



УДК 577.412.083.3:615.374

## АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ВИРУСА ЯЩУРА

I. СИНТЕЗ ПРОТЕКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ  
ОСНОВНОГО ИММУНОГЕННОГО РАЙОНА БЕЛКА VP<sub>1</sub> ВИРУСА ЯЩУРА  
ШТАММА О<sub>1</sub>К*Суровой А. Ю., Вольгина О. М., Снеткова Е. В.,  
Волкова Т. Д., Иванов В. Т., Чепуркин А. В.\*,  
Иванющенко В. Н.\*, Бурдов А. Н.\*, Дрягалин Н. Н.\***Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина  
Академии наук СССР, Москва;**\*Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт, Владимир*

Синтезированы фрагменты 145–159, 149–159, 145–152, 136–152, 136–148, 141–148 и 141–152 белка VP<sub>1</sub> вируса ящура штамма О<sub>1</sub>К. Иммунизация пептидами 136–148 и 136–152 либо их конъюгатами с гемодиазном улитки обеспечивает 50–100%-ную защиту лабораторных животных от заболевания ящуром, вызываемого вирусом штамма О<sub>1</sub>К. Остальные синтезированные пептиды не проявили протективной активности.

Недавние достижения в области разработки противоящурных вакцин продемонстрировали возможность создания эффективных иммуногенных препаратов на основе «неинфекционных» молекул, полученных с использованием либо технологий рекомбинантных ДНК, либо пептидного синтеза. Работа Андерера по изучению антигенности белка вируса табачной мозаики [1] положила начало целому направлению исследований, имеющих целью применение синтетических пептидов для получения у животных вируснейтрализующих эффектов. Традиционный подход заключается в локализации антигенных детерминант поверхностных белков вируса, синтезе пептидов, моделирующих основные антигенные детерминанты, конъюгации этих пептидов с белками-носителями и иммунизации животных конъюгатами, что должно приводить к образованию вируснейтрализующих антител и (или) созданию иммунологической памяти.

В последнее время активно изучаются подходы к созданию искусственной пептидной противоящурной вакцины. Такой интерес обусловлен несколькими причинами. Во-первых, ящур — распространенное заболевание домашних животных, наносящее большой экономический ущерб животноводству. Во-вторых, используемые в настоящее время противоящурные вакцины, получаемые путем химической инактивации вируса, порой сами являются причиной ящурных эпидемий. В-третьих, возбудитель ящура — РНК-содержащий вирус — является представителем большого семейства вирусов, которое включает в себя возбудителей опасных заболеваний, таких, как генатит А, полиомиелит и др. Белковые капсиды этих вирусов организованы сходным образом, что дает возможность переносить некоторые данные с одного представителя на другой, а также использовать подходы к созданию противоящурной вакцины как модель для создания других противоящурных вакцин.

Вирус ящура относится к семейству пикорнавирусов. Капсид вируса образован 60 копиями четырех белков, обозначаемых как VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> и VP<sub>4</sub>. По своим антигенным свойствам вирус ящура подразделяется на семь серотипов: О, А, С, SAT-1, SAT-2, SAT-3 и ASIA. Серотипы, в свою

Приняты сокращения: DCC — дициклогексилкарбодимид, НОВТ — 1-гидроксибензотриазол, КЛН — гемодиазид улитки, DMF — диметилформамид, ЭА — этилацетат, ИД — инфекционная доза, Fm — флуоренилметил, Pp — пентафторфенил.

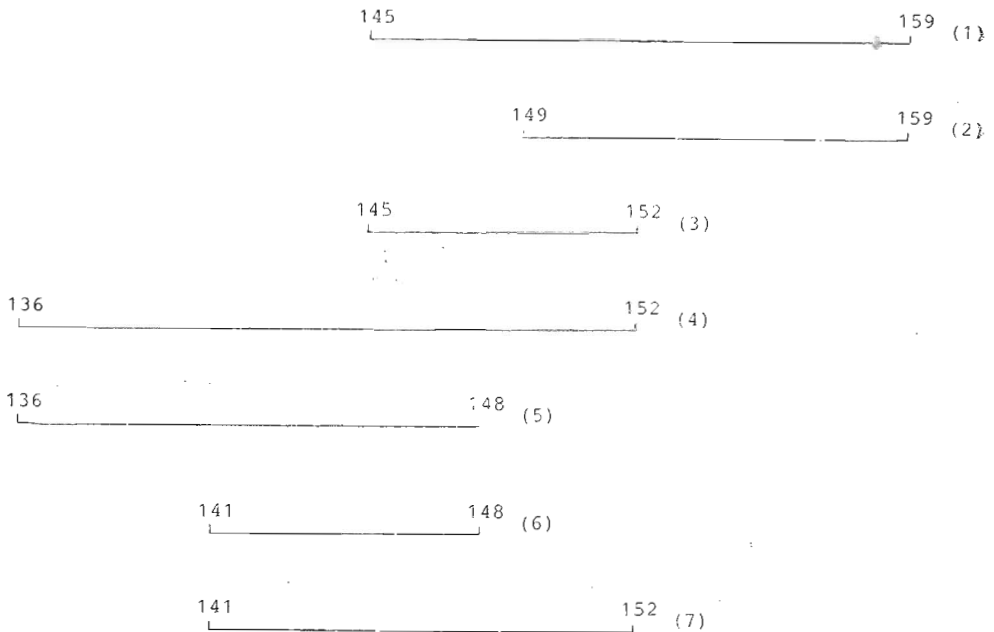


Рис. 1. Синтетические пептиды фрагмента белка VP<sub>1</sub> штамма O<sub>1</sub>K вируса ящура.

