



УДК 547.466.964:542.95:577.112.6.017

## ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ХЕМОКИНА MCP-1, ИХ СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА MCP-1-ОПОСРЕДОВАННУЮ МИГРАЦИЮ МОНОЦИТАРНЫХ КЛЕТОК

© 2004 г. М. В. Сидорова, А. С. Молокоедов, Т. И. Арефьева, Н. Б. Кухтина, Т. Л. Красникова<sup>#</sup>, Ж. Д. Беспалова, В. Н. Бушуев

Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15а

Поступила в редакцию 03.12.2003 г. Принята к печати 26.01.2004 г.

Твердофазным методом с использованием Fmoc-методологии осуществлен синтез 14 пептидов – фрагментов хемокина MCP-1 и их структурных аналогов. Полученные пептиды оттестированы на предмет их влияния на миграцию моноцитарных клеток, стимулированную MCP-1. Выявлены соединения как стимулирующие, так и ингибирующие миграцию моноцитарных клеток в условиях *in vitro*. Впервые получены данные о возможном участии C-концевого участка молекулы MCP-1 в ингибировании клеточной миграции, стимулированной MCP-1.

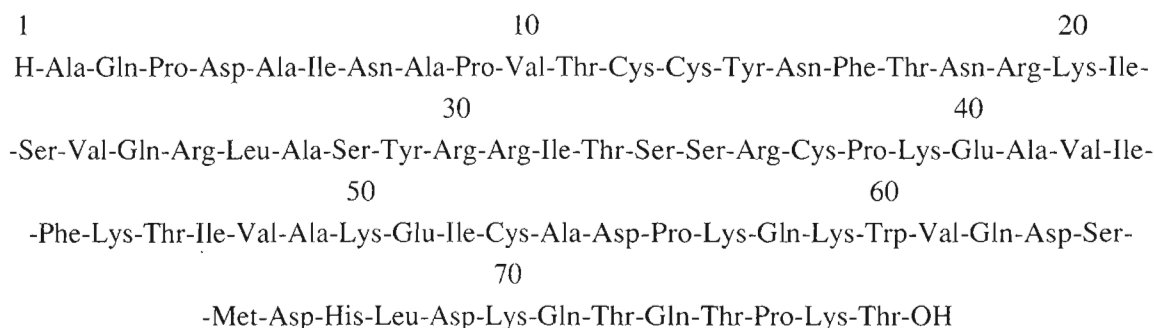
*Ключевые слова:* синтетические пептиды, твердофазный синтез; хемокин; MCP-1; моноциты, миграция MCP-1-опосредованная.

### ВВЕДЕНИЕ

Воспаление является неотъемлемым компонентом многих патологических состояний, таких, как онкогенез, атеросклероз, аутоиммунные заболевания, болезнь Альцгеймера и др.

Привлечение лейкоцитов в участки воспаления, их активация и дифференцировка осуществляются при непосредственном участии хемотаксических цитокинов – хемокинов [1]. Хемокины – это семейство небольших по массе основных белков (8–12 кДа), действие которых осуществляется

через хемокиновые рецепторы. Хемокины не только играют существенную роль в развитии воспалительных процессов при различных заболеваниях, но и активируют экспрессию молекул адгезии, оказывают влияние на клеточную пролиферацию и дифференцировку, вызывают дегрануляцию лейкоцитов, в результате которой освобождаются медиаторы воспаления. Установлено, что в патогенезе атеросклероза ведущая роль принадлежит хемокину MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1).



MCP-1 продуцируется макрофагами, гладкомышечными и эндотелиальными клетками стен-

ки сосуда [2]. Присутствие в атеросклеротической бляшке моноцитов/макрофагов и Т-клеток

Использованы сокращения, рекомендованные комиссией IUPAC-IUB, а также: Acм – ацетамидометил; DCM – дихлорметан; DIC – *N,N*<sup>1</sup>-диизопропилкарбодимид; EDT – 1,2-этандитиол; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; HMP – гидроксиметилфенокси; HOBt – 1-гидроксibenзотриазол; MALDI-MS – масс-спектрометрия с лазерной десорбцией; NMP – *N*-метилпирролидон; Pmc – 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил; PAL – 5-(4-аминометил-3,5-диметоксифенокси)валероил, TFA – трифтороуксусная кислота; Trt – тритил; TIBS – триизобутилсилан; ТФС – твердофазный синтез.

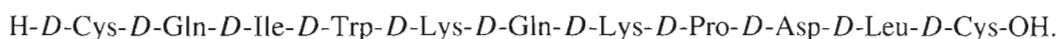
<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 414-69-56; эл. почта: Krasnikova@cardio.ru).

свидетельствует о развитии локального воспалительного процесса в сосудистой стенке [3].

Значительная роль MCP-1 в развитии воспаления и, в частности в атерогенезе [4], вызвала интерес к синтезу антагонистов этого хемокина. В литературе появились серии публикаций, в которых авторы попытались идентифицировать участки человеческого MCP-1, важные для проявления как присущей этому белку биологической активности, так и ингибирующей ее. Так, была изучена биологическая активность аналогов белка, полученных в результате направленного мутагенеза [5, 6], аналогов белка, укороченных с N-конца [7], пептидных библиотек, связанных с MCP-1 [8], были синтезированы и тестируются пептиды из различных участков MCP-1, выбранные по принципу: N-конец, первая петля, вторая петля, середина [9], синтезированы и изучены относительно короткие (до 15 а.о.) пептиды из "консервативной" части белка (совпадающей по аминокислотной последовательности в MCP-1 человека и мыши) [10]. В результате было показано, что синтетический пептид, соответствующий последовательности 13–35 MCP-1, стимулирует миграцию моноцитов и сравним по активности с природным MCP-1 [11]. В то же время авторы другой работы [9] утверждают, что этот пептид, напротив, ингибирует миграцию моноцитов, стимулированную MCP-1, при этом активность возрастает при амидировании и циклизации пептида (имеется в виду образование внутримолекулярной дисульфидной связи). Эти же авторы [9] показали, что вторая петля и C-конец не являются важными для взаимодействия с рецепторами

MCP-1 на моноцитарных клетках. Установлено, что участки 10–13 и 34–35 функционально важны, так как мутации по этим положениям или введение дополнительных аминокислотных остатков заметно уменьшает активность MCP-1 [6]. Авторы работы [10] показали, что пептид последовательности 51–62 MCP-1 H-Glu-Ile-Cys-Ala-Asp-Pro-Lys-Gln-Lys-Trp-Val-Gln-OH [MCP-1-(51–62)-пептид] ингибировал миграцию моноцитов крови человека и клеток моноцитарной линии THP-1, стимулированную хемокинами, и не оказывал влияния на миграцию клеток, вызванную хемоаттрактантами нехемокиновой природы. Еще более активным (в 3–4 раза) оказался аналог MCP-1-(51–62)-пептида с заменой аланина на лейцин в положении 4 и валина на изолейцин в положении 11. Согласно Реклесс и Грейнджер [10], именно этот пептид вероятнее всего ответствен за проявление активности *in vivo*.

Использование пептидов в экспериментальных и терапевтических целях *in vivo* имеет ряд ограничений, связанных, в частности, с коротким временем их существования в плазме крови из-за подверженности протеолизу. Для предупреждения деградации пептидазами авторы работы [12] осуществили синтез *ретро-энантио*-аналога пептида MCP-1-(51–62). Они удлиннили последовательность, приведенную выше, на остаток цистеина на C-конце, убрали остатки глутаминовой кислоты и изолейцина на N-конце, заменили остатки всех L-аминокислот на остатки соответствующих D-аминокислот, соединили их в обратной последовательности и замкнули дисульфидный мостик:



Синтез *ретро-энантио*-пептидов был предложен ранее как подход к конструированию аналогов, устойчивых к действию протеиназ [13]. Циклический *ретро-энантио*-пептид оказался более эффективным ингибитором миграции клеток *in vitro* по сравнению с исходным пептидом, а также обладал значительным противовоспалительным действием *in vivo* [12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель настоящего исследования – поиск и синтез пептидов, ингибирующих MCP-1-стимулированную миграцию моноцитарных клеток. Актуальность такого исследования связана, в частности, с поиском соединений для покрытия стентов\*, используемых при коронарной ангиопластике у

больных с ишемической болезнью сердца, для предупреждения развития рестенозов (повторного сужения сосудов).

