



УДК 577.112.6.017

## ИНГИБИТОР ГРАНУЛОПОЭЗА. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 1995 г. С. В. Куликов<sup>#</sup>, Е. Б. Леонова, Н. М. Калинина, М. А. Самарцев,  
Л. Н. Бубнова\*, Т. В. Глазанова\*, И. Е. Павлова\*, С. А. Кетлинский

НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург;

\* Санкт-Петербургский НИИ гематологии и переливания крови

Поступила в редакцию 25.02.94 г. После доработки 22.06.94 г.

Проведено сравнение трех схем синтеза пентапептида последовательности Glp-Glu-Asp-Cys-Lys-OH. Для защиты меркаптогруппы цистеина использовали ацетамидометильную группу или вели синтез на основе цистина. Показано, что оптимальным является твердофазный способ синтеза с S-ацетамидометильной защитой цистеина и удалением последней действием ацетата ртути перед отщеплением пептида от полимера. Стабилизированный пептид ингибирует пролиферацию клеток костного мозга больных хроническим миелолейкозом в 5 - 20 раз и оказывает умеренное воздействие (ингибирование не более чем в 2 раза) на клетки периферической крови, что делает перспективным его применение для лечения гемобластозов.

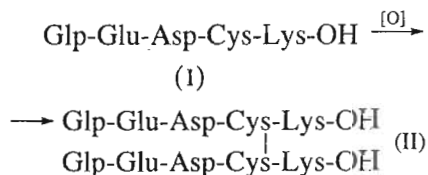
*Ключевые слова:* ингибитор гранулопоэза; пентапептид цистеинсодержащий; твердофазный синтез.

Один из механизмов регуляции постоянства клеточного состава ткани заключается в сохранении баланса между числом малодифференцированных делящихся клеток и дифференцированных клеток путем отрицательной обратной связи с участием ингибиторов клеточной пролиферации – кейлонов [1 - 4]. Последние продуцируются дифференцированными клетками, являются тканеспецифичными агентами [4] и ингибируют вхождение клеток в фазу синтеза ДНК в G<sub>1B</sub>-фазе клеточного цикла.

Один из наиболее изученных представителей этого класса соединений – фактор, ингибирующий гранулопоэз (GIF), называемый в литературе также гранулоцитарным кейлоном, или HP-5 [5, 6]. Аминокислотный состав и предполагаемая последовательность определены на основании анализа продуктов его расщепления [5 - 7]. Окончательно строение этого пептида доказано путем его химического синтеза и сравнения свойств с природным продуктом [8 - 10].

Для GIF (I) характерно наличие в его молекуле цистеина со свободной сульфгидрильной груп-

пой, благодаря чему пептид может превращаться в димер (II) путем образования дисульфидного мостика:



Если пептид (I) ингибирует пролиферацию стволовых клеток костного мозга, то димер (II), напротив, стимулирует ее [7, 11, 12]. Этот факт, а также ряд других наблюдений [9] позволили Леруму и Пауковицу [11] предложить гипотезу регуляторной пептидной пары, которая играет важную роль в функционировании кроветворной системы.

Недавно было обнаружено влияние пептида (I) на лейкозные клетки крови [13] и показана возможность использования этого соединения для лечения больных с различными патологиями кроветворной системы [14, 15]. Это особенно актуально, так как при лейкозах обычно применяется химиотерапия цитостатиками, которая оказывает повреждающий эффект на все кроветворные клетки. Кейлоны же, как природные регуляторы, не обладают неспецифическим цитотоксическим эффектом.

В литературе описаны варианты синтеза кейлона (I) в растворе [5, 10] и твердофазным методом [9] с применением трет-бутилоксикарбонильной

Использованные сокращения: Acst – ацетамидометил; DCNA – дициклогексиламин; GIF – ингибитор гранулопоэза; Glp – пироглутаминовая кислота; НОБТ – 1-гидроксibenзотриазол; Pfp – пентафторфенил; TFA – трифторуксусная кислота; TFMSA – трифторметансульфокислота; ТФСР – твердофазный синтез пептидов; ХМЛ – хронический миелолейкоз.

<sup>#</sup> Адрес для переписки: 197110, С.-Петербург, Пудожская, 7, С.В. Куликову.

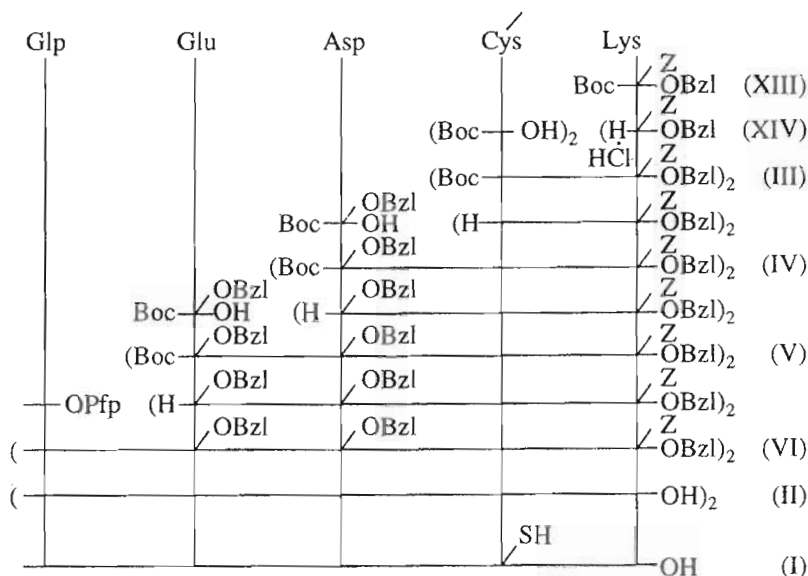


Схема 1.

