



УДК 577.112.6.083.3

СИНТЕЗ POLY (Lys-Ser-Glu)
И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО АНТИГЕННЫХ И ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ*Халиков Ш. Х., Валиев Р. В., Шарецкий А. Н.*,
Аристовская Л. В.***Таджикский государственный университет им. В. И. Ленина, Душанбе;*** Научно-исследовательский институт общей и коммунальной гигиены
им. А. Н. Сысина АМН СССР, Москва*

Классическими методами в растворе синтезировали олиго- и полипептиды, содержащие *L*-лизин, *L*-серин и *L*-глутаминовую кислоту. Общая схема синтеза заключалась в получении активированных эфиров ди- и трипептидов последовательным наращиванием с *C*-конца с помощью N,N' -дициклогексилкарбодимидом и метода смешанных ангидридов. Олигопептиды получали блочной конденсацией, используя пентафторфениловый эфир трипептида, а полипептиды — путем поликонденсации 2,4,5-трихлорфениловых эфиров дипептидов. С помощью олигопептидов различной молекулярной массы и полипептидов различного состава и специфических антител к $(Lys-Ser-Glu)_n$ установлено, что все три аминокислотных остатка, регулярно повторяющиеся в составе политрипептида, участвуют в формировании антигенных детерминант на уровне первичной структуры макромолекулы. Серин, по-видимому, является иммунодоминантной аминокислотой, а дипептид Ser-Glu — иммунологически наиболее значимым компонентом эпитопа Lys-Ser-Glu. Индуцированные политрипептидом антитела перекрестно реагировали с рядом белковых макромолекул или обладали гетероклитичными свойствами; характер и выраженность иммунного ответа зависели от генотипа доноров антител.

Значительные успехи в области синтеза регулярных полипептидов, достигнутые как в нашей стране, так и за рубежом [1—3], позволили использовать их для конструирования вакцин и иммуномодуляторов [4, 5]. При введении этих препаратов в организм следует учитывать возможность индукции антител, обладающих перекрестной реактивностью и, что особенно важно, гетероклитичными свойствами. Так называемые гетероклитичные антитела в отличие от обычных перекрестно взаимодействующих реагентов обладают высоким сродством не к антигенным детерминантам иммуногена, а к их аналогам [6].

Гетероклитичные свойства антител в большинстве случаев остаются незамеченными. Между тем анализ тонкой специфичности индуцированных полипептидами антител необходим, так как вместо ожидаемой протективной реакции или иммунокоррекции можно получить серьезные патологические осложнения.

Мы исследовали антигенную структуру и иммуногенные свойства синтетического политрипептида — $(Lys-Ser-Glu)_n$ (M_r 20 000) с целью выяснения его пригодности в качестве носителя детерминантных групп. Этот полипептид содержит функционально активные участки, к которым можно легко присоединять различные гаптены, а регулярная структура позволяет получать конъюгаты с заранее запланированной локализацией и эпитопной плотностью антигенных детерминант.

С другой стороны, последовательность -Lys-Ser-Glu- и аналогичные структуры довольно часто встречаются в белках [7]. Поэтому представ-

Принятые сокращения: DMF — диметилформамид, DCC — N,N' -дициклогексилкарбодимид, Pfp — пентафторфенил, Tser — 2,4,5-трихлорфенил, Nps — *o*-нитрофенилсульфенил, THF — тетрагидрофуран, B1gG — иммуноглобулин быка класса G, H1gG — иммуноглобулин человека класса G, OVA — овальбумин кур, HSA — сывороточный альбумин человека, BSA — сывороточный альбумин быка, ELISA — иммуноферментное исследование в твердой фазе, M_r — средняя относительная молекулярная масса, AT_{XXIVa} — антитела к политрипептиду (XXIVa).