Проанализировав литературные данные, мы решили синтезировать пептид, соответствующий последовательности 51–62 белка MCP-1 и его Leu<sup>4</sup>,Ile<sup>11</sup>-аналог, описанные в работе [10]. Для повышения устойчивости пептидов к действию карбоксипептидаз обе последовательности предполагалось синтезировать в виде амидов. К тому же, как отмечалось выше, биологическая активность фрагментов MCP-1 возрастает при их амидировании [9]. N-Концевая аминогруппа была нами заблокирована ацетилированием для повышения устойчивости соединений к действию аминопептидаз. Предполагалось провести тестирование как линейных Asp-защищенных предшественников целевых пептидов, так и пептидов со свободной сульфгидрильной группой.

\* Стент – устройство для армирования стенки артерии в ходе внутрисосудистой операции.

*ретро-энантио*-Пептид, описанный в работе [12], решено было синтезировать в качестве аналога, имеющего в настоящее время наилучшие перспективы с точки зрения практического применения для ингибирования подвижности клеток в очаге воспаления, а также, поскольку использованный нами метод тестирования синтезированных пептидов несколько отличается от метода, предложенного в работах [10, 12], – в качестве вещества сравнения.

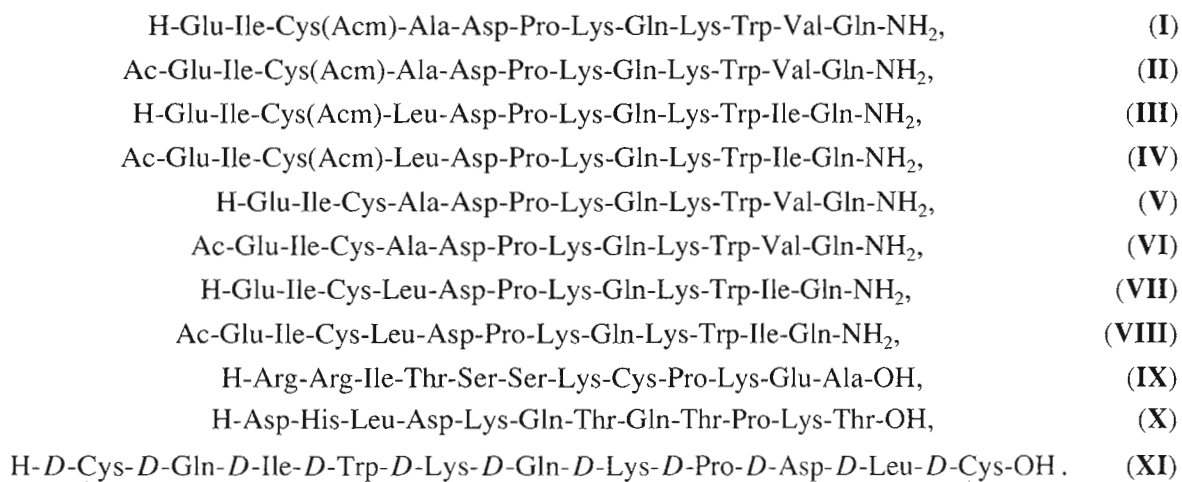
Выше мы отмечали, что в разных работах авторы пытались идентифицировать “активные”, то есть способные взаимодействовать с рецепторами участки молекулы МСР-1, разными довольно трудоемкими методами [6–10]. Мы решили проанализировать структуру МСР-1 с помощью пакета компьютерных программ, хорошо зарекомендовавших себя при предсказании линейных эпитопов в белках, включающего метод предсказания гидрофильных участков аминокислотной цепи, метод оценки поверхностной доступности и метод, учитывающий встречаемость различных сочетаний аминокислотных остатков в уже известных антигенных детерминантах. Обычно эти методы применяются для выявления антигенных детерминант различных белков, но белково-рецепторное и антиген-антитело взаимодействия имеют сходную природу. Расчет был произведен с помощью пакета программ Peptide Companion.

Результаты этих расчетов приведены на рис. 1: три профиля соответствуют трем использованным методам. Критерий выбора необычайно прост: выбираются фрагменты аминокислотной последовательности, которые соответствуют максимумам всех трех профилей.

Следует отметить два обстоятельства: 1) аминокислотная последовательность фрагмента 51–62 МСР-1, выбранного авторами работы [10] из “консервативной” области белка и обладающего способностью ингибировать подвижность моноцитов, полностью совпадает с максимумами всех трех расчетных профилей; 2) пептид последовательности 13–35 МСР-1 проявляет активность, присущую МСР-1 [11], и его аминокислотная последовательность в С-концевой части перекрывается с максимумами двух профилей. Это, как нам кажется, подтверждает правомерность применения вышеперечисленных методов расчета для выявления потенциально “активных” участков МСР-1.

На основании проведенных расчетов (рис. 1) мы выбрали для синтеза еще два фрагмента МСР-1: пептид H-Arg-Arg-Ile-Thr-Ser-Ser-Lys-Cys-Pro-Lys-Glu-Ala-OH, соответствующий последовательности 30–41 МСР-1, и пептид H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH, МСР-1-(66–77).

Таким образом, нами были выбраны соединения следующей структуры:



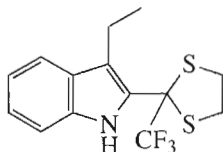
Пептиды синтезировали автоматическим твердофазным методом с использованием Fmoc-методологии. В качестве нерастворимого носителя был выбран сополимер стирола с 1% дивинилбензола с кислотоллабильными якорными группами: PAL – для синтеза амидов пептидов и НМР – для получения пептидных кислот. Для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот применяли следующие защиты: трет-бутильную для карбоксильных групп аспарагиновой и глута-

миновой кислот и гидроксильных функций серина и треонина; Вос-защиту для ε-аминогруппы лизина; Pmc-защиту для гуанидиновой функции аргинина; Trt-группу для карбоксамидной функции глутамина. При получении пептидов (I)–(VIII) сульфгидрильную группу цистеина блокировали Acm-защитой, при синтезе остальных пептидов для блокирования этой функции применяли Trt-группу. Во всех случаях пептидную цепь наращивали по одной аминокислоте, начиная синтез с С-конца.

Для создания амидных связей использовали карбодимидный (DIC/NOBt) метод.

Для заключительного деблокирования и отщепления пептидов от носителя применяли трифторуксусную кислоту со специальными добавками-скавенджерами (см. "Эксперимент. часть"). Сырые продукты твердофазного синтеза очищали с использованием препаративной ВЭЖХ до 95–98%-ной чистоты и характеризовали с помощью  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Сульфгидрильную группу в пептидах (I)–(IV) деблокировали действием 2 экв. ацетата ртути в 30% уксусной кислоте по описанной методике [14]. Полученные при этом пептиды (V)–(VIII) очищали с помощью ВЭЖХ. Выходы и характеристики синтезированных соединений представлены в табл. 1. Следует отметить, что в случае всех пептидов, кроме *ретро-энантио*-пептида, описанного в работе [12], сырые продукты твердофазного синтеза содержали не менее 70% (по данным аналитической ВЭЖХ) основного вещества, а примеси существенно отличались от целевых продуктов по хроматографической подвижности.