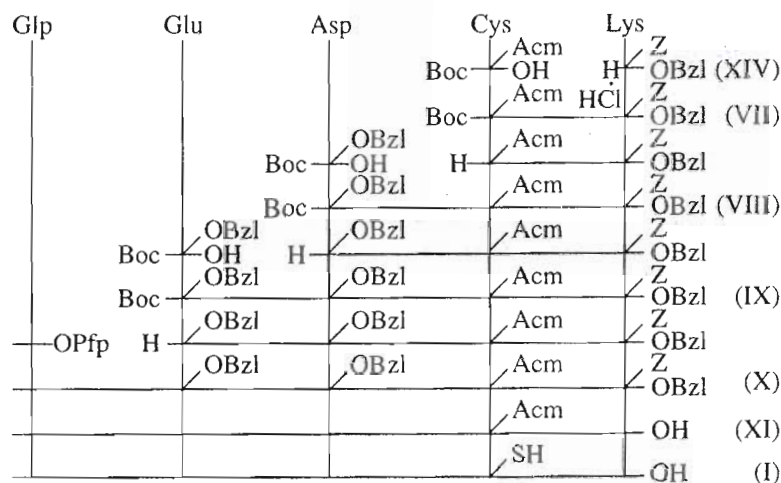


Схема 2.

[5] или флуоренилметилоксикарбонильной [9, 10] защиты  $\alpha$ -аминогрупп. Для защиты меркаптогруппы цистеина использовали бензильную [5] или *трет*-бутильную [9] группы или вели синтез димерного пентапептида на основе цистина [10].

В настоящей работе с целью выбора рационального пути синтеза проведено сравнение трех синтетических схем, основанных на Boc-защите  $\alpha$ -аминогрупп и защитных группах бензильного типа для боковых функций. Синтезы по схемам 1 и 2 проводили в растворе, исходя из бензильного эфира  $N^{\epsilon}$ -бензилоксикарбониллизина. Различались они использованием S-ацетамидометильной защиты цистеина (схема 2) или получением пептидов в димерной цистиновой форме (схема 1). Третий вариант представляет собой твердофазный метод синтеза на полимере Меррифилда

(схема 3) с S-ацетамидометильной защитой цистеина. Во всех вариантах пептидная связь образовывалась с помощью дициклогексилкарбодиимидного метода в присутствии 1-гидроксibenзотриазола, за исключением N-концевой пироглутаминовой кислоты, которую вводили в синтез в виде пептафторфенилового эфира. Boc-защитную группировку отщепляли раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле. Ниже даны основные результаты проведения синтезов по указанным схемам.

Синтез гидрохлорида бензильного эфира  $N^{\epsilon}$ -бензилоксикарбониллизина (XIV) выполнен тремя различными способами. По методу Вебера [16] из  $N^{\alpha}$ -*трет*-бутилоксикарбонил- $N^{\epsilon}$ -бензилоксикарбониллизина (XII) и бензильного спирта в присутствии дициклогексилкарбодиимида и

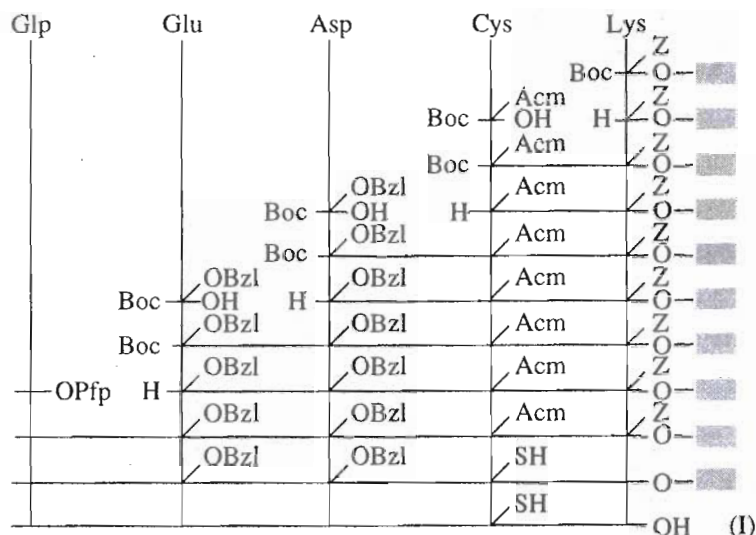


Схема 3.

1-гидроксibenзотриазола был получен некристаллизующийся, полностью защищенный эфир (XIII), который после деблокирования  $\alpha$ -аминогруппы дает целевой продукт (XIV) с выходом 82%. По реакции цезиевой соли производного (XII) с бензилбромидом по методу [17] эфир (XIII) получен в кристаллическом состоянии с выходом 80%, а из него продукт (XIV) с общим выходом около 75%. Наконец, третий путь (получение полностью защищенного эфира (XIII) исходя из соединения (XII) и бензилбромида в присутствии карбоната калия и бромида тетрабутиламмония с последующим удалением  $N^\alpha$ -защитной группы) позволяет получить продукт (XIV) с выходом около 90% и представляет собой, таким образом, наиболее эффективный способ его наработки.

По схеме 1 на всех последовательных стадиях были получены кристаллические защищенные димерные пептиды цистина с выходами 95, 75, 75 и 54%. Суммарный выход димерного пентапептида (VI) составил, таким образом, 22,7%. После деблокирования этого пептида трифторметансульфо кислотой в трифторуксусной кислоте в присутствии диэтилсульфида и *m*-крезола [18] продукт (II) очищали на сефадексе G-25 в 10% уксусной кислоте. Фракции, дающие положительную реакцию на дисульфидную группу [19] при тестировании на 96-ячеечных планшетах, лиофилизовали, растворяли в воде и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой. Элюция градиентом концентрации NaCl в воде дала четыре фракции, содержащие дисульфидные производные, которые были обессолены на сефадексе G-25 и лиофилизованы. Их аминокислотный анализ не дал возможности идентифицировать фракцию, содержащую целевой пептид, поэтому было проведено количественное определение содержа-

ния дисульфидных групп во фракциях [19] и определение эквивалента нейтрализации потенциометрическим методом. Оказалось, что пептид (II) находится в первой фракции, рехроматография которой на колонке с обращенной фазой позволила получить пептид (II) с выходом около 13%.

Из двух способов расщепления дисульфидной связи в димере (II) более высокий выход пептида (I) достигнут при восстановлении трифенилфосфином в уксусной кислоте [20, 21] по сравнению с восстановлением меркаптанами [22]: после обессоливания реакционной смеси на сефадексе G-25 в 10% уксусной кислоте выходы составили соответственно 58 и 23%. Количественное содержание пептида в полученном продукте определяли по методу Элмана [23]. Общий выход пептида (I) по схеме 1 составил, таким образом, 2-7%.