Выход и характеристика синтезированных защищенных пептидов

Номер соединения	Соединение	Выход, %	Агрегатное состояние *	[α] _D ²⁰ , град	R _f			
					A	B	B	Г
I	Nps-Ser-Glu(OBzl)-OBzl	66	a	-10,0 (c 0,4; THF)	0,92	0,84	0,95	0,87
III	Z-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OBzl	60	a	-7,6 (c 0,36; THF)	0,91	0,80	0,96	0,94
V	Nps-Ser-Glu(OBzl)-OPfp	65	m	-25,0 (c 1; EtOAc)	0,90	0,96	0,94	0,90
VII	Z-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OPfp	55	m	-16,0 (c 1; EtOAc)	0,88	0,80	0,90	0,84
VIII	Boc-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OBzl	60	a	-12,5 (c 0,7; THF)	0,76	0,65	0,70	0,62
X	Z-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl) ₁ -OBzl	63	a	Не определены	0,92	0,86	0,98	0,96
XIV	Boc-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl) ₁ -OBzl	52	m	-20,5 (c 0,4; EtOAc)	0,97	0,93	0,90	0,85
XV	Boc-[Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)] ₂ -OBzl	55	m	Не определены	0,92	0,90	0,85	0,80
XVII	Z-[Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)] ₁ -OBzl	47	a	-12,4 (c 1; EtOAc)	0,78	0,77	0,80	0,78
XIX	Nps-Ser-Glu(OBzl)-OTcp	88	m	-22,5 (c 1; EtOAc)	0,80	0,83	0,95	0,90
XXI	Boc-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OTcp	87	m	-16,8 (c 1; EtOAc)	0,97	0,83	0,89	0,51
XXV	Boc-Lys(Z)-Ser-OTcp	60	m	Не определены	0,90	0,96	0,85	0,70
XXXIII	Boc-Lys(Z)-Glu(OBzl)-OTcp	75	m	-30,0 (c 1; EtOAc)	0,50	0,90	0,80	0,60

* a — аморфное, m — маслообразное.

Выход и характеристика синтезированных хлоридратов эфиров пептидов

Номер соединения	Соединение	Получено из соединений	Выход, %	Т. п. л., °С *	Растворители для очистки	R _f	
						A	B
II	HCl-H-Ser-Glu(OBzl)-OBzl	I	76	a	EtOAc — эфир — гексан	0,44	0,78
VI	HCl-H-Ser-Glu(OBzl)-OPfp	V	64	133—134	EtOAc — эфир	0,43	0,35
IX	HCl-H-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OBzl	VIII	60	a	EtOAc — эфир	0,43	0,35
XVI	HCl-H-[Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)] ₂ -OBzl	XV	68	180—181	Ацетон — гексан	0,31	0,45
XX	HCl-H-Ser-Glu(OBzl)-OTcp	XIX	52	a	EtOAc — гексан	0,62	0,70
XXIII	HCl-H-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OTcp	XXI	66	a	EtOAc — эфир	0,38	0,45
XXVI	HCl-H-Lys(Z)-Ser-OTcp	XXV	66	a	EtOAc — гексан	0,49	0,47
XXXIV	HCl-H-Lys(Z)-Glu(OBzl)-OTcp	XXXIII	70	a	EtOAc — эфир	0,55	0,50

* См. примечание к табл. 1.

Условия поликонденсации 2,4,5-трихлорфениловых эфиров ди- и трипептидов

Номер соединения	Защищенный полипептид	Исходный активированный эфир		Время поликонденсации, сут	DMF, м.г	Et ₃ N, м.г	Выход полимера	
		номер	количество, г				г	%
XXIIa	(Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)) _n	XXII	2,00	40	2,00	0,56	1,2	81,0
XXIIIб	То же	XXII	0,80	6	8,80	0,32	0,47	83,9
XXIIIв	»	XXII	0,80	4	0,80	0,32	0,40	71,4
XXIIIг	»	XXII	0,80	2	0,80	0,32	0,30	53,5
XXVII	(Lys(Z)-Ser) _n	XXVI	1,00	10	1,00	0,41	0,45	76,2
XXXI	(Ser-Glu(OBzl)) _n	XX	1,00	10	1,00	0,38	0,40	64,5
XXXV	(Lys(Z)-Glu(OBzl)) _n	XXXIV	1,00	10	1,00	0,30	0,45	68,1

Таблица 4

Средняя молекулярная масса свободных полипептидов

Номер соединения	Соединение	M _r	Метод определения
XXIVa	(Lys-Ser-Glu) _n	20 000	Колончатая хроматография
XXIVб	То же	9 500	То же
XXIVв	»	9 000	»
XXIVг	»	5 000	»
XXVIII	(Lys-Ser) _n	15 500	По Ван-Слайку
XXXII	(Ser-Glu) _n	13 100	»
XXXVI	(Lys-Glu) _n	14 000	»

