



УДК 547.964.4.07+578.083

СИНТЕЗ [Pro<sup>1</sup>]ТАФЦИНА<sup>1</sup>—НОВОГО АНТАГОНИСТА  
ФАГОЦИТОЗСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА*Веретенникова Н. И., Атаре З. А., Приедниесе Э. Е.,  
Чинис Г. И.**Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Синтезирован один из аналогов тафцина — [Pro<sup>1</sup>]тафцин; показано, что он является сильным антагонистом тафцина.

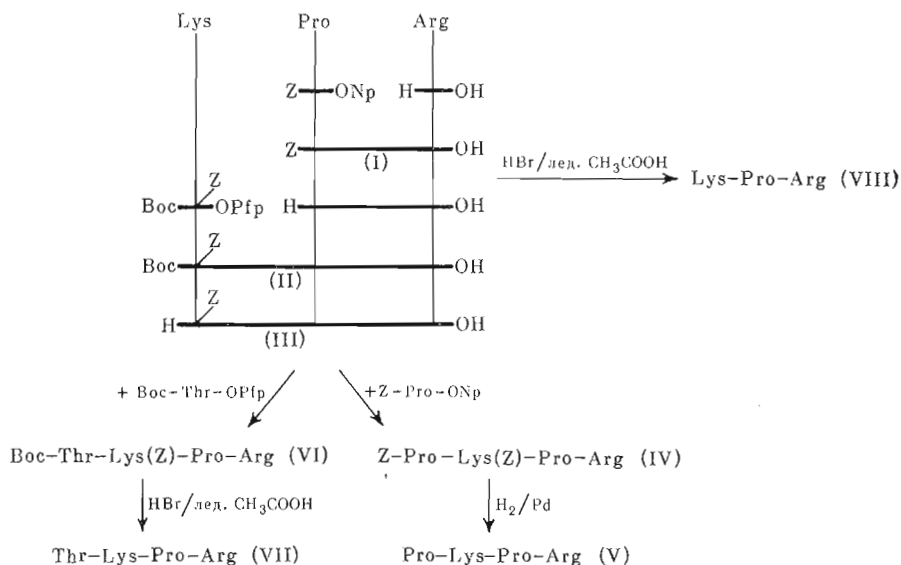
Фагоцитозстимулирующий тетрапептид Thr-Lys-Pro-Arg представляет собой фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулинов человека класса G (например, последовательность 289—292 в H-цепи иммуноглобулина человека EU [1]) и является гормоноподобным биорегулятором, участвующим в активации иммунзащитных систем живых организмов [2, 3]. В настоящее время исследованы его биологические свойства в системах *in vitro* и *in vivo* [4, 5], но механизм образования тафцина еще не раскрыт.

Минимальной структурной единицей тафцина, которая определяет специфичность «узнавания» и комплексобразования молекулы как с клеточными рецепторами лейкоцитов, так и с антителами, является C-концевой трипептид [6], основная аминокислота (Lys<sup>2</sup>) которого участвует в формировании уникальной пространственной структуры биорегулятора [7]. Поэтому можно предположить, что мутационные изменения, превращающие молекулу тафцина из агониста в антагонист в случае так называемой семейной недостаточности по тафцину [8—10], затрагивают именно N-концевую аминокислоту — треонин.

Как известно, треонин кодируется четырьмя триплетами: ACU, ACC, ACA и ACG. Учитывая неравномерную вырожденность генетического кода, с наибольшей уверенностью можно предположить, что в результате мутации треонин будет замещен на серин (шесть триплетов), пролин, аланин (четыре триплета) или изолейцин (три триплета).

Некоторые аналоги тафцина, содержащие в качестве N-концевой аминокислоты предполагаемые «мутантные формы», в литературе уже описаны и действительно являются антагонистами природного пептида. Так, например, [Ser<sup>1</sup>]тафцин ингибирует фагоцитарное стимулирование полиморфноядерных лейкоцитов, вызванное тафцином, на 78%, а [Ala<sup>1</sup>]тафцин в том же тесте — на 65% [11]. [Lys<sup>1</sup>]тафцин, однако, является лишь слабым агонистом тафцина, что, учитывая некоторую эквивалентность остатков лизина, аргинина и аспарагина, позволяет постулировать такие же свойства и у [Arg<sup>1</sup>]- и [Asn<sup>1</sup>]тафцина. Интерес в качестве антагониста тафцина, по-видимому, не представляет также [Phe<sup>1</sup>]тафцин, так как [Val<sup>1</sup>]тафцин ингибирует фагоцитарную активность тафцина лишь на 30% [11].