По схеме 2 дипептид (VII) и трипептид (VIII) были получены с удовлетворительными выходами. На стадии получения тетрапептида (IX) образовалась сложная смесь продуктов, из которой требуемый пептид был выделен с помощью препаративной ТСХ с выходом всего 26%. Использование других методов конденсации – смешанных ангидридов или активированных эфиров – привело к еще меньшему содержанию пептида (IX) в смеси. Трудности наблюдались и на стадии получения пентапептида (X), выход которого после препаративной ТСХ составил 40%. Деблокирование пептида (X) трифторметансульфо кислотой [18] с последующей очисткой на DEAE-целлюлозе привело к пептиду (XI) с выходом около 50%. Обработка *S*-ацетамидометилпептида (XI) ацетатом ртути в уксусной кислоте при pH 4 привела к смеси димера и мономера, из которой хроматографией на сефадексе G-25 в 10% уксусной кислоте выделен мономерный пентапептид (I)

**Таблица 1.** Ингибирующее влияние синтетического гранулоцитарного кейлона (I) на спонтанную пролиферацию клеток костного мозга крыс (ККМК) и линии U-937. Приведена радиоактивность включенного в клетки [<sup>3</sup>H]тимидина, 10<sup>4</sup> имп/мин (см. "Экспер. часть")

Клетки	Доза пептида (I), мкг/мл						
	0	3	6	12	25	50	100
ККМК	5.05 ± 0.37	4.80 ± 0.28	5.60 ± 0.82	4.6 ± 0.3	3.60 ± 0.43	3.10 ± 0.54*	2.30 ± 0.23*
U-937	3.40 ± 0.25	3.6 ± 0.4	3.30 ± 0.35	3.50 ± 0.43	2.70 ± 0.22	2.40 ± 0.29	1.80 ± 0.23*

\*  $p < 0.01$ .

с выходом 20%; чистота его, по данным ВЭЖХ, была не менее 90%. Известно [9], что образование димера и, как следствие, низкий выход пептида (I) связаны с нестабильностью последнего при pH 4. В связи с этим был изучен альтернативный путь деблокирования меркаптогруппы, заключающийся в обработке пептида (XI) раствором пода в уксусной кислоте [24]. При этом образовался димер (II), восстановление которого трифенилфосфином привело к пептиду (I) с более высоким выходом – около 60%.

Твердофазный синтез по схеме 3 проводили в основном по стандартному методу [25], контролируя полноту замещения аминогрупп с помощью нингидринового теста Кайзера [26] или по реакции с тринитробензолсульфокислотой [27]. Во всех случаях однократное проведение реакции конденсации обеспечивало полное ацилирование аминогрупп. После обработки пептидил-полимера смесью TFMSA-TFA-диэтилсульфид-*m*-крезол [18] и последующей очистки на DEAE-целлюлозе и сефадексе G-25, как описано выше, выход S-ацетамидометилпептида (XI) составил 14% в расчете на первую аминокислоту (лизин), что в 7 раз выше, чем при синтезе по схеме 2. Однако при снятии с пептида (XI) ацетамидометильной группы возникли те же трудности в процессе очистки пептида, что были отмечены при обсуждении схемы 2.

Мы предположили, что в случае освобождения меркаптогрупп пептида, закрепленного на полимере, ограничение подвижности пептидных цепей создаст гораздо меньше возможностей для замыкания дисульфидных связей, чем в растворе. Обработка пептидил-полимера ацетатом ртути в смеси водной уксусной кислоты и диметилформамида привела к отщеплению защитной грушцы. После отмывки избытка реагента меркапид-полимер обрабатывали раствором меркаптоэтанола или дитиотреята в DMF и отмывали избыточный меркаптан. В результате полимер давал положительную качественную реакцию на меркаптаны с реагентом Элмана. Попытка количественного определения меркаптогрупп на полимере не увенчалась успехом, вероятно, из-за неясности взаимодействия с аналитическим реагентом.

При отщеплении SH-пептида (I) от полимера в условиях, предложенных в работе [18], нами получен неочищенный пептид (I) с выходом 80% в расчете на исходный лизил-полимер. Его последовательная очистка на сефадексе G-25 в 10% уксусной кислоте и на колонке с обращенной фазой RP-8 в градиенте метанола в 0.1% TFA (0 → 20%) позволила получить пептид (I) с выходом 30% в расчете на лизил-полимер. Содержание основного вещества в продукте составило, по данным ВЭЖХ, не менее 92%. Таким образом, твердофазный способ синтеза пептида (I), предусматривающий удаление S-ацетамидометильной защиты перед отщеплением пептида от полимера, представляет собой наиболее рациональный путь наработки препарата высокого качества.

При комнатной температуре пептид (I) теряет свою активность в течение нескольких часов. Поэтому для его стабилизации использовали кальций-динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, в присутствии которой препарат может храниться не менее 1 мес. при 4°C и 6 мес. при -70°C.

Биологическая активность пептида (I) проверена в опытах *in vitro* по его влиянию на спонтанную пролиферацию клеток костного мозга крыс и клеток перевиваемой миеломоноцитарной линии человека U-937 при их краткосрочном (6 и 18 ч соответственно) культивировании с пептидом. Степень пролиферации оценивали по включению в клетки [<sup>3</sup>H]тимидина. Приведенные в табл. 1 данные показывают, что в дозах более 25 мкг/мл ( $4 \times 10^{-8}$  M) пептид оказывает ингибирующий эффект, замедляя в 2 раза пролиферацию клеток гранулоцитарного ряда.

Особый интерес представляют данные по ингибированию пролиферации миелоидных клеток костного мозга больных хроническим миелолейкезом (ХМЛ). При долгосрочном (7 сут) культивировании в агаре пептид (I) в 5 - 20 раз угнетал образование колоний, кластеров и агрегатов клеток-предшественников, причем эффект носил дозозависимый характер. В то же время пролиферация миелоидных клеток костного мозга здоровых доноров ингибировалась на 15 - 25%.