Таблица 5

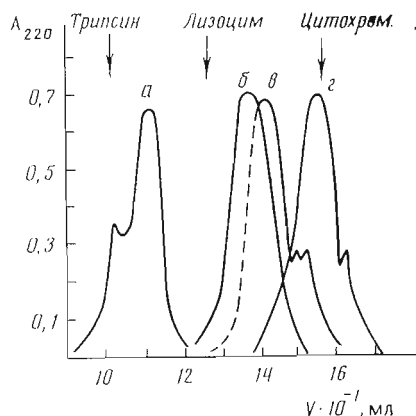
Выход и характеристика синтезированного трипептида и его олигомеров

Номер соединения	Соединение	Получено из соединения	Выход, %	Т. п.а., °С	[α] _D ²² , град	R _f	
						А	Б
IV	H-Lys-Ser-Glu-OH	III	69,2	175-177	-26,0 (с 1, MeOH)	0,31	0,37
XI	H-(Lys-Ser-Glu) ₂ -OH	X	64,4	200-202	Не определяли	0,18	0,33
XVIII	H-(Lys-Ser-Glu) ₃ -OH	XVII	61,5	230-232	-19,6 (с 1, MeOH)	0,16	0,29

лялось интересным оценить способность антител против (Lys-Ser-Glu)_n к перекрестному и гетероклитичному взаимодействию с антигенами.

Общий план синтеза полипептидов состоял в получении ди- и трипептидных фрагментов с защищенными функциональными группами аминокислот, содержащих на С-конце остаток глутаминовой кислоты, и их последовательной блочной конденсации методом активированных эфиров. Для получения ди- и трипептидов (I), (V), (VII), (XIV), (XIX), (XXI), (XXV), и (XXXIII) использовали карбодимидный метод, трипептиды (III) и (VII) синтезировали методом смешанных ангидридов (табл. 1). Защитные группы выбирали таким образом, чтобы свести к минимуму побочные реакции при их удалении на промежуточных стадиях синтеза. Для защиты N^α-аминогруппы лизина в соединениях (VIII), (XIV), (XXI), (XXV) и (XXXIII) применяли *tert*-бутилоксикарбонильную, а в соединениях (III), (VII), (X) и (XVII) — N^α-бензилоксикарбонильную группы. Для защиты N^α-аминогрупп серина в дипептидах (I), (V) и глутаминовой кислоты в дипептиде (XIX) использовали *o*-нитрофенилсульфонильную группу. Боковую функциональную группу лизина блокировали

Рис. 1. Кривые элюции образцов политрипептида $(\text{Lys-Ser-Glu})_n$ (XXIV) в 0,01 М аммиачно-ацетатном буфере (рН 8) на колонке (2×60 см) с сефадексом G-50 (тонкий). Скорость элюции 15 мл/ч. Время полимеризации (сут): а — 10 (M_r 20 000 — XXIVа), б — 6 (M_r 9500 — XXIVб), в — 4 (M_r 9000 — XXIVв), г — 2 (M_r 5000 — XXIVг). Для калибровки колонки использовали белки (мол. масса): трипсин (24 000), лизоцим (13 000) и цитохром (5000)



бензилоксикарбонильной группой, а γ -карбоксил глутаминовой кислоты — бензильной. Такое сочетание защитных групп позволяло избирательно удалять их, способ удаления на промежуточных стадиях зависел от природы пептида и блокирующей группы. *tert*-Бутилоксикарбонильную и *o*-нитрофенилсульфенильную группы удаляли 3 н. раствором хлористого водорода в этилацетате (табл. 2). Полипептиды (XXIIIа), (XXIIIб), (XXIIIв), (XXIIIг), (XXVII), (XXXI) и (XXXV) получены методом активированных эфиров, исходя из соединений (XX), (XXII), (XXVI) и (XXXIV) поликонденсацией в диметилформамиде в присутствии триэтиламина в течение различного времени (табл. 3) с последующим пересаживанием из раствора смесью метанол — эфир (1 : 3) и высушиванием в вакууме.

Бензилоксикарбонильную и бензильную группы удаляли гидрогенолизом над палладиевой чернью. Попытка удаления аналогичным способом защиты с пептида (XXIIIа) не дала желаемых результатов, защитные группы снимались не полностью. Это удалось лишь при последующей обработке бромистым водородом в ледяной уксусной кислоте. Полноту удаления защитных групп контролировали с помощью БХ, УФ- и ИК-спектроскопии. Исчезновение характерных пиков в области $700\text{--}740\text{ см}^{-1}$ свидетельствует о полноте удаления бензильных групп.