Схема синтеза пептидов



-ONp — *n*-нитрофенокси-, -OPfp — пентафторфенокси-.

Из всех возможных точечных мутаций наибольший интерес вызывает замена Thr → Pro. Это изменение может привести к образованию структур, не только ингибирующих действие тафцина на уровне клеточных рецепторов, но и блокирующих активные центры ферментных систем, участвующих в образовании тафцина. Последовательность Pro-Lys-Pro-Arg вызывает также интерес как фрагмент, который часто встречается в структурах различных биологически активных пептидов и минибелков (так называемый общий фрагмент второго типа с аминокислотной последовательностью Pro/Val-B-Pro/Val-B, где B — основная аминокислота, см. [12]).

Для исследования биологических свойств [Pro<sup>1</sup>]тафцина мы синтезировали этот пептид и исследовали его влияние на процесс фагоцитоза лейкоцитов. Классическими методами пептидного синтеза получены также сам тафцин и описанный в литературе антагонист тафцина — Lys-Pro-Arg [11] (дез-Thr<sup>1</sup>-тафцин).

Трипептид Boc-Lys(Z)-Pro-Arg, общий для всех трех соединений, получили ступенчатым наращиванием пептидной цепи с C-конца с помощью активированных эфиров (см. схему). Гуанидиновую и карбоксильную группы аргинина защищали посредством образования внутренней соли по методу, описанному в работе [13]. Активированные эфиры выбирали, учитывая растворимость получаемых и исходных продуктов. Для синтеза тетрапептидов к трипептиду со свободной аминогруппой прибавляли активированные эфиры Boc-треонина или Z-пролина. Снятие защитных групп проводили ацидолизом или гидрированием над палладиевым катализатором. Свободные пептиды очищали на колонках с СМ-целлюлозой, применяя в качестве элюента ацетат аммония с линейным градиентом ионной силы.

Биологическую активность полученных веществ исследовали в двух тестах, определяя их воздействие на фагоцитарную активность сегментно-ядерных нейтрофилов крови крыс *in vitro* по методике Гостева и сотр. [14] и ингибирование действия тафцина на фагоцитоз нейтрофилов [11].

Предварительные данные биологических испытаний показали, что синтезированный образец тафцина в концентрациях 10<sup>-7</sup> М (2 мкг/мл) стимулирует фагоцитоз лейкоцитов двукратно (фагоцитарное стимулирование 104%). Индекс фагоцитоза, характеризующий число активных фаго-

цитов (см. «Экспериментальную часть») в той же концентрации для синтезированного образца тафцина, — 1,3. Определение степени ингибирования процесса фагоцитоза показало, что [Pro<sup>1</sup>]тафцин является более сильным ингибитором тафцина, чем трипептид дез-Thr<sup>1</sup>-тафцин. В концентрациях 10<sup>-7</sup> М ингибирование для нового аналога составляет 154%, а для трипептида — только 112%. В более высоких концентрациях (10<sup>-6</sup>–10<sup>-7</sup> М) оба соединения действуют как агонисты тафцина. Таким образом, наряду с [Ser<sup>4</sup>]- и [Ala<sup>4</sup>]тафцином [Pro<sup>1</sup>]тафцин является сильным антагонистом тафцина.

### Экспериментальная часть

Для синтеза использовали аминокислоты и их производные фирмы «Reanal» (Венгрия). Все аминокислоты имеют *L*-конфигурацию. Температуры плавления, определяемые в открытых капиллярах, приведены без поправок. Гомогенность полученных соединений проверяли на пластинках «Silufol», «Eastman», «Merck». Приведены хроматографические подвижности  $R_f$  в следующих системах: *n*-бутанол — этанол — вода — уксусная кислота, 80:10:30:5 (А); *n*-бутанол — этанол — пиридин — вода — уксусная кислота, 30:20:24:5 (Б), а также электрофоретическая подвижность по отношению к гистидину  $E_{HIS}$  на бумаге FN-15 (Filtrak, ГДР) в 1 н. (рН 2,4) и 5 н. (рН 1,4) уксусной кислоте. Углы вращения определяли на поляриметре «Perkin-Elmer 141». Для всех соединений данные элементного и аминокислотного анализа совпадают с вычисленными значениями. При очистке на СМ-целлюлозе линейный градиент ионной силы создавали с помощью смесителя фирмы ЛКВ (Швеция) «Ultrograd», время — 24 ч.

