



УДК 577.175.82'(15 + 17)

© 1993 И. А. Прудченко, Л. В. Сташевская,  
Е. Н. Шепель, И. И. Михалева, В. Т. Иванов,  
Ю. П. Шмалько \*, А. П. Чалый \*, В. Ю. Уманский \*,  
С. Н. Гринжевская \*

### СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНАЛОГОВ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА. 2 \*. АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;*

*\* Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии  
им. Р. Е. Кавецкого АН Украины, Киев*

**Ключевые слова:** ДСИП, пептид дельта-сна; аналоги; твердофазный синтез; антиметастатическая активность; макрофаги; нейроэндокринный статус.

С целью дальнейшего структурно-функционального изучения пептида дельта-сна (ДСИП) осуществлен синтез 5 новых аналогов пептида с помощью твердофазного способа синтеза по Fmoc-схеме. Проведено изучение антиметастатической активности соединений в сравнении с нативным пептидом при внутривенном введении (50 мкг/кг) на мышцах с метастазирующей карциномой Льюис. Исследовано действие аналогов на функциональную активность перитонеальных, альвеолярных и селезеночных макрофагов *in vivo*, а также влияние на эндокринный статус и состояние симпатoadренальной системы у мышей с карциномой Льюис. Показано нормализующее действие ДСИП и ряда аналогов *in vivo* на активность макрофагов и нейроэндокринный статус мышей с карциномой Льюис, в результате чего наблюдалось повышение устойчивости организма к опухолевому росту и метастазированию. Выявлен аналог, антиметастатическая активность которого превышает активность нативного ДСИП.

Исследование антиметастатических свойств пептида дельта-сна (ДСИП) и его синтетических аналогов является частью проводимого нами структурно-функционального изучения этого нейропептида, обладающего широким спектром биологической активности. Ранее нами уже были опубликованы данные об антиэпилептическом действии ДСИП и ряда его аналогов. На основе полученных данных были выявлены некоторые структурные закономерности для этого вида

† Сообщение 1 см. [1].

В работе использованы стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC — IUB, а также: ДСИП — пептид дельта-сна; НОБТ — 1-гидроксибензотриазол; ТФА — трифторуксусная кислота; Fmoc — 9-флуоренилметилоксикарбонил; ДОФА — 3-гидрокси-L-тирозин.

активности пептида [1]. В настоящей работе мы попытались для ряда уже синтезированных и некоторых новых аналогов ДСИП охарактеризовать структурно-функциональную зависимость по другому виду биологической активности — антиметастатическому действию.

Из опубликованных нами ранее данных известно, что ДСИП и его циклическое производное  $\text{cyclo}(\text{Gly-ДСИП})$  предупреждают вызванное стрессом снижение активности нормальных киллеров [2]. Отмечается также повышение противоопухолевой устойчивости животных с помощью ДСИП в условиях инокуляции лейкозных клеток на фоне чрезмерной стрессорной реакции [3].

Нами было продемонстрировано также, что ДСИП (60 мкг/кг; внутривенно) существенно тормозит метастазирование карциномы Льюис у мышей при хирургическом удалении опухоли в условиях эмоционально-болевого стресса. Полученные данные свидетельствовали о том, что действие пептида затрагивает как центральные, так и периферические стрессреализующие механизмы. Его введение предотвращало истощение и срыв медиаторных систем головного мозга, эндокринной и симпатoadреналовой систем [4].

В данной работе мы предприняли дальнейшее изучение антиметастатической активности как самого ДСИП, так и серии его новых структурных аналогов с заменами в положениях 2 и 6 аминокислотной последовательности нативного ДСИП (для аналогов показаны только аминокислотные замены):

ДСИП	<sup>1</sup> Trp-- <sup>2</sup> Ala-- <sup>3</sup> Gly-- <sup>4</sup> Gly-- <sup>5</sup> Asp-- <sup>6</sup> Ala-- <sup>7</sup> Ser-- <sup>8</sup> Gly-- <sup>9</sup> Glu
ID-1	----DVal-----
ID-3	----DAla-----Tyr-----
ID-7	----DAla-----Pro-----
ID-10	----DAia-----
ID-11	----Pro-----Pro-----
ID-13	----DPhc-----
ID-15	----Tyr-----
ID-16	----Leu-Pro-----Thr-Thr-----
ID-17	----DSer-----
ID-25	AcTrp-----
ID-26	----DPro-----

Среди перечисленных аналогов имеется ряд соединений с остатками различных *D*-аминокислот в положении 2, полученных с целью увеличения устойчивости к аминопептидазам. Синтезирован также ацетилированный по *N*-концевому аминокислотному остатку аналог ID-25.

В банке белков PIR (версия 22, сентябрь 1989 г.) был осуществлен поиск последовательностей, подобных ДСИП, с использованием разработанной в ИБХ РАН программы определения локального сходства, в основу которой положен алгоритм быстрого поиска [5]. Среди нескольких фрагментов белков с 56%-ной идентичностью ДСИПу мы выбрали фрагмент 14—22 из предшественника человеческого иммуноглобулина (каппа-цепь; V-3-регион), сохраняющий остатки Trp<sup>1</sup>, Gly<sup>4</sup>, Asp<sup>5</sup>, Gly<sup>8</sup>, Glu<sup>9</sup> в соответствующих позициях и имеющий гомологичный остаток треонина вместо серина в положении 7. Соответствующий пептид ID-16 был также синтезирован и исследован.

Синтез аналогов осуществляли методом последовательного наращивания пептидной цепи с использованием Fmoc-схемы твердофазного пептидного синтеза. Для временной защиты  $\alpha$ -аминогруппы аминокислот использовали Fmoc-группу, для защиты боковых функциональных групп — *tert*-бутиловые эфиры. В качестве носителя применяли *n*-гидроксиметилфенилоксиметилполистирал. Для увеличения скорости протекания реакции конденсации нами применялись 4-кратные избытки реагентов. Для конечного деблокирования пептидов использовали смесь TFA/хлороформ/индол (75 : 23 : 2). Этот реагент позволяет практически полностью избежать побочных реакций при деблокировании (по данным ВЭЖХ) и выделить желаемый продукт за одну стадию очистки [1].