очередь, включают в себя более 70 субтипов. Следует подчеркнуть, что между серотипами нет перекрестных серологических реакций, т. е. вакцинация животных вирусом одного серотипа не приводит к защите от вирусов других серотипов.

Показано, что главные антигенные детерминанты этого вируса, так называемые протективные эпитопы, расположены на поверхности одного из капсидобразующих белков — VP<sub>1</sub> [2, 3]. Однако иммуногенная активность изолированного белка VP<sub>1</sub> невысока: дозы цельного вируса и выделенного VP<sub>1</sub>, вызывающие протективный эффект, различаются на 2—3 порядка [4]. Согласно литературным данным [5, 6], короткие синтетические фрагменты VP<sub>1</sub> являются более сильными иммуногенами, чем сам белок. Полагают, что иммуногенность выделенного VP<sub>1</sub> по сравнению с белком, встроенным в вирусный капсид, обусловлена изменением его конформации, приводящим к скрытию важных вирусных эпитопов. Это обстоятельство является серьезным препятствием на пути создания генно-инженерной противоящурной вакцины на основе экспрессии гена белка VP<sub>1</sub>.

Цель настоящей работы — изучение подходов к созданию искусственной противоящурной вакцины с использованием синтетических пептидов. В качестве объекта исследования выбран вирус лабораторного штамма O<sub>1</sub>K. Антигенная структура белка VP<sub>1</sub> этого штамма в настоящее время наиболее хорошо изучена, причем этот штамм и встречающиеся на территории СССР штаммы O<sub>194</sub> и O<sub>1618</sub> вступают в перекрестные серологические реакции. Белок VP<sub>1</sub> штамма O<sub>1</sub>K содержит 213 аминокислотных остатков [7]. Анализ антигенной структуры белка VP<sub>1</sub> при помощи теоретических методов, позволяющих предсказать вторичную структуру и локализовать экспонированные и высоковариабельные участки, а также изучение иммуногенности фрагментов протеолиза выявили три наиболее вероятных антигенных фрагмента: 40—60, 130—160 и 200—213 [8, 9]. Район 130—160 отличается повышенной вариабельностью, являясь основным иммуногенным районом белка VP<sub>1</sub> [8]. Прямое доказательство присутствия протективных эпитопов в этом районе было получено рядом исследователей в работах с использованием синтетических пептидов. Протективную

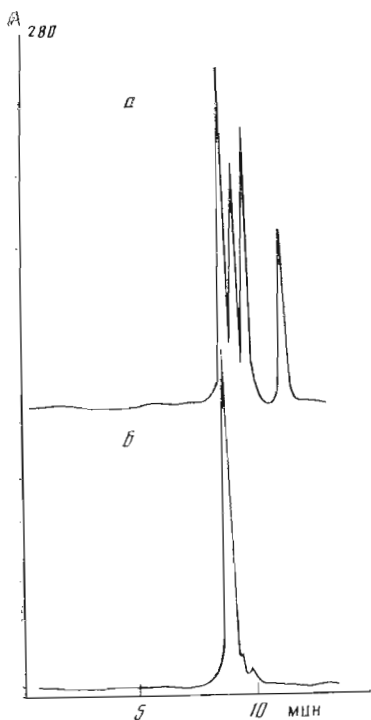


Рис. 2. Анализ реакционной смеси, образующейся в ходе синтеза пептида 136–152 (38) (а) и выделенного пептида (б) методом ВЭЖХ на колонке Silasorb 60 (5,2×250 мм) в DMF при скорости элюирования 1 мл/мин

Пептиды (1)–(7) получены по схемам 1 и 2. Синтез проводили в растворе с использованием блочной конденсации фрагментов. Защитные группы трифункциональных аминокислот были выбраны с расчетом на конечное деблокирование при помощи переносного гидрирования. В качестве временной N-защитной группы использовали Вос-группу, а карбоксильную группу С-концевой аминокислоты либо этерифицировали (получали бензильные или флуоренилметильные эфиры), либо защищали путем солеобразования. Для последовательного наращивания пептидной цепи применяли методы *n*-нитрофениловых, пентафторфениловых и *N*-оксисукцинимидных эфиров, а также метод смешанных ангидридов. При конденсации фрагментов использовали методы пентафторфениловых эфиров и DCC/НОВТ-метод. Гомогенные препараты всех защищенных пептидов получены экстракцией, промывками и кристаллизацией, за исключением пептида (39), для очистки которого применяли эксклюзионную хроматографию на сефадексе LH-20. Высокая степень чистоты всех защищенных коротких пептидов была доказана при помощи тонкослойной хроматографии, а для характеристики продуктов блочных конденсаций и контроля полноты протекания реакций при конденсации блоков использовали ВЭЖХ в режиме эксклюзии (например, рис. 2). Деблокированные пептиды очищали при помощи либо эксклюзионной, либо ионообменной хроматографии. Для доказательства гомогенности полученных пептидов использовали обращенно-фазовую и ионообменную ВЭЖХ (табл. 4). Все полученные соединения охарактеризованы методом аминокислотного анализа (табл. 2), а продукты блочных конденсаций после предварительного удаления Вос-группы — методом N-концевого анализа.