*Бензилоксикарбонилпролил-аргинин (I)*. К раствору 37 г (100 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилпролина в 360 мл диоксана при интенсивном перемешивании прибавляли раствор 16 г (90 ммоль) аргинина в 160 мл воды. Через 2 ч растворитель упаривали досуха в вакууме и остаток растворяли в 100 мл ДМФА. Раствор перемешивали при 20°С 72 ч, затем выливали в 1 л этилацетата. После выдерживания реакционной смеси в течение 12 ч при 5°С образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре этилацетатом и эфиром. После перекристаллизации из смеси этанол — этилацетат, 1:5, получали 35 г (96%) соединения (I), т. пл. 137–140°С;  $[\alpha]_D^{20}$  —46,6° (*c* 1,0; H<sub>2</sub>O);  $R_f$  0,53 (А, Eastman), 0,66 (Б, Eastman);  $E_{HIS}$  0,56 (рН 2,4).

*трет-Бутилоксикарбонил-N<sup>e</sup>-бензилоксикарбониллизил-пролил-аргинин (II)*. 35 г (86 ммоль) соединения (I) обрабатывали 250 мл 2 н. НВг/лед. СН<sub>3</sub>СООН в течение 1 ч, затем упаривали в вакууме досуха и растирали под сухим эфиром. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, сушили в вакууме над Р<sub>2</sub>О<sub>5</sub>, растворяли в 500 мл воды и обрабатывали анионитом АВ 17×8 до отрицательной реакции на Вг<sup>-</sup>ионы. Раствор упаривали в вакууме досуха. Выход 23 г (100%). Далее растворяли остаток в 100 мл воды и к раствору при перемешивании прибавляли 53 г (100 ммоль) пентафторфенилового эфира трет-бутилоксикарбонил-N<sup>e</sup>-бензилоксикарбониллизина в 300 мл диоксана. Через 2 ч раствор упаривали в вакууме досуха, осадок растворяли в 150 мл ДМФА, раствор перемешивали в течение 48 ч, отгоняли ДМФА в вакууме до 1/3 объема, затем выливали в 1 л эфира. Далее обрабатывали как в случае соединения (I). После перекристаллизации из смеси этилацетат — этанол — эфир, 3:1:30, получали 47 г (74%) соединения (II); т. пл. 90°С (разл.);  $[\alpha]_D^{20}$  —39,0° (*c* 1,0; 10% СН<sub>3</sub>СООН);  $R_f$  0,51 (А, Eastman), 0,82 (Б, Eastman);  $E_{HIS}$  0,34 (рН 2,4).

*N<sup>e</sup>-Бензилоксикарбониллизил-пролил-аргинин (III)*. 6,3 г (10 ммоль) соединения (II) обрабатывали 1,5 ч 40 мл 70% водного раствора трифторуксусной кислоты. Раствор упаривали в вакууме досуха, остаток растирали под сухим эфиром и сушили в вакууме над Р<sub>2</sub>О<sub>5</sub>. Полученное вещество растворяли в 100 мл воды и обрабатывали анионитом АВ 17×8.

Раствор упаривали в вакууме досуха, сушили в вакууме над  $P_2O_5$ . Выход 5,6 г (100%);  $R_f$  0,30 (А, Eastman), 0,62 (Б, Eastman);  $E_{HIS}$  0,75 (рН 2,4).

*Бензилоксикарбонилпролил-N<sup>ε</sup>-бензилоксикарбониллизил-пролил-аргинин (IV)*. К раствору 1,86 г (3,3 ммоль) соединения (III) в 10 мл воды при перемешивании прибавляли раствор 1,33 г (3,6 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилпролина в 30 мл диоксиана. Через 2 ч раствор упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 8 мл ДМФА и перемешивание продолжали еще 72 ч. Реакционную смесь выливали в 200 мл этилацетата. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре этилацетатом и сушили в вакууме над  $P_2O_5$ . Выход 2,36 г (94%); т. пл. 129° С;  $[\alpha]_D^{20}$   $-86,2^\circ$  (с 0,5; 5%  $CH_3COOH$ );  $R_f$  0,36 (А, Eastman), 0,65 (Б, Merck);  $E_{HIS}$  0,38 (рН 2,4).

