5 мл воды растворяли 0.29 г (2.0 ммоль) аспарагина, прибавляли 0.41 мл TEA (3.0 ммоль), раствор охлаждали до 5°C и объединяли при перемешивании на магнитной мешалке с охлажденным до 5°C раствором 0.75 г (1.5 ммоль) пентафторфенилового эфира N^α-трет-бутилоксикарбонил-нитроаргинина [17]. Раствор перемешивали 0.5 ч при охлаждении и 1 ч при комнатной температуре, затем добавляли 4 н. раствор HCl в этилацетате до pH 5–6 и упаривали растворители в вакууме. К остатку – смеси кристаллов и масла – добавляли 5.0 мл этилацетата, нерастворившиеся кристаллы отделяли фильтрованием, к этилацетатному фильтрату прибавляли 15.0 мл эфира, выпавший кристаллический осадок дипептида для очистки пересаждали из метанола эфиром и промывали хлороформом. После сушки в вакууме над P₂O₅ получили 0.40 г (61%) соединения (X) с т. пл. 103–105°C; $[\alpha]_D^{20}$ –21.0° (*c* 1, MeOH), *R_f* 0.55 (B), 0.63 (B).

Вос-Arg(NO₂)-Asn-Trp-Asp(OBzl)-Val-Tyr-Lys(Z)—OMe (XI). К раствору 0.29 г (0.3 ммоль) HCl · H-Trp-Asp(OBzl)-Val-Tyr-Lys(Z)—OMe (получен обработкой соединения (IX) HCl в смеси этилацетата и уксусной кислоты) в 4.0 мл DMF прибавляли 0.045 мл NMM (0.4 ммоль) и перемешивали рас-

твор в течение 20 мин. После охлаждения реакционной смеси до 0°C прибавляли последовательно 0.15 г (0.35 ммоль) Вос-Arg(NO₂)-Asn-OH, 0.054 г (0.40 ммоль) НОВт и 0.072 г (0.35 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 12 ч при комнатной температуре. После окончания реакции осадок отфильтровывали, а к фильтрату прибавляли 15.0 мл эфира, выпавший осадок повторно переосаждали из DMF эфиром, промывали на фильтре смесью метанол-этилацетат 1 : 1, этилацетатом. После сушки в эксикаторе над P₂O₅ получили 0.26 г (65%) Вос-Arg(NO₂)-Asn-Trp-Asp(OBzl)-Val-Tyr-Lys(Z)-OMe (XI), $[\alpha]_D^{20} -28.0^\circ$ (с 0.5, уксусная кислота), R_f 0.56 (B), 0.48 (D), APCI-MS, m/z : 1362.7 $[M + H]^+$.

3HCl · H-Arg-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys-OH (XII). К раствору 0.20 г (0.15 ммоль) соединения (XI) в 2.0 мл метанола добавляли 0.1 мл 2 М NaOH и перемешивали полученный раствор в течение часа. После окончания гидролиза реакционную смесь нейтрализовывали до pH 2–3 3.3 М HCl в уксусной кислоте, добавляли в полученный раствор 4.0 мл уксусной кислоты, 0.03 г катализатора – палладиевой черни и при перемешивании на магнитной мешалке через реакционную смесь пропускали ток водорода в течение 23 ч, контролируя полноту отщепления защитных групп методом ТСХ. После завершения гидрирования катализатор отделяли фильтрованием, гептапептид переводили в осадок добавлением 12.0 мл эфира. После высушивания осадок растворяли в 2.0 мл уксусной кислоты, к раствору прибавляли 2.0 мл 4 н. раствора HCl, все перемешивали в течение 50 мин, затем растворители упаривали, кристаллический остаток промывали этилацетатом и смесью метанол-этилацетат 2 : 1. Очистку соединения проводили методом колоночной хроматографии на сефадексе LH-20, используя в качестве элюента смесь уксусная кислота-этанол в соотношении 1 : 1. Фракции, содержащие чистый пептид, объединяли и упаривали. После сушки в эксикаторе получили 0.076 г (69%) соединения (XII) с т. пл. 161–164°C; $[\alpha]_D^{20} -17.0^\circ$ (с 0.5, уксусная кислота), R_f 0.25 (A), 0.33 (B). APCI-MS, m/z : 981.1 $[M + H]^+$. По данным ВЭЖХ содержание целевого пептида (XII) 94%.