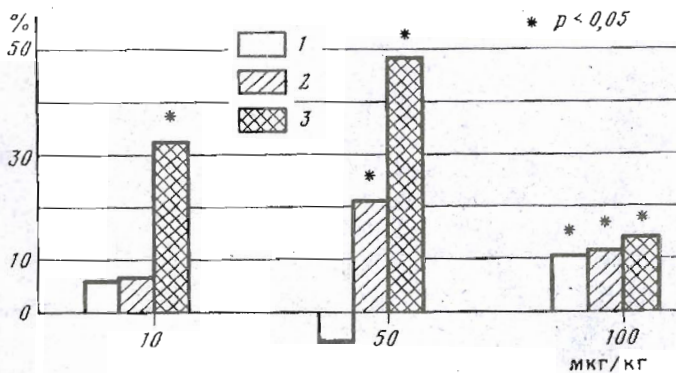


Рис. 1. Увеличение выживаемости мышей с метастазирующей карциномой Льюис при введении ДСИП (% к контролю). Осуществляли 5-кратное введение (1 — подкожно, 2 — внутрибрюшинно, 3 — внутривенно) пептида с 10-х по 14-е сут после перевивки опухоли

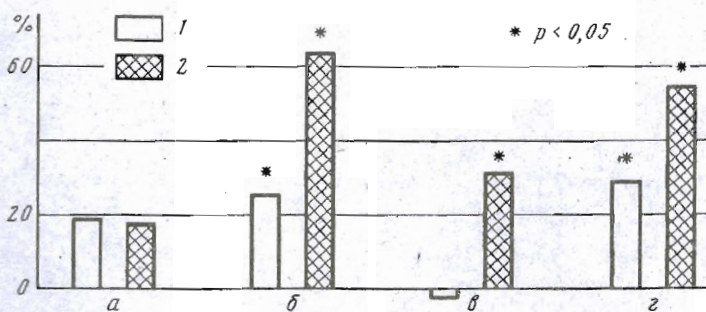


Рис. 2. Уменьшение общего объема метастазов при введении ДСИП (1 — внутрибрюшинно, 2 — внутривенно) мышам с метастазирующей карциномой Льюис (% к контролю) в течение 1—7 (а), 7—14 (б), 14—21 (в) и 1—28-х сут (г) после перевивки опухоли в дозе 50 мкг/кг ежедневно

Для выделения деблокированных пептидов мы использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-15 (чистота более 97% по данным аналитической ВЭЖХ). Все аналоги охарактеризованы данными аминокислотного анализа и масс-спектрометрии; структура подтверждена данными  $^1\text{H-NMR}$ -спектроскопии.

В качестве модели для изучения антиметастатического действия аналогов ДСИП нами была выбрана метастазирующая карцинома Льюис у мышей и был проведен поиск эффективной дозы и способа введения ДСИП мышам с метастазирующей карциномой Льюис. В результате проведенного исследования было установлено, что наибольший антиметастатический эффект достигается при внутривенном введении препарата в дозе 50 мкг/кг (рис. 1) в период с 7-х по 14-е сут после перевивки опухоли. Увеличение продолжительности использования ДСИП (1—28-е сут после перевивки опухоли) не сопровождалось усилением антиметастатического эффекта (рис. 2). Антиметастатическое действие оценивалось на 28-е сут после перевивки опухоли по уменьшению общего объема и числа метастазов по сравнению с контролем (рис. 3). Найдено, что антиметастатическим эффектом обладают сам ДСИП и ряд его аналогов, которые, основываясь на данных по уменьшению общего объема метастазов, можно расположить в следующей последовательности по уменьшению их активности: ID-10, ДСИП, ID-16,

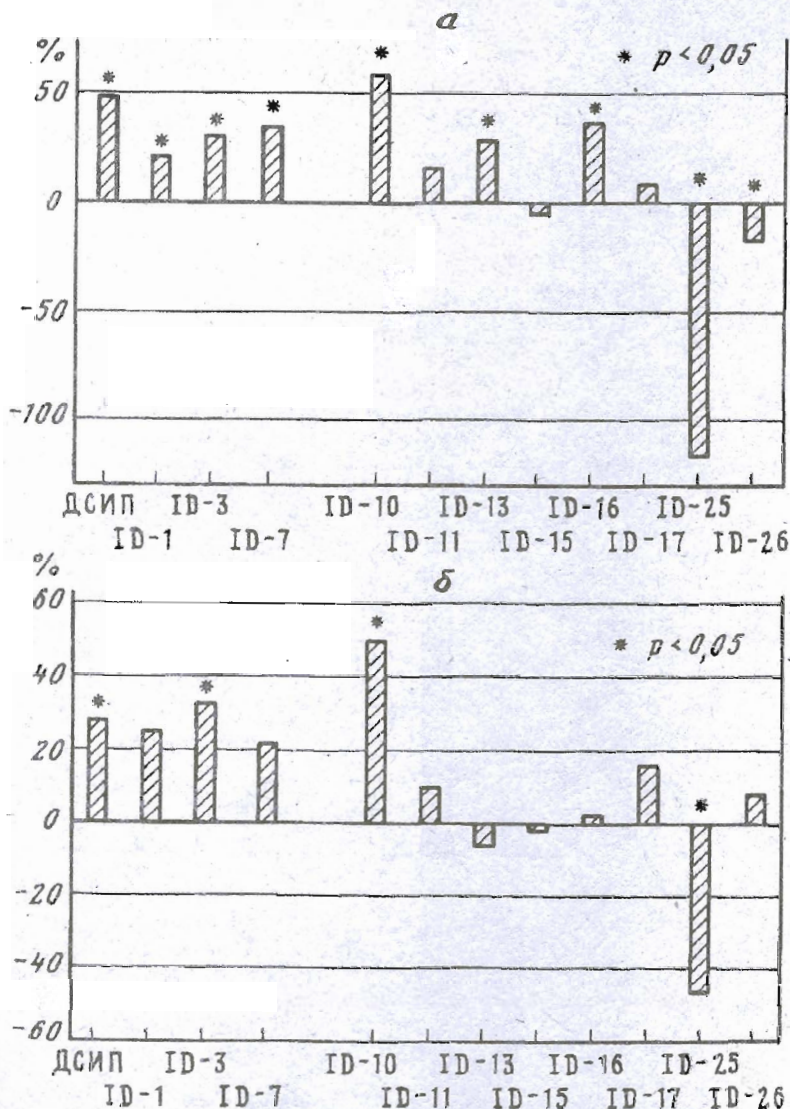


Рис. 3. Антиметастатическое действие аналогов ДСИП при внутрибрюшинном введении мышам с карциномой Льюис. Введение аналогов (50 мкг/кг) проводилось 6-кратно с 7-х по 12-е сут после перевивки опухоли. Учет метастазов производили на 28-е сут после перевивки опухоли. Показано уменьшение общего объема (а) и общего числа метастазов (б) (% к контрольным животным)

ID-7, ID-13, ID-3, ID-1. По влиянию на общее число метастазов можно построить несколько другой ряд: ID-10, ID-3, ДСИП, что свидетельствует о том, что аналоги последнего ряда уменьшают не только общий объем метастазов, но и тормозят инвазию опухолевых клеток. Аналог ID-25 (ацетилированный ДСИП), напротив, значительно увеличивал как общий объем, так и число метастазов по сравнению с контрольными животными, проявляя эффект, противоположный действию нативного пептида.