При получении пептида (XI) мы столкнулись с рядом трудностей на стадии синтеза его линейного предшественника – дитиола *H-D-Cys-D-Gln-D-Ile-D-Trp-D-Lys-D-Gln-D-Lys-D-Pro-D-Asp-D-Leu-D-Cys-OH* (XIa). Так, независимо от условий заключительного деблокирования, сырой продукт твердофазного синтеза представлял смесь веществ с близкими временами удерживания в условиях аналитической ВЭЖХ. На рис. 2 видно, что состав сырых продуктов синтеза этого пептида существенно зависит от использованной деблокирующей смеси. Пептид (XIa) содержит триптофан, который при отщеплении защитных групп трифторуксусной кислотой подвержен побочным реакциям, таким, как необратимое окисление или алкилирование индольного кольца образующимися карбокатионами [15, 16], а также реакциям с участием скавенджеров, призванных предотвратить алкилирование индола [17, 18]. Так, известно, что используемый в синтезе этандитиол (EDT), с одной стороны, наиболее эффективно предотвращает алкилирование индольного кольца триптофана [15], а с другой стороны, участвует в необратимом образовании побочного продукта по индольному кольцу следующей структуры [17, 18]:



Поэтому были опробованы рекомендованные для триптофансодержащих пептидов деблокирующие смеси [15, 16], содержащие и не содержащие EDT. Из рис. 2a видно, что, если при деблоки-

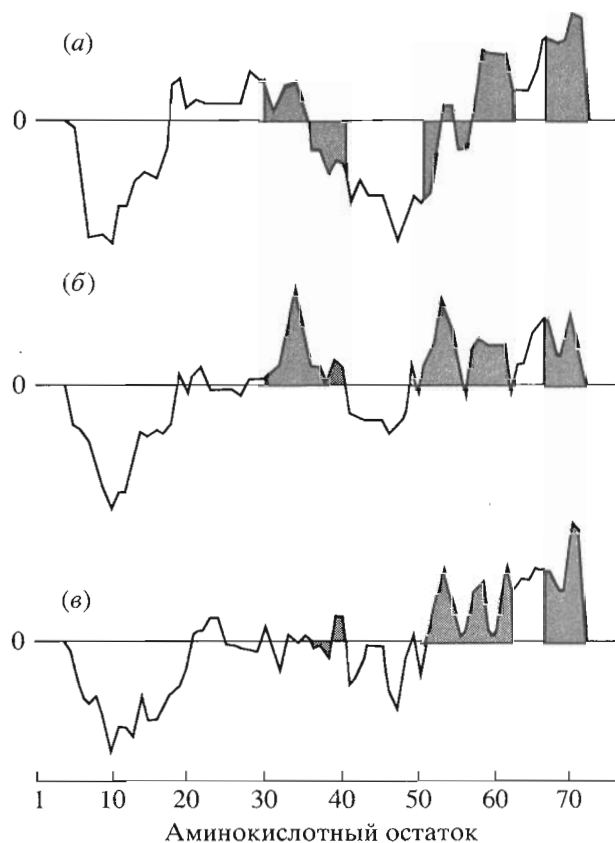


Рис. 1. Анализ структуры хемокина МСР-1 человека с помощью компьютерных методов: профиль поверхностной доступности (а), гидрофильности (б), статистической антигенности (в). Выбранные для синтеза участки белка затемнены.

ровании в присутствии EDT получается в основном два продукта: (XIa) с содержанием по ВЭЖХ 40 и (XIб) с содержанием 30%, то при отсутствии в составе деблокирующей смеси EDT сырой продукт (рис. 2б) состоит из четырех веществ с содержанием (XIa) – 21, (XIб) – 16, (XIв) – 14, (XIг) – 10%. Вещества (XIa)–(XIг) (рис. 2а и б) были разделены с помощью препаративной ВЭЖХ, проанализированы и идентифицированы. Продукты (XIa) и (XIб) имели ожидаемые и одинаковые аминокислотный состав ( $^1\text{H}$ -ЯМР) и молекулярную массу ( $[M + \text{H}]^+ - 1365.1$ ,  $M_{\text{расч}} - 1361.7$ ). Интересно, что соединения (XIв) и (XIг) также имели одинаковые аминокислотный состав и молекулярную массу ( $[M + \text{H}]^+ - 1469.6$ ), отличающуюся от расчетной на 107 единиц.

Изучение пар соединений (XIa), (XIб) и (XIв), (XIг) с помощью  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии показало, что в спектрах соединений (XIв) и (XIг) отсутствует сигнал протона при атоме углерода во втором положении ароматической системы триптофана. Наблюдаются также заметные различия в химических сдвигах сигналов протонов ароматического кольца триптофана, в первую очередь, в

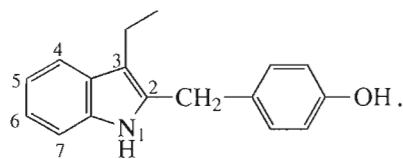
Таблица 1. Характеристики синтезированных пептидов

Пептид	Брутто-формула, расчетная молекулярная масса	Выход, %	ВЭЖХ		MALDI-MS, $m/z$
			Чистота, %	$R_t$ , мин	
(I)	$C_{67}H_{107}N_{19}O_{19}S$ , $M = 1514.8$	43.1 <sup>(a)</sup>	99	11.9 <sup>(z)</sup>	1515.3 $[M + H]^+$
(II)	$C_{69}H_{109}N_{19}O_{20}S$ , $M = 1556.8$	50.0 <sup>(a)</sup>	99	13.9 <sup>(z)</sup>	1556.0 $[M + H]^+$
(III)	$C_{71}H_{115}N_{19}O_{19}S$ , $M = 1570.9$	49.5 <sup>(a)</sup>	95	15.4 <sup>(z)</sup>	1570.9 $[M + H]^+$
(IV)	$C_{73}H_{117}N_{19}O_{20}S$ , $M = 1612.9$	44.1 <sup>(a)</sup>	98	16.6 <sup>(z)</sup>	1612.7 $[M + H]^+$
(V)	$C_{64}H_{102}N_{18}O_{18}S$ , $M = 1442.7$	75.0 <sup>(b)</sup>	98	12.3 <sup>(z)</sup>	1443.5 $[M + H]^+$ , 1466.3 $[M + Na]^+$
(VI)	$C_{66}H_{104}N_{18}O_{19}S$ , $M = 1485.7$	84.1 <sup>(b)</sup>	98	14.6 <sup>(z)</sup>	1486.3 $[M + H]^+$ , 1524.2 $[M + K]^+$
(VII)	$C_{68}H_{110}N_{18}O_{18}S$ , $M = 1499.8$	82.0 <sup>(b)</sup>	97	16.0 <sup>(z)</sup>	1500.9 $[M + H]^+$ , 1521.9 $[M + Na]^+$
(VIII)	$C_{70}H_{112}N_{18}O_{19}S$ , $M = 1541.8$	80.0 <sup>(b)</sup>	98	17.0 <sup>(z)</sup>	1542.3 $[M + H]^+$ , 1564.3 $[M + Na]^+$ , 1580.5 $[M + K]^+$
(IX)	$C_{56}H_{102}N_{20}O_{18}S$ , $M = 1375.8$	36.0 <sup>(a)</sup>	98	12.5 <sup>(d)</sup>	1376.5 $[M + H]^+$
(X)	$C_{59}H_{98}N_{18}O_{22}$ , $M = 1411.5$	46.0 <sup>(a)</sup>	96	13.4 <sup>(d)</sup>	1411.7 $[M + H]^+$ , 1434.5 $[M + Na]^+$ , 1450.7 $[M + K]^+$
(XIa)	$C_{60}H_{96}N_{16}O_{16}S_2$ , $M = 1361.7$	25.0 <sup>(a)</sup>	98	15.7 <sup>(z)</sup>	1365.1 $[M + H]^+$
(XIб)	$C_{60}H_{96}N_{16}O_{16}S_2$ , $M = 1361.7$	17.0 <sup>(a)</sup>	98	16.3 <sup>(z)</sup>	1365.1 $[M + H]^+$
(XI)	$C_{60}H_{94}N_{16}O_{16}S_2$ , $M = 1359.7$	52.0 <sup>(b)</sup>	96	14.7 <sup>(z)</sup>	1359.9 $[M + H]^+$ , 1381.6 $[M + Na]^+$ , 1397.8 $[M + K]^+$
(XII)	$C_{60}H_{94}N_{16}O_{16}S_2$ , $M = 1359.7$	56.0 <sup>(b)</sup>	96	15.3 <sup>(z)</sup>	1359.9 $[M + H]^+$

Выходы приведены в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру (a), на  $[Cys(Actm)]_2$ -производное (б) или  $[Cys(SH)]_2$ -производное (в) соответствующего пептида. Времена удерживания пептидов ( $R_t$ ) при ВЭЖХ на колонке Ultra-sphere ODS ( $4.6 \times 250$  мм), 5 мкм; детекция при 226 нм, буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрил в буфере А, градиент Б от 10 до 70% за 30 мин (z) или от 0 до 60% за 30 мин (d), скорость потока – 1 мл/мин.