Для изучения иммуногенных свойств синтетических пептидов были получены их конъюгаты с КЛН. Подобные конъюгаты имеют такие оче-

и вируснейтрализующую активность проявляют сыворотки животных, иммунизированных пептидами 141–160, 200–213 [5], 144–159 [6] в виде конъюгатов с гемоцианином улитки, а также свободные пептиды 141–158-Pro-Cys-Gly, 200–213-Pro-Pro-Ser-141–158-Pro-Cys-Gly и Cys-Cys-200–213-Pro-Pro-Ser-141–158-Pro-Cys-Gly [10].

Для локализации антигенной и иммуногенной активности в основном иммуногенном районе белка VP<sub>1</sub> нами синтезированы перекрывающиеся фрагменты района 136–159 [11]. Аминокислотная последовательность синтезированных пептидов приведена на рис. 1.

Пептид 145–159 (4) представляет собой укороченный с N-конца на один аминокислотный остаток ранее описанный фрагмент белка VP<sub>1</sub>, который, по данным [6], проявляет протективную активность. Кроме того, получены укороченные аналоги этого фрагмента: 149–159 (2) и 145–152 (3). Синтез пептида 136–152 (4) ранее не описан. Этот фрагмент начинается с экспонированного на поверхности вируса остатка Tyr<sup>136</sup> [12] и включает высоковариабельный район. Согласно теоретическому анализу этот район обладает высокой гидрофильностью [13]. Для детального анализа этого района синтезирован ряд укороченных перекрывающихся фрагментов: 136–148 (5), 141–148 (6) и 141–152 (7).

Времена удерживания пептидов (1)–(7) при обращенно-фазовой и ионообменной ВЭЖХ

Соединение	Время удерживания, мин			
	а	б	в	г
(1)	24	30	—	—
(2)	23	—	—	—
(3)	18,6	—	—	—
(4)	22	22,5	19	11,25
(5)	20,8	—	16,5	—
(6)	19,2	15	—	16,5
(7)	21,6	24,75	—	15,5

Условия хроматографии: а) колонка Ultrasphere ODS, 4,6×150 мм; буферы: А — 0,01%  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , Б — 70%  $\text{CH}_3\text{CN}$  в А; режим элюирования: 5 мин буфер А, затем 30-минутный линейный градиент до 100% Б, скорость 1 мл/мин; б) колонка Ultrasphere ODS, 4,6×250 мм; буферы: А — 5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  в 0,05 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , Б — 70%  $\text{CH}_3\text{CN}$  в 0,05 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ; режим элюирования: 7,5 мин буфер А, 20-минутный линейный градиент до 30% Б, затем 10-минутный градиент до 50% Б, скорость 1 мл/мин; в) все условия, за исключением формы градиента, идентичны приведенным в пункте «б». Режим элюирования: 7,5 мин буфер А, затем 40-минутный линейный градиент до 100% Б; г) колонка Spherogel TSK DEAE 3 SW, 7,5×75 мм, буфер — 0,05 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 7,5, скорость элюирования 0,25 мл/мин. Во всех случаях поглощение регистрировали при 226 нм.

видные недостатки, как химическая гетерогенность получаемого продукта, широкая специфичность вырабатываемых антител, а также высокая стоимость КЛН. Однако, учитывая хорошо известную способность КЛН повышать иммуногенность коротких пептидов, мы использовали этот носитель для первоначальной оценки иммуногенности синтезированных пептидов. Иммуногенность всех пептидов, проявивших активность в виде конъюгата с КЛН, была изучена и без белка-носителя, в свободном виде.

Активность препаратов, полученных на основе синтетических пептидов, изучали на морских свинках \* (табл. 3).

Как показывают результаты испытаний, полностью неактивным оказался пептид 145–159. Наиболее высокую активность проявил пептид 136–152, причем 100%-ную защиту животных от заболевания обеспечивал свободный пептид, некопьюгированный с белком-носителем. При изучении иммуногенности перекрывающихся фрагментов пептида 136–152 получены следующие результаты. Пептид 136–148 проявил 50–60%-ный проактивный эффект. Как и в случае пептида 136–152, свободный пептид 136–148 и его конъюгат с КЛН обладали сходной активностью. Пептиды 141–148 и 141–152 не защищали животных от заболевания.

Таким образом, синтезирован ранее не описанный пептид последовательности 136–152 белка  $\text{VP}_1$  вируса ящура штамма  $\text{O}_1\text{K}$ . Это самый короткий из всех известных пептидов, проявляющих после вакцинации в свободном виде 100%-ное защитное действие против вируса ящура. Поскольку пептид 136–152 проявляет протективные свойства в свободном виде, без белка-носителя, можно предположить, что в его состав входит не только В-эпитоп, обеспечивающий выработку вируснейтрализующих антител, но и Т-эпитоп, заменяющий действие белка-носителя. В ходе дальнейшей работы предполагается локализовать и синтезировать Т- и В-эпитопы и создать на их основе оптимальные конструкции, вызывающие максимальный иммунологический ответ, специфичный к вирусу ящура. Параллельно проводится аналогичная работа по синтезу иммуногенных пептидов белка  $\text{VP}_1$  другого серотипа — А (штамм  $\text{A}_{22}$ ).