Следующей серией экспериментов была показана способность ДСИП увеличивать *in vivo* функциональную активность перитонеальных, альвеолярных и селезеночных макрофагов интактных мышей (рис. 4). В качестве показателей активации макрофагов использовали активность ферментов аденозиндезаминазы

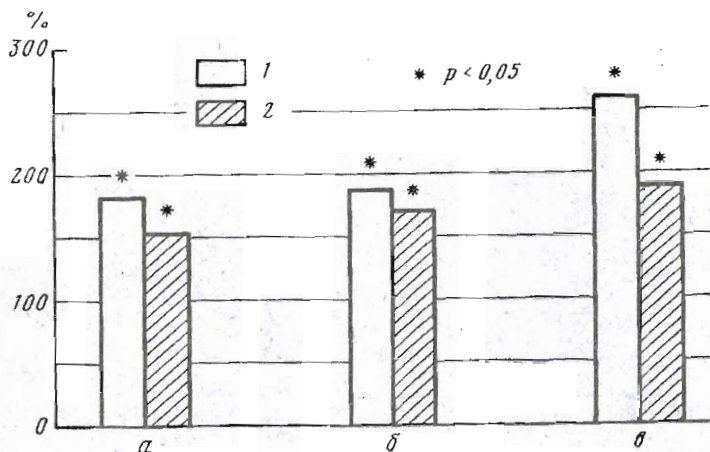


Рис. 4. Изменение активности перитонеальных (а), альвеолярных (б) и селезеночных макрофагов (в) при введении ДСИП мышам внутривенно (1) и внутрибрюшинно (2) в дозе 50 мкг/кг ( $A_A/A_N$  в % к контролю, см. «Экспер. часть»)

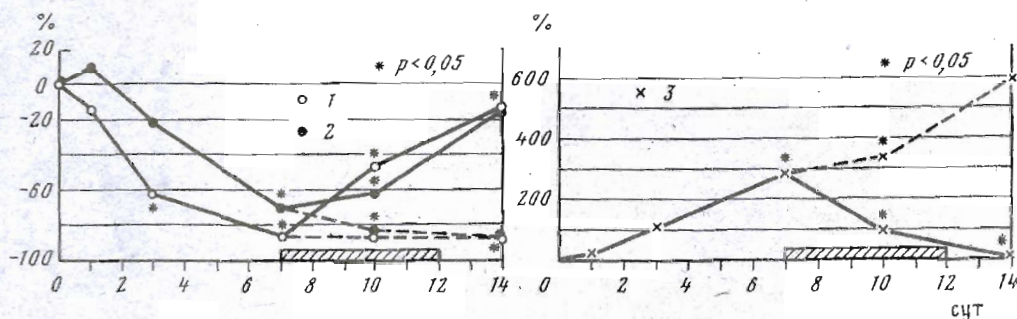


Рис. 5. Нормализация активности перитонеальных (1), альвеолярных (2) и селезеночных макрофагов (3) у мышей с карциномой Льюис при введении ДСИП (увеличение  $A_A/A_N$  (%)) в сравнении с интактными животными). Внутривенное введение ДСИП (50 мкг/кг) проводилось 6-кратно с 7-х по 12-е сут после перевивки опухоли (период отмечен). Штриховой линией показано изменение активности макрофагов у животных с карциномой без введения ДСИП

(КФ 3.5.4.4) и 5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5) в клеточном лизате. Эти ферменты, регулирующие уровень метаболизма аденозина, играют важнейшую роль в функционировании и дифференцировке макрофагов [6]. В случае мышей с карциномой Льюис внутривенное 6-кратное введение ДСИП в дозе 50 мкг/кг в период 7—12-х сут после перевивки опухоли приводило к полной нормализации активности этих ферментов, что может свидетельствовать о восстановлении нормальной функциональной активности макрофагов (рис. 5).

Изучение влияния аналогов ДСИП на функциональное состояние альвеолярных и перитонеальных макрофагов при метастазировании карциномы Льюис показало, что аналоги, проявляющие антиметастатическую активность (ДСИП, ID-1, ID-3, ID-7), вызывают также и нормализацию активности макрофагов (рис. 6).

Нами было проведено также сравнение активности селезеночных макрофагов при внутривенном введении ДСИП или нескольких его аналогов (ID-1, ID-3, ID-7) интактным животным и животным с карциномой Льюис. Известно, что функциональная активность клеток-супрессоров в селезенке повышается на этом этапе метастазирования, а макрофаги селезенки обладают супрессорными по

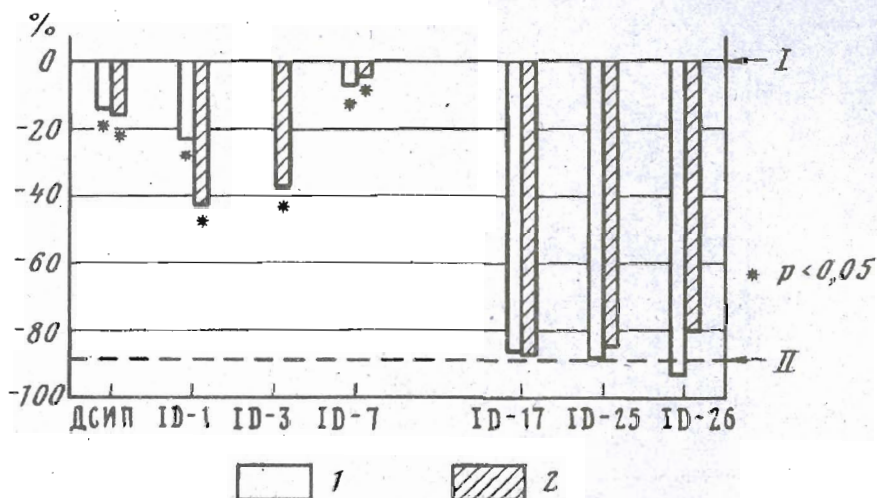


Рис. 6. Изменение активности перитонеальных (1) и альвеолярных макрофагов (2) у мышей с карциномой Льюис при введении аналогов ДСИП (увеличение  $A_A/A_N$  (%)) в сравнении с интактными животными). Активность макрофагов изучали на 14—17-е сут. Стрелками показан уровень активности для интактных мышей (контроль, I) и для мышей с карциномой без введения аналогов (II)