Вос-Asn-Trp-Asp(OBzl)-Val-Tyr-Lys(Z)-OMe (XIII). 0.58 г (0.6 ммоль) HCl · H-Trp-Asp(OBzl)-Val-Tyr-Lys(Z)-OMe (получен обработкой соединения (IX) в смеси этилацетата и уксусной кислоты) растворяли в 3.0 мл DMF, прибавляли 0.14 мл NMM (1.25 ммоль), все перемешивали в течение 20 мин, затем охлаждали до 0°C и прибавляли последовательно 0.14 г (0.6 ммоль) Вос-Asn-OH, 0.09 г (0.6 ммоль) НОВт и 0.15 г (0.7 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 12 ч при комнатной температуре. Очистку и выделение защищенного гексапептида (XIII)

проводили по методике, описанной для соединения (I). Выход продукта составил 0.42 г (61%), $[\alpha]_D^{20} -31.0^\circ$ (с 1, MeOH), R_f 0.71 (B), 0.33 (B).

2HCl · H-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys-OH (XIV) получали аналогично соединению (XII). Выход гексапептида на 0.25 г (0.2 ммоль) Вос-Asn-Trp-Asp(OBzl)-Val-Tyr-Lys(Z)-OMe составил 0.12 г (71%), $[\alpha]_D^{20} -21.0^\circ$ (с 1, уксусная кислота). APCI-MS, m/z : 824.9 $[M + H]^+$, 846.9 $[M + Na]^+$. По данным ВЭЖХ содержание целевого пептида (XIV) 95%.

Иммуноферментный анализ

В иммунобиологических исследованиях применяли тест-систему *D. pteronyssinus* №DP0004, конъюгат пероксидазы хрена с антителами против иммуноглобулинов класса E человека (Anti-Human IgE (ε-chain specific) peroxidase conjugate) (Sigma, № A9667), пероксидазу хрена (Sigma, № P8375).

Получение конъюгатов пептид-пероксидаза хрена. В основе синтеза конъюгатов пероксидазы хрена с пептидами Arg-Asn-Trp-Asp (V), Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys (XIV), Arg-Asn-Trp-Asp-Val-Tyr-Lys (XII) положена методика, описанная в работе [18]. Концентрацию пероксидазы хрена в полученных конъюгатах определяли спектрофотометрически, используя при расчете коэффициенты поглощения $A_{280} = 0.73$, $A_{403\text{ нм}} = 2.275$, $\epsilon = 109000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [19]. Конъюгаты хранили при +4°C с добавлением стабилизатора для белков “Диа-плюс” (Хема-медика, Россия) в объемном соотношении конъюгат-стабилизатор 1 : 2.

Тест-система *D. pteronyssinus* №DP0004. По 100.0 мкл рабочего раствора (100 PNU*/мл) диализованного аллергена из *D. pteronyssinus* (5000 PNU/мл, ОАО “Биомед им. И.И. Мечникова”) в 0.1 М Na-карбонатном буфере, pH 9.6, вносили в каждую лунку планшетов (Nunc MaxiSorp 468667). Инкубировали закрытые планшеты 18 ч при температуре +4°C. После инкубации удаляли содержимое лунок, лунки промывали немедленно фосфатно-солевым буфером (0.01 М, 0.021% раствор Triton X-100, pH 7.4) 3 раза, каждый раз заполняя лунку 300.0 мкл промывочного раствора на 1 мин. Хранили до использования при +4°C.

Конъюгат пероксидазы хрена с антителами против иммуноглобулинов класса E человека (Anti-Human IgE-ПХ). Конъюгат (2.0 мл) разводили 1 : 10 0.01 М фосфатно-солевым буфером, содержащим 0.05% детергента Tween 20, pH 7.4 (PBS-T), делили на аликвоты по 1.0 мл и замораживали. Хранили до использования при –20°C.

* PNU (protein nitrogen unit) – единица измерения активности неинфекционных аллергенов, соответствующая содержанию 0.00001 мг белкового азота в 1 мл аллергена.