Среднюю относительную молекулярную массу соединений (XXIVа—г), полученных соответственно из соединений (XXIII а—г), определяли на калиброванной колонке с сефадексом G-50 (рис. 1). Среднюю молекулярную массу соединений (XXVIII), (XXXII) и (XXXVI) определяли методом Ван-Слайка (табл. 4). Характеристики синтезированных олигомеров приведены в табл. 5.

Изучение иммуногенных свойств синтетического политрипептида $(\text{Lys-Ser-Glu})_n$ со средней относительной молекулярной массой 20 000 (соединение XXIVа) показало, что этот полимер при введении мышам линии СВА (H-2^k) в полном адьюванте Фрейнда индуцировал слабый первичный иммунный ответ, сопровождающийся образованием антител классов IgM и IgG, которые определялись после выделения их из сыворотки крови с помощью аффинной хроматографии. У мышей линии С57 BL/GJ (H-2^b), иммунизированных аналогичным образом, антитела к $(\text{Lys-Ser-Glu})_n$ обнаружить не удалось. При вторичном ответе выявились антитела IgG-изотипа с высоким титром (1/4096) у мышей линии СВА и низким титром (1/64) у мышей линии С57BL/Gj. У кроликов шиншилла после многократной иммунизации с адьювантом Фрейнда определялись антитела, которые с низкой авидностью и небольшим титром взаимодействовали с иммуногеном $(\text{Lys-Ser-Glu})_n$. Убедительно доказать их наличие было возможно только при исследовании соответствующих аффинно очищенных и сконцентрированных препаратов.

Таким образом, степень иммуногенности полипептида $(\text{Lys-Ser-Glu})_n$ зависела от генотипа доноров антител.

Для выявления размера антигенных детерминант и возможной роли конформационных структур в их организации мы сравнили способность

Взаимодействие кроличьих антител к политрипептиду (XXIV_a) (AT_{XXIVa}) с исходными полимерами и олигомерами

Номер соединения	Полипептид, иммобилизованный на полистирольных платах	Титр антител в реакции ELISA, Log ₂	Конкурентное ингибирование взаимодействия AT _{XXIVa} с политрипептидом (XXIV _a), %
IV	H-Lys-Ser-Glu-OH	6,6 (5,2-7,0)	90
XI	H-(Lys-Ser-Glu) ₂ -OH	6,0 (5,0-6,8)	86
XVIII	H-(Lys-Ser-Glu) ₃ -OH	6,3 (5,2-7,0)	87
XXIV _a	(Lys-Ser-Glu) _n (M _r 20 000)	6,5 (6,1-7,2)	100
XXIV _b	(Lys-Ser-Glu) _n (M _r 9500)	6,1 (5,0-7,1)	80
XXIV _в	(Lys-Ser-Glu) _n (M _r 9000)	6,2 (5,1-7,1)	82
XXIV _г	(Lys-Ser-Glu) _n (M _r 5000)	6,0 (4,9-7,3)	88

Таблица 7

Взаимодействие антиполитрипептидных антител (AT_{XXIVa}) различного происхождения с синтезированными полипептидами

Номер соединения	Полипептид, иммобилизованный на полистирольных платах	Титр антител в реакции ELISA, log ₂		Конкурентное ингибирование взаимодействия AT _{XXIVa} с политрипептидом (XXIV _a), %
		мыши СВА *	кролики *	
XXIV _a	(Lys-Ser-Glu) _n	12,3 (11,9-13,5)	6,5 (6,1-7,2)	100
XXVIII	(Lys-Ser) _n	7,2 (6,5-8,1)	3,6 (2,5-3,7)	60
XXXVI	(Lys-Glu) _n	8,5 (5,1-7,2)	3,1 (2,6-3,4)	40
XXXII	(Ser-Glu) _n	(10,1-12,3)	(3,5-4,9)	100

* Количество экспериментальных животных: мышей — 20, кроликов — 9.

политрипептида (XXIV_a) и олигомеров этого трипептида реагировать с антителами к политрипептиду (XXIV_a) (AT_{XXIVa}), а также исследовали конкурентное ингибирование олигомерами реакции взаимодействия политрипептида (Lys-Ser-Glu)_n с AT_{XXIVa}. Оказалось, что AT_{XXIVa} практически одинаково реагировали со всеми исследованными препаратами, а мономер Lys-Ser-Glu и все олигомеры и полимеры подавляли реакцию взаимодействия антигенов с антителами на 80—90% (табл. 6).

Следовательно, участок, представленный звеном Lys-Ser-Glu, является антигенной детерминантой на уровне первичной структуры. Что касается вторичной структуры, то, по-видимому, существенной роли в формировании антигенных детерминант политрипептида она не играет.