положениях 7 и 6. Химический сдвиг сигнала NH индольного кольца триптофана в спектрах пептидов равен 10.8 м.д., а в спектрах побочных продуктов – 10.47 м.д. Кроме того, в спектрах побочных продуктов (XIв) и (XIг) можно выделить ряд дополнительных сигналов по сравнению со спектрами соединений (XIa) и (XIб). Так, в ароматической области имеется два спин-связанных дублетных сигнала с интенсивностью в два протона каждый с химическими сдвигами 6.7 и 7.0 м.д., а также однопротонный синглетный сигнал гидроксильной группы при 9.2 м.д. Химические сдвиги и соотношение интенсивностей этих протонов практически совпадают с сигналами протонов ароматического остатка тирозина в спектрах  $^1H$ -ЯМР свободных пептидов в растворе DMSO [19]. В спектрах веществ (XIв) и (XIг) наблюдаются два однопротонных спин-связанных дублетных сигнала при 3.8 и 4.0 м.д., которые могут быть отнесены к протонам группы  $CH_2$ . Химические сдвиги остальных сигналов в спектрах пар пептидов (XIa) и (XIб), (XIв) и (XIг) близки. Эти данные служат доказательством того, что соединения

(XIв) и (XIг) являются продуктами модификации пептидов (XIa) и (XIб) по положению 2 индольной системы триптофана 4-гидроксибензильной группой с молекулярной массой, равной 107:



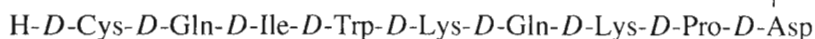
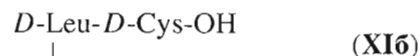
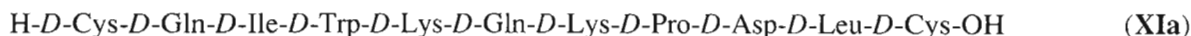
Аналогичная побочная реакция ранее уже отмечалась [16]. Так, при ацидолитическом отщеплении пептидов с C-концевым триптофаном от полимера наблюдалось необратимое алкилирование индольной системы триптофана образовавшимися из якорной группы карбокатионами, связанными с носителем.

Поскольку соединения (XIa) и (XIб) имеют одинаковую молекулярную массу 1365.1, совпадающую с расчетной, очевидно, что одно из них является целевым продуктом, а второе – его изомерной формой. То же относится ко второй паре

соединений – (XIв) и (XIг) ( $M$  1469.7): оба соединения содержат остаток триптофана, модифицированный по положению 2 индольного кольца 4-гидроксibenзильным остатком, и также являются изомерами. Может быть несколько причин образования таких побочных продуктов: 1) рацемизация в процессе пептидного синтеза при использовании карбодиимидов на стадии создания амидной связи, 2) образование аспартимида и последующая транспептидация ( $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировка амидной связи) при применении пиперидина для отщепления Fmoc-защиты [15]. Степень прохождения этой побочной реакции существенно зависит от выбранной для  $\beta$ -карбоксылной группы аспарагиновой кислоты защиты, аминокислотной последовательности и конформации синтезируемого пептида, от полярности растворителя [14, 15, 20]. Так, Asp(OBu<sup>t</sup>)-производные наименее склонны к транспептидации при использовании пиперидина [14, 15, 20]. Наиболее часто транспептидация наблюдалась в последовательности -Asp-Gly- [15, 21], есть данные об образовании аспартимида при использовании Fmoc-методологии ТФС в последовательностях -Asp-Ser- [15], -Asp-Thr- [15, 20], Asp-Asn- и -Asp-Gln- [22].

Для оценки оптической чистоты соединений (XIа) и (XIб) (см. рис. 2) был сделан энантиомерный анализ их гидролизатов с помощью ГЖХ на колонке с хиральной фазой. При этом оказалось, что оба соединения имеют одинаковый энантиомерный состав, все аминокислоты (за исключением триптофана, который не определяли) имеют *D*-конфигурацию. Таким образом, по всей видимости, причиной образования побочных продуктов не является рацемизация в ходе ТФС.

<sup>1</sup>H-ЯМР продемонстрировал наличие в спектре продукта (XIб) заметного ядерного эффекта Оверхаузера между NH-протоном остатка лейци-



Для замыкания дисульфидного мостика в пептидах (XIа) и (XIб) использовали перекись водорода при pH 7.5 [23]. Выходы циклических дисульфидов (XI) и (XII) составили 52 и 56% соответственно. В обоих случаях на стадии циклизации пептидов (XIа) и (XIб), наряду с целевыми дисульфидами, мы обнаруживали также побочные продукты (см. рис. 3). Побочные продукты циклизации пептидов (XIа) и (XIб), выделенные из реакционных смесей окисления с помощью ВЭЖХ, судя по данным масс-спектрометрии, представляли собой димеры с  $M$  2724.9, их выходы составляли 10 и 9% соответственно. Образование подобных олигоме-

**Таблица 2.** Влияние пептидов на МСР-1-стимулированную миграцию промоноцитарных клеток ТНР-1 и моноцитов крови

Пептид	Ингибирование МСР-1-стимулированной миграции, %	
	Клетки ТНР-1	Моноциты
(V)	55 ± 14	8 ± 2
(VII)	22	6
(X)	30	21 ± 5
(XI)	15 ± 5	32 ± 7
(XII)	23 ± 17	31 ± 4

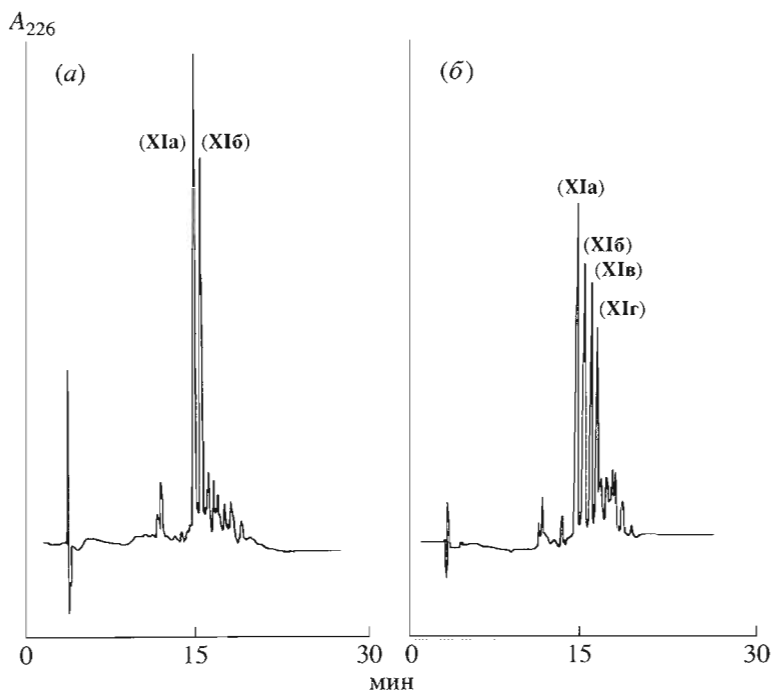
Действие пептидов оценивали по формуле:  $(1 - M_n/M)100\%$ , где  $M$  – миграция клеток под влиянием МСР-1, принятая за единицу (или 100%),  $M_n$  – миграция клеток в присутствии смеси МСР-1 + пептид. Спонтанная миграция составляла  $58.3 \pm 5.2\%$  для ТНР-клеток и  $50.0 \pm 4.9\%$  для моноцитов от уровня МСР-1-стимулируемой миграции клеток. Приведены средние значения ингибирования миграции из 3-х экспериментов (клетки от разных доноров) или средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего в том случае, когда количество экспериментов было  $>3$ .