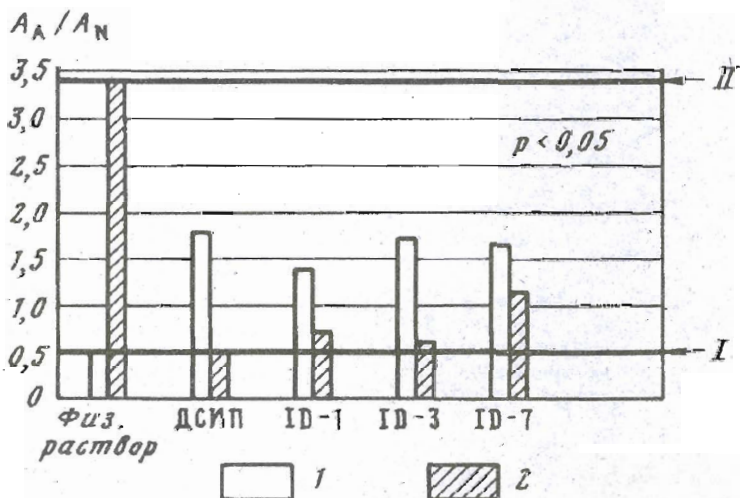


Рис. 7. Активность селезеночных макрофагов у мышей с карциномой Льюис после внутривенного введения аналогов (50 мкг/кг) в сравнении с активностью макрофагов после введения аналогов интактным животным: 1 — активность макрофагов через 72 ч после внутривенного введения физиологического раствора или аналогов (50 мкг/кг) интактным животным; 2 — активность макрофагов на 14—17-е сут после перевивки опухоли при введении аналогов 6-кратно с 7-х по 12-е сут после перевивки опухоли. I и II — см. рис. 6

отношению к эффекторным Т-клеткам функциями, и при метастазировании их количество и функциональная активность резко возрастают [7].

В наших экспериментах функциональная активность селезеночных макрофагов у мышей с карциномой Льюис увеличивалась в 7 раз по сравнению с интактными животными. После внутривенного введения ДСИП и аналогов интактным животным активность селезеночных макрофагов несколько повышалась (на 3-и сут в 2—3 раза). В случае внутривенного введения ДСИП и аналогов животным с карциномой Льюис (6-кратно с 7-х по 12-е сут после перевивки опухоли) активность селезеночных макрофагов нормализовалась практически до уровня активности для интактных животных (рис. 6, 7). Аналогично по их способности

Эндокринный статус у мышей с карциномой легкого Льюис

Определяемые вещества	Содержание в плазме крови, мкг/л	
	До перевивки опухоли	На 28-е сут после перевивки опухоли
Инсулин	2,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2 *
Тироксин	33,8 ± 3,1	18,7 ± 2,3 *
Тестостерон	3,2 ± 0,2	1,6 ± 0,2 *
Кортикостерон	142,0 ± 8,5	206,4 ± 13,2 *

\*  $p < 0,05$  по отношению к показателям до перевивки опухоли.

Таблица 2

Состояние симпатoadреналовой системы у мышей с карциномой легкого Льюис

Определяемые вещества	Содержание в надпочечниках, мкг/г	
	До перевивки опухоли	На 28-е сут после перевивки опухоли
ДОФА	115 ± 8	70 ± 9
Дофамин	105 ± 5	90 ± 7
Адреналин	697 ± 31	367 ± 30 *
Норадреналин	341 ± 54	206 ± 26 *

\*  $p < 0,05$  по отношению к показателям до перевивки опухоли.

нормализовать функциональную активность макрофагов можно расположить следующим образом: ДСИП, ID-7, ID-1, ID-3.

С момента злокачественной трансформации основное значение в формировании противоопухолевой резистентности на уровне органа или ткани начинают играть тканевые нейрогуморальные реакции. Влияя на функциональную активность клеток и являясь регуляторной основой межклеточного взаимодействия, они могут существенно модифицировать процессы метастазирования злокачественных опухолей. Ранее было показано стимулирующее влияние стресса на возникновение и рост метастазов [8]. В частности, опухолевый процесс и его лечение (облучение, химиотерапия, хирургическое вмешательство) сопровождаются устойчивым возбуждением стрессреализующих механизмов центральной нервной системы, эндокринной и симпатoadреналовой систем. Поэтому актуальным является поиск веществ, способных нормализовать нейроэндокринный статус организма с целью повышения его жизнеспособности в условиях опухолевого роста.

При изучении влияния аналогов ДСИП на эндокринный статус и состояние симпатoadреналовой системы у мышей с карциномой Льюис использовали внутривенное введение аналогов в дозе 50 мкг/кг 6 раз в период с 7-х по 12-е сут после перевивки опухоли. Нейроэндокринные показатели (уровень кортикостерона, инсулина, тироксина и тестостерона в плазме крови) оценивались на 28-е сут после перевивки опухоли. О влиянии на периферическую нервную систему судили по показателям состояния симпатoadреналовой системы. Для этого в надпочечниках исследовали уровень ДОФА, дофамина, адреналина и норадре-