\* Более подробно иммуногенные и антигенные свойства синтезированных пептидов будут описаны в отдельной публикации.

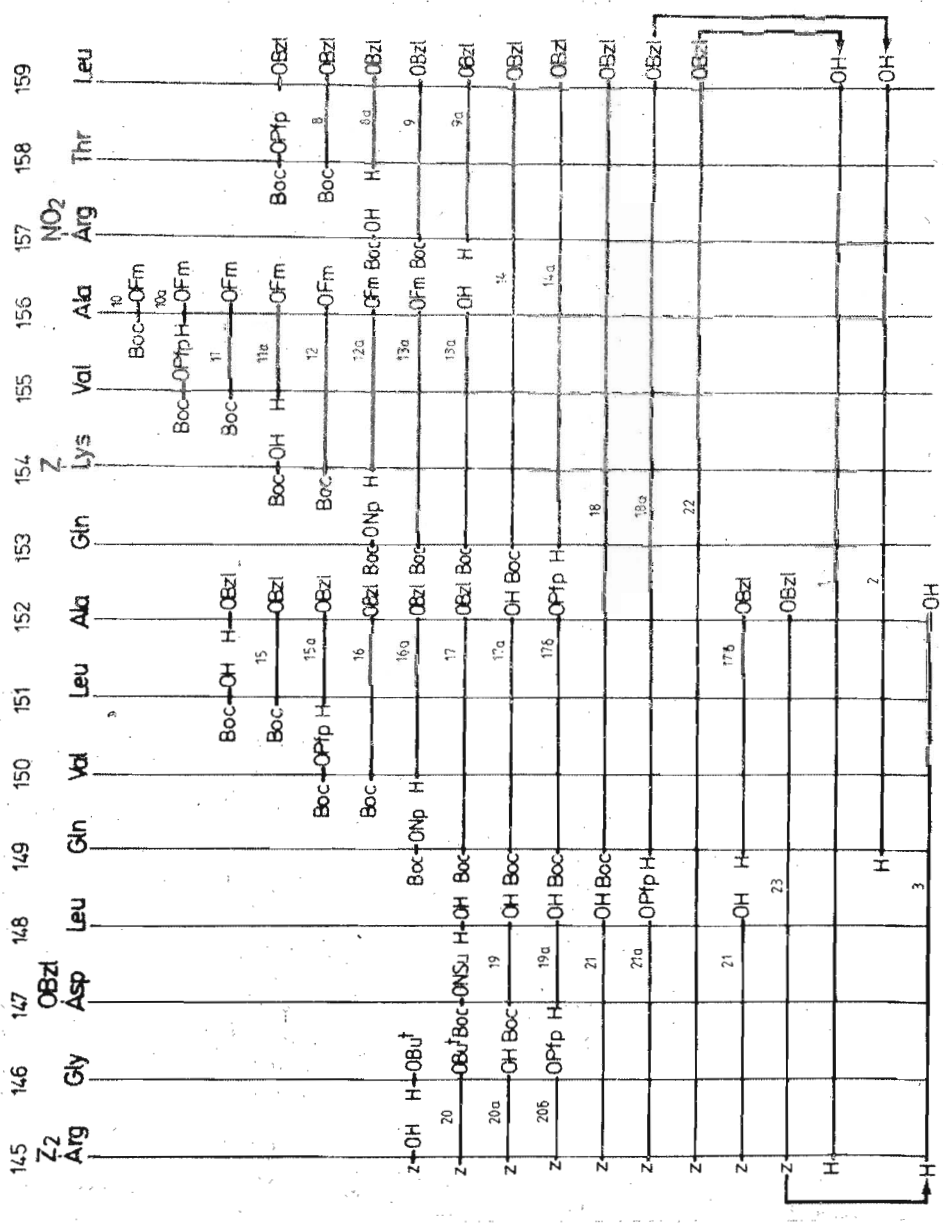


Схема 1. Синтез пептида 145-159



Данные аминокислотного анализа синтетических пептидов

Соединение	Asp	Ala	Val	Pro	Arg	Leu	Gly	Glu	Lys	Thr	Tyr
(1)	1,00(4)	4,93(2)	4,90(2)		4,90(2)	2,89(3)	1,07(4)	2,00(2)	0,95(4)	0,95(4)	
(2)		2,00(2)	4,92(2)		0,92(1)	2,08(2)		2,03(2)	4,02(1)	0,96(4)	
(3)	1,00(1)	1,01(4)	0,97(4)		0,98(4)	2,00(2)	1,01(4)	1,00(4)			0,82(1)
(4)	3,97(4)	4,98(2)	1,98(2)	1,04(4)	2,08(2)	3,00(3)	4,00(1)	0,99(4)			0,85(1)
(5)	4,01(4)	1,00(4)	0,95(4)	1,00(4)	2,01(2)	2,00(2)	1,02(4)				
(6)	2,01(2)	1,00(4)	0,97(4)	0,88(1)	1,03(1)	2,08(1)	4,00(1)	4,01(4)			
(7)	1,99(2)	4,05(4)	4,89(2)	0,93(4)	4,02(4)	3,02(3)	1,04(1)			1,00(4)	
(8)					0,90(4)	1,07(4)				0,95(4)	
(9)		1,00(4)	0,82(4)			4,00(4)					
(11)		1,05(4)	0,95(4)						1,1(1)		
(12)		1,00(4)	1,05(4)					4,02(4)	0,95(4)		
(13)		0,9(4)	0,97(4)		0,85(4)	1,00(4)		1,2(4)	0,90(4)	0,95(4)	
(14)		4,02(4)				1,00(1)					
(15)		1,01(4)	0,98(4)			1,00(1)					
(16)		1,05(4)	1,03(4)			1,00(1)					
(17)		2,07(2)	4,8(2)		0,89(4)	2,00(2)			4,00(4)	1,05(4)	
(18)	0,90(4)					4,00(1)					
(19)							1,00(4)				
(20)					4,02(4)						
(21)	0,98(4)				4,05(4)	1,00(4)				1,10(4)	
(22)	0,85(4)	2,07(2)	1,75(2)		1,72(2)	2,85(3)		2,04(4)	4,00(4)		
(23)	1,02(4)	4,03(4)	0,90(4)		0,92(4)	2,07(2)		1,07(4)			
(25)	0,95(4)					1,00(4)					
(26)	1,09(4)				0,90(4)	0,97(4)					
(27)	1,10(4)					0,95(4)					
(28)	0,99(4)					1,00(4)					
(29)				4,01(4)		1,00(4)					
(30)	1,15(4)		0,90(4)	0,91(4)		1,00(4)					
(31)	2,12(2)		0,92(4)	0,95(4)	1,01(4)	2,00(2)					
(32)	0,99(4)		0,97(4)		1,05(4)	2,00(2)		1,05(4)			
(33)	4,98(2)		1,80(2)	0,91(4)	4,01(4)	3,00(3)		1,00(4)			
(34)	1,10(4)										
(35)	1,01(4)				0,96(4)						
(36)	1,95(2)				0,96(4)						0,75(4)
(37)	2,15(2)				0,90(4)						0,79(4)
(38)	3,97(4)		1,87(2)	0,90(4)	2,01(2)	3,00(3)					0,70(4)
(39)	3,99(4)		0,95(4)	0,95(4)	2,01(2)	2,00(2)		1,40(4)			

Иммуногенность синтетических пептидных фрагментов белка VP<sub>1</sub> вируса ящура штамма O<sub>1</sub>K

Иммуноген	Носитель	Число животных зараженных/заболевших	Эффективность защиты, %
Вирус	—	5/0	100
145—159	KLH	5/5	0
145—159	—	5/5	0
136—152	KLH	5/1	80
136—152	—	5/0	100
136—148	KLH	4/2	50
136—148	—	5/2	60
141—152	KLH	5/5	0
141—152	—	5/5	0
141—148	KLH	5/5	0
141—148	—	5/5	0

Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 44 сут. Доза пептида — 200 мкг на одну иммунизацию. Первую иммунизацию проводили с полным адъювантом Фрейнда, вторую — с неполным. Для определения протективного эффекта на 55-е сут после первой иммунизации проводили заражение морских свинок путем введения 200—500 ИД<sub>50</sub> вируса O<sub>1</sub>K в подушечку лап. Эффективность защиты определяли по числу животных, не заболевших генерализованной формой ящура. В первой строке таблицы приведены данные по иммунизации 5 мкг инактивированного очищенного вируса O<sub>1</sub>K.

Таблица 4

## Условия ТСХ синтезированных соединений

Растворитель	Объемные соотношения компонентов в системах															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Гексан	1	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Эфир	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Хлороформ	1	—	20	9	3	1	40	6	5	5	15	4	—	10	—	—
Этилацетат	1	1	20	3	1	1	20	3	5	5	5	4	4	10	—	8
Изопропанол	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
n-Бутанол	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	42	—
Метанол	—	—	1	1	1	1	1	—	5	5	5	1	—	10	—	—
Пипридин	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24	—
25% NH <sub>4</sub> OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
Уксусная кислота	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	1	1	4	2
Вода	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	30	1

## Экспериментальная часть

В работе использованы реактивы и производные аминокислот фирм Reanal (ВНР), Fluka (Швейцария) и Merck (ФРГ). ТСХ на пластинках с закрепленным слоем сорбента Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) проводили в системах, состав которых указан в табл. 4. Для колоночной хроматографии использовали сефадексы LH-20, G-10, G-25 и CM-сефадекс С-25 (Pharmacia, Швеция); поглощение элюата регистрировали при помощи детектора Uvicord SII (LKB, Швеция). Для высокоэффективной хроматографии использовали прибор фирмы Dupont (США). Гидролиз пептидов проводили в течение 45 мин при 170° С в смеси 6 н. HCl—CF<sub>3</sub>COOH (2:1) либо в 6 н. HCl в течение 24 ч при 115° С. Растворители абсолютировали обычным образом [14]. Условия получения и очистки всех описанных соединений приведены в табл. 5. Синтез проводили по следующему методу:

А. Удаление Вос-группы. 1. Пептид растворяли в смеси CF<sub>3</sub>COOH—CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), либо в 70% водной CF<sub>3</sub>COOH. Через 30–40 мин раствор упаривали. К остатку добавляли толуол и раствор упаривали, операцию повторяли 2–3 раза.

