



УДК 577.175.82.05+612.112.94

ВЛИЯНИЕ SH-ГРУППЫ МИЕЛОПЕПТИДА МП-3 НА ЕГО МАКРОФАГСТИМУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2001 г. Л. А. Фони́на^{*,#}, М. И. Балдин^{**}, М. А. Ефремов^{*}, С. А. Гурьянов^{*}, Р. Г. Белевская^{*}

^{*}Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/110;

^{**}НИИ экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного
комплекса МЗ РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

Поступила в редакцию 26.01.2001 г. Принята к печати 11.03.2001 г.

Изучена фагоцитозстимулирующая способность синтетического пептида МП-3, идентичного костно-мозговому пептиду МП-3 (Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln), его Val³- и Ser³-аналогов и аналога, димеризованного за счет замыкания S–S-связи. Пептиды синтезированы классическими методами пептидной химии в растворе. Показано, что только пептид МП-3 стимулирует фагоцитарную активность макрофагов и, таким образом, выявлена ключевая роль SH-группы пептида МП-3 в проявлении им данной активности. Димерный аналог МП-3, в отличие от димерных аналогов других моноцистеинсодержащих пептидов – глутатиона и HP5b, не обладает ингибирующим эффектом.

Ключевые слова: МП-3, аналоги; цистеин, синтез, фагоцитоз.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что клетки костного мозга, одного из центральных органов иммунной системы, продуцируют группу биологически активных пептидов – миелопептидов (МП), влияющих на различные популяции иммунокомпетентных клеток [1]. В последние годы из супернатанта культуры клеток костного мозга свиньи было выделено и идентифицировано несколько индивидуальных МП [2]. Изучение функциональной активности МП показало, что каждый из них обладает биологической активностью, направленно действуя на определенный тип иммунокомпетентных клеток [3]. Так, пептид МП-1 (Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr) обладает иммунокорректирующим эффектом при иммунодефицитах различного генеза [4, 5]. Пептид МП-2 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp) способен восстанавливать нарушенную под действием лейкозных клеток функциональную активность Т-лимфоцитов человека и обладает противоопухолевым эффектом [6]. Пептид МП-3 (Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln) оказывает стимулирующее действие на фагоцитоз макрофагов, проявляя выраженный протективный эффект при заражении животных патогенными штаммами микроорганизмов [7].

МП-1–МП-3 – гексапептиды, содержащие преимущественно гидрофобные аминокислотные ос-

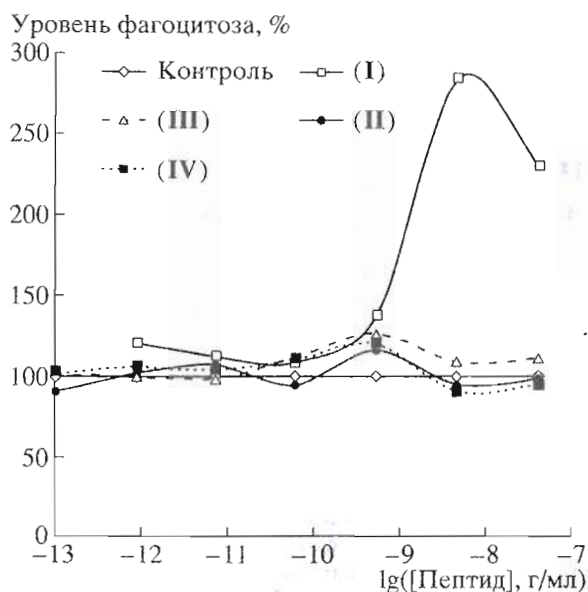
татки; а в пятом положении – остаток пролина. Пептиды МП-2 и МП-3 отличаются лишь двумя аминокислотными остатками (в положениях три и шесть). При достаточно близкой структуре пептиды МП-1–МП-3 проявляют специфическую иммунорегуляторную активность, воздействуя на разные звенья иммунитета и вызывая принципиально разные биологические эффекты [3]. Для выяснения причин их столь различного поведения необходимы синтез и изучение биологических и физико-химических свойств самих пептидов и их аналогов. Данная работа посвящена синтезу и изучению биологических свойств пептида МП-3 и его аналогов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пептид МП-3, обладающий способностью усиливать функциональную активность системы мононуклеарных макрофагов [7], содержит один остаток цистеина, что крайне редко встречается в эндогенных биорегуляторных пептидах. Известно два эндогенных пептида, содержащих в своем составе по одному остатку цистеина – глутатион [8] и пептид HP5b [9]. Оба этих пептида участвуют в регуляции гранулоцитоза: мономеры со свободной SH-группой подавляют гранулоцитоз, а их окисленные формы, димеры, стимулируют этот процесс, усиливая выработку гранулоцитмакрофаг колониестимулирующего фактора [8, 10]. Очевидно, что SH-группа играет решающую роль в реализации функциональной активности этих пептидов. Известно также, что ряд пептидов, не содержащих в