на и  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-группой остатка аспарагиновой кислоты, в отличие от продукта (XIа). Известно, что при  $\alpha$ -амидной связи в пептидах ядерный эффект Оверхаузера наблюдается между C <sub>$\alpha$</sub> H (*i*) и NH (*i* + 1) [19]. Наиболее вероятно, что наблюдаемые различия связаны с тем, что в пептидах (XIа) и (XIв) в образовании амидной связи между остатками аспарагиновой кислоты и лейцина участвует  $\alpha$ -карбоксылная группа Asp, а в пептидах (XIб) и (XIг) –  $\beta$ -карбоксылная группа. Таким образом, вещество (XIа) является целевым дитиолом, а пептид (XIб) представляет собой продукт происходящей в процессе ТФС  $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировки амидной связи остатка аспарагиновой кислоты.

ров при замыкании дисульфидной связи в пептидах с большим расстоянием между остатками цистеина наблюдается достаточно часто, даже в условиях высокого разбавления [23].

Полный перечень и характеристики синтезированных нами пептидов, а также выделенных и охарактеризованных побочных продуктов приведены в табл. 1.

Мы определили влияние синтезированных пептидов на миграцию клеток крови и линейных промоноцитарных клеток ТНР-1 в камере Бойдена (рис. 4 и табл. 2). На рис. 4 приведены данные одного из экспериментов (на клетках одного до-



**Рис. 2.** Аналитическая ВЭЖХ сырого продукта ТФС пептида (XIa). Элюция градиентом от 10 до 70% буфера Б в буфере А за 30 мин (см. “Эксперимент. часть”). а – заключительное деблокирование пептида смесью Д. (XIa) – целевой пептид, (XIb) – побочный продукт транспептидации ( $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировки амидной связи -Asp-Leu-). б – заключительное деблокирование пептида смесью Д без EDT. (XIb) – побочный продукт с модифицированным остатком триптофана, (XIc) – побочный продукт транспептидации (XIa) с модифицированным остатком триптофана.

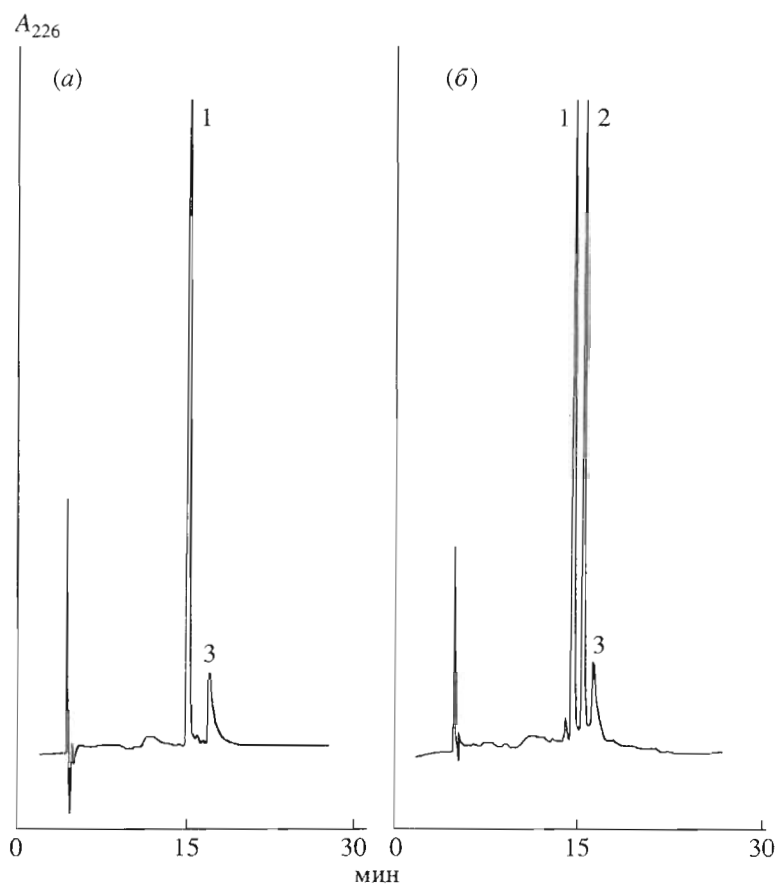
нора) для моноцитов и ТНР-1-клеток, а в табл. 2 – усредненные данные миграционного ответа тех же клеток (моноциты) от разных доноров. Пептиды вносили в верхние ячейки камеры (в суспензию клеток) и в нижние ячейки (в раствор хемоаттрактанта). Следует отметить, что в ряду пептидов (I)–(VIII) только пептид (V) существенно ингибировал миграцию клеток ТНР-1 и в незначительной степени – моноцитов (табл. 2). Степень ингибирования пептидом (VII) МСР-1-стимулированного хемотаксиса клеток, ТНР-1 составляла примерно 20%. Следует отметить, что структура этого пептида отличается от структуры высокоактивного аналога, описанного авторами в работе [10], лишь наличием амидной группы на С-конце.

Пептид (IX) МСР-1-(30–41) в использованной нами модели усиливал хемотаксис клеток ТНР-1 и моноцитов в присутствии МСР-1 на  $24$  и  $37 \pm 15\%$  соответственно (рис. 4). Без МСР-1 пептид (IX), внесенный в нижние ячейки камеры, стимулировал хемотаксис клеток в среднем на 40%, т.е. соизмеримо с действием МСР-1 ( $50 \pm 13\%$  спонтанной миграции клеток). Одновременное внесение пептида (IX) в верхние и в нижние ячейки камеры не вызывало усиления миграционной активности клеток. Таким образом, пептид (IX) представляет собой хемоаттрактант, вызывающий, подобно полноразмерному МСР-1, миграцию клеток. *ретро-энантио*-Пептиды (XI) и (XII) оказывали ингиби-

рующее влияние на МСР-1-стимулированный хемотаксис клеток, при этом наблюдалась тенденция к более выраженному их эффекту по сравнению с пептидом (V) на миграцию моноцитов (табл. 2). Следует отметить известную вариабельность в миграционном ответе моноцитов от разных доноров и соответственно вариабельность в действии пептидов (так, для пептида (XI) степень ингибирования миграционного ответа на МСР-1, принятого за 100%, варьировала от 15 до 53%, для пептида (XII) – от 7 до 38%).

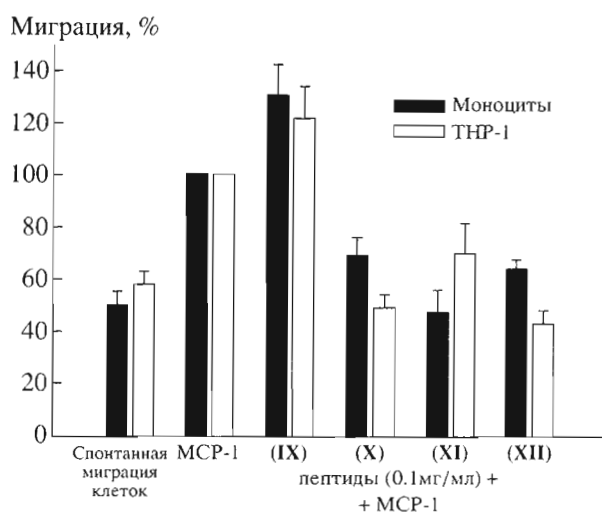
В предыдущих исследованиях утверждалось, что С-концевая область хемокина МСР-1 не имеет функционального значения в стимуляции клеточной миграции [24, 25] и пептиды из этой области не конкурируют с меченым МСР-1 при взаимодействии с рецепторами ТНР-1-клеток [9]. Синтезированный нами пептидный фрагмент С-концевой части МСР-1 (X), выбранный на основании проведенных расчетов, ингибировал МСР-1-опосредованную миграцию клеток ТНР-1 практически до уровня их спонтанной миграции и в значительной степени – моноцитов (рис. 4). Мы исследовали также миграцию клеток при добавлении смеси пептидов (X) + (XI) и (X) + (XII), однако существенного увеличения ингибирующего действия каждого из компонентов не наблюдали.