При определении роли каждого аминокислотного остатка в организации эпитопа Lys-Ser-Glu мы провели сравнительное исследование способности AT_{XXIVa} взаимодействовать с политрипептидами, содержащими остатки лизина, серина и глутаминовой кислоты в различных сочетаниях. Оказалось, что кроличьи антитела и особенно антитела мыши линии СВА в наибольшем титре реагировали с (Ser-Glu)_n по сравнению с другими соединениями (табл. 7). Кроме того, полидипептид (Ser-Glu)_n в 0,05% концентрации на 100% подавлял взаимодействие политрипептида (XXIV_a) с антителами к нему в реакции конкурентного ингибирования, тогда как (Lys-Ser)_n и (Lys-Glu)_n ингибировали слабее соответственно на 60 и 40%.

По-видимому, в организации детерминанты Lys-Ser-Glu ведущая роль принадлежит дипептиду Ser-Glu, а серин является иммунодоминантной аминокислотой.

Титр антител в реакции ELISA (\log_2) при перекрестном взаимодействии с белковыми антигенами иммунных сывороток к политрипептиду (XXIVa) различного происхождения

Антигены	Доноры антител		
	мыши СВА	мыши С57 ВL/GJ	кролики шиншилла
XXIVa	12 (11,0–12,5)	6,5 (5,3–7,1)	0
OVA	8,4 (8,1–9,0)	5,1 (4,8–5,6)	11,5 (11,3–12,0)
HIgG	Не определяли		10,2 (9,4–10,8)
BIgG	7,8 (7,5–8,6)	5,4 (4,2–6,0)	10,3 (9,2–10,7)
HSA	0	0	0
BSA	0	0	0

Примечание. Сыворотки контрольных животных с антигенами не реагировали.

Таблица 9

Конкурентное ингибирование (%) белками взаимодействия кроличьих АТ_{XXIVa} с различными антигенами

Антиген, иммобилизованный на полистирольных платах	Конкурентные ингибиторы					
	(Lys-Ser-Glu) _n	OVA	BIgG	HIgG	BSA	HSA
XXIVa	100	100	100	100	0	0
OVA	0	100	6	95	0	0
BIgG	0	0	100	100	0	0
HIgG	0	20	100	100	0	0

На основании вышеприведенных данных для изучения возможного перекрестного взаимодействия АТ_{XXIVa} с белками мы выбрали в качестве антигенов HIgG, BIgG, OVA, HSA и BSA, в которых довольно часто встречается детерминанта Lys-Ser-Glu и ее фрагменты [7]. Иммунные сыворотки мышей линии СВА и С57ВL/Gj перекрестно взаимодействовали с OVA и BIgG в титрах, однако, более низких, чем с гомологичным антигеном (иммуногеном) (XXIVa) (табл. 8). В отличие от мышей иммунный ответ у кроликов носил иной характер. Нативная кроличья иммунная сыворотка практически не реагировала с гомологичным антигеном (XXIVa), но в большом титре и с высокой авидностью взаимодействовал с OVA, BIgG и HIgG. Высокое сродство аффинно выделенных АТ_{XXIVa} к иммуноглобулинам и OVA следует из данных табл. 9.

Показана неспособность политрипептида (XXIVa) конкурентно ингибировать взаимодействие АТ_{XXIVa} с HIgG, BIgG и OVA. В то же время иммуноглобулины и OVA полностью ингибировали взаимодействие АТ_{XXIVa} с гомологичным антигеном. Авидность антиполитрипептидных антител к OVA была особенно велика, так как при постановке реакции двойной диффузии в агаре по Ouchterlony [8] при введении в тест-систему OVA (но не иммуноглобулинов) наблюдалась выраженная линия преципитации (рис. 2). В иммунных сыворотках не определялись антитела к эритроцитам барана, кур, мышей, к гаптенам N,N-диметиламиноафтилу и тринитрофенилу, обычно сопровождающие поликлональный иммунный ответ. Поэтому мало вероятно, чтобы антитела к OVA и иммуноглобулинам были следствием поликлональной активации. По-видимому, (Lys-Ser-Glu)_n индуцировал у кроликов (но не у мышей) гетероклитичные антитела, которые имеют большее сродство к антигенным эпитопам OVA и иммуноглобулинам, чем к детерминантам самого иммуногена.