В краткосрочной культуре клеток костного мозга больных (18-часовая инкубация) значимое ингибирование пролиферации (на 20 - 70%) под действием пептида (I) отмечалось в 63% случаев. Этот результат хорошо согласуется с приведенными выше данными для клеток костного мозга крыс и миелоидных клеток U-937. При изучении влияния препарата на клетки периферической крови больных ХМЛ ингибирование пролиферации отмечено в 81% случаев, при колебании степени ингибирования от 10 до 93% и малой зависимости этой величины от дозы препарата. Это позволяет предположить, что у исследованных пациентов лейкозные клетки находятся в различных стадиях клеточного цикла. Так, увеличение содержания клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, снижает эффективность действия GIF, и наоборот.

Таким образом, пептид (I) оказывает значительное ингибирующее воздействие на клетки костного мозга больных ХМЛ и умеренное - на клетки периферической крови. Высокая селективность действия по сравнению с традиционными цитостатиками говорит в пользу перспективности применения синтетического пептида (I) при лечении миелопролиферативных заболеваний.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные L-аминокислот (Fluka). Температуры плавления определяли в открытом капилляре. Чистоту полученных пептидов контролировали с помощью ТСХ на готовых пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Merck, ФРГ) в следующих системах растворителей: хлороформ-этанол, 9 : 1 (А), хлороформ-этанол, 20 : 1 (Б), этилацетат-гексан-этанол, 2 : 2 : 1 (В), хлороформ-ацетон-метанол, 15 : 4 : 1 (Г), хлороформ-метанол-уксусная кислота, 17 : 2 : 1 (Д). Вещества на хроматограммах обнаруживали под ультрафиолетовым освещением при 254 нм, а также визуально после выдерживания в парах соляной кислоты с последующим опрыскиванием нингидриновым реагентом и нагреванием при 110°C. Кроме того, пептиды, содержащие цистеин и цистин, обнаруживали опрыскиванием раствором 2-нитро-5-(S-сульфо)тио-бензоата натрия [28]. Для очистки пептидов использовали препаративные пластинки с силикагелем (Merck, ФРГ).

Анализ пептидов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ проводили на приборе Spectraphysics SR 8000 в следующих условиях: колонка 4,5 × 2,50 мм, носитель - Zorbax ODS, элюция 0.1% раствором трифторуксусной кислоты в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 10%, скорость потока 2 мл/мин, детекция при 220 нм. Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Alpha-Plus (Pharmacia, Швеция) после гидролиза 6 н. соляной кислотой при 110°C

в течение 24 ч; пептиды (I) и (II) гидролизovali с добавлением 0.2% фенола в атмосфере азота. Удельное оптическое вращение измеряли на спектрополяриметре PEPOI-60 (Bellingham & Stanley, Англия).

Полученные экспериментально данные элементарного анализа совпадали с вычисленными значениями.

Диметилформамид (отечественного производства) хранили над молекулярными ситами 0.4 нм и использовали не перегоняя. 1-Гидроксibenзо-триазол (Fluka, Швейцария) перед использованием высушивали в вакууме над КОН и P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Хлористый метилен перегоняли над K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Триэтиламин (Fluka) и N-метилморфолин (Koch-Light, Англия) выдерживали над КОН и перегоняли над нингидрином.

**Стандартные процедуры обработки пептидов при синтезе в растворе.** а) После завершения реакции получения полностью защищенного пептида в реакционную массу добавляли несколько капель уксусной кислоты, перемешивали 30 мин, фильтровали от дихлоргексилмочевины, фильтрат разбавляли пятикратным объемом этилацетата и органический слой последовательно промывали 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, насыщенным раствором NaCl, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и снова насыщенным раствором NaCl, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отгоняли растворитель в вакууме. Остаток подвергали дальнейшей очистке.

б) Для удаления Вос-защиты защищенный пептид растворяли или суспендировали в хлористом метиле и добавляли равный объем трифторуксусной кислоты. Через 1 ч при 20°C раствор упаривали в вакууме при температуре не выше 30°C или осаждали продукт эфиром; после завершения кристаллизации продукт отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали в вакууме над КОН.

**Процедура твердофазного синтеза (ТФСФ).** Использовали хлорметилированный сополимер стирола с 1% дивинилбензола (Fluka) с содержанием хлора 0.68 мэкв/г. С-Концевую аминокислоту присоединяли к полимеру по методу [29]. Полученный аминоацил-полимер содержал 0.3 мэкв/г лизина. Синтез пептида (I) проводили на 1 г полимера в ручном варианте [25] карбодимидным методом по протоколу, представленному в табл. 2.

**Woc-Lys(Z)-OBzl (XIII).** К раствору 6.78 г (17.8 ммоль) Woc-Lys(Z)-OH (XII) в 30 мл DMF добавляли 2.95 г (21.4 ммоль) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.12 мл (17.8 ммоль) бензилбромид и 0.58 г (1.78 ммоль) тетрабутиламмонийбромид. Смесь перемешивали 5 ч при комнатной температуре, контролируя протекание реакции по ТСХ. По окончании реакции разбавляли раствор 300 мл воды, экстрагировали этилацетатом (3 × 100 мл), промывали по стандартной процедуре (а), высушивали и упаривали

Таблица 2. Протокол синтеза пептидов

№ п.п.	Состав реагентов	Время обработки, мин	Количество реагента, мл
1	50% TFA в CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2	8
2	То же	30	8
3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6 × 1 - 2	10
4	5% триэтиламина в CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3 × 2	8
5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6 × 1 - 2	10
6	Вос-аминокислота (3 экв.) + DCC (3 экв.) + НОВТ (3 экв.)	120	6 - 8
7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6 × 1 - 2	10
8	Тест на содержание остаточных аминокислот		

в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из метанола. Выход 7.96 г (95%), т. пл. 54 - 56°C,  $[\alpha]_D -7.4^\circ$  (с 1, CHCl<sub>3</sub>).