**Рис. 3.** Аналитическая ВЭЖХ реакционной смеси циклизации пептида (XIa) (а) и искусственной смеси дитиола и продуктов его циклизации (б). Элюция градиентом от 10 до 70% буфера Б в буфере А за 30 мин (см. “Эксперимент. часть”). Пик 1 – целевой циклический дисульфид (XI), пик 2 – исходный дитиол (XIa), пик 3 – димер.

Различия в активности пептида (VII) и его дезамидированного аналога [10] возможно связаны с различиями в их химической структуре. Возможно также, что это несовпадение обусловлено использованием разных методов оценки клеточной миграции в камере Бойдена, использованной нами, и в системе “Transwell”, которую использовали в работе [10]. Принцип обоих методов одинаков: клетки перемещаются по концентрационному градиенту хемоаттрактанта через поры в поликарбонатной мембране. Мы оценивали количество промигрировавших клеток, окрашивая нижнюю, т.е. обращенную к раствору хемоаттрактанта, часть мембраны, авторы исследования [10] – по количеству клеток в нижней ячейке после смыва с мембраны 20 мМ раствором EDTA в 0.01 М фосфатном буфере. При попытке провести таким образом высвобождение промигрировавших клеток в системе “Transwell” наши данные не соответствовали результатам, получаемым нами в камере Бойдена. Кроме того, в отличие от работы [10], где авторы изучали миграцию смешанной популяции мононуклеарных клеток крови (которая состоит преимущественно из лимфоцитов), мы проводили эксперименты на обога-



**Рис. 4.** Влияние пептидов на миграцию моноцитов и клеток THP-1, стимулированную MCP-1 (концентрация пептидов 50 нг/мл в случае моноцитов и 100 нг/мл в случае THP-клеток). Представлены данные одного из экспериментов, где каждое определение – среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего от измерений в шести ячейках камеры Бойдена. За 100% принята миграция клеток в присутствии MCP-1.



щенной моноцитами фракции (~70% моноцитов). Известно, что в присутствии Т- и В-лимфоцитов миграционная активность моноцитов существенно снижается [26]. Нами также было показано, что степень стимуляции моноцитов хемоаттрактантом МСР-1 в смешанной популяции мононуклеарных клеток значительно ниже по сравнению с таковой в обогащенной моноцитами фракции.

Таким образом, в рамках настоящей работы осуществлен синтез 14 пептидов – фрагментов хемотаксина МСР-1 и их структурных аналогов. Изучено влияние полученных пептидов на миграцию ТНР-1- и моноцитарных клеток, стимулированную белком МСР-1. Выявлены соединения как стимулирующие, так и ингибирующие миграцию ТНР-1- и моноцитарных клеток в условиях модели *in vitro*. Так, показано, что пептид (IX) (МСР-1-(30–41)), синтезированный нами на основании проведенных расчетов, является хемоаттрактантом и стимулирует подвижность ТНР-1- и моноцитарных клеток в той же степени, что и полноразмерный МСР-1. Показано также, что выявленный нами на основании проведенных расчетов пептид (X) (МСР-1-(66–77)) ингибирует МСР-1-опосредованную миграцию клеток ТНР-1 до уровня спонтанной миграции и в значительной степени – моноцитов, причем, его ингибирующая активность сопоставима с активностью пептида (XI), который описан в литературе [12] как самый эффективный пептидный ингибитор миграции ТНР-1- и моноцитарных клеток *in vitro*. Таким образом, впервые получены данные об участии С-концевой части молекулы МСР-1 в ингибировании клеточной миграции.

Ингибирующую активность, сопоставимую с активностью пептида (XI), проявляет также пептид (XII), являющийся результатом транспептидации ( $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировки амидной связи остатка аспарагиновой кислоты) пептида (XI).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы производные *L*- и *D*-аминокислот (Bachem, Швейцария), фенол (Merck, Германия), ацетат ртути, тиоанизол, EDT, DIC, NOVt, TIBS (Fluka, Швейцария), 50% перекись водорода (Solvay Interco, Бельгия). Перед проведением реакций окисления перекись водорода разбавляли деионизованной водой до нужной концентрации и титровали 1 н. раствором  $KMnO_4$ . Для твердофазного синтеза пептидов применяли *N*-метилпирролидон, дихлорметан, пиперидин, метанол и трифторуксусную кислоту фирмы “Applied Biosystems GmbH” (Германия). Диметилформамид перегоняли над нингидрином и окисью бария. Аналитическую и препаративную ВЭЖХ проводили на хроматографе (Gilson-305, Франция), для аналитической ВЭЖХ использовали колонку Ultrasphere ODS, 5 мкм (4.6 × 250 мм) Beckman (США), в качестве элюентов применяли бу-

фер А – 0.05 М  $KH_2PO_4$ , рН 3 и буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А, либо буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Скорость потока 1 мл/мин, детекция при 220 нм. Препаративную ВЭЖХ проводили на колонке с диасорбом-130-С16Т (25 × 250 мм), 10 мкм, ЗАО “Биохиммак СТ” (РФ), детекция – при длине волны 226 нм. Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил фирмы “Technopharm” (РФ). Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Analytical Compact MALDI 4 фирмы “Kratos” (Великобритания).  $^1H$ -ЯМР-спектры снимали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц (Германия) в  $DMSO-d_6$  при 300 К, концентрация пептидов составляла 2–3 мг/мл. Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) измерялись относительно тетраметилсилана. В работе использовали газообразный азот марки “ос. ч.” (РФ).

Для проведения энантиомерного анализа пептиды гидролизovali 2 н. HCl в течение 10 ч. Аминокислоты анализировали в виде изопропиловых эфиров *N*-трифторацетилпроизводных методом ГЖХ на капиллярной колонке [27] с хроматографической фазой Chirasil Valine (0.23 мм × 35 м), толщина слоя фазы – 0.12 мкм. Производные пролина анализировали на колонке (0.25 мм × 18 м) с  $\beta$ -циклодестрином T120. Хроматографию проводили на приборе Fractovar с ПИ-детектором фирмы “Carlo Erba” (Италия), газ-носитель – гелий.

Синтезированные пептиды анализировали по их способности влиять на миграцию промоноцитарных клеток линии ТНР-1 и моноцитов периферической крови человека, стимулированную МСР-1.

В работе были использованы следующие препараты фирмы “Gibco” (Великобритания): среда для культивирования клеток RPMI-1640; эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), *L*-глутамин, пенициллин-стрептомицин, раствор Хенкса, бычий сывороточный альбумин (BSA) и HEPES-буфер; рекомбинантный человеческий МСР-1 – фирмы “BD Pharmingen” (США). При определении миграционной способности клеток *in vitro* использовали мембраны, не содержащие поливинилхлорид, с диаметром пор 5 и 8 мкм (Osmonics, США) и краситель Гимза (Sigma-Aldrich, США). Для выделения мононуклеарных клеток из крови с последующим получением фракции, обогащенной моноцитами, использовали последовательное центрифугирование на градиентах плотности Histopaque-1077 и Percoll (Sigma-Aldrich, США). Типирование клеток осуществляли с помощью мышиных моноклональных антител CD14 (Becton Dickinson, США), меченных флуоресцеинизотиоционатом, и контрольных иммуноглобулинов. Для культивирования клеток использовали пластиковую посуду фирмы “Costar” (Нидерланды). Биохимические реактивы общего назначения аналитической чистоты – фирм “Sigma” (США), “Serva” (Германия) и “Реахим” (РФ).