Анализ пула гетероклитичных антител был осуществлен в реакции конкурентного ингибирования (табл. 9). Оказалось, что HIgG практически полностью ингибировал реакцию АТ_{XXIVa} с OVA и BIgG. Вместе

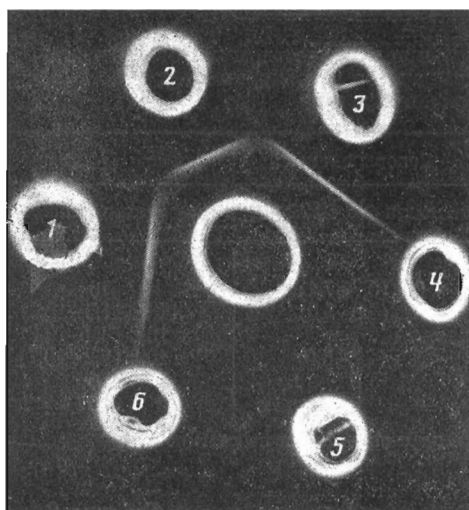


Рис. 2. Взаимодействие кроличьей иммунной сыворотки против политрипептида (XXIVa) с белковыми антигенами в реакции преципитации в агаре. В центральной лунке иммунная сыворотка к соединению (XXIVa). В лунках: 1 — 3 — OVA, 4 — HIgG, 5 — BIgG, 6 — политрипептид (XXIVa)

с тем BIgG, подавляя взаимодействие антител с HIgG, не ингибировал взаимодействия с OVA. Соответственно OVA не влиял на реакцию с BIgG.

Можно предполагать, что кроличьи AT_{XXIVa} гетерогенны по составу и содержат по крайней мере два пула. Активные центры одного из них могут включать участки с высоким сродством к эпитопам OVA, активные центры другого — к BIgG, но оба, вероятно, обладают одинаковой авидностью к эпитопам HIgG. С другой стороны, на сродство эпитопов к активным центрам антител, по-видимому, могут влиять аминокислотные остатки, расположенные рядом с антигенными детерминантами. Как известно [9], такие «неспецифические» участки, входящие в состав многих биоактивных пептидов, способны при лиганд-рецепторном взаимодействии повышать или понижать активность специфического участка на несколько порядков. Примечательно, что сывороточные альбумины человека и быка, содержащие часто повторяющуюся последовательность Lys-Ser-Glu, не взаимодействовали с AT_{XXIVa} кроличьего и мышинного происхождения. Возможно, третичная структура сывороточных альбуминов такова, что антигенные детерминанты Lys-Ser-Glu не доступны для антител.

Таким образом, синтетический политрипептид $(Lys-Ser-Glu)_n$ в зависимости от генотипа подопытных животных стимулировал у них различающийся по выраженности гуморальный иммунный ответ. AT_{XXIVa} при этом были способны перекрестно реагировать с другими антигенами или обладали гетероклитичными свойствами.

Очевидно, «замаскированная» иммуногенность должна привлекать серьезное внимание при исследовании разнообразных синтетических полипептидов с целью выяснения их пригодности в качестве иммуномодуляторов, аналогов различных биологически активных факторов и носителей детерминантных групп.

Экспериментальная часть

В работе использовались L-аминокислоты, выпускаемые фирмами Chemarol (СССР) и Reanal (ВНР). Производные аминокислот получали по описанным методикам [10, 11]. ТСХ проводили на пластинках силуфол UV₂₅₄ в системах: *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 4 : 1 : 1 (А); *n*-бутанол — вода — пиридин — уксусная кислота, 30 : 24 : 20 : 6 (Б); толуол — диоксан — гептан — этанол, 10 : 6 : 3 : 1 (В); толуол — диоксан — гептан — уксусная кислота, 10 : 6 : 3 : 1 (Г). Вещества на хроматограммах обнаруживали вингидрином и парами иода. Бумажную хроматографию проводили на бумаге Whatman № 2 (Англия) в системе: *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 4 : 1 : 1. Температуру плавления определяли на приборе Voëtius (ГДР). Для проведения аминокислотного анализа полипептид (XXIVa) подвергали кислотному гидролизу в стандартных условиях (6 н. HCl, 105°С, 24 ч), после чего с помощью автоматического аминокислотного анализатора Biotronic LC2000 (ФРГ) определяли количественное содержание аминокислот в гидролизате. В работе использовали HCl-H-Glu(OBzl)-OTcp, HCl-H-Glu(OBzl)-OPf и HCl-H-Ser-Glu(OBzl)-OTcp, которые получили согласно [12, 13].