2. Если в последующей реакции конденсации использовали метод Б, то в этих случаях образовывали соль пептида с *n*-толуолсульфокислотой: за 15 мин до конца деблокирования 50% CF<sub>3</sub>COOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> добавляли 1 экв. *n*-толуолсульфокислоты, далее смесь обрабатывали как было описано выше.

Б. Метод смешанных ангидридов. К охлажденному до –15° С раствору 1 экв. карбоксильного компонента и 1 экв. *N*-метилморфолина в минимальном объеме DMF добавляли 1 экв. изобутилхлорформата, смесь перемешивали 1–2 мин при –15° С, затем добавляли по каплям раствор 1 экв. *n*-толуолсульфоната аммиокомпонента и 1 экв.



Соединение	Метод синтеза	Метод очистки	Выход, %	R <sub>f</sub> (№ системы)
(1)	Е	Н(эфир); О(СМ-сефадекс G-25, 0,2 н. NH <sub>4</sub> OAc pH 5,2)	79	0,38(15)
(2)	Е	Н(эфир); О(сефадекс G-25, 0,1 н. AcOH)	63	0,51(15)
(3)	Е	Н(эфир); О(сефадекс G-25, 0,1 н. AcOH)	81	0,32(15)
(4)	А, Е	Н(эфир); О(сефадекс G-10, 0,1 н. AcOH; СМ-трисакрил, 0,1 н. NH <sub>4</sub> OAc, pH 4,5)	65	0,30(15)
(5)	А, Е	Н(эфир); О(сефадекс G-10, 0,1 н. AcOH; СМ-сефадекс G-25, 0,1 н. NH <sub>4</sub> OAc, pH 5,7)	60	0,25(15)
(6)	А, Е	Н(эфир); О(сефадекс G-25, 0,1 н. AcOH)	71	0,32(15)
(7)	А, Е	Н(эфир); О(сефадекс G-10, 0,1 н. AcOH; СМ-трисакрил, 0,1 н. NH <sub>4</sub> OAc, pH 4,5)	79	0,40(15)
(8)	Д	Л, М(эфир – гексан)	88	0,50(1); 0,64(4)
(8a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	99	0,50(5)
(9)	Б	Л, М(ЭА – эфир)	92	0,75(3), 0,85(5)
(9a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	98	0,52(10), 0,31(5)
(10)	Ж <sub>1</sub>	Л, М(ЭА – гексан)	70	0,59(2)
(10a)	А <sub>2</sub>	Н(ЭА)	98	0,27(8)
(11)	Д	Л, М(ЭА – гексан)	78	0,75(1), 0,36(2)
(11a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	95	0,4(5)
(12)	Б	Л, М(ЭА – эфир)	77	0,8(4), 0,25(1)
(12a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	95	0,55(5)
13	В	Н(ЭА)	70	0,65(5), 0,80(16)
(13a)	З	Н(H <sub>2</sub> O)	90	0,30(5), 0,75(16)
(14)	Б	Л, М(CF <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH – эфир)	90	0,84(3), 0,81(6), 0,652(11)
(14a)	А <sub>1</sub>	И(эфир)	85	0,60(13)
(15)	Б	Л	98	0,70(7)
(15a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	99	0,28(4)
(16)	Д	Л, М(ЭА – гексан)	95	0,71(4), 0,46(1), 0,51(7)
(16a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	99	0,54(6), 0,85(3)
(17)	В	Н(эфир), М(CH <sub>3</sub> OH – эфир)	85	0,45(12), 0,24(4), 0,73(6)
(17a)	Е	М(CH <sub>3</sub> OH – эфир)	98	0,79(13), 0,26(6)
(17б)	Г	–		0,54(7)
(17в)	А <sub>1</sub>	Н(ЭА)	95	0,47(13)
(18)	Д	Н(диоксан)	95	0,75(13), 0,75(6)
(18a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	97	0,38(9)
(19)	К	Л	85	0,31(6), 0,25(9)
(19a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	96	0,28(6)
(20)	Б	Л, М(ЭА – эфир)	95	0,86(8), 0,52(1), 0,91(4)
(20a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	88	0,55(6)
(20б)	Г	Н(эфир)	98	0,66(1), 0,93(6)
(21)	Д	Л, М(ЭА – эфир)	95	0,76(6), 0,27(4)
(21a)	Г	Н(эфир)	88	0,77(4), 0,83(3)
(22)	Д	Н(диоксан)	80	0,85(13), 0,78(6), 0,46(16)
(23)	И	Н(диоксан)	75	0,82(6), 0,61(5)
(24)	Ж <sub>2</sub>	Л	70	0,71(2)
(24a)	А <sub>2</sub>	Н(эфир)	95	0,48(4)
(25)	Б	Л, М(ЭА – эфир)	87	0,55(2), 0,95(4), 0,77(1)
(25a)	А <sub>2</sub>	Н(эфир)	95	0,58(4)
(26)	Б	Л, М(эфир – гексан)	85	0,62(4), 0,67(8), 0,28(1)
(26a)	А <sub>2</sub>	Н(эфир)	95	0,56(6)
(27)	Б	Л, М(ЭА)	70	0,72(6), 0,67(5), 0,75(14)
(27a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	95	0,50(6)
(27б)	З	М(ЭА)	80	0,48(13), 0,51(14)
(28)	В	Н(ЭА)	90	0,48(4), 0,90(13), 0,51(8)
(28a)	А <sub>2</sub>	Н(ЭА)	95	0,65(13)
(29)	Б	Л, М(ЭА)	80	0,34(8), 0,37(4), 0,82(6)
(29a)	А <sub>1</sub>	Н(эфир)	95	0,55(5)
(30)	Д	Л, М(ЭА – эфир)	60	0,62(4), 0,72(8)
(30a)	З	И(эфир)	72	0,72(13)
(31)	И	Л, М(ЭА)	70	0,60(5), 0,82(6), 0,58(16)
(31a)	А <sub>1</sub>	Н(ЭА)	90	0,62(13)