Сокращения: МП – миелопептид; НОВТ – *N*-гидроксibenзотриазол; ДСС – *N,N'*-дициклогексилкарбодимид; HOSu – *N*-гидроксисукцинимид; ONp – *n*-нитрофенокси.

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



Уровень фагоцитоза эритроцитов барана перитонеальными макрофагами мыши в присутствии пептидов (I)–(IV) и в их отсутствие (контроль).

своем составе цистеина (тафцин, вещество P, нейротензин), также проявляют фагоцитозстимулирующий эффект, но, в отличие от МП-3, данный эффект наблюдается только на активированных, например, тиогликолятобработанных перитонеальных макрофагах. Следует отметить, что для этих пептидов на поверхности макрофагов выявлены специфические рецепторы [11].

Для выявления влияния SH-группы пептида МП-3 на проявление им специфической биологической активности был синтезирован исходный пептид (I) и его димерный аналог (IV), а также два аналога МП-3, в которых остаток цистеина в третьем положении замещен на другие аминокислотные остатки Val (II) и Ser (III).

Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln (I), МП-3

Leu-Val-Ser-Tyr-Pro-Gln (II)

Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Gln (III)

Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln

Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln (IV)

Пептиды синтезировали классическими методами пептидной химии, наращивая пептидную цепь с N-конца карбодиимидным методом или методом активированных эфиров. Для защиты аминогрупп использовали Z- и Boc-защитные группы, SH-группу цистеина блокировали Acm-защитной группой, OH-группу серина превращали в Bu^t-эфирную. Димерный аналог (IV) получали окислением SH-групп перекисью водорода, контролируя процесс окисления методами Элмана и аналитической ВЭЖХ. Контроль за ходом реакций на промежуточных стадиях синтеза осуществляли с помощью хроматографии в тонком

слое силикагеля. Выделение целевых и промежуточных пептидов проводили методом препаративной ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой. Целевые пептиды (I)–(IV) охарактеризованы данными аналитической ВЭЖХ, их структура подтверждена секвенированием.

Влияние МП-3 и его аналогов на функциональную активность перитонеальных макрофагов мышей изучали с помощью НСТ*-теста [12], в качестве корпускулярного антигена использовали опсонизированные эритроциты барана. Исследуемые пептиды добавляли либо вместе с макрофагами, либо при добавлении опсонизированных эритроцитов барана. Эксперименты проводили в широком диапазоне концентраций пептидов (1×10^{-7} – 1×10^{-13} г/мл). Контролем служил естественный фагоцитоз макрофагов (без добавления пептидов). Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета компьютерных программ Statgraphics.

Показано (рисунок), что в дозах 1×10^{-8} – 1×10^{-7} мг/мл исходный пептид МП-3 (I) стимулировал функциональную активность перитонеальных макрофагов мышей, вызывая усиление фагоцитоза опсонизированных эритроцитов барана на 180%. Для остальных исследованных аналогов в подобном диапазоне концентраций уровень фагоцитоза не превышал контрольного показателя.

Димерный аналог (IV) не оказывал также ингибирующего действия на функциональную активность макрофагов, т.е. не обладал оппозитным эффектом, характерным для димерных аналогов глутатиона [8] и геморегуляторного пептида HP5b [10].