Nps-Ser-Glu(OBzl)-OBzl (I). К раствору 1,0 г (3,8 ммоль) *Nps-Ser-OH* в 20 мл THF при -15°C прибавляли 0,79 г (3,8 ммоль) DCC. Через 10 мин прибавляли 1,4 г (3,8 ммоль) $\text{HCl}\cdot\text{H-Glu(OBzl)-OBzl}$ и 0,54 мл (3,8 ммоль) триэтиламина. Перемешивали 2 ч при -5°C и 4 ч при 20°C . Растворитель упаривали, остаток растворяли в 20 мл этилацетата, охлаждали, отфильтровывали выпавшую дициклогексимочевину и фильтр промывали 1 н. H_2SO_4 (3×10 мл), H_2O (2×10 мл), 0,5% NaHCO_3 (3×10 мл) и H_2O (2×10 мл), сушили безводным Na_2SO_4 и упаривали. Получили 1,0 г соединения (I). Аналогично карбодимидным методом наращиванием с С-концом получали соединения (V), (VIII), (XIV), (XIX), (XXI), (XXV) и (XXXIII) (табл. 1). При обработке соединений (VIII), (XXI), (XXV) и (XXXIII) вместо 1 н. H_2SO_4 использовали 10% лимонную кислоту, а при обработке соединений (V) и (XIV) промывание 0,5% NaHCO_3 не проводили.

HCl-H-Ser-Glu(OBzl)-OBzl (II). 2,6 г (5,7 ммоль) дипептида (I) растворяли в 10 мл этилацетата, добавляли 3,7 мл 3 н. раствора хлористого водорода в этилацетате и смесь выдерживали 40 мин при 20°C . Продукт осаждали абс. эфиром. Выпавший осадок растворяли в 15 мл этилацетата и осаждали 12 мл смеси гексан — эфир (2 : 1), а затем сушили в вакууме. Получили 1,0 г соединения (II). Аналогично получали соединения (VI), (IX), (XVI), (XX), (XXII), (XXVI) и (XXXIV) (табл. 2). При получении соединения (IX), (XVI), (XXII), (XXVI) и (XXXIV) брали 5-кратный избыток 3 н. раствора хлористого водорода в этилацетате.

Z-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OBzl (III). Раствор 1,15 г (2,8 ммоль) *Z-Lys(Z)-OH* в 20 мл THF с 0,39 мл (2,8 ммоль) триэтиламина охлаждали до -10 — 15°C и добавляли 0,37 мл (2,8 ммоль) изобутилхлорформата. Через 2 мин добавляли раствор 1,29 г (2,8 ммоль) соединения (II) в 15 мл тетрагидрофурана с 0,39 мл (2,8 ммоль) триэтиламина, охлажденный до той же температуры. Реакционную смесь перемешивали 4 ч при -10 — 15°C и 2 ч при 20°C , затем THF упаривали, остаток растворяли в 30 мл этилацетата и промывали 1 н. H_2SO_4 (3×10 мл), H_2O (2×10 мл), 0,5% NaHCO_3 (3×10 мл) и H_2O (2×10 мл), сушили безводным Na_2SO_4 и упаривали. Получили 1,3 г соединения (III).

Z-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OPfp (VII). 0,79 г (1,9 ммоль) *Z-Lys(Z)-OH* в 10 мл THF с 0,25 мл (1,9 ммоль) триэтиламина охлаждали до -20°C и добавляли 0,25 мл (1,9 ммоль) изобутилхлорформата. Через 2 мин добавляли раствор 1,3 г (1,9 ммоль) соединения (VI) (табл. 2) в 10 мл THF с 0,25 мл (1,9 ммоль) триэтиламина, охлажденный до той же температуры. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при -20 — 15°C и 2 ч при 20°C , затем THF упаривали, остаток растворяли в 25 мл этилацетата и промывали H_2O (2×10 мл), 5% KHSO_4 (2×10 мл) и H_2O (2×10 мл). Сушили безводным Na_2SO_4 и упаривали. Остаток растворяли в 15 мл изопропанола и осаждали 10 мл петролейного эфира. Выпавший маслообразный продукт сушили в вакууме. Получили 0,85 г соединения (VII).