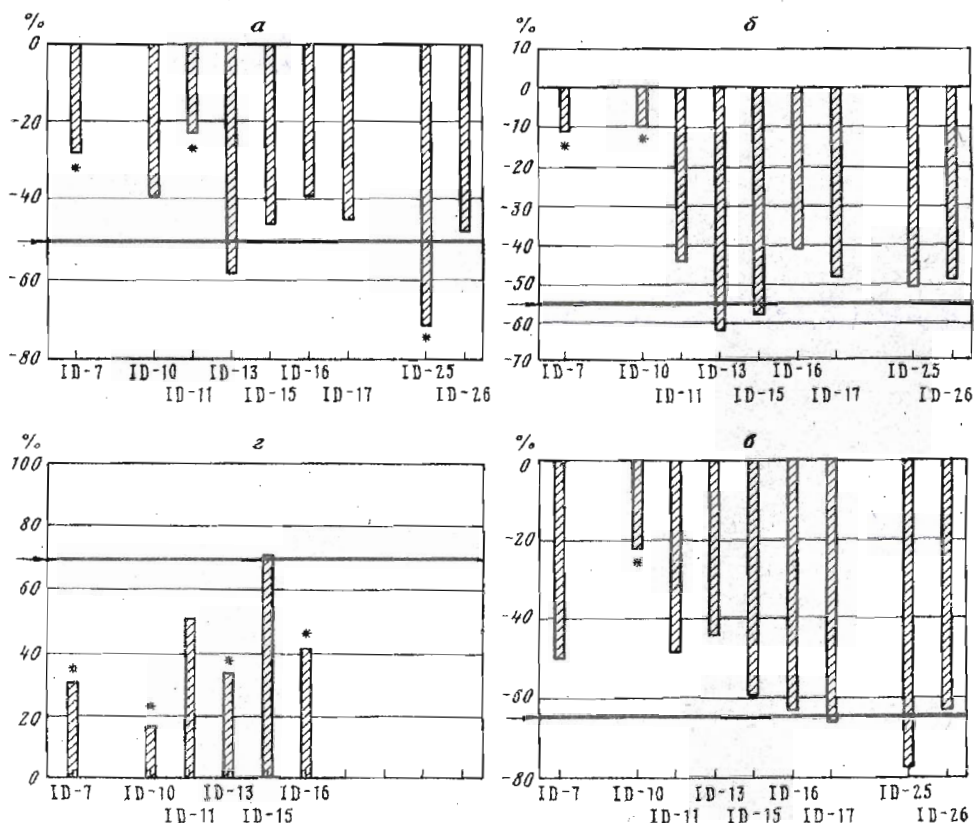


Рис. 8. Влияние аналогов ДСИП на эндокринный статус мышей с карциномой Льюис. Внутривенное введение аналогов (50 мкг/кг) проводилось 6-кратно с 7-х по 12-е сут после перевивки опухоли. Определение содержания гормонов проводилось на 28-е сут после перевивки опухоли. Показано уменьшение содержания инсулина (а), тироксина (б), тестостерона (в) и увеличение содержания кортикостерона (г) в процентах к статусу intactных животных. Звездочкой отмечены эксперименты, имеющие  $p < 0,05$  по отношению к контрольным животным с карциномой Льюис. Стрелками показан уровень изменения содержания гормонов у контрольных животных с карциномой Льюис (% к содержанию в intactных животных)

налина, используя методики, приведенные в работе [4]. Было показано, что на 28-е сут после перевивки опухоли происходит существенное угнетение активности инсулярного аппарата, выражающееся в снижении уровня инсулина, и резкое угнетение секреции тироксина и тестостерона. При этом значительно возрастало содержание кортикостерона в крови (табл. 1). Наблюдалось также существенное угнетение симпатoadренальной системы, которое проявлялось в снижении продукции ДОФА и катехоламинов в мозговом слое надпочечников (табл. 2).

Проведенные эксперименты показали, что в ряде случаев введение аналогов предотвращало угнетение эндокринного статуса и изменения функционального состояния симпатoadренальной системы, препятствовало развитию состояния гиперкортицизма. Наибольший эффект проявлялся аналогами ID-10 и ID-7 (рис. 8, 9). Аналоги ID-13 и ID-16 также имели тенденцию к нормализации уровня кортикостерона, которая коррелировала с нормализующим действием этих аналогов на симпатoadренальную систему.

Выявленная нами корреляция между антиметастатической активностью аналогов и их нормализующим действием на активность макрофагов указывает, по-видимому, на то, что эти аналоги проявляют антиметастатическую активность, действуя на иммунологическую систему резистентности организма. На основании полученных результатов можно предположить, что в значительной мере



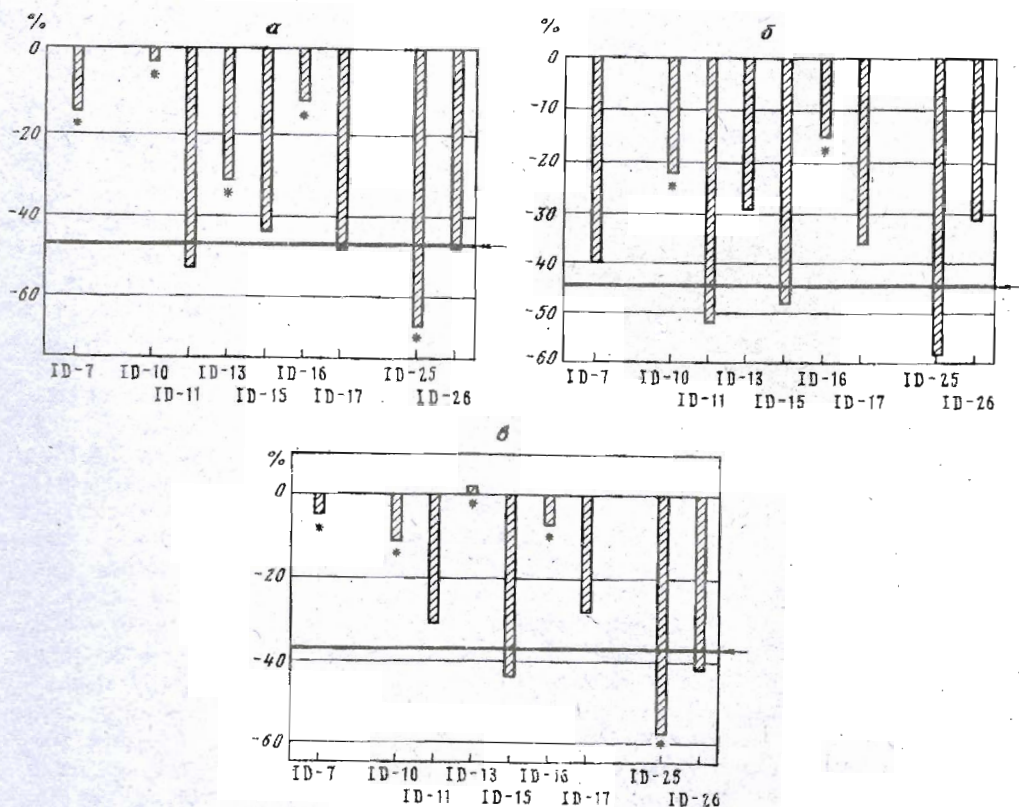


Рис. 9. Влияние аналогов ДСИП на симпатoadренальную систему мышей с карциномой Льюис. Условия проведения экспериментов и обозначения см. рис. 8

этот эффект опосредуется влиянием аналогов на нейрогуморальные механизмы регуляции антиметастатической резистентности — эндокринные и симпатoadренальные.