**HCl · H-Lyz(Z)-OBzl (XIV).** К раствору 4.3 г (9.2 ммоль) соединения (XIII) в 24 мл этилацетата добавляли 28 мл насыщенного раствора HCl в этилацетате. Выдерживали 1 ч при 20°C и разбавляли 400 мл эфира. Продукт отделяли фильтрованием, промывали эфиром и высушивали в вакууме. Выход 3.46 г (93%), т. пл. 128 - 130°C,  $[\alpha]_D -17.7^\circ$  (с 1, CHCl<sub>3</sub>).

**(Woc-Cys-Lys(Z)-OBzl)<sub>2</sub> (III).** К раствору 4.41 г (10 ммоль) Вос-цистина и 8.13 г (20 ммоль) производного (XIV) в 50 мл DMF, охлаждаемому льдом, добавляли 2.8 мл (20 ммоль) триэтиламина, 2.7 г (20 ммоль) НОВТ и 4.32 г (20.9 ммоль) DCC. Перемешивали 30 мин в ледяной бане и 3 ч при 20°C, а затем подвергали стандартной обработке (а). Остаток после упаривания растворителя перекристаллизовывали из смеси этилацетата с гексаном. Продукт индивидуален по данным ТСХ в системах А и В. Выход 10.85 г (95%), т. пл. 153 - 154°C,  $[\alpha]_D +21.4^\circ$  (с 1, CHCl<sub>3</sub>).

**(Woc-Asp(OBzl)-Cys-Lys(Z)-OBzl)<sub>2</sub> (IV).** К суспензии 7.0 г (6.12 ммоль) пептида (III) в 30 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> добавляли 30 мл TFA, через 1 ч при 20°C разбавляли 60 мл эфира и выдерживали 2 ч при 5°C. После стандартной обработки (б) выход продукта составил 5.4 г (75%). Полученный трифторацетат пептида (5.33 г, 4.6 ммоль) и 6 г (9.19 ммоль) Вос-Asp(OBzl)-ОН растворяли в 20 мл DMF, охлаждали льдом и добавляли 1.28 мл (9.19 ммоль) триэтиламина, 1.24 г (9.2 ммоль) НОВТ и 2.08 г (9.2 ммоль) DCC. Перемешивали 30 мин в ледяной бане, 3 ч при 20°C и затем подвергали стандартной обработке (а). Маслообразный остаток заливали эфиром и оставляли на ночь при 5°C. Кристаллический продукт отфильтровывали,

промывали эфиром и сушили. Выход 5.8 г (81%), т. пл. 87 - 91°C. Индивидуален при ТСХ в системах А и В.  $[\alpha]_D +5.6^\circ$  (с 1, CHCl<sub>3</sub>).

**(Woc-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Cys-Lys(Z)-OBzl)<sub>2</sub> (V).** По стандартной процедуре (б) проводили деблокирование 2.5 г (1.61 ммоль) пептида (IV) в 16 мл 50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и остаток после упаривания растирали с эфиром, отфильтровывали и высушивали в вакууме. Выход трифторацетата 2.48 г (97%). Его растворяли в 18 мл DMF, добавляли 1.81 г (3.48 ммоль) Вос-Glu(OBzl)-ОН · DCNA, охлаждали в ледяной бане, добавляли 0.47 г (3.48 ммоль) НОВТ и затем 0.79 г (3.48 ммоль) DCC. Перемешивали 30 мин при охлаждении льдом и 3 ч при 20°C, проводили стандартную обработку (а) и упаривали. Остаток растирали со смесью эфира и петролейного эфира (1 : 1), продукт отфильтровывали, промывали петролейным эфиром и высушивали в вакууме. Выход 2.62 г (75%), т. пл. 90 - 102°C,  $[\alpha]_D -10.1^\circ$  (с 0.8, CHCl<sub>3</sub>). Продукт индивидуален по данным ТСХ в системах А и В и не требует дополнительной перекристаллизации. Аминокислотный состав: Asp 1.00 (1), Glu 1.07 (1), Cys 1.02 (1), Lys 1.09 (1).

**(Glp-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Cys-Lys(Z)-OBzl)<sub>2</sub> (VI).** По стандартной процедуре (б) из 2.62 г (1.31 ммоль) пептида (V) обработкой 13 мл 50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> получали 2.30 г (86%) трифторацетата деблокированного пептида. Растворяли 2.02 г (1.0 ммоль) этого продукта в 10 мл DMF и добавляли 0.59 г (2.0 ммоль) пентафторфенилового эфира пироглутаминовой кислоты [30] и 0.56 мл (4.0 ммоль) триэтиламина, перемешивали 4 ч при 20°C, после чего проводили стандартную обработку (а). Полученный пептид растирали с эфиром, фильтровали, промывали эфиром, высушивали и перекристаллизовывали из этанола. Выход 1.08 г (54%), т. пл. 138 - 142°C,  $[\alpha]_D -21.6^\circ$  (с 1, CHCl<sub>3</sub>). Индивидуален по данным ТСХ в системах А, В и Д. Аминокислотный состав: Asp 1.12 (1), Glu 1.92 (2), Cys 1.09 (1), Lys 1.00 (1).

**Woc-Cys(Acm)-Lys(Z)-OBzl (VII).** Раствор 0.41 г (1.0 ммоль) HCl · H-Lyz(Z)-OBzl, 0.33 г (1.0 ммоль) Вос-Cys(Acm)-ОН, 0.11 мл (1.0 ммоль) N-метилморфолина и 0.14 г (1.0 ммоль) НОВТ в 3 мл DMF охлаждали до 0°C и добавляли 0.25 г (1.2 ммоль) DCC. Перемешивали 3 ч при 20°C, проводили стандартную обработку (а) и продукт растирали с эфиром. Выход 0.45 г (70%), т. пл. 112 - 117°C. После перекристаллизации из бензола с эфиром т. пл. 117 - 120°C,  $[\alpha]_D +4.8^\circ$  (с 1, CHCl<sub>3</sub>). Продукт индивидуален при ТСХ в системах А и Г.