*Пролил-лизил-пролил-аргинин ([Pro<sup>1</sup>]тафцин) (V)*. 1,00 г (1,3 ммоль) соединения (IV) гидрировали 48 ч в смеси 20 мл метанола и 1 мл лед.  $CH_3COOH$  над палладиевой чернью. Затем упаривали в вакууме досуха, промывали остаток эфиром и растворяли в 100 мл воды; раствор наносили на колонку (100×25 мм) с СМ-целлюлозой, колодку промывали ацетатом аммония с линейным градиентом ионной силы: 0,01 М, рН 4,5—0,25 М, рН 6,7. Собирали фракции 77—177 (фракции по 20 мл), упаривали в вакууме, лиофилизировали из ацетата аммония, затем из воды. Выход 0,32 г (34%); т. пл. 115° С (разл.);  $[\alpha]_D^{20}$   $-80,6^\circ$  (с 0,5; 5%  $CH_3COOH$ );  $R_f$  0,11 (Б, Merck);  $E_{HIS}$  1,01 (рН 2,4). Найдено, %: С 44,65; Н 7,95; N 15,69.  $C_{22}H_{40}N_8O_5 \cdot 3CH_3COOH \cdot 3H_2O$ . Вычислено, %: С 44,00; Н 7,99; N 15,33.

*трет-Бутилоксикарбонилтреонил-N<sup>ε</sup>-бензилоксикарбониллизил-пролил-аргинин (VI)*. 2,2 г (4,1 ммоль) соединения (III) в 30 мл воды при перемешивании прибавляли к раствору 2,1 г (5,3 ммоль) пентафторфенилового эфира трет-бутилоксикарбонилтреонина [15] в 70 мл диоксиана. Далее реакционную смесь обрабатывали подобно соединению (IV). Выход 2,6 г (88%). Полученное вещество очищали на колонке (50×30 мм) с силикагелем «Сметарол» (40/100 мкм, ЧССР) в системе А. Отобранные фракции контролировали ТСХ. Объединяли фракции с  $R_f$  0,45 (А, Silufol). Выход соединения (VI) 1,8 г (60%); т. пл. 175° С (разл.);  $R_f$  0,65 (Б, Merck);  $E_{HIS}$  0,41 (рН 1,4).

*Треонил-лизил-пролил-аргинин (тафцин) (VII)*. 1,3 г (1,7 ммоль) соединения (VI) растворяли в 3 мл лед.  $CH_3COOH$  и прибавляли 2 мл 4,9 н. раствора  $HVg/$ лед.  $CH_3COOH$ . Через 90 мин растворитель упаривали в вакууме досуха, остаток обрабатывали сухим эфиром, полученный порошок отфильтровывали и сушили в вакууме. Затем его растворяли в 100 мл воды, обрабатывали анионитом АВ 17×8 до отрицательной реакции на  $Vg^-$ -ионы и наносили на колонку (120×25 мм) с СМ-целлюлозой. Элюировали вещество в градиенте ацетата аммония подобно соединению (V). Собирали фракции 79—100, упаривали и лиофилизировали из ацетата аммония, а затем из воды. Выход 0,5 г (77%); т. пл. 140° С (разл.);  $[\alpha]_D^{20}$   $-58,3^\circ$  (с 0,6; 5%  $CH_3COOH$ );  $R_f$  0,19 (Б, Merck);  $E_{HIS}$  0,98 (рН 2,4). Найдено, %: С 44,70; Н 7,81; N 16,58.  $C_{21}H_{40}N_8O_6 \cdot 2CH_3COOH \cdot 3H_2O$ . Вычислено, %: С 44,50; Н 8,06; N 16,61.

*Лизил-пролил-аргинин (дез-Thr<sup>1</sup>-тафцин) (VIII)*. 0,63 г (1 ммоль) трет-бутилоксикарбонил-N<sup>ε</sup>-бензилоксикарбониллизил-пролил-аргинина (II) растворяли в 3 мл лед.  $CH_3COOH$  и прибавляли 3 мл 4 н.  $HVg/$ лед.  $CH_3COOH$ . Реакционную смесь выдерживали 2 ч, упаривали в вакууме досуха и растирали под сухим эфиром. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, сушили в вакууме над  $P_2O_5$ . Выход 0,41 г (100%);  $R_f$  0,16 (Б, Merck);  $E_{HIS}$  1,12 (рН 2,4).

Полученное вещество очищали на колонке (120×25 мм) с СМ-целлюлозой, элюируя ацетатом аммония 0,05 М, рН 5,0—0,20 М, рН 8,0. Фракции 77—100 (по 20 мл/фракция) объединяли, упаривали, лиофилизировали из ацетата аммония, а затем из воды. Выход чистого соединения (VI)

0,36 г (62%); т. пл. 145° С (разл.);  $[\alpha]_D^{20} -40,1^\circ$  (с 1,0; H<sub>2</sub>O). Литературные данные [11]:  $[\alpha]_D^{23} -35,8^\circ$  (с 0,79; 5% CH<sub>3</sub>COOH);  $R_f$  0,16 (Б, Merck);  $E_{1\%}^{1\text{см}}$  1,18 (рН 2,4). Найдено, %: С 47,09; Н 8,37; N 16,85. C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> · 3CH<sub>3</sub>COOH. Вычислено, %: С 47,66; Н 7,83; N 16,91.