Интересно отметить, что активность укороченного с С-конца аналога с *D*-аланином в положении 2 (ID-10) превышала активность нативного ДСИП, что свидетельствует о функциональной важности для данного вида активности N-концевого гексапептидного звена. Изучение серии производных с различной природой *D*-остатка в положении 2 выявило значительную зависимость активности от характера бокового радикала. Так, аналог с *D*-Val (ID-1), уступая ДСИП, все же сохраняет значительную активность, аналог с *D*-Phe (ID-13) уступает ID-1, аналог с *D*-Ser (ID-17) неактивен, а аналог с *D*-Pro (ID-26) проявляет противоположную активность (рис. 3). Таким образом, ограничение протеолитического отщепления N-концевого остатка триптофана с помощью введения различных *D*-остатков в положение 2 не приводит к существенному положительному сдвигу в их активности по сравнению с нативным ДСИП, что свидетельствует о значительной роли конформационных факторов для реализации антиметастатического действия. К такому же выводу приводит и сравнение активности ДСИП и [L-Tyr<sup>2</sup>]ДСИП (ID-15), который практически лишен активности вследствие замены *L*-Ala на *L*-Tyr в положении 2.

Учитывая тот факт, что наряду с наиболее уязвимым для протеолиза N-концевым остатком триптофана следующим участком, подверженным протеолизу, хотя и в меньшей степени, является участок Ala<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup> [9], нами синтезированы и исследованы 2,6-дизамещенные аналоги ДСИП (ID-3, ID-7, ID-11). Аналог ID-11, содержащий пролин в положениях 2 и 6, практически лишен активности, а из

сравнения аналогов ID-3 и ID-7, обладающих близкой активностью, можно видеть, что присутствие тирозина или пролина в положении 6 практически равнозначно для проявляемой активности.

Далее интересно отметить, что ацетилованный по N<sup>α</sup>-аминогруппе триптофана аналог вызывает стимуляцию метастазирования, проявляя тем самым эффект, обратный нативному ДСИП. Такое ингибирующее действие этого аналога свидетельствует о важности N-концевой аминогруппы для проявляемой активности. Можно предположить, что в данном случае значима роль N-концевой аминогруппы в поддержании необходимой пространственной организации молекулы, например квазициклических структур [10], в то время как возможное участие N<sup>α</sup>-аминогруппы триптофана в связывании с гипотетическим рецептором представляется менее вероятным, если учесть, что упомянутый выше *cyclo*[Gly-ДСИП] обладает способностью увеличивать устойчивость к опухолевому росту [2].

Анализируя приведенные выше структурные закономерности, можно сделать вывод, что необходимое условие проявления аналогами активности — это прежде всего сохранение конформационных возможностей молекулы. Данное предположение подтверждается также тем, что фрагмент иммуноглобулина (ID-16), довольно сильно отличающийся своей аминокислотной последовательностью от ДСИП заменами в положениях 2, 3, 6 и 7, тем не менее проявляет значительную антиметастатическую активность. Этот аналог отличается от ДСИП повышенной липофильностью и несколько более жесткой структурой N-концевой части молекулы за счет введения лейцина в положение 2 и пролина в положение 3. Обнаружено, что ID-16, так же как и ID-13, имеет более узкий спектр антиметастатического действия. Эти аналоги уменьшают уровень кортикостерона у мышей с карциномой и в то же время нормализуют состояние симпатoadренальной системы. Однако они в отличие от ДСИП не нормализуют другие показатели эндокринного статуса организма. Возможно, ограничение антиметастатического действия этих двух аналогов связано с их повышенной липофильностью.

Если сравнить два вида биологической активности ДСИП и его аналогов (антиэпилептическую и антиметастатическую), можно обнаружить некоторое сходство в структурно-функциональных закономерностях. Увеличение липофильности с одновременным увеличением устойчивости к протеолизу за счет введения остатков *D*-аминокислот в положение 2 несколько снижает активность аналогов (ID-1, ID-13) в обоих тестах. По-видимому, энзиматическая деградация не критична для проявления этих видов биологической активности. Однако существует и несоответствие в структурных закономерностях — это важность С-концевого участка молекулы ДСИП для проявления антиэпилептической активности. Так, антиметастатическая активность укороченного с С-конца аналога ID-10 превышала активность нативного ДСИП, а антиэпилептическая активность полностью отсутствовала [1].

Таким образом, наибольшее значение для проявления аналогами антиметастатической активности имеет N-концевой (1—6) фрагмент пептида, поскольку некоторые изменения в положениях 1 и 2 могут привести к полной потере активности, а укорачивание пептида с С-конца на три аминокислоты с одновременным введением *D*-аланина в положение 2 приводит к повышению активности. N-Концевой участок оказывается наиболее уязвимым к структурным изменениям с точки зрения сохранения антиметастатических свойств. Необходимо также отметить, что описанные данные, полученные на ограниченном круге соединений, оставляют открытыми многие аспекты структурно-функциональной зависимости в ряду ДСИП и его аналогов. Тем не менее выявленные особенности могут быть полезны в поиске эффективных антиметастатических средств.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислотные производные и реактивы фирм Reanal (ВНР), PRF (Япония), Advanced Chemtech (США), Aldrich (США), Fluka (Швейцария). Пептиды получали твердофазным методом пептидного синтеза на авто-

матическом синтезаторе Biosearch 9500 (Milligen/Biosearch, США). В качестве исходного полимера брали *n*-гидроксиметилфенилоксиметилполимер (Novabiochem). Для гель-фильтрации применяли сефадекс G-15 фирмы Pharmacia (Швеция). Центрифугирование проводили на приборе Centrifuge 5413 (Eppendorf, ФРГ). ВЭЖХ осуществляли на приборе System Gold (Beckman, США) с использованием колонки Nucleosil 5C18 (4×200 мм) фирмы Macherey-Nagel (ФРГ). Удельное вращение измеряли на поляриметре DIP-360 (Jasco, Япония). Аминокислотный анализ кислотных гидролизатов пептидов осуществляли на приборе D-500 (Durrum, США). Гидролиз пептидов проводили 6 н. HCl (110° С, 24 ч) или смесью пропионовая кислота — HCl, 1 : 1 (155° С, 15 мин). Молекулярную массу веществ определяли с помощью FAB-масс-спектрометрии на приборе Kratos MS50TS (Великобритания). Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц) снимали на спектрометре WM 500 (Bruker, ФРГ), УФ-спектры — на приборе Ultrospec II (LKB, Швеция).

