



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1277903** **A3**

(51) 4 C 07 K 1/02, 5/04, A 61 K 37/02

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

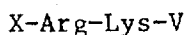
К ПАТЕНТУ

- (21) 3454444/23-04
(22) 11.06.82
(31) 1755/81
(32) 12.06.81
(33) HU
(46) 15.12.86. Бюл. № 46
(71) Рихтер Геден Ведезети Дьяр РТ (HU)
(72) Лайош Кишфалуди, Олга Ньеки, Иштван Шён, Ласло Денеш, Юлиа Эмбер, Дьёрдь Хайош, Ласло Спорни и Бела Сенде (HU)
(53) 547.964.4.07(088.8)
(56) Патент США № 4190646, кл. C 07 C 103/52, опублик. 1980.
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДОВ В ВИДЕ КИСЛОТНО-АДДИТИВНЫХ СОЛЕЙ
(57) Изобретение касается пептидов, в частности их получения в виде кислотно-аддитивных солей общей форму-

лы I X-Arg-Lys-Y, где X - H, Ser; Y - Asp, Asp-Val, Asp-Val-NH₂, Asp-Val-ONH₂, Asn-Val, Asp-Ala, Asp-Ile, Ala-Val, Glu-Val, Asu-Val, которые обладают иммунологической активностью и могут быть использованы в биологии и медицине. Для выявления активности среди пептидов были получены новые I. Их синтез ведут ступенчатым наращиванием пептидной цепи, начиная с эфира C - концевой аминокислоты, методом активированных эфиров и методом смешанных ангидридов с последующим отщеплением от конечного защищенного пептида защитных групп каталитическим гидрогенолизом. Испытания I показывают, что они обладают более широким спектром иммунорегулирующего действия при низкой токсичности, чем известные пептиды. 6 табл.

(19) **SU** (11) **1277903** **A3**

Изобретение относится к способу получения новых пептидов общей формулы



в виде кислотно-аддитивных солей, где X - водород, Glp;

V-Asp, Asp-Val, Asp-Val-NH₂, Asp-Val-OMe, Asn-Val, Asp-Ala, Asp-Ile, Ala-Val, Gly-Val, Asu-Val, обладающих иммуномодулирующей активностью, которые могут найти применение в экспериментальной биологии и медицине.

Цель изобретения - способ получения новых пептидов, обладающих более широким спектром иммунорегулирующего действия.

Принятые сокращения: Z - бензилоксикарбонил-; Boc - трет-бутилоксикарбонил-; OBu^t - трет-бутилокси-; OPfp - пентафторфенокси-; Asu - аминосукцинил-; OMe - метокси-; OBzl - бензилокси-; ONB - 4-нитробензилокси-группа; ДМФА - диметилформамид; ТЭА - триэтиламин.

Температуру плавления определяют с помощью прибора Тоттоли фирмы Büchi (Швейцария). Гомогенность промежуточных и конечных соединений контролируют с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем фирмы Merck (ФРГ) в системах:

1 - этилацетат-(пиридин-уксусная кислота - вода, 20:6:11), 95:5;

2 - этилацетат - (пиридин-уксусная кислота - вода, 20:6:11), 9:1;

3 - этилацетат - (пиридин-уксусная кислота - вода, 20,5:11), 4:1;

4 - этилацетат - (пиридин-уксусная кислота - вода, 20:6:11), 3:2;

5 - н-бутанол - (пиридин-уксусная кислота - вода, 20:6:11), 3:7;

6 - хлороформ - метанол, 9:1;

7 - н-бутанол - уксусная кислота - вода, 1:1:1;

8 - н-бутанол - уксусная кислота - вода, 4:1:5.

Хроматограммы проявляли нингидрином после хлорирования с К-толидином. Удельное оптическое вращение измеряли на цифровом фотоэлектрическом поляриметре Perkin-Elmer 141 (США). Растворители отгоняли на ротационном испарителе фирмы (Швейцария) на водяной бане с температурой не выше 40°C.

Пример 1 (Метод А). Z-Arg(NO₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB (I). К раствору 1,73 г (6,0 ммоль) Val-

ONB · HCl в 15 мл ДМФА добавляют 0,84 мл (6,0 ммоль) триэтиламина и 2,45 г (5,0 ммоль) Boc-Asp-OPfp.