IgE-связывающую активность пептидов оценивали с помощью ИФА по их способности связываться со специфическими IgE-антителами к аллергенам из *D. pteronyssinus*. Вносили в две лунки планшета по 180.0 мкл PBS-Т и по 20.0 мкл исследуемой сыворотки, перемешивали, инкубировали 60 мин при 37°C и три раза промывали PBS-Т. Затем параллельно вносили либо 150.0 мкл раствора конъюгата пептида с ПХ, разведенного PBS-Т 1 : 200, либо такое же количество раствора конъюгата Anti-Human IgE-ПХ, разведенного PBS-Т 1 : 200. Планшеты инкубировали 60 мин при 37°C, затем трехкратно промывали PBS-Т. Добавляли в каждую лунку по 150.0 мкл 0.2% раствора ТМВ в 75% водном растворе DMSO, инкубировали 60 мин при 18°C в темном месте и вносили по 100.0 мкл на лунку стоп-реагента (4%-ного раствора серной кислоты). Результаты реакции регистрировали фотометрически, с помощью иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С, РУПП "Витязь", Беларусь, при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с использованием пакета STATISTICA 6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kinet J.P. // Annu. Rev. Immunol. 1999. V.17. P. 931–972.
2. Новиков Д.К., Титова Н.Д., Янченко В.В. // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8. С. 207–216.
3. Kraft S., Kinet J.P. // Nat. Rev. Immunol. 2007. V. 7. P. 365–378.
4. Kawakami T., Galli S.J. // Nat. Rev. Immunol. 2002. V.2. P. 773–786.
5. Shimizu A., Tepler I., Benfey P.N., Berenstein E.H., Siraganian R.P., Leder P. // Proc. Nat. Acad. Sci. 1988. V. 85. P. 1907–1911.
6. Dombrowicz D., Flamand V., Brigman K.K., Koller B.H., Kinet J.P. // Cell. 1993. V. 75. P. 969–976.
7. Bisberg D., Froehlich J., Schoenhoff M., Mendelson J. // Pediatr. Res. 1996. V. 39. P. 9A.
8. Noguchi K., Matsuo K., Ohta N. // Chem. Pharm. Bull. 1990. V. 38. P. 353–356.
9. Singh R., Nath A., Gupta P.P. // Indian J. Exp. Biol. 2001. V. 39. P. 871–877.
10. Verdoliva A., Rossi M. // Anti-Inflammatory AntiAllergy Agents in Medicinal Chemistry. 2008. V. 7. P. 252–263.
11. Garman S.C., Wurzburg B.A., Tarchevskaya S.S., Kinet J.P., Jardeztzky T.S. // Nature. 2000. V. 406. P. 259–266.
12. Alakhov Yu.B., Kiryushkin A.A., Lipkin V.M., Milne G.W.A. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1970. V. 1970. P. 406–407.
13. Гершкович А.А., Кубишев В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наукова думка, 1987. 264 с.
14. Yanchenko V.V., Novikov P.D., Novikov D.K., Golubovich V.P., Martinovich V.P., Melnik O.V., Yanchenko L.K. // J. Peptide Sci. Supp. 2006. V. 12. P. 225.
15. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NYLB/WHO Workshop Report 1993.
16. Янченко В.В., Новиков Д.К., Грибовская О.В., Мартинович В.П., Голубович В.П., Языкова Е.В., Хайрулина Н.В., Выхристенко Л.П. // Известия НАН Беларуси. Серия. мед. наук. 2011. № 1. С. 34–44.
17. Kishfaludi L., Low M., Nyeki O., Szirtes T., Schon I. // Liebig's Ann. Chem. 1973. № 9. S. 1421–1429.
18. Wilson M.B., Nakane P.K. // Immunofluorescence and related staining techniques. / Ed. Knapp W. Amsterdam: Elsevier. 1978. P. 215–224.
19. Еремин А.Н., Будникова Л.П., Свиридов О.В., Метелица Д.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. С. 174–182.

Synthesis of Peptide Fragments of High-Affinity Receptor FcεR1 and Study Their Binding with Allergen-Specific Immunoglobulin E

O. V. Gribovskaya^{a, #}, V. P. Martinovich^a, V. P. Golubovich^a, V. V. Yanchenko^b, L. R. Vihristenko^b, and D. K. Novikov^b

[#] Phone: +375 (17) 267-82-63; e-mail: olymelnik@yandex.ru

^aInstitute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Ak. Kuprevich Str., 5/2, Minsk, 220141 Belarus

^bVitebsk State medical University, Frunze Av., 27, Vitebsk, 210023 Belarus

High-affinity receptor FcεR1 is a key substance which participates in IgE-dependent allergic reactions of immediate type. A minimal sequence Arg¹³⁶-Asn¹³⁷-Trp¹³⁸-Asp¹³⁹, which takes part in binding with C3 and C4 fragments of IgE was determined by methods of computer analysis. As possible analogs of FcεR1 receptor, capable of binding to Fc-fragment IgE, a number of peptide compounds containing this sequence were proposed. Biological researches have shown that these peptides possess immunobiological effect and bind to IgE. Studied the ability of peptides to bind with IgE class serum antibodies specific to allergen *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with allergic bronchial asthma.

Keywords: peptide synthesis, receptor FcεR1, immunoglobulin E, immunobiological activity.