### 1. Синтез пептидов с использованием Fmoc-схемы

Получение *n*-(Fmoc-Glu(OBu<sup>1</sup>)-оксиметил)фенилоксиметилполимера и синтез аналогов ID-1 — ID-13 и самого ДСИП описаны в предыдущей статье [1].

Синтез аналогов ID-15 — ID-17, ID-26 проводили исходя из 1 г *n*-(Fmoc-Glu(OBu<sup>1</sup>)-оксиметил)фенилоксиметилполимера (0,25 ммоль/г). В качестве конденсирующего агента применяли диизопропилкарбодиимид с HOBT (1 : 1). Протокол синтеза приведен в предыдущей статье [1]. В качестве защиты боковых функций Asp, Glu, Ser, Tyr использовали *трет*-бутиловые эфиры.

Для конечного деблокирования пептидов использовали реагент А — смесь TFA — хлороформ — индол (75 : 23 : 2); реакцию проводили в течение 3 ч при 5° С с последующим упариванием на роторном испарителе при 20° С. Реакционную смесь обрабатывали сухим эфиром, отфильтровывали; осадок тщательно промывали эфиром (более 7 раз); полученный осадок экстрагировали 10% уксусной кислотой (3 раза) и лиофилизовали.

Леофилизат, полученный после деблокирования пептидов, растворяли в 4 мл 0,1 М уксусной кислоты, центрифугировали 5 мин (20 000 об./мин); супернатант подвергали гель-фильтрации на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-15 (0,1 М уксусная кислота). Скорость элюции 25 мл/ч; детекция при 226 нм.

Синтез ацетилированного аналога ДСИП (ID-25) проводили по следующей методике [11]: 100 мг ДСИП растворяли в 1 мл 0,5% NaHCO<sub>3</sub> и добавляли 2 мл смеси Ac<sub>2</sub>O/MeOH (1 : 3). Через 1 мин реакционную смесь замораживали в жидком азоте и лиофилизовали. Леофилизат растворяли в 1 мл 0,1 М уксусной кислоты и проводили гель-фильтрацию в условиях, описанных выше.

Чистота продуктов подтверждена аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации MeCN — 0,2% TFA — *i*PrOH, 80 : 25 : 20 (В) в 0,2% TFA: 0—1 мин 0% В; 1—21 мин 0—50%; 21—23 мин 50—100%. Скорость 1 мл/мин, детекция при 226 нм. Пептиды охарактеризованы корректными данными аминокислотного анализа и масс-спектрометрии; индивидуальность подтверждена с помощью ЯМР и аналитической ВЭЖХ. Константы полученных соединений приведены в табл. 3.

### 2. Влияние ДСИП на продолжительность жизни мышей с метастазирующей карциномой Льюис

Опыты проведены на 320 мышах-самцах C57Bl. Опухолевые клетки перевивали в подушечку стопы в дозе 2 · 10<sup>5</sup> на мышь в 0,05 мл физиологического раствора. Метастазы образовывались на 14-е сут опухолевого процесса. Гибель животных наступала на 30—40-е сут после перевивки опухоли при наличии в легких большого числа метастазов.

ДСИП вводили на протяжении 10—14-х сут после перевивки опухоли в период, предшествующий возникновению метастазов, в дозе 10, 50 и 100 мкг/кг.

Физико-химические свойства аналогов

Аналог	$M_r$	$R_1^*$ , мин	$[\alpha]_D^{28}$ (с 0,3; $H_2O$ )	$\lambda J_{max}$ , нм	$\epsilon_{max}$ , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$
ID-15	941	14,41	-6,66	277	4642
ID-16	975	15,80	-22,66	279	4233
ID-17	865	12,62	-1,99	278	4527
ID-25	909	15,09	-31,70	279	4543
ID-26	875	14,80	26,55	279	4497

\* ВЭЖХ.

Использовали подкожный, внутривенный и внутрибрюшинный способы введения. Препарат вводили в 0,2 мл физиологического раствора. Наблюдение за животными осуществляли на протяжении 2 мес. Погибших животных вскрывали для подтверждения наличия метастазов (рис. 1).

### 3. Антиметастатический эффект ДСИП при различных способах введения

Опыты проведены на 400 мышах-самцах С57В1 с метастазирующей карциномой Льюис. ДСИП применяли внутрибрюшинно и внутривенно в дозе 10, 50 и 100 мкг/кг. Препарат вводили в 0,2 мл физиологического раствора на протяжении 1—7, 7—14, 14—21 и 1—28-х сут после перевивки опухоли ежедневно. В качестве контроля служили животные с опухолями, которым вводили соответствующее количество физиологического раствора. Антиметастатический эффект ДСИП оценивали на основании подсчета общего объема метастазов (рис. 2).

### 4. Антиметастатическая активность аналогов ДСИП

Опыты проведены на мышах-самцах С57В1/6 массой 25—30 г разводки вивария Института проблем онкологии. Животные были разбиты на 4 группы. Первую группу составляли здоровые животные, вторую — здоровые животные, которым однократно вводили аналоги ДСИП в дозе 50 мкг/кг. В третью группу входили животные с карциномой легкого Льюис и в четвертую — животные с опухолью, получавшие аналоги ДСИП с 7 по 12-е сут. Материал для исследований у мышей второй группы брали через 3 сут после введения препаратов, у мышей третьей группы — на 7, 14, 21 и 28-е сут после перевивки опухоли, у животных четвертой группы — на 28-е сут опухолевого процесса. Учет метастазов производили на 28-е сут; оценивали количество и общий объем метастазов (рис. 3).

### 5. Активность макрофагов у интактных мышей

Опыты проведены на мышах-самцах С57В1/6 массой 25—30 г разводки вивария Института проблем онкологии. ДСИП вводили мышам внутривенно или внутрибрюшинно в количестве 50 мкг/кг в 0,2 мл физиологического раствора. Контрольным животным вводили тот же объем физиологического раствора. Для получения макрофагов перитонеального экссудата брюшную полость мышей промывали 10 мл раствора Хенкса, содержащего 10 МЕ/мл гепарина. Полученную суспензию клеток осаждали на пластиковых чашках Петри диаметром 40 мм. После инкубации в термостате при 37° С в течение 1,5—2 ч образовавшийся монослой макрофагов снимали резиновым валиком. Альвеолярные и селезеноч-

ные макрофаги мышей выделяли из предварительно гомогенизированных легких и селезенки в растворе Хенкса с 10 МЕ/мл гепарина, используя их способность прилипать к пластику [12, 13].