**Woc-Asp(OBzl)-Cys(Acm)-Lys(Z)-OBzl (VIII).** К раствору 2.56 г (3.97 ммоль) пептида (VII) в 10 мл этилацетата добавляли 12 мл насыщенного раствора HCl в этилацетате и выдерживали 1 ч при 4°C. Растворитель декантировали, остаток

растирали с эфиром и после кристаллизации отделяли фильтрованием, промывали эфиром и высушивали. Выход деблокированного пептида 1.99 г (86%). Раствор 0.33 г (0.58 ммоль) полученного продукта, 0.19 г (0.58 ммоль) Вос-Asp(OBzl)-OH, 0.06 мл (0.58 ммоль) N-метилморфолина и 0.08 г (0.575 ммоль) НОВТ в 5 мл DMF охлаждали до 0°C, добавляли 0.13 г (0.58 ммоль) DCC и перемешивали 2 ч при 20°C. После обычной обработки получали 0.39 г (79%) пептида с т. пл. 88 - 92°C. После перекристаллизации из смеси этанола с эфиром и гексаном получили продукт с т. пл. 92 - 93°C,  $[\alpha]_D -9.1^\circ$  (с 0.84, CHCl<sub>3</sub>). Продукт индивидуален по данным ТСХ в системах А и Г.

**Вос-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Cys(Acm)-Lys(Z)-OBzl (IX).** К раствору 0.35 г (0.41 ммоль) пептида (VIII) в 1 мл этилацетата добавляли 1.26 мл насыщенного раствора HCl в этилацетате и выдерживали 40 мин при 20°C и 20 мин при 4°C. Раствор разбавляли 15 мл эфира, верхний слой декантировали, а нижний растирали с эфиром и после кристаллизации отделяли фильтрованием, промывали эфиром и высушивали; выход хлоргидрата пептида 0.31 г (95%). Полученный продукт растворяли в 3 мл DMF, добавляли 0.26 г (0.49 ммоль) Вос-Glu(OBzl)-OH · DCHA, 0.07 г (0.49 ммоль) НОВТ и после охлаждения до 0°C 0.10 г (0.49 ммоль) DCC, перемешивали 2 ч при 20°C. После стандартной обработки (а) получали 0.34 г кристаллического продукта, который подвергали препаративной ТСХ в системе Б. После перекристаллизации из водного метанола выход 0.16 г (26%), т. пл. 95 - 97°C,  $[\alpha]_D -18.7^\circ$  (с 0.6, CHCl<sub>3</sub>).

**Glp-Glu(Bzl)-Asp(OBzl)-Cys(Acm)-Lys(Z)-OBzl (X).** Деблокированием 0.36 г (0.34 ммоль) пептида (IX) по стандартной процедуре (б) 2 мл 50% раствора TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> получали с выходом 0.30 г (82%) трифторацетат пептида. Продукт растворяли в 2 мл DMF, добавляли 0.09 мл (0.66 ммоль) триэтиламина и 0.10 г (0.33 ммоль) Glp-OPfp [30]. Раствор перемешивали 16 ч при 20°C, разбавляли этилацетатом и проводили стандартную обработку (а). Получали 0.29 г нерастворимого в эфире продукта (X), который очищали препаративной ТСХ в системе А и кристаллизовали из смеси этилацетата с гексаном. Выход 0.12 г (40%), т. пл. 139 - 144°C,  $[\alpha]_D -20.5^\circ$  (с 0.51, CHCl<sub>3</sub>).

**Glp-Glu-Asp-Cys(Acm)-Lys-OH (XI).** а) Растворяли 200 мг (0.099 ммоль) защищенного пептида (X) в 5 мл смеси TFMSA-TFA-диэтилсульфид-*m*-крезол (1 : 5 : 3 : 1) и выдерживали 4 ч при 0°C. Разбавляли 120 мл эфира, осадок отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали. Продукт хроматографировали на колонке (2 × 47 см) с сефадексом G-25 в 10% уксусной кислоте со скоростью 6 мл/ч. Фракции, содержащие продукт, объединяли, лиофильно высушивали и подвергали хроматографии на колонке (0.7 × 30 см) с DEAE-

целлюлозой DE-52, промытой деионизованной водой. Элюцию проводили в градиенте концентрации NaCl (0 → 0.2 М) со скоростью 18 мл/ч. Вещество, соответствующее основному пику, обессоливали на колонке с сефадексом G-25 в 10% уксусной кислоте и лиофилизовали. Выход 65 мг (49.6%). Индивидуален по данным ВЭЖХ. Аминокислотный состав: Asp 1.0 (1), Glu 1.84 (2), Cys 0.87 (1), Lys 1.12 (1).

б) Суспендировали 1 г пептидил-полимера, полученного по описанной выше процедуре ТФСР, в 20 мл смеси TFMSA-TFA-диэтилсульфид-*m*-крезол (1 : 5 : 3 : 1) и перемешивали 4 ч при 0°C. Полимер отделяли фильтрованием, фильтрат разбавляли 500 мл эфира и выдерживали 1 ч при 5°C. Образовавшийся осадок отделяли, промывали эфиром, высушивали в вакууме, растворяли в 10% уксусной кислоте и лиофилизовали. Продукт подвергали хроматографической очистке, как описано выше в методике "а". Выход 29 мг (14%); по данным ВЭЖХ, идентичен продукту, полученному по методике "а".

**(Glp-Glu-Asp-Cys-Lys-OH)<sub>2</sub> (II).** а) Раствор 100 мг (0.05 ммоль) защищенного пентапептида (VI) в 2 мл 1 М раствора TFMSA в TFA, содержащем 0.1 мл диэтилсульфида, выдерживали 1 ч при 20°C. Добавляли 50 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали и высушивали. Выход 39.6 мг (56%). Пептид подвергали хроматографической очистке на сефадексе G-25 и DEAE-целлюлозе, как описано выше для пептида (X). Фракции, дающие положительную реакцию с 2-нитро-5-(S-сульфо)тиобензоатом натрия [28], обессоливали на сефадексе G-25 в 10% уксусной кислоте и лиофилизовали. Для вещества полученных фракций определяли молекулярную массу спектрофотометрическим методом [19] и путем потенциометрического титрования, а также их аминокислотный состав. Выделение пептида (II) из фракций, отвечающих требуемым для пептида (II) характеристикам, проводили на колонке Lobar A RP-8 (Merck, ФРГ) в градиенте метанола от 0 до 20% в 0.1% TFA. Выход 9.4 мг (13.3%). Индивидуален по данным ВЭЖХ. Аминокислотный состав: Asp 1.0 (1), Glu 1.92 (2), Cys 0.93 (1), Lys 1.01 (1). Молекулярная масса, определенная потенциометрически, 1692, спектрофотометрически - 1555. C<sub>46</sub>H<sub>70</sub>N<sub>12</sub>O<sub>22</sub>S<sub>2</sub>. Вычисленная молекулярная масса 1406.