Z-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OBzl (X). 0,68 г (0,77 ммоль) соединения (VII) растворяли в 15 мл DMF, добавляли 0,54 г (0,77 ммоль) соединения (IX) и 0,10 мл (0,77 ммоль) триэтиламина и перемешивали 2 сут при 20°C , затем упаривали, остаток растворяли в 25 мл этилацетата и промывали 1 н. H_2SO_4 (3×10 мл), H_2O (2×10 мл), 0,5% NaHCO_3 (3×10 мл) и H_2O (2×10 мл), сушили безводным Na_2SO_4 и упаривали. Получили 0,60 г соединения (X). Аналогично из соединений (XIV) и (IX) получали соединения (XV) и из соединений (XIV) и (XVI) — соединения (XVII) (табл. 1).

Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)_n (XXIIIa). Раствор 2,10 г (2,6 ммоль) соединения (XXII) в 2 мл DMF смешивали с 0,56 мл (3,9 ммоль) триэтиламина и оставляли в запаянной ампуле на 10 сут при комнатной температуре. Продукт осаждали смесью метанол — эфир (1 : 3). Осадок промывали этой же смесью (3×10 мл). Получили 1,2 г соединения (XXIIIa). Аналогично получали соединения (XXIIIb), (XXIIIv), (XXIIIг) с различным временем поликонденсации (6, 4 и 2 сут соответственно), а также соединения (XXVII), (XXXI) и (XXXV) (табл. 3).

H-Lys-Ser-Glu-OH (IV). 0,35 г (0,9 ммоль) соединения (III) растворяли в 15 мл смеси уксусная кислота — диоксан — этилацетата (1 : 1 : 1) и гидрировали 48 ч в слабом токе водорода над Pd-чернью. Затем катализатор отфильтровывали и фильтрат упаривали в вакууме. Полученный продукт переосаждали из этанола абс. эфиром. Получили 0,09 г соединения (IV). Аналогично из соединения (X) получали (XI) и из (XVII)—(XVIII) (табл. 5), из соединений (XXIIIb—г) — соединения (XXIVb—г), из (XXVII)—(XXVIII) и из (XXXV)—(XXXVI) (табл. 4).

Снятие защитных групп в процессе гидрирования контролировали с помощью ИК-, УФ-спектроскопии и БХ. Пробы из реакционной смеси отбирали через каждые 10 ч. Однако в случае получения соединения (XXIVa) спустя 50 ч гидрирование еще не закончилось, хотя 2 раза пришлось добавлять свежую порцию катализатора. Поэтому смесь после гидрирования подвергали дополнительному гидробромнолизу. 1,0 г смеси растворяли в ледяной CH_3COOH и пропускали ток бромистого водорода в течение 40 мин при комнатной температуре. Продукт осаждали абс. эфиром. Выпавший осадок переосаждали из ацетона абс. эфиром. Получили 0,8 г водорастворимого соединения (XXIVa). Соединения (XXIVa), (XXIVb), (XXIVv), (XXIVr), (XXVIII), (XXXII) и (XXXVI) очищали на колонке (3×55 см) с сефадексом G-25 (тонкий). Элюцию проводили водой (15 мл/ч), отбирая фракции по 5 мл. Собранные фракции лиофильно высушивали. Выход продуктов с колонки фиксировали с помощью спектрофотометра СФ-26. Аминокислотный анализ соединения (XXIVa): Lys 1,00 (1); Ser 1,07 (1); Glu 1,21 (1). При анализе антигенных свойств политрипептида (*Lys-Ser-Glu*)_n использовали соединения (XXIVa), (IV), (XI), (XVIII), (XXVIII), (XXXII), (XXXVI), а также препараты:

OVA, перекристаллизованный 5 раз (Koch-Light), BSA (Sigma), B1gG, HSA, H1gG (Serva).

Кроликов шиншиллы иммунизировали соединением (XXIVa) подкожно по 500 мкг на инъекцию в 5 точек с 4-недельным интервалом 2 раза в полном, 2 раза в неполном адьюванте Фрейнда (Difco). Через месяц внутривенно вводили разрешающую дозу антигена — 500 мкг. Анализ крови производили на 7-е сут после разрешающей инъекции. Контролем служила сыворотка крови, полученная у пятактиных кроликов, иммунизированных столбнячным анатоксином по вышеописанной схеме.

При изучении первичного иммунного ответа мышей линии СВА (гаплотип H-2^k) и С57BL/Gj (гаплотип H-2^b) массой 20—25 г, полученных из питомника «Столбная» АМН СССР, иммунизировали соединением (XXIVa) в дозе 100 мкг подкожно в области холки и корня хвоста в полном адьюванте Фрейнда или внутривентрально без адьюванта. Кровь для определения титра антител брали из глазного синуса соответственно на 5-й и 