Таким образом, результаты изучения пептида МП-3 и его аналогов, не содержащих SH-группу, четко свидетельствуют о том, что наличие у данного пептида свободной SH-группы важно для проявления им фагоцитозстимулирующей активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия; Fluka, Швейцария) или полученные по стандартным методикам. Индивидуальность синтезированных соединений контролировали методом ТСХ на хроматографических пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в следующих системах растворителей: хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 60 : 45 : 20 (А); хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 5 : 3 : 1 (Б); хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 15 : 4 : 1 (В); *n*-бутанол–уксусная кислота–вода, 3 : 1 : 1 (Г); хлороформ–метанол–уксусная кислота, 9 : 1 : 0.5 (Д); хлороформ–метанол, 9 : 1 (Е).

Аналитическую ВЭЖХ проводили с использованием хроматографической системы CL-10Avr

* НСТ – нитро-синий тетразолиний.

(Shimadzu, Япония) на колонке Ультрасфера C18 (4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте (0–80%, 32 мин). Скорость элюции 1.6 мл/мин, детектирование осуществляли при длине волны 214 нм.

Препаративную ВЭЖХ конечных и промежуточных пептидов выполняли на колонке (50 × 250 мм) Диасорб С 16-Т в градиенте буфера В в буфере А (10–50%, 120 мин; буфер А – 0.01 н. CH₃COONH₄, буфер В – 80% ацетонитрила в буфере А). Скорость потока 50 мл/мин, детекция при 226 нм. Фракции, соответствующие главному пику, объединяли, ацетонитрил упаривали, полученный раствор разбавляли водой и лиофилизировали.

H-Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln-OH (I)

Z-Pro-Gln-OBu'. К раствору 20.23 г (100 ммоль) H-Gln-OBu', 24.93 г (100 ммоль) Z-Pro-OH и 4.05 г (30 ммоль) НОВТ в 500 мл этилацетата, охлажденному до –20°C, при перемешивании добавляли 21.63 г (105 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при +4°C. Образовавшийся осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат промывали последовательно насыщенным раствором NaHCO₃ (2 × 200 мл), водой (1 × 200 мл), 5% раствором H₂SO₄ (1 × 200 мл) и водой до нейтральной реакции. Органический раствор упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при 20°C. Выход после ВЭЖХ 19.9 г (66.5%). R_f 0.77 (B), 0.52 (D), 0.48 (E).

Z-Tyr-Pro-Gln-OBu'. Раствор 19.9 г (66.5 ммоль) Z-Pro-Gln-OBu' в 300 мл этанола выдерживали в атмосфере водорода над 10% Pd/C до исчезновения исходного пептида (контроль ТСХ). Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 200 мл DMF и прибавляли 20.95 г (66.5 ммоль) Z-Tyr-OH, 3.45 г (30 ммоль) HONSu. Полученный раствор охлаждали до –20°C и прибавляли 14.38 г (69.8 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при +4°C. Образовавшийся осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 500 мл этилацетата и полученный раствор промывали последовательно насыщенным раствором NaHCO₃ (2 × 200 мл), водой (1 × 200 мл), 5% раствором H₂SO₄ (1 × 200 мл), водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при 20°C. Выход после ВЭЖХ 33.12 г (83%). R_f 0.47 (D), 0.75 (B), 0.42 (E).

Woc-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OBu'. Раствор 33.12 г (55.3 ммоль) Z-Tyr-Pro-Gln-OBu' в 300 мл этанола выдерживали в атмосфере водорода над 10% Pd/C до исчезновения исходного пептида по ТСХ. Ка-

тализатор отфильтровывали, фильтрат концентрировали в вакууме. Маслообразный остаток растворяли в 200 мл DMF и к этому раствору прибавляли 20.65 г (50 ммоль) Woc-Cys(Acm)-ONp. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C. К образовавшейся суспензии прибавляли 300 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили на воздухе при 20°C. Выход пептида после ВЭЖХ 26.51 г (64.5%). R_f 0.3 (D), 0.3 (B), 0.2 (E).

H-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OH × TFA. Раствор 26.51 г (32.2 ммоль) Woc-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OBu' в 150 мл TFA выдерживали 1 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили в эксикаторе над КОН. Выход после ВЭЖХ 20.15 г (89%). R_f 0.45 (A), 0.45 (Г), 0.3 (B).