**Твердофазный синтез пептидов** проводили на автоматическом пептидном синтезаторе Applied Biosystems, модель 431A (Германия). В качестве полимерного носителя во всех случаях использовали сополимер стирола с 1% дивинилбензола. Для получения амидов пептидов применяли PAL-полимер (PerSeptive Biosystems, Германия) с содержанием аминогрупп – 0.37 ммоль/г, а для синтеза остальных пептидов использовали соответствующие Fmoc-аминоацилполимеры (Bachem, Швейцария) с гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой (полимер Ванга). В каждом случае исходили из 0.25 ммоль Fmoc-аминоацилполимера (в скобках приведено содержание соответствующих стартовых аминокислот): пептид (IX) – Fmoc-Ala-полимер (0.50 ммоль Fmoc-Ala/г); пептид (X) – Fmoc-Thr(Bu')-полимер (0.67 ммоль Fmoc-Thr(Bu')/г); пептид (XI) – Fmoc-D-Cys(Trt)-полимер (0.67 ммоль Fmoc-D-Cys(Trt)/г).

Пептиды синтезировали по стандартной программе для однократной конденсации Fmoc-аминокислот. Согласно этой программе, синтетический цикл включал деблокирование  $\alpha$ -аминогрупп 20% раствором пиперидина в NMP в течение 20 мин, 20-минутную активацию 1 ммоль присоединяемой аминокислоты в присутствии эквивалентных количеств DIC и HOBT в NMP, конденсацию с 1 ммоль (4-кратным избытком) ацилирующего агента, полученного таким образом, в течение 37 мин и все необходимые промежуточные промывки пептидилполимера.

Для заключительного деблокирования и отщепления пептидов от носителя соответствующие пептидилполимеры суспендировали в 10 мл деблокирующей смеси TFA–фенол–TIBS–тиоаннлизол–EDT (16.5 : 1 : 1 : 1 : 0.5) (смесь Д) и перемешивали при 20°C 2 ч. Смолу отфильтровывали, промывали TFA (2 × 1 мл), фильтрат упаривали до объема 3–5 мл и прибавляли 100 мл сухого эфира или этилацетата. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром и этилацетатом, сушили.

**Очистка пептидов.** Полученные пептиды (I)–(XII) растворяли в 5–10% AcOH и хроматографировали на колонке (25 × 250 мм) с диасорбом. Элюцию проводили градиентом концентрации (0.5%/мин) CH<sub>3</sub>CN в 0.01 М ацетате аммония, pH 4.5 со скоростью потока 12 мл/мин. Фракции, соответствующие целевым продуктам, объединяли, упаривали, остаток растворяли в воде и лиофилизовали. Выходы и характеристики полученных пептидов приведены в табл. 1.

**H-D-Cys-D-Gln-D-Ile-D-Trp-D-Lys-D-Gln-D-Lys-D-Pro-D-Asp-D-Leu-D-Cys-OH (XIa).** Соответствующий пептидилполимер был получен по вышеописанной методике, половинное количество ундекапептидилполимера суспендировали в 10 мл деблокирующей смеси Д, перемешивали 2 ч при 25°C и выделяли сырой продукт ТФС как описано

выше. Полученный продукт (200 мг) представлял собой смесь двух веществ – (XIa) и (XIб) (см. рис. 2а), которую разделяли препаративной ВЭЖХ в вышеприведенных условиях. Выход целевого пептида (XIa) – 43.0 мг (25% в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру, далее СА), чистота по ВЭЖХ – 98%, MALDI-MS:  $m/z$  – 1365.1  $[M + H]^+$  (вычислено 1361.7 для C<sub>60</sub>H<sub>96</sub>N<sub>16</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>); энантиомерный анализ – все аминокислоты D-ряда, Trp – не определяли. Выход пептида (XIб) – 30.0 мг (17% в расчете на СА), чистота по ВЭЖХ – 98%, MALDI-MS:  $m/z$  – 1365.1  $[M + H]^+$  (вычислено 1361.7 для C<sub>60</sub>H<sub>96</sub>N<sub>16</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>); энантиомерный анализ – все аминокислоты D-ряда, Trp – не определяли.

Вторую половину ундекапептидилполимера суспендировали в 10 мл деблокирующей смеси Д без EDT, перемешивали 2 ч при 25°C и выделяли сырой продукт ТФС как описано выше. Полученный продукт (180 мг) представлял собой смесь четырех веществ (XIa)–(XIr) (см. рис. 2б), которую также разделяли препаративной ВЭЖХ в вышеприведенных условиях. Выход пептида (XIa) – 25.0 мг (14.7% в расчете на СА), чистота по ВЭЖХ – 98%, MALDI-MS:  $m/z$  – 1365.1  $[M + H]^+$  (вычислено 1361.7 для C<sub>60</sub>H<sub>96</sub>N<sub>16</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>). Выход пептида (XIб) – 16.0 мг (9.4% в расчете на СА), чистота по ВЭЖХ – 98%, MALDI-MS:  $m/z$  – 1365.1  $[M + H]^+$  (вычислено 1361.7 для C<sub>60</sub>H<sub>96</sub>N<sub>16</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>). Выход вещества (XIв) – 13.0 мг (7.0% в расчете на СА), чистота по ВЭЖХ – 98%, MALDI-MS:  $m/z$  – 1469.6  $[M + H]^+$ . Выход вещества (XIr) – 11.0 мг (6.0% в расчете на СА), чистота по ВЭЖХ – 98%, MALDI-MS:  $m/z$  – 1469.2  $[M + H]^+$ .

#### H-D-Cys-D-Gln-D-Ile-D-Trp-D-Lys-D-Gln-D-

#### Lys-D-Pro-D-Asp-D-Leu-D-Cys-OH (XI).

Раствор 25 мг линейного дитиола (XIa) в 25 мл воды доводили до pH 7.5 разбавленным раствором аммиака и добавляли 50 мкл 1% раствора перекиси водорода. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ. По окончании циклизации реакционную смесь подкисляли до pH 4 10% AcOH и хроматографировали на колонке с диасорбом в вышеописанных условиях. Выход пептида (XI) – 13 мг (52%), чистота по ВЭЖХ – 98%, 1359.9  $[M + H]^+$ , 1381.6  $[M + Na]^+$ , 1397.8  $[M + K]^+$  (вычислено – 1359.7 для C<sub>60</sub>H<sub>94</sub>N<sub>16</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>). Выход побочного продукта циклизации (димера) – 5 мг (10%), чистота по ВЭЖХ 95%, MALDI-MS:  $m/z$  – 2724.9  $[M + H]^+$ .

#### H-D-Cys-D-Gln-D-Ile-D-Trp-D-Lys-D-Gln-D-

#### Lys-D-Pro-D-Asp(-D-Leu-D-Cys-OH)-OH (XII).

Пептид (XII) получали аналогично соединению (XI) из дитиола (XIб), соответствующие характеристики приведены в табл. 1.

**Выделение моноцитов из периферической крови человека и культивирование клеток линии ТНР-1.** Мононуклеарные клетки были выделены из венозной крови здоровых доноров центрифугированием в градиенте плотности Histopaque [26] и отмывты в фосфатном буфере (ФБ) без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (0.01 М фосфатный буфер pH 7.4; 0.137 М NaCl, 0.27 мМ KCl). Обогащенную моноцитами суспензию клеток получали с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте Percoll (Sigma-Aldrich, США) [28]. Мононуклеарные клетки ресуспендировали в растворе ФБ-Percoll с плотностью 1.074, сверху последовательно наслаивали ФБ-Percoll плотностью 1.066 и 1.057. Центрифугировали 90 мин при 400g, после чего отбирали обогащенную моноцитами фракцию, находящуюся на границе фаз с плотностью 1.057 и 1.066. Клетки отмывали в ФБ без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  и ресуспендировали в растворе Хэнкса с 0.5% BSA в концентрации 4 млн/мл. Согласно данным морфологического анализа и анализа экспрессии поверхностных антигенов (CD14) методом прямой иммунофлюоресценции, полученная суспензия клеток содержала  $74 \pm 10\%$  моноцитов. Жизнеспособность клеток, определенная по исключению красителя трипановый синий, составляла не менее 96%.