Для определения фагоцитарной активности лейкоцитов в присутствии синтезированных веществ брали кровь крысы, разведенную 2% раствором лимоннокислого натрия в отношении 1:1, добавляли одинаковый объем раствора изучаемых соединений с определенной концентрацией и суточную культуру коагулазопозитивного патогенного штамма *Staphylococcus aureus* в концентрации 1 млрд/мл и инкубировали в термостате при 37° С в течение 30 мин. Затем готовили мазки, окрашивали их и подсчитывали количество активных сегментно-ядерных нейтрофилов из 100 и количество бактерий, поглощенных 100 лейкоцитами.

Для определения антагонистических свойств аналогов в данном тесте преинкубировали кровь 30 мин при 37° С с исследуемым соединением, а затем добавляли тафцин в соответствующей концентрации. Далее опыт проводили по вышеупомянутой методике. Параметры, характеризующие процесс, рассчитывали по следующим формулам:

$$\text{Индекс фагоцитоза} = \frac{\text{количество активных фагоцитов из 100 в опыте}}{\text{количество активных фагоцитов из 100 в контроле}};$$

$$\text{Фагоцитарное стимулирование} = \frac{P_v - P_k}{P_k} \cdot 100\%;$$

$$\text{Ингибирование} = \frac{P_t - P_a}{P_t - P_k} \cdot 100\%.$$

Здесь  $P_v$  — количество бактерий, поглощенных 100 фагоцитами в присутствии исследуемого вещества (в том числе тафцина);  $P_t$  — количество бактерий, поглощенных 100 фагоцитами в присутствии тафцина;  $P_a$  — количество бактерий, поглощенных 100 фагоцитами в опытах по ингибированию;  $P_k$  — количество бактерий, поглощенных 100 фагоцитами в контроле.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Edelman C. M. (1970) *Biochemistry*, 9, 3197–3205.
2. Najjar V. A., Nishioka K. (1970) *Nature*, 228, 672–673.
3. Nishioka K., Constantopoulos A., Satoh P. S., Najjar V. A. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 47, 172–179.
4. Nishioka K. (1978) *Gann*, 69, 569–572.
5. Florentin I., Bruley-Rosset M., Kiger N., Imbach J. L., Winternitz F., Mathe G. (1978) *Cancer Immunol. Immunopathol.*, 5, 211–216.
6. Tzevalou E., Segal S., Stabinsky Y., Fridkin M., Spierer Z., Feldman M. (1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, 3400–3404.
7. Никифорович Г. В. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 1427–1430.
8. Constantopoulos A., Najjar V. A., Smith J. W. (1972) *J. Pediat.*, 80, 564–572.
9. Constantopoulos A., Najjar V. A. (1973) *Acta paediatrica scand.*, 62, 645–648.
10. Najjar V. A. (1975) *J. Pediat.*, 87, 1121–1124.
11. Fridkin M., Stabinsky Y., Zakuth V., Spierer Z. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, 496, 203–211.
12. Chipens G. I., Krikis A. I., Polevaya L. K. (1979) in: *Biophysical and Biochemical Information Transfer in Recognition* (Vassileva-Popova J. G., Jensen E. V., eds), pp. 23–48, Plenum Press, N. Y.—London.
13. Вироев С. И., Мартынов В. Ф., Титов М. И. (1968) *Ж. общ. химии*, 38, 2337.
14. Гостев В. С., Петряшина С. А., Сааков А. К. (1950) в кн.: *Вопросы питания*, т. 13, вып. 2, с. 110–116, Труды АМН СССР.
15. Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I. (1973) *Lieb. Ann. Chem.*, 1421–1429.

Поступила в редакцию  
29.1.1980

#### SYNTHESIS OF [Pro<sup>4</sup>]TUFTSIN — A NOVEL ANTAGONIST OF PHAGOCYTOSIS-STIMULATING PEPTIDE

VERETENNIKOVA N. I., ATARE Z. A., PRIEDNIECE E. J., CHIPENS G. I.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences  
of the Latvian SSR, Riga*

[Pro<sup>4</sup>]Tuftsins, one of possible tuftsins analogs, has been synthesized and shown to be a potent tuftsins antagonist.