Woc-Val-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OH. К раствору 20.15 г (28.8 ммоль) H-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OH × TFA и 1.35 г (10 ммоль) НОВТ в 200 мл DMF при перемешивании прибавляли 6.66 мл (60 ммоль) N-метилморфолина и 9.07 г (28.8 ммоль) Woc-Val-ONSu. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C и упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 300 мл n-бутанола и раствор промывали 5% раствором H₂SO₄ (1 × 200 мл) и водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, полученный маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при 20°C. Выход пептида после ВЭЖХ 18.17 г (79.9%). R_f 0.75 (Г), 0.65 (B), 0.2 (B).

H-Val-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OH × TFA. Раствор 18.17 г (23 ммоль) Woc-Val-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OH в 150 мл TFA выдерживали в течение 1 ч при 20°C. Реакционную смесь концентрировали, маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили в эксикаторе с КОН. Выход после ВЭЖХ 17.5 г (95.6%). R_f 0.45 (A), 0.45 (Г), 0.3 (B).

Woc-Leu-Val-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OH. К раствору 17.5 г (22 ммоль) H-Val-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OH × TFA в 200 мл DMF прибавляли 0.94 г (7 ммоль) НОВТ, 4.9 мл (44 ммоль) N-метилморфолина и 7.22 г (22 ммоль) Woc-Leu-ONSu. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C и концентрировали. Маслообразный остаток растворяли в 300 мл n-бутанола и промывали 5% раствором H₂SO₄ (1 × 200 мл) и водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, полученный осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при 20°C. Выход после ВЭЖХ 17.5 г (95%). R_f 0.65 (B), 0.25 (B), 0.8 (Г).

H-Leu-Val-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OH × TFA. Раствор 17.5 г (21 ммоль) Woc-Leu-Val-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OH в 150 мл TFA выдерживали 1 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, получен-

ный осадок отфильтровывали и сушили в эксикаторе с КОН. Выход после ВЭЖХ 17.9 г (94.3%). R_f 0.55 (А), 0.4 (Б), 0.6 (Г).

H-Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln-OH (I). К раствору 17.9 г (19.8 ммоль) H-Leu-Val-Cys(Acm)-Tyr-Pro-Gln-OH \times TFA в 200 мл 30% уксусной кислоты добавляли 12.72 г (0.040 моль) Hg(OAc)₂. Реакционную смесь перемешивали в течение 1.5 ч при 20°C, затем через этот раствор пропускали газообразный H₂S (в течение 20 мин). Образовавшийся осадок отфильтровывали, раствор концентрировали в вакууме. Полученный продукт очищали методом ВЭЖХ. Выход после ВЭЖХ 7.3 г (51%). R_f 0.6 (А), 0.45 (Б), 0.65 (Г). Время удерживания по данным аналитической ВЭЖХ 9.1 мин.

H-Leu-Val-Ser-Tyr-Pro-Gln-OH \times TFA (II)

Z-Ser(Bu')-Tyr-Pro-Gln-OBu'. Раствор 2.99 г (5 ммоль) Z-Tyr-Pro-Gln-OBu' в 25 мл этанола выдерживали в атмосфере водорода над 10% Pd/C до исчезновения исходного соединения (контроль ТСХ). Катализатор отфильтровывали, фильтрат концентрировали в вакууме. Маслообразный остаток растворяли в 25 мл DMF и к раствору прибавляли 2.28 г (5 ммоль) Z-Ser(Bu')-ONB. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, DMF упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 50 мл этилацетата, раствор промывали последовательно насыщенным раствором NaHCO₃ (2 \times 50 мл), водой (1 \times 50 мл), 5% раствором H₂SO₄ (1 \times 50 мл) и водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при 20°C. Выход после ВЭЖХ 2.4 г (65%). R_f 0.72 (В), 0.48 (Д), 0.71 (Е).