Промоноцитарная клеточная линия ТНР-1 была получена из Американской типовой коллекции клеточных культур (АТСС). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  в среде RPMI-1640, содержащей 10% ЭТС, по 100 Ед./мл пенициллина и стрептомицина и 20 мкМ меркаптоэтанол. Перед исследованием миграции клетки отмывали от среды культивирования в ФБ без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  и ресуспендировали в растворе Хэнкса с 0.5% BSA в количестве 4 млн/мл.

Мембранную экспозицию моноцитами крови антигена CD14 определяли методом прямой иммунофлюоресценции. Клеточную суспензию в ФБ с 1% BSA инкубировали 30 мин при 4°C с антителами к CD14 или контрольными иммуноглобулинами. Клетки отмывали в ФБ и фиксировали 1% раствором формальдегида в ФБ. Флуоресценцию клеток измеряли методом цитофлюориметрии в потоке.

**Определение миграционной способности клеток.** Миграционную способность клеток оценивали, используя камеру Бойдена [29]. В нижние ячейки камеры Бойдена помещали раствор МСР-1, 50–100 нг/мл, в верхние ячейки камеры вносили по 50 мкл суспензии клеток. Пептиды растворяли в бидистиллированной  $\text{H}_2\text{O}$  в концентрации 10 мМ и добавляли как в клеточную суспензию перед внесением в микрокамеру, так и в нижние ячейки микрокамеры. Конечная концентрация пептидов составляла 100 мкМ. Верхние и нижние ячейки разделяли поликарбонатной мембраной с размером пор 5 (для оценки миграции моноцитов)

и 8 мкм (для оценки миграции клеток ТНР-1). Камеру переносили в  $\text{CO}_2$ -инкубатор на 1 ч (при исследовании миграции моноцитов) или на 3 ч (при изучении миграции клеток ТНР-1). Немигрировавшие клетки счищали, клетки, оставшиеся на фильтре, фиксировали в метаноле 5 мин и окрашивали красителем Гимза. Мембрану с окрашенными клетками сканировали на сканере HP ScanJet 5300C и обсчитывали при помощи программы SigmaGel. Достоверность различий в данных по миграции клеток оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Действие пептидов оценивали в процентах по формуле:  $(1 - M_n/M)100\%$ , где  $M$  – миграция клеток под влиянием МСР-1, принятая за единицу (или 100%),  $M_n$  – миграция клеток в присутствии МСР-1 и пептида.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 04-04-48454 и Миннауки РФ ИБ 02-03.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Baggiolini M.* // Nature. 1998. V. 392. P. 565–568.
2. *Libby P.* // J. Intern. Med. 2000. V. 247. P. 349–358.
3. *Ross R.* // Am Heart J. 1999. V. 138. P. 419–420.
4. *Rollins B.L.* // Blood. 1997. V. 90. P. 909–928.
5. *Yla-Herttuala S., Lipton B.A., Rosenfeld M.E., Sarkioja T., Yoshimura T., Leonard E.J., Wilzlum J.L., Steinberg D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 5252–5256.
6. *Beall C.J., Mahajan S., Kuhn D.E., Kolattukudy P.E.* // Biochem J. 1996. V. 313. P. 633–640.
7. *Gong J.-H., Clark-Levis I.* // J. Exp. Med. 1995. V. 181. P. 631–640.
8. *Kaji M., Ikari M., Hashiguchi S., Ito Y., Mastsumoto R., Yoshimura T., Karatsb J., Sugimura K.* // J. Biochem. 2001. V. 129. P. 577–583.
9. *Steitz S.A., Hasegawa K., Chiang S.-L., Cobb R.R., Castro M.A., Lobl T.J., Yamada M., Lazarides E., Cardarelli P.M.* // FEBS Lett. 1998. V. 430. P. 158–164.
10. *Reckleess J., Grainger D.J.* // Biochem. J. 1999. V. 340. P. 803–811.
11. *Valente A.J., Rozek M.M., Schwartz C.J., Graves D.T.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 176. P. 309–314.
12. *Reckleess J., Tatalick L.M., Grainger D.J.* // Immunology. 2001. V. 103. P. 1–17.
13. *Shemyakin M.M., Ovchinnikov Yu.A., Ivanov V.T.* // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1969. V. 8. P. 492–499.
14. *Andreu D., Albericio F., Sole N.A., Munson M.C., Ferrer M., Barany G.* // Peptide Synthesis Protocols / Eds W. Pennington, M.B. Dunn. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1994. P. 91–169.
15. *Fields G.B., Noble R.L.* // Int. J. Peptide Protein Res. 1990. V. 35. P. 161–214.
16. *Walker B.* // Peptide Antigens / Ed. G.B. Wisdom. Oxford UK: IRL Press, 1994. P. 27–81.
17. *Siber P.* // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. P. 1637–1640.

18. Rubina A.Yu., Bespalova Zh.D., Ovchinnikov M.V., Bushuev V.N., Popletaeva E.B., Efremov E.E. // *Mendeleev Commun.* 1996. P. 159–161.
19. Wuthrich K. // *NMR of Proteins and Nucleic Acids.* N.Y.: Wiley, 1986.
20. Lauer J.L., Fields C.G., Fields G.B. // *Letters in Peptide Sci.* 1994. V. 1. P. 197–205.
21. Nicolas E., Pedroso E., Giralt E. // *Tetrahedron Lett.* 1989. V. 30. P. 497–500.
22. Dolling R., Beyermann M., Haenel J., Kernchen F., Krause E., Franke P., Brudel M., Bienert M. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994. P. 853–854.
23. Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Азьмуко А.А., Кудрявцева Е.В., Краузе Е., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // *Биоорганическая химия.* 2004. Т. 30. С. 115–125.
24. Han K.H., Green S.R., Tangirala R.K., Tanaka S., Quenhenberger O. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 32055–32062.
25. Jarnagin K., Grunberger D., Mulkins M., Wong B., Hemmerich S., Paavola C., Bloom A., Bhakta S., Diehl F., Freedman R., McCarley D., Polsky I., Pingsou A., Kosaka A., Handel T.M. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 16167–16177.
26. Boyum A. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968. P. 77–89.
27. Витт С.В., Мягкова М.А., Сапоровская М.Б., Никитина С.Б., Беликов В.М. // *Биоорганическая химия.* 1978. Т. 4. С. 154–157.
28. Al-Sumidaie A.M., Jones D.L., Young H.L. // *J. Immunol. Methods.* 1984. V. 75. P. 129–140.
29. Falk W., Goodwin R.H. Jr., Leonard E.J. // *J. Immunol. Methods.* 1980. V. 33. P. 239–247.

## Peptide Fragments and Structural Analogues of Chemokine MPC-1: Synthesis and Effect on the MPC-1-Induced Migration of Mononuclear Cells

M. V. Sidorova, A. S. Molokoedov, T. I. Aref'eva, N. B. Kukhtina,  
T. L. Krasnikova<sup>#</sup>, Zh. D. Bespalova, and V. N. Bushuev

<sup>#</sup>Phone: +7(095) 414-6956; e-mail: krasnikova@cardio.ru

Cardiological Research and Production Association, Ministry of Health of the Russian Federation,  
ul. Tret'ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia

Fourteen fragments and structural analogues of chemokine MCP-1 were synthesized using the Fmoc strategy of solid phase peptide synthesis. The effect of synthesized peptides on the MCP-1-stimulated migration of mononuclear cells was examined. Both *in vitro* stimulants and inhibitors of the monocyte migration were found among the peptides. A possible participation of the C-terminal part of the MCP-1 molecule in the inhibition of the MCP-1-stimulated cell migration was found for the first time. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* chemokine, MPC-1, monocytes, MPC-1-induced migration, solid phase synthesis, synthetic peptides