Реакционную смесь перемешивают

- 5 30 мин при комнатной температуре, упаривают, остаток растворяют в 30 мл этилацетата. Раствор промывают 15 мл 1 н. соляной кислоты, 15 мл 5%-ного раствора бикарбоната натрия и 15 мл воды, сушат над безводным сульфатом натрия и упаривают в вакууме. Полученный защищенный дипептид (R_f⁶ 0,9) растворяют в 10 мл 8 н. HCl в диоксане, через 15 мин добавляют 40 мл безводного эфира и упаривают досуха.
- 10 Полученный в остатке свободный дипептид (R_f² 0,5) растворяют в 10 мл ДМФА, доводят значение pH раствора с помощью триэтиламина до 8,0 и добавляют 3,1 г (5,5 ммоль) Boc-Lys-/Z/-OPfp. Реакционную смесь перемешивают 30 мин, поддерживая pH 8,0 с помощью триэтиламина, разбавляют
- 15 60 мл хлороформа и промывают 15 мл 1 н. соляной кислоты и 15 мл воды, сушат безводным сульфатом натрия и упаривают, остаток упаривают с безводным эфиром. Полученный защищенный трипептид (R_f¹ 0,4) высаждают со 100 мл безводного эфира, отфильтровывают, дважды промывают эфиром и растворяют в 20 мл ДМФА. К полученному раствору добавляют триэтиламин до pH 8,0, а затем 3,3 г (7,0 ммоль) Z-Arg/NO₂/-OPfp. Реакционную смесь перемешивают 30 мин, поддерживают pH 8,0 с помощью триэтиламина, упаривают, остаток растирают с 50 мл этанола, отфильтровывают, промывают этанолом (2 × 10 мл). В итоге получают 3,85 г (73%) I с т.пл. 135-148°C; R_f¹ 0,80.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40

Пример 2 (метод В). Z-Arg(NO₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-OBzl (II).

- 45 Смесь 1,62 г (3,3 ммоль) Boc-Lys(Z)-OPfp, 1,40 г (4,0 ммоль) Asp(OBzl)-OBzl, HCl и 0,98 мл (7,0 ммоль) триэтиламина в 10 мл этилацетата оставляют стоять в течение часа при комнатной температуре и затем разбавляется с 20 мл этилацетата. Смесь встряхивают сначала с 10 мл 1 н. раствора соляной кислоты, затем с
- 50 10 мл 5%-ного раствора бикарбоната натрия, сушат над безводным сульфатом натрия и затем упаривают в вакууме. Остаток укрепляют с н-гексаном, отфильтровывают и промывают с н-гек-
- 55

саном. Получаемый защищенный дипептид (выход: 81,2%; т.пл. 92-95°C; $R_f^2 = 0,75$) обрабатывают с 30 мл 4 н. солянокислого диоксана в течение 30 мин, затем упаривают до сухого остатка. Свободный дипептид ($R_f^2 = 0,10$) растворяют в 10 мл диметилформамида, раствор нейтрализуют с 0,35 мл триэтиламина и полученную суспензию добавляют к приготовленному следующим образом смешанному ангидриду: 10,6 г (3,0 ммоль) Z-Arg(NO₂)-OH и 0,42 мл (3,0 ммоль) триэтиламина растворяют в 5 мл диметилформамид. Раствор охлаждают до -10°C и при этой температуре смешивают с 0,36 мл (3,0 ммоль) пивалоилхлорида капельным образом. К полученному таким путем раствору смешанного ангидрида через 5 мин при -10°C добавляют раствор свободного пептида. Реакционную смесь перемешивают еще в течение 30 мин при 0°C, затем оставляют стоять на ночь и на следующий день испаряют до сухого остатка. Остаток растворяют в 50 мл хлороформа и раствор встряхивают с 10 мл 1 н. раствора соляной кислоты, затем с 10 мл 5%-ного раствора бикарбоната натрия и, наконец, с 10 мл воды. После сушки органическая фаза упаривается до сухого остатка и полученный остаток укрепляют приготовленной в соотношении 1:1 смесью эфира и н-гексана. Получают 1,82 г (выход 84%) защищенного трипептида с $R_f^2 = 0,70$.

Пример 3 (метод С). Z-Arg(NO₂)-Lys(Z)-Asu-Val-OH (III).

2,51 г (12 ммоль) Val-OtBu·HCl растворяют в 50 мл хлороформа. Раствор смешивают с 3,86 г (10 ммоль) Boc-Asp(OtBu)-OSu и 1,68 мл (12 ммоль) триэтиламина. На следующий день раствор встряхивают сначала с 3×10 мл 1 н. раствора соляной кислоты, затем с 3×10 мл 5%-ного раствора бикарбоната натрия. После осушки растворитель отгоняют. Полученный в качестве остатка защищенный дипептид ($R_f^2 = 0,80$) растворяется в 30 мл 5 н. уксусной кислоты, содержащей бромистый водород, и раствор оставляют стоять на неделю. Затем реакционную смесь упаривают до сухого остатка и остаток укрепляют безводным эфиром. Получают 2,65 г (98,2%) Asu-Val-OH.

Hbr ($R_f^4 = 0,15$) и ацилируют дальше описанным в примере 1 методом. Дан-

ные защищенного тетрапептида содержатся в табл. 5.

Пример 4. Arg-Lys-Asp-Val·AcOH (IV).

2,25 г (2,22 ммоль) Z-Arg(NO₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB (пример 1) суспендируют в 50 мл 90%-ной уксусной кислоты. Суспензия смешивается с 1 г 5%-ного палладия на активном угле и через смесь в течение 14 ч пропускают водород. Затем катализатор отфильтровывают, промывают с 2×10 мл 90%-ной уксусной кислоты, фильтрат объединяют с промывной жидкостью и затем упаривают до сухого остатка. Остаток с водой и этанолом вновь упаривают, затем растворяют в 2 мл воды и смешивают с 30 мл этанола. Полученную суспензию фильтруют и осадок промывают этанолом. Получают 0,92 г (80%) IV с $[\alpha]_D^{20} = -24,8^\circ$ (Cl; 10% AcOH); $R_f^2 = 0,10$.

Аминокислотный анализ: Lys 1,05 (1); Arg 0,95 (1); Asp 1,04 (1); Val 0,95 (1).

Пример 5. Glp-Arg-Lys-Asp-Val·AcOH (V).

4,1 г IBoc-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB растворяют в 10 мл 8 н. HCl соляной кислоты в диоксане, через 15 мин добавляют 100 мл безводного эфира, выпавший осадок отфильтровывают, дважды промывают эфиром и растворяют в 20 мл ДМФА. К полученному раствору добавляют триэтиламин до pH 8,0, а затем 3,5 г Boc-Arg(NO₂)-POfp и 0,98 мл триэтиламина. Реакционную смесь перемешивают 1 ч, упаривают, остаток растирают с 50 мл этанола, отфильтровывают, промывают этанолом (2×10 мл). Полученный защищенный тетрапептид ($R_f^2 = 0,80$) растворяют в 25 мл 8 н. HCl в диоксане, через 15 мин добавляют к раствору 70 мл безводного эфира, выпавший осадок отфильтровывают, промывают дважды эфиром и растворяют в 30 мл ДМФА. К раствору добавляют триэтиламин до pH 8,0, а затем 2,4 г Glp-OPfp. Реакционную смесь перемешивают 1 ч, добавляют 100 мл этанола, выпавший продукт отфильтровывают, промывают этанолом (2×20 мл). В итоге получают 3,9 г Z-Glp-Arg(NO₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB с т.пл. 166-172°C, $R_f^3 = 0,80$.

2,2 г Z-Glp-Arg(NO₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB суспендируют в 50 мл

90%-ной уксусной кислоты, добавляют 1 г 5%-ного Pd/C и в течение 14 ч гидрируют. Затем катализатор отфильтровывают, промывают 10 мл 90%-ной уксусной кислоты, объединенный фильтрат упаривают, остаток растирают с 30 мл этанола, образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают этанолом (2 × 10 мл) и сушат.

В итоге получают 1,12 г (93%) V. Полученный продукт очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле SI-100 с использованием в качестве элюента системы: метанол - вода 1:1. В итоге получают 0,74 г V с $[\alpha]_D^{22} = -51,3^\circ$ (с 0,9; 10%-ная уксусная кислота).

Аналогично получают ряд других пептидов, физико-химические характеристики которых приведены в табл. 1-2.

Иммуномодулирующая активность описываемых соединений была изучена в опытах *in vitro* и *in vivo* по известным методикам.

1. *in vitro*.

Изучение на активные Е-розетки проводилось с помощью модифицированного способа Wybran и др. с лимфоцитами частично здоровых, частично аутоиммунно больных людей (ревматоидный артрит и системная волчанка красная). К 50 мл клеточной суспензии лимфоцитов, смотря по обстоятельствам, добавляют 100 мл разбавленного до концентрации от 10^{-3} до 10^{-11} мол/л изучаемого вещества. Смесь инкубировали при 37°C на воздухе, содержащем 5% CO₂, в течение 60 мин и затем смешивали с 50 мл 1%-ной суспензии эритроцитов (овечьих). Затем в течение 10 мин центрифугировали с числом оборотов 1000 мин⁻¹. После этого стеклышки ставили на модифицированную встряхивающую машину для борьбы с желчнокаменной болезнью и встряхивали в течение 30 с (частота встряхивания: 65 мин⁻¹, высота подъема 8 см). С целью фиксации розеток к каждой трубочке добавляли 50 мл 0,1%-ного глутарового альдегида. Через 3 мин под микроскопом насчитывались более чем три лимфоцита, связывающие происходящие от овцы эритроциты, всего оценивались 4 × 100 клеток. Сепарированные лимфоциты содержали в качестве загрязнителя макрофаги и полиморфноядерные

клетки (максимально 10%). Часто связывающие розетки клетки корригировались в каждом случае до этого значения. Полученные результаты представлены в табл. 3-4.

Тест ингибирования азатиоприном Е-розеток.

Суспензию клеток, содержащую 2×10^6 лимфоцитов/мл, получают из крови здоровых доноров, выбранных по случайному закону. Тест на ингибирование азатиоприном Е-розеток выполняется согласно ранее описанному способу. Коротко, этот способ состоит во введении в 200 мкл суспензии клеток 500 мкл азатиоприна и 200 мкл HBSS без добавок, или содержащего исследуемое вещество. Вещества подвергают испытанию при концентрациях в пределах от 10^{-11} до 10^{-3} моль/л. В качестве сравнительного эксперимента смешивают 200 мкл суспензии клеток и 400 мкл HBSS.

Полученные смеси инкубируют в воздухе, содержащем 5% двуокиси углерода, при 37°C в течение 1 ч, после чего смешивают с 200 мкл суспензии 1% SRBC и центрифугируют при 90g в течение 5 мин. 400 мкл верхней фракции (жидкости) удаляют и после осторожного повторного суспендирования берут для расчета образования Е-розеток по меньшей мере 400 клеток (образование розеток - когда 3 или более SRBC окружают один лимфоцит). Статистический анализ осуществляется с использованием распределения Стьюдента.

Вследствие различной активности в отношении образований Е-розеток у лимфоцитов, полученных от различных доноров и различной их ингибируемости азатиоприном, вещества характеризуются их способностью восстанавливать активность лимфоцитов к образованию Е-розеток, ингибируемую азатиоприном, выраженной в % восстановления (R %):

$$R \% = \frac{100(\text{Эксп-ERFC-A-ERFC})}{\text{ERFC} - \text{Az-ERFC}}$$

где ERFC и Az-ERFC обозначают средний процент клеток, образующих Е-розетки, без ингибитора и в присутствии азатиоприна соответственно.

Эксп-ERFC представляет собой процент клеток, образующих Е-розетки, в присутствии азатиоприна и экспериментального вещества.

Полученные результаты представлены в табл. 5.

II. in vivo.

1. Для изучения оказывающего влияния на продукции антител действия выбирали метод Цегловского.

Новорожденным Wistar - крысам самое позднее в 12-й час после их рождения внутрибрюшинно вводилось подлежащее изучению вещество в форме 25 мл жидкости с концентрацией от $4 \cdot 10^3$ до $4 \cdot 10^7$ мол/л (единичная доза на каждые 9 животных). В возрасте 14 дней животные иммунизировались путем внутрибрюшинного введения каждому 0,5 мл 5%-ной суспензии эритроцитов овцы, и на 7-й день после иммунизации животные обескровливают путем декапитации. Кровь каждых трех животных объединяют, в течение 10 мин центрифугируют с числом оборотов 3000 мин⁻¹ и в таком образом полученной сыворотке определяют титр антител по методу Така tsy.

Результаты выражались как титр агглютинации, причем в качестве титра принималось то наибольшее разбавление сыворотки, при котором еще различимой является агглютинация. Результаты сведены в табл. 6.

2. Число клеток, производящих специфические антивещества, определялось по методу Gunningham.

Суть метода состоит в том, что из клеток селезенки иммунизированных животных, из суспензии эритроцитов овцы и комплемента готовится гомогенная суспензия и вводится в камеру пригодную для развития моноклеточных слоев. Вокруг клеток, производящих антивещества, образуется постепенный ореол и число этих ореолов (пятен) идентич-

но с числом клеток, производящих специфическое антивещество (Plaque forming cells, PFC).

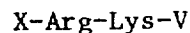
Подопытные животные максимум на 12-й час после своего рождения один раз внутрибрюшинно обрабатывались с подлежащим изучению веществом. Согласно методу (1) каждое вещество изучалось в трех дозах. На 7-й день после иммунизации изучалась способность пропарированных из животных селезеночных клеток к образованию Plaque.

В табл. 7 указано частное от числа Plaques обработанных животных и числа Plaques необработанных контрольных животных.

Как видно из данных, приведенных в табл. 3-7, соединения, получаемые предлагаемым способом, обладают широким спектром иммуномодулирующего действия в сочетании с низкой токсичностью.

25 Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения пептидов общей формулы



где X - водород, Glp;

V-Asp, Asp-Val, Asp-Val-NH₂, Asp-Val-OMe, Asn-Val, Asp-Ala, Asp-Ile, Ala-Val, Glu-Val, Asu-Val, в виде кислотно-аддитивных солей, отличающийся тем, что синтез осуществляют путем ступенчатого наращивания пептидной цепи, начиная с эфира C-концевой аминокислоты, методом активированных эфиров и методом смешанных ангидридов с последующим отщеплением от конечного защищенного пептида защитных групп каталитическим гидрогенолизом.

Получение и свойства защищенных пептидов

	Пептид	Выход, %	Ступе- ни	Метод полу- чения	Т.пл., °C	Rf	Очистка
1	Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB	73	90	A	135-148	0,8 (2)	80%-ная уксус- ная кислота
2	Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-OBzl	68	82	B	аморфная	0,70 (2)	Эфир-н-гексан (промывка) 1:2
3	A-Arg(Z)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-NH ₂	52	81	A	214-216	0,70 (2)	Этанол (вывари- вание)
4	Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-OMe	52	80	B	125-135	0,60 (2)	Этанол
5	Z-Glp-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val-ONB	59	84	A	166-172	0,80 (3)	" -
6	Z-Glp-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-OBzl	60	85	A	100-104	0,60 (2)	Этанол-эфир 1:2
7	Z-Arg(Z)-Lys(Z)-Asn-Val-OBzl	41	74	A	193-195	0,7 (3)	Этанол (выварка)
8	Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Ala-Val-ONB	68	87	A	157-159	0,45 (1)	60%-ная уксусная кислота
9	Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asu-Val-OH	62	85	C, A	94 (с раз- ложением)	0,30 (3)	Этанол-эфир 1:4
10	Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Ala-ONB	50	80	A	124-126	0,45 (1)	60%-ная уксусная кислота
11	Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Ile-OBzl	64	86	B	136-138	(0,70)	Этанол
12	Z-Glp-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Val	68	87	A	199-205	0,80 (3)	60%-ная уксусная кислота
13	Z-Arg(NO ₂)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-4-Cl-Val-OBzl	39	73	B	124-127	0,65 (2)	Этилацетат

Свойства свободных пептидов

Пептид	Выход, %	Rf	(α) _D ^{22*}
1 Arg-Lys-Asp-Val AcOH**	80	0,10 (8)	-24,8
2 Arg-Lys-Asp-AcOH	83	0,20 (7)	0
3 Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂ 2AcOH	84,3	0,20 (7)	-26,5
4 Arg-Lys-Asp-Val-OMe 2AcOH	84,6	0,35 (5)	-28,3
5 Glp-Arg-Lys-Asp-Val**	93	0,40 (5)	-51,3
6 Glp-Arg-Lys-Asp-AcOH**	70	0,35 (5)	-31,4
7 Arg-Lys-Asn-Val AcOH	79,5	0,10 (5)	-23,0
8 Arg-Lys-Ala-Val 3AcOH	88,5	0,45 (5)	-34,6
9 Arg-Lys-Asu-Val 2AcOH	68	0,15 (5)	-31,0
10 Arg-Lys-Asp-Ala-AcOH	88	0,25 (5)	-19,0
11 Arg-Lys-Asp-Ile-AcOH	48,6	0,15 (5)	-19,5
12 Glp-Arg-Ly Asp-Val-Tyr**	80,0	0,20 (8)	-51,5
13 Arg-Lys-Glu-Val AcOH	97	0,30 (7)	-21,4

* с = 1, в 10%-ной уксусной кислоте.

** хроматографированный в колонке, заполненной силикагелем S1-100, водой и метанолом 1:1.

AcOH = уксусная кислота.

Т а б л и ц а 3

Связывающая Е-розетки активность лимфоцитов, страдающих ревматоидным артритом (выраженная в процентах активности лимфоцитов, n=4)

Пептид	Концентрация (написанная как отрицательный десятичный логарифм концентрации, мол/л)						
	00	11	9	7	5	3	$\Delta\%$
1 Arg-Lys-Asp-Val-Tyr (TP5)	23,6	26,7	26,8	29,9	26,7	-	6,3
2 Arg-Lys-Asp-Val	29,4	32,6	36,8	34,4	31,5	36,2	7,4
3 Arg-Lys-Asp**	26,4	28,4	30,7	28,8	28,6	27,2	4,3
4 Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂	26,4	28,2	34,8	26,8	29,8	31,5	2,4
5 Lys-Arg-Asp-Val	20,8	26,6	25,7	21,2	25,8	23,6	-
6 Arg-Lys-Asp-Val-OMe	26,4	26,5	27,9	32,4	30,6	31,2	6,0
7 Glp-Arg-Lys-Asp-Val	23,7	20,4	19,4	21,4	23,2	22,8	-4,3

Пептид	Концентрация (написанная как отрицательный десятичный логарифм концентрации, мол/л)						
	00	11	9	7	5	3	Δ
8 Glp-Arg-Lys-Asp ⁺⁺	23,7	18,4	19,7	19,5	18,7	20,6	-5,3
9 Arg-Lys-Asn-Val	27,7	24,3	23,7	24,7	21,9	22,3	-6,8
10 Arg-Lys-Asn-Val	20,8	25,0	28,6	24,3	22,5	23,6	7,8
11 Arg-Ala-Asp-Val	23,7	22,5	20,7	19,8	20,2	21,8	-
12 Arg-Lys-Ala-Val	20,8	23,1	25,5	21,7	23,4	20,3	4,7
13 Ala-Lys-Asp-Val	23,7	20,3	23,9	22,5	22,8	25,3	-
14 Arg-Lys-Asp-Ala	26,4	27,9	25,3	25,8	24,5	28,6	+2,2; -1,1
15 Arg-Lys-Asp-Ila	27,7	24,5	28,7	23,2	25,4	25,5	-4,5; +1,0
16 Arg-Asp-Lys-Val	27,7	27,5	27,3	26,4	26,2	25,4	-
17 Glp-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr	20,8	24,9	26,6	22,6	22,7	24,1	5,8

⁺⁺ 0,05 F тест (с однопараметрическим анализом, считая на TP5) 0,05 со Student-Test.

Т а б л и ц а 4

Связывающая Е-роетки активность лимфоцитов здоровых в процентах активности лимфоцитов, n = 4

Пептид	Концентрация (написанная как отрицательный десятичный логарифм, выраженный в мол/л концентрации)						
	00	11	9	7	5	3	Δ%
1 Arg-Lys-Asp-Val-Tyr(TP5)	27,8	25,2	27,1	24,4	23,7	29,4	1,6
2 Arg-Lys-Asp-Val ⁺⁺	33,8	33,7	43,0	38,5	39,1	41,3	9,2
3 Arg-Lys-Asp	30,3	35,9	39,3	41,7	34,1	29,9	11,4
4 Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂	30,3	38,1	26,6	35,1	33,8	29,0	7,8
5 Arg-Lys-Asp-Ala	35,3	40,5	36,4	40,8	39,6	41,2	5,9
6 Ala-Lys-Asp-Val	35,3	36,2	39,1	47,5	34,9	43,4	-
7 Arg-Lys-Asp-Val-OMe	29,7	23,8	24,8	29,4	27,2	26,8	-5,9
8 Arg-Asp-Lys-Val ⁺⁺⁺	32,1	36,4	40,4	37,7	37,5	34,2	-
9 Glp-Arg-Lys-Asp	30,3	38,1	26,6	35,1	33,8	29,1	+7,8; -3,7
10 Arg-Lys-Ala-Val	34,7	30,9	34,5	35,8	30,5	33,3	-4,2
11 Arg-Ala-Asp-Val	34,7	36,0	38,2	32,4	33,4	32,5	-
12 Lys-Arg-Asp-Val	28,9	32,9	29,1	30,0	25,6	31,5	-
13 Arg-Lys-Asn-Val	29,7	31,5	32,3	29,0	29,7	29,3	2,6
14 Arg-Lys-Glu-Val ⁺⁺	31,9	33,0	35,4	36,2	32,9	33,2	4,3
15 Arg-Lys-Asn-Val ⁺⁺	32,1	36,7	35,4	-	39,1	35,5	7,0

Пептид	Концентрация (написанная как отрицательный десятичный логарифм, выраженный в мол/л концентрации)						
	00	11	9	7	5	3	$\Delta\%$
16 Arg-Lys-Asp-Ile ⁺⁺	33,2	30,7	35,0	34,9	32,0	35,5	-2,5; +2,3
17 Glp-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr	24,1	29,9	25,5	29,4	22,5	29,9	+5,8

⁺⁺P 0,05 г F тест (с однопараметр-изменяющимся анализом, считая на TP5);

⁺⁺⁺P 0,01 F тест (с однопараметр-изменяющимся анализом, считая на TP5); P 0,05 Student
значительное действие.

Т а б л и ц а 5

Эффект аналогов, TP-5 и левamisole в отношении ингибируемого азатиоприном образования Е-розеток^a

Соединение	EPFC ⁶	Az-ERFC ⁶	Восстановление в 0, в присутствии соединения в концентрации, мол/л				
			10 ⁻¹¹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻³
Levamisole							
Arg-Lys-Asp-Val-Tyr	45,9±3,0	14,8±5,5	41,0±8,1*	47,6±3,3**	50,2±3,3**	31,8±4,0*	26,7±4,6
Arg-Lys-Asp-Val	56,1±8,2	16,2±1,8	29,4±5,6	30,0±5,5*	31,7±5,4*	29,3±4,0	31,7±4,3
Arg-Lys-Asp	47,4±4,3	12,1±1,9	34,0±6,7*	32,5±6,1	46,4±7,0**	35,4±5,6*	35,4±5,5
Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂	53,6±6,3	16,8±4,7	39,2±6,0*	33,9±6,9*	39,9±4,3**	51,9±9,9**	37,2±3,5
Arg-Lys-Asp-Val-OMe	64,6±3,7	24,1±3,8	13,3±1,3	17,4±3,6	15,9±3,6	23,9±3,8	14,3±4,1
Glp-Arg-Lys-Asp-Val	54,4±4,7	13,0±4,0	16,7±4,7	17,9±3,8	18,5±6,0	28,8±5,7	11,5±1,8
Glp-Arg-Lys-Asp	52,4±4,4	11,7±3,3	17,9±6,4	23,3±6,0	18,9±5,3	28,5±6,1	12,2±3,5
Arg-Lys-Asn-Val	71,8±1,8	23,0±4,5	19,6±4,2	37,9±7,6*	27,5±6,5	18,1±7,2	42,4±7,3
Arg-Lys-Ala-Val	54,6±1,6	19,1±1,9	21,7±3,0	15,6±2,0	27,9±4,4	26,2±6,8	37,1±6,6
Arg-Lys-Asu-Val	46,0±1,3	11,2±1,0	22,4±6,0	18,1±6,2	23,5±4,1	22,7±4,8	30,1±6,6
Arg-Lys-Asu-Val	57,0±3,7	21,6±7,5	31,6±4,3*	26,8±5,5	40,9±7,9*	38,4±5,8*	27,4±3,0
Arg-Lys-Asp-Ala	56,6±3,3	13,7±2,4	21,7±3,0	13,9±3,3	30,0±4,9*	25,8±10,4	22,1±6,2
Arg-Lys-Asp-Ile	54,6±1,6	19,1±1,9	9,5±3,1	17,4±2,4	22,5±4,1	21,1±8,3	11,8±3,0
Arg-Asp-Lys-Val	58,7±6,6	19,7±3,6	18,7±5,2	30,0±5,1*	17,9±5,6	22,3±5,8	28,8±7,2
Glp-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr	56,6±3,3	13,7±2,4	21,9±5,8	18,4±8,6	15,8±3,6	10,2±4,8	12,8±4,0
Arg-Lys-Glu-Val	64,4±5,0	22,9±3,9	24,6±1,4	29,9±5,3	27,0±1,4	40,1±7,8*	12,8±6,0

Т а б л и ц а 6

Действие in vivo, выполняющее продукцию антител, выраженное как титр агглютинации (титр антител = A ± SD)

Пептид	Концентрация, мол/л						
	4·10 ⁻³	4·10 ⁻⁴	4·10 ⁻⁵	4·10 ⁻⁶	4·10 ⁻⁷	4·10 ⁻⁸	0
(TP5)							
1 Arg-Lys-Asp-Val-Tyr	12,0±0	8,7±2,3	10,7±2,3	9,0±1,7	-	-	9,3±1,5
2 Arg-Lys-Asp-Ala ⁺⁺	10,5±1,5	-	11,5±0,9	-	12,0±0	-	9,3±1,5
3 Arg-Lys-Asp ⁺⁺	-	6,0±0	-	7,3±0,6	-	6,0±1,2	5,2±1,3

Продолжение табл.6

Пептид	Концентрация, мол/л						
	$4 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-8}$	0
4 Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂	-	5,2 $\pm$ 2,2	-	6,2 $\pm$ 2,0	-	6,8 $\pm$ 0,8	5,2 $\pm$ 1,3
5 Glp-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr**	5,5 $\pm$ 0,6 [†] 3,0 $\pm$ 1,0 [‡]	-	5,2 $\pm$ 0,8*	-	-	-	5,2 $\pm$ 1,3
6 Glp-Arg-Lys-Asp-Val	9,0 $\pm$ 2,6	-	8,3 $\pm$ 0,6	-	7,2 $\pm$ 1,3	-	9,3 $\pm$ 1,5
7 Arg-Lys-Asp-Val-OMe	6,0 $\pm$ 1,7	-	4,5 $\pm$ 0,5	-	5,5 $\pm$ 2,6	-	5,2 $\pm$ 1,3

** Р 0,05 с Student тестом;

* концентрация изучаемого вещества составляла половину указанного сверху значения;

† концентрация $2 \cdot 10^{-4}$ мол/л.

Т а б л и ц а 7

Действие, выполняющее plaque-связывающее
селезеночные клетки

Пептид	Концентрация, ммоль	PFC-число (обработанное)
		PFC-число (контрольное)
Arg-Lys-Asp	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,7
	$1,0 \cdot 10^{-6}$	2,1
	$1,0 \cdot 10^{-8}$	1,8
Arg-Lys-Asp-Val-NH ₂	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,3
	$1,0 \cdot 10^{-6}$	0,52
	$1,0 \cdot 10^{-8}$	2,7
Arg-Lys-Asp-Val	$2,5 \cdot 10^{-3}$	0,34
	$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,8
Arg-Lys-Asp-Ala	$1,0 \cdot 10^{-4}$	4,9
	$1,0 \cdot 10^{-6}$	1,9
	$1,0 \cdot 10^{-8}$	3,0

Составитель О. Галкин

Редактор В. Ковтун

Техред И. Попович

Корректор А. Тяско

Заказ 6766/60

Тираж 343

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4