Для оценки чистоты выделенных популяций макрофагов применяли метод определения активности ферментов — неспецифической эстеразы и кислой неспецифической эстеразы с помощью одновременного азосочетания. Эти лизосомальные ферменты относятся к цитохимическим маркерам макрофагов. Согласно полученным данным, макрофаги составляли 80—85% всех выделенных с помощью прилипания к пластиковой поверхности клеток.

Выделенные макрофаги лизировали в гипотоническом растворе, содержащем 20 ммоль трис-НCl, 5 ммоль MgSO<sub>4</sub>, pH 7,4. Активность аденозиндезамидазы (A<sub>A</sub>) и 5'-нуклеотидазы (A<sub>N</sub>) измеряли в полученном клеточном лизате с помощью меченных по углероду субстратов — аденозина и аденозинмонофосфата с использованием восходящей хроматографии на бумаге [14]. Время инкубации с ферментом и содержание клеток в пробе лизата подбирали с таким расчетом, чтобы определение ферментативной активности проводилось в условиях начальной скорости реакции. Для каждой пробы делали два параллельных определения. Активность макрофагов оценивали по величине A<sub>A</sub>/A<sub>N</sub> для лизатов, выделенных через 72 ч после введения ДСИП.

#### *6. Активность макрофагов у мышей с метастазирующей карциномой Льюис*

Опыты проведены на мышах-самцах C57Bl/6 массой 25—30 г разводки вивария Института проблем онкологии. Опухолевые клетки перевивали в подушечку стопы в дозе  $2 \cdot 10^5$  на мышь в 0,05 мл физиологического раствора. ДСИП вводили внутривенно в дозе 50 мкг/кг в 0,2 мл физиологического раствора ежедневно 6 раз с 7-х по 12-е сут после перевивки опухоли. Макрофаги выделяли на 1, 3, 7, 10 и 14-е сут после перевивки опухоли. Их активность определяли с помощью той же методики, что и активность макрофагов у интактных мышей (описана выше). В качестве контроля использовали активность макрофагов интактных животных (рис. 5).

#### *7. Влияние аналогов на активность макрофагов у мышей с метастазирующей карциномой Льюис*

Опыты проведены на мышах-самцах C57Bl/6 массой 25—30 г разводки вивария Института проблем онкологии. Опухолевые клетки перевивали в подушечку стопы в дозе  $2 \cdot 10^5$  на мышь в 0,05 мл физиологического раствора. Аналоги ДСИП вводили внутривенно в дозе 50 мкг/кг в 0,2 мл физиологического раствора ежедневно 6 раз с 7-х по 12-е сут после перевивки опухоли. Макрофаги выделяли на 14—17-е сут после перевивки опухоли. Их активность определяли с помощью той же методики, что и активность макрофагов у интактных мышей (описана выше). В качестве контроля использовали активность макрофагов интактных животных (рис. 6, 7). Для сравнения была взята группа мышей с карциномой, которым внутривенно вводился физиологический раствор в объеме 0,2 мл.

Результаты исследований обрабатывали статистически с применением критерия Т-Стьюдента.

Авторы выражают свою признательность Т. А. Балашовой за помощь в получении и интерпретации <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров и Г. И. Дмитриевой за проведение поиска подобных структур в белковом банке.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прудченко И. А., Сташевская Л. В., Михалева И. И., Иванов В. Т., Шандра А. А., Годлевский Л. С., Мазарати А. М. // Биоорг. химия. 1993. Т. 19. № 1. С. 43—55.
2. Меерсон Ф. З., Сухих Г. Т., Фукс Б. Б., Михалева И. И., Свиричев В. И., Иванов В. Т. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. № 2. С. 482—484.
3. Сухих Г. Т., Меерсон Ф. З., Михалева И. И. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 1. С. 253—256.
4. Шмалько Ю. П., Михалева И. И. // Эксперим. онкология. 1988. Т. 10. № 2. С. 57—60.
5. Dumas J. P., Ninio J. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. P. 197—206.
6. Ohtani A., Kumazawa Y., Fujisawa H., Nishimura C. // J. Reticuloendothel. Soc. 1982. V. 15. № 3. P. 189—200.
7. Pope B. L. // Cancer Immunol. Immunother. 1985. V. 19. № 2. P. 101—108.
8. Balitsky K. P., Shmalko Yu. P., Pinchuck V. G. // Cancer, Stress and Death/Ed. J. Tache, H. Selye. N. Y., 1986. P. 113—132.
9. Marks N., Stern F., Kastin A. J., Coy D. H. // Brain Res. Bull. 1977. V. 2. P. 491—493.
10. Mikhaleva I. I., Sargsyan A. S., Balashova T. A., Ivanov V. T. // Chemistry of Peptides and Proteins/Eds W. Voelter, E. Wunsch, J. Ovchinnikov, V. Ivanov. Berlin, 1982. V. 1. P. 289—297.
11. Практическая химия белка // Ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989. С. 519.
12. Pietrangeli G. E., Scamene E., Edelson P., Kongshavn P. // Infect. Immunol. 1981. V. 32. № 3. P. 1206—1210.
13. Fidler I. J., Raz A., Fogler W. E., Kirsh R., Bugelski P., Posta G. // Cancer Res. 1980. V. 40. № 9. P. 4460—4466.
14. Дмитренко Н. П., Комиссаренко В. Ю., Уманский В. Ю. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 351. № 1. С. 251—253.

Поступила в редакцию  
15.VI.1993

*I. A. Prudchenko, L. V. Stashevskaya, E. N. Shepel,  
I. I. Mikhaleva, V. T. Ivanov, Yu. P. Shmalko\*,  
A. P. Chaly\*, V. Yu. Umansky\*, S. N. Grinzhevskaya\**

### **SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF NOVEL ANALOGUES OF DELTA SLEEP INDUCING PEPTIDE (DSIP). 2. ANTIMETASTATIC ACTION**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow;*

*\* P. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,  
Kiev*

With the aim to investigate structure-functional relations of DSIP, 11 DSIP analogues were tested on antimetastatic activity, among them five new analogues, differing in positions 2 and 6 of the DSIP amino acid sequence were synthesized by the solid-phase method using Fmoc-approach. Experiments on C57Bl mice with metastatic Lewis lung carcinoma showed some analogues to be more efficient as antimetastatic agents than DSIP after i. v. (50 µg/kg) administration. Normalization of neuroendocrine status and activity of peritoneal, alveolar and spleen macrophages after the DSIP and some analogues injections in mice with metastatic Lewis lung carcinoma took place. Antimetastatic action of DSIP derivatives is considerably affected by structural changes, especially in the N-terminal part. Conformational factors rather than enhanced enzymatic resistance are essential for antimetastatic response.