б) К раствору 20 мг (0.019 ммоль) пептида (XI) в 0.5 мл уксусной кислоты добавляли 0.5 мл 25% раствора иода в уксусной кислоте и перемешивали 2 ч при 20°C. Избыток иода удаляли, добавляя по каплям раствор тиосульфата натрия до слабожелтой окраски. Полученный раствор хроматографировали на колонке (2 × 47 см) с сефадексом G-25 в 10% уксусной кислоте. Получали 15 мг (75%) пептида, идентичного полученному по

методике "а" по данным ВЭЖХ и аминокислотного анализа.

**Glp-Glu-Asp-Cys-Lys-OH (I).** а) Растворяли 14 мг (0.01 ммоль) димерного пептида (II) в 0.5 мл воды, добавляли 15 мг (0.1 ммоль) дитиотреита и перемешивали 15 ч при 20°C. Добавляли 0.5 мл 50% уксусной кислоты. Продукт хроматографировали на сефадексе G-25 так, как описано для пептида (II) (методика "б"). Фракции, дающие положительную реакцию с реагентом Эллмана [23], лиофилизировали и хроматографировали на колонке Lobar A RP-8 так, как описано для пептида (II) (методика "а"). Получено 3 мг (21%) продукта, содержащего, по данным ВЭЖХ, 95% основного вещества. Аминокислотный состав: Asp 0.98 (1), Glu 2.00 (2), Cys 0.67 (1), Lys 1.00 (1). Молекулярная масса, определенная по методике Эллмана, 760.  $C_{23}H_{36}N_6O_{11}S$ . Вычисленная молекулярная масса 704.

б) К раствору 12 мг (9 мкмоль) пептида (II) в 1.2 мл 80% уксусной кислоты добавляли 54 мг (0.658 ммоль) ацетата натрия и 37 мг (0.141 ммоль) трифенилфосфина, продували раствор азотом и перемешивали в атмосфере азота 170 ч при 20°C. Затем раствор фильтровали, осадок промывали 80% уксусной кислотой, а раствор подвергали двухстадийной хроматографии, как описано в методике "а". Выход 7 мг (58%); по данным аминокислотного анализа и ВЭЖХ, идентичен описанному в методике "а".

в) К раствору 13 мг (0.018 ммоль) пептида (XI) в 0.5 мл 0.1 М ацетатного буфера, рН 4, при перемешивании добавляли 6.1 мг (0.019 ммоль) ацетата ртути. Перемешивали 3 ч при 20°C, добавляли 2 мл воды и осаждали ионы ртути сероводородом. Раствор фильтровали, осадок промывали 10% уксусной кислотой. Объединенный с промывками раствор подвергали хроматографической очистке так, как описано в методике "а". Выход 2 мг (15.4%).

г) Суспендировали 400 мг (0.12 ммоль пептида) пептидил (I)-полимера в смеси 4.5 мл DMF и 0.5 мл 1 М уксусной кислоты, содержащей 76.8 мг (0.24 ммоль) ацетата ртути, и встряхивали в течение 2 ч при 20°C. Затем проводили следующие промывки: смесью DMF-вода (9 : 1), DMF (5 × 5 мл по 5 мин), 1% меркаптоэтанол в DMF (5 × 5 мл по 10 мин), DMF (5 × 5 мл по 5 мин),  $CH_2Cl_2$  (5 × 5 мл по 5 мин), этанол (5 × 5 мл по 2 мин). После промывок выполняли пробу на меркаптаны с реагентом Эллмана [23]. По достижении отрицательной реакции полимер высушивали в вакууме и обрабатывали 4 ч при 0°C 5 мл смеси TFA-TFMSA-диэтилсульфид-м-крезол (5 : 1 : 3 : 1). Полимер отфильтровывали, фильтрат разбавляли 120 мл эфира, продукт отфильтровывали, растворяли в 50% уксусной кислоте и обессоливали на сефадексе так, как описано в методике "а". Выход 26 мг (30%);

по данным ВЭЖХ, идентичен продукту, полученному по методикам "а" - "в".

Для стабилизации пептида (I) лиофильно высушенный продукт растворяли в 10% уксусной кислоте, добавляли кальций-динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты [9] и снова лиофилизировали. Продукт расфасовывали в ампулы, которые запаивали в атмосфере азота и хранили при -70°C.

**Ингибирующий эффект** на пролиферацию клеток изучали на 6-часовой культуре клеток костного мозга беспородных крыс и 18-часовой культуре клеток миеломоноцитарной линии человека U-937. Пептид (I) (далее - препарат) в среде Игла в дозах от 3 до 100 мкг/мл вносили в лунки 96-ячеечных планшетов. Затем туда же вносили клетки костного мозга крыс в концентрации  $(2 - 5) \times 10^6$  или клетки линии U-937 в концентрации  $(1.0 - 2.5) \times 10^5$  клеток на 1 мл и инкубировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5%  $CO_2$ . За 4 ч до окончания эксперимента в лунки вносили [ $^3H$ ]тимидин в дозе 2.5 мкКи/мл. Снятие изучаемых проб на фильтры проводили с помощью харвестера. Перед подсчетом включения метки фильтры трехкратно отмывали дистиллированной водой. Пролиферацию клеток оценивали по включению [ $^3H$ ]тимидина.

Подобным же образом изучали ингибирование пролиферации клеток костного мозга и периферической крови больных хроническим миелолейкозом в развернутой стадии заболевания (31 пациент) после 18-часовой инкубации с препаратом. В долгосрочных опытах клетки костного мозга исследовали в культуральной системе "агаровый квадрат" при одновременном внесении клеток (в концентрации  $(2 - 5) \times 10^6$ ) и препарата и инкубировании в течение 7 сут. Величину ингибирования оценивали по изменению числа клеточных агрегатов. В качестве контроля использовали клетки костного мозга 12 здоровых доноров.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кусень С.И., Стойка Р.С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста. М.: Наука, 1985. С. 155, 156.
2. Chalones / Ed. J. Houck. N.Y.: North Holland Publ. Co., 1976.
3. Балаж А., Блажек И. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации. М.: Мир, 1982.
4. Романов Ю.А., Кетлинский С.А., Анохин А.И., Окулов В.Б. Кейлоны и регуляция деления клеток. М.: Медицина, 1984.
5. Paukovits W.R., Laerum O.D. // Z. Naturforsch. 1982. В. 37С. № 11/12. S. 1223 - 1230.
6. Paukovits W.R., Paukovits I.B., Laerum O.D., Hinterberger W. // Int. Res. Commun. System. Med. Sci. 1980. V. 8. P. 305, 306.



7. *Paukovits W.R., Laerum O.D.* // *Z. Physiol. Chem.* 1984. B. 365. № 3. S. 303 - 311.
8. *Paukovits W., Laerum O., Guigon M.* // *Cell Proliferation. Serono Symposium. V. 34* / Eds R. Baserga et al. N.Y.: Raven Press, 1986. P. 111 - 119.
9. *Paukovits W.R., Laerum O.D., Paukovits J.B., Guigon M., Schanche J.S.* // *The Inhibitors of Hematopoiesis. Colloque INSERM. V. 162* / Eds A. Najman et al. L.: J. Lifley Eurotext Ltd, 1987. P. 31 - 42.
10. *Eriksen J.A., Schanche J.S., Hestdal K., Jakobsen S.E., Tveteraas T., Johansen J.H., Paukovits W.R., Laerum O.D.* // *The Inhibitors of Hematopoiesis. Colloque INSERM. V. 162* / Eds A. Najman et al. L.: J. Lifley Eurotext Ltd, 1987. P. 51 - 54.
11. *Laerum O.D., Paukovits W.R.* // *The Inhibitors of Hematopoiesis. Colloque INSERM. V. 162* / Eds A. Najman et al. L.: J. Lifley Eurotext Ltd, 1987. P. 24 - 30.
12. *Laerum O.D., Paukovits W.R.* // *Exptl Hematol.* 1984. V. 12. № 1. P. 7 - 17.
13. *Solesvik O.V.* // *Итоги науки и техники. Иммунология.* 1988. № 26. С. 96 - 100.
14. *Laerum O.D.* // *Итоги науки и техники. Иммунология.* 1988. № 26. С. 93 - 96.
15. *Guigon M., Paukovits W.R.* // *Итоги науки и техники. Иммунология.* 1988. № 26. С. 206 - 212.
16. *Weber H.* // *Z. Naturforsch.* 1976. B. 31B. S. 1157 - 1158.
17. *Wang S.S., Gisin B.F., Winter D.P., Makofske R., Kulesha J.D., Tzougraki C., Meienhofer J.* // *J. Org. Chem.* 1977. V. 42. № 8. P. 1286 - 1290.
18. *Tam J.P., Heath W.F., Merrifield R.B.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1986. V. 108. № 17. P. 5242 - 5251.
19. *Thannhauser T.N., Konishi Y., Sheraga H.* // *Analyt. Biochem.* 1984. V. 138. № 1. P. 181 - 188.
20. *Куликов С.В., Соколова Н.Ю., Самарцев М.А.* // *Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов. Тез. докл. Таллин, 1987. С. 200.*
21. *Moroder L., Gemeiner M., Goehring W., Jaeger E., Thamm P., Wuensch E.* // *Biopolymers.* 1981. V. 20. № 1. P. 17 - 37.
22. *Satoe H., Walter R.* // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1973. V. 5. № 4. P. 283.
23. *Ellman J.L.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1959. V. 82. № 1. P. 70 - 77.
24. *Atherton E., Sheppard R.C., Ward P.* // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1985. № 10. P. 2065 - 2073.
25. *Стюарт Дж., Янг Дж.* *Твердофазный синтез пептидов: Пер. с англ. М.: Мир, 1976. С. 176.*
26. *Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I.* // *Analyt. Biochem.* 1970. V. 34. № 2. P. 595 - 598.
27. *Perlman M.O.* // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1987. V. 30. № 2. P. 153 - 162.
28. *Куликов С.В., Самарцев М.А.* // *Химия природн. соедин.* 1987. № 4. С. 613, 614.
29. *Gisin B.F.* // *Helv. chim. acta.* 1973. V. 50. № 5. P. 1476 - 1482.
30. *Лысогорская Е.Н., Филиппова Н.Ю., Бойцова С.Е., Оксенойт Е.С., Люблинская Л.А., Степанов В.М.* // *Биоорган. химия.* 1983. Т. 9. № 4. С. 470 - 477.

## Granulopoiesis Inhibiting Factor: Synthesis and Biological Activity

**S. V. Kulikov\*,<sup>1</sup> E. B. Leonova\*, N. M. Kalinina\*, M. A. Samartsev\*,  
L. N. Bubnova\*\*, T. V. Glazanova\*\*, I. E. Pavlova\*\*, and S. A. Ketlinskii\***

\* *Institute of Highly Pure Biopreparations, ul. Pudozhskaya 7, St. Petersburg, 197110 Russia*

\*\* *St. Petersburg Research Institute of Hematology and Transfusion, St. Petersburg, Russia*

**Abstract** – Three schemes of synthesis for pentapeptide Glp-Glu-Asp-Cys-Lys-OH were compared was carried out. Acetamidomethyl protection was used for the mercapto group of cysteine. For the same purpose, cystine was used as the starting compound for synthesis. The optimal method was shown to be the solid phase method with S-acetamidomethyl cysteine protection that can be removed by mercuric acetate before the cleavage of a peptide from a polymer. The stabilized peptide inhibits proliferation of bone marrow cells of patients with chronic myeloleukemia 5- to 20-fold and has a less pronounced effect (up to 2-fold inhibition) on peripheral blood cells. Thus, its application for the therapy of hemoblastoses is promising.

*Key words: granulopoiesis inhibiting factor, solid phase peptide synthesis, cysteine-containing pentapeptide.*

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