Соединение	Метод синтеза	Метод очистки	Выход, %	R <sub>f</sub> (№ системы)
(32)	И	H(ЭА)	82	0,80(6), 0,53(5), 0,65(16)
(32a)	A <sub>1</sub>	H(ЭА - эфир)	95	0,58(13)
(33)	И	H(ЭА)	80	0,77(13), 0,63(16), 0,78(6)
(33a)	A <sub>1</sub>	H(ЭА, эфир)	85	0,47(13)
(34)	В	H(ЭА)	92	0,47(4), 0,70(5), 0,50(8)
(34a)	A <sub>2</sub>	H(ЭА, эфир)	85	0,50(6), 0,12(4)
(35)	Б	Л, H(ЭА)	80	0,56(5), 0,81(6), 0,64(16)
(35a)	A <sub>1</sub>	H(ЭА)	95	0,64(13)
(36)	В	H(ЭА)	75	0,47(14), 0,80(13), 0,45(6)
(36a)	A <sub>1</sub>	H(ЭА)	95	0,36(13)
(37)	В	H(ЭА)	90	0,75(13), 0,4(16)
(37a)	З	H(1% HCl)	80	0,60(13)
(38)	И	H(H <sub>2</sub> O), H(DMF-ЭА)	75	0,75(13), 0,35(16)
(39)	И	H(H <sub>2</sub> O), O(сефадекс LH-20, DMF)	60	0,74(13), 0,40(16)

N-метилморфолина в DMF. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при  $-15^{\circ}\text{C}$  и 30 мин при  $20^{\circ}\text{C}$ .

*В. Метод n-нитрофениловых эфиров.* Раствор 1 экв. n-нитрофенилового эфира карбоксильного компонента (в случае пептидов (34), (36) и (37) использовали до 3 экв. n-нитрофениловых эфиров), 1 экв. трифторацетата аминок компонента, 1 экв. N-метилморфолина и 2 экв. НОВТ в минимальном объеме DMF перемешивали 3–15 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ .

*Г. Получение пентафторфениловых эфиров.* Раствор 1 экв. аминокислоты или пептида и 1,5 экв. пентафторфенола в тетрагидрофуране охлаждали до  $-5^{\circ}\text{C}$ , а затем добавляли 1,2 экв. DCC. Реакционную массу перемешивали 1 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и 2 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ , дициклогексилмочевину отфильтровывали, а полученный эфир либо сразу вводили в реакцию, либо выделяли.

*Д. Метод пентафторфениловых эфиров.* К раствору 1 экв. пентафторфенилового эфира карбоксильного компонента в DMF добавляли метил 1 экв. трифторацетата аминок компонента, предварительно нейтрализованного N-метилморфолином, и реакционную массу перемешивали 2 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и 1–10 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ .

*Е. Удаление защитных групп гидрированием.* Пептид растворяли в смеси  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{HCOOH}$  (7 : 3), добавляли Pd-чернь и пропускали водород 10–24 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ . Катализатор отфильтровывали и фильтрат упаривали.

*Ж. Получение флуоренилметилового эфира.* 1. Раствор 1 экв. n-нитрофенилового эфира аминокислоты, 1 экв. флуоренилметанола и 1 экв. имидазола в толуоле перемешивали 3–4 ч, затем раствор упаривали, а полученный эфир выделяли. 2. Раствор 1 экв. аминокислоты, 1 экв. флуоренилметанола и 0,1 экв. диметиламинопиридина в этилацетате охлаждали до  $0^{\circ}\text{C}$ , затем добавляли 1,2 экв. DCC и смесь перемешивали 30 мин при  $0^{\circ}\text{C}$  и 4 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ , после чего дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали и выделяли полученный эфир.

*З. Удаление флуоренилметильной группы.* Флуоренилметильный эфир пептида растворяли в 20% растворе пиперидина в DMF и выдерживали 40–60 мин при  $20^{\circ}\text{C}$ . Раствор разбавляли этилацетатом, подкисляли 1 н. HCl до pH водной фазы 2,5, органическую фазу промывали водой.