Z-Val-Ser(Bu')-Tyr-Pro-Gln-OBu'. Раствор 2.4 г (3.2 ммоль) Z-Ser(Bu')-Tyr-Pro-Gln-OBu' в 25 мл этанола выдерживали в атмосфере водорода над 10% Pd/C до исчезновения исходного пептида по ТСХ. Катализатор отфильтровывали, фильтрат концентрировали в вакууме. Маслообразный остаток растворяли в 25 мл DMF и к раствору прибавляли 1.15 г (3.2 ммоль) Z-Val-ONSu и 0.27 г (2 ммоль) НОВТ. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, DMF упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 50 мл этилацетата, раствор промывали последовательно насыщенным раствором NaHCO₃ (2 \times 50 мл), водой (1 \times 50 мл), 5% раствором H₂SO₄ (1 \times 50 мл) и водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при 20°C. Выход после ВЭЖХ 2.7 г (93%). R_f 0.7 (В), 0.4 (Д), 0.68 (Е).

Woc-Leu-Val-Ser(Bu')-Tyr-Pro-Gln-OBu'. Раствор 2.7 г (3 ммоль) Z-Val-Ser(Bu')-Tyr-Pro-Gln-OBu' в 25 мл этанола выдерживали над 10% Pd/C

до исчезновения исходного пептида по ТСХ. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 25 мл DMF и к раствору прибавляли 0.99 г (3 ммоль) Woc-Leu-ONSu и 0.135 г (1 ммоль) НОВТ. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C. DMF упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 50 мл этилацетата и раствор промывали последовательно насыщенным раствором NaHCO₃ (2 \times 50 мл), водой (1 \times 50 мл), 5% раствором H₂SO₄ (1 \times 50 мл) и водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при 20°C. Выход после ВЭЖХ 2.46 г (89%). R_f 0.55 (А), 0.4 (Д), 0.68 (Е).

H-Leu-Val-Ser-Tyr-Pro-Gln-OH \times TFA. Раствор 2.46 г (2.68 ммоль) Woc-Leu-Val-Ser(Bu')-Tyr-Pro-Gln-OBu' в 50 мл TFA выдерживали в течение 1 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили в эксикаторе над КОН. Выход после ВЭЖХ 1.87 г (85%). R_f 0.55 (А), 0.22 (Г), 0.22 (Д). Время удерживания по данным аналитической ВЭЖХ 8.05 мин.

H-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Gln-OH \times TFA (III)

Z-Val-Tyr-Pro-Gln-OBu'. Раствор 2.99 г (5 ммоль) Z-Tyr-Pro-Gln-OBu' в 25 мл этанола выдерживали над 10% Pd/C до исчезновения исходного пептида по ТСХ. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 25 мл DMF и к раствору прибавляли 1.75 г (5 ммоль) Z-Val-ONSu и 0.135 г (1 ммоль) НОВТ. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, DMF упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 50 мл этилацетата, раствор последовательно промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (2 \times 50 мл), водой (1 \times 50 мл), 5% раствором H₂SO₄ (1 \times 50 мл), водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при 20°C. Выход после ВЭЖХ 3.02 г (87%). R_f 0.63 (В), 0.42 (Д), 0.65 (Е).

Z-Val-Val-Tyr-Pro-Gln-OBu'. Раствор 3.02 г (4.35 ммоль) Z-Val-Tyr-Pro-Gln-OBu' в 25 мл этанола выдерживали над 10% Pd/C до исчезновения исходного соединения по ТСХ. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 25 мл DMF и к раствору прибавляли 1.52 г (4.35 ммоль) Z-Val-ONSu и 0.135 г (1 ммоль) НОВТ. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, DMF упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 50 мл этилацетата и раствор промывали последовательно насыщенным раствором NaHCO₃ (2 \times 50 мл), водой (1 \times 50 мл), 5% раствором H₂SO₄ (1 \times 50 мл), водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, маслообразный остаток растирали с эфи-

ром, осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при 20°C. Выход после ВЭЖХ 2.94 г (85%). R_f 0.6 (В), 0.35 (Д), 0.61 (Е).

Woc-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Gln-OBu'. Раствор 2.94 г (3.7 ммоль) Z-Val-Val-Tyr-Pro-Gln-OBu' в 25 мл этанола выдерживали над 10% Pd/C до исчезновения исходного пептида по ТСХ. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 25 мл DMF, к раствору прибавляли 1.21 г (3.7 ммоль) Woc-Leu-ONSu и 0.135 г (1 ммоль) НОВТ. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C. DMF упаривали, маслообразный остаток растворяли в 50 мл этилацетата, раствор промывали последовательно насыщенным раствором NaHCO₃ (2 × 50 мл), водой (1 ×

× 50 мл), 5% раствором H₂SO₄ (1 × 50 мл), водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при 20°C. Выход после ВЭЖХ 2.9 г (90%). R_f 0.58 (В), 0.31 (Д), 0.58 (Е).

H-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Gln-OH × TFA (III). Раствор 2.9 г (3.33 ммоль) Woc-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Gln-OBu' в 50 мл TFA выдерживали 1 ч при 20°C и упаривали. Маслообразный остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали и сушили в эксикаторе над КОН. Выход после ВЭЖХ 2.54 г (92%). R_f 0.55 (А), 0.4 (Б), 0.6 (Г). Время удерживания по данным аналитической ВЭЖХ 9.325 мин.

H-Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln-OH H-Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln-OH (IV). К раствору 1 г (1.39 ммоль) H-Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln-OH в 100 мл H₂O прибавляли водный раствор NH₃ до pH 8, а затем при интенсивном перемешивании прибавляли десятикратный избыток H₂O₂. Процесс димеризации контролировали с помощью реактива Элмана и ВЭЖХ. По окончании реакции к реакционной массе прибавляли 30% CH₃COOH до pH 4, полученный раствор концентрировали в вакууме. Полученный продукт очищали методом ВЭЖХ. Выход после ВЭЖХ 0.53 г (53%). R_f 0.6 (А), 0.25 (Б), 0.65 (Г). Время удерживания по данным аналитической ВЭЖХ 11.133 мин.

Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов определяли как описано в сообщении [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petrov R.V., Mikhailova A.A., Fonina L.A. // Biopolymers. 1997. V. 43. P. 139–146
2. Фокина Л.А., Гурьянов С.А., Ефремов М.А., Смирнова О.В. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 403–407.
3. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фокина Л.А. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 811–815.
4. Шанурин С.Ю. // Радиобиология. 1994. Т. 34. С. 36.
5. Mikhailova A.A., Shanurin S.Yu., Petrov R.V. // Immunology Lett. 1995. V. 47. P. 199–203.
6. Стрелков Л.А., Михайлова А.А., Фокина Л.А., Петров Р.В. // Докл. АН. 1994. Т. 338. С. 125–126.
7. Белевская Р.Г., Михайлова А.А., Фокина Л.А., Ефремов М.А., Петров Р.В. // Докл. РАН. 1998. Т. 358. С. 847–849.
8. Fetsch J., Maurer H.R. // Exp. Hematol. 1990. V. 18. P. 322.
9. Paukovits W.R., Laerum O.D. // Z. Naturforsch. 1982. V. 37C. P. 297–300.
10. Laerum O.D., Stetvold O., Bjercknes R., Erikson J.A., Johansen J.H., Schanche J.S., Tveteras T., Paukovits W.R. // Exp. Hematol. 1988. V. 16. P. 274.
11. Bar-Shavit Z., Terry S., Blumberg S., Goldman R. // Neuropeptides. 1982. V. 2. P. 325–335.
12. Rook G.A.W., Steel J., Umar S., Dockrell H.M. // Immunol. Mem. 1985. V. 82. P. 161–167.

Effect of the SH-group of Myelopeptide MP-3 on Its Macrophage Stimulating Activity

L. A. Fonina^{#*}, M. I. Baldin^{**}, M. A. Efremov^{*}, S. A. Gur'yanov^{*}, and R. G. Belevskaya^{*}

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

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

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

Peptide Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln, identical to the bone marrow peptide MP-3, and its Val³ and Ser³ analogs, lacking SH-group, were synthesized by conventional methods of peptide chemistry in solution and, along with the MP-3 S–S-dimerization product, were studied with respect to their effect on the macrophage phagocytic activity. It was shown that the activity was only enhanced by peptide MP-3, which demonstrated the essential role of the SH-group in this function. The dimer analog of MP-3, unlike dimer analogs of other monocysteine-containing peptides, glutathione and HP5b, did not exhibit the inhibitory effect. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cysteine, MP-3 analogs, phagocytosis, synthesis