*И. DCC/НОВТ-метод.* К раствору 1 экв. карбоксильного компонента в DMF прибавляли 1,2 экв. DCC и 2 экв. НОВТ при  $-5^{\circ}\text{C}$ . Через 30 мин добавляли 1 экв. трифторацетата аминок компонента, нейтрализованного N-метилморфолином. Реакционную массу перемешивали 30 мин при  $0^{\circ}\text{C}$  и 2–15 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ . Затем добавляли  $\text{CH}_3\text{COOH}$  до pH 5, дициклогексилмочевину отфильтровывали.

*К. Метод N-оксисукцинимидных эфиров для пептидов со свободным C-концом.* К охлажденной до  $0^{\circ}\text{C}$  суспензии 1 экв. гидроксида аминок компонента и 2 экв.  $\text{NaHCO}_3$  в 50% водном диоксане добавляли 0,5 экв. N-оксисукцинимидного эфира карбоксильного компонента и перемешивали 1 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и 20 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ . Затем смесь подкисляли 1 н. HCl до pH 2,5 и экстрагировали этилацетатом.

#### Методы очистки продукта реакции

*Л.* Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в этилацетате, в случае низкой растворимости отдельных пептидов использовали n-бутанол. Полученный раствор промывали 3 раза 5%  $\text{NaHCO}_3$ , водой, 3 раза 10% лимонной кислотой, водой, высушивали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали.

*М.* Кристаллизацию из раствора, указанного в табл. 5 в скобках, и отфильтровывали.

*Н.* Раствор упаривали до минимального объема и продукт реакции осаждали растворителем, указанным в табл. 5 в скобках, и отфильтровывали.

*О.* Хроматографическая очистка. Условия хроматографии указаны в табл. 5 в скобках.

Получение препаратов для иммунизации. Конъюгацию пептидов с КЛН проводили согласно описанной методике [6]. 15 мг КЛН и 3 мг пептида в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,5) перемешивали 30 мин, затем в течение 1 ч добавляли по каплям 0,5 мл 0,5% раствора глутарового альдегида в воде. Реакционную массу перемешивали 15 ч, после чего диализовали против Na-фосфатного буфера, рН 7,5.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Anderer F. A. // Biochim. et biophys. acta. 1963. V. 71. № 2. P. 246-248.
2. Bachrach H. L., Moore D. M., McKercher P. D., Polatnick J. // J. Immunol. 1975. V. 115. № 6. P. 1636-1641.
3. Laporte J., Grosclaude J., Watyghem J., Bernard S., Rouce P. // C. R. Acad. Sci. 1973. V. 276. Ser. D. P. 3399-3401.
4. Bachrach H. L., Morgan D. D., McKercher P. D., Moore D. M., Robertson B. H. // Vet. Microbiol. 1980. V. 7. № 1. P. 85-96.
5. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. // Nature. 1982. V. 298. № 5869. P. 30-33.
6. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H. D., Schulz G. E., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869-874.
7. Kurz C., Forss S., Kupper H., Strohmaier K., Schaller H. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 8. P. 1919-1931.
8. Strohmaier K., Franze R., Adam K. H. // J. Gen. Virol. 1982. V. 59. № 2. P. 295-306.
9. Cheung A., DeLamarter J., Weiss G., Kupper H. // J. Virol. 1987. V. 61. № 5. P. 1621-1629.
10. DiMarchi R., Brooke G., Gale C., Dracknell V., Doel T., Mowet N. // Science. 1986. V. 232. № 4764. P. 639-641.
11. Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1132-1135.
12. Robertson B. H., Moore D. M., Grubman M. J., Kleid D. J. // J. Virol. 1983. V. 46. № 1. P. 311-316.
13. Hopp T. P., Woods K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824-3828.
14. Стюард Дж., Янг Д. // Твердофазный синтез пептидов. М.: Мир, 1971. С. 76-77.

Поступила в редакцию  
25.IV.1988

### ANTIGENIC STRUCTURE OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS. I. SYNTHESIS OF PROTECTIVE PEPTIDES FROM THE IMMUNODOMINANT REGION OF VP<sub>1</sub> PROTEIN OF FMDV O<sub>1</sub>K STRAIN

SUROVOY A. Yu., VOLPINA O. M., SNETKOVA E. V.,  
VOLKOVA T. D., IVANOV V. T., CHEPURKIN A. V.\*,  
IVANYUSHCHENKOV V. N.\*, BURDOV A. N.\*, DRYAGALIN N. N.\*

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*

\* *All-Union Research Institute Foot-and-Mouth Disease, Vladimir*

A series of overlapping peptides with the sequence of the immunodominant region of VP<sub>1</sub> protein of FMDV strain O<sub>1</sub>K have been synthesized by the classical solution method. Peptides were purified by standard methods and used for immunization of guinea pigs. It is shown that the 136-152 and 136-148 segments provide antiviral protection in guinea pigs, both in the free state and conjugated with an immunogenic carrier. Results with uncoupled peptides indicated that these segments may form not only B-, but also T-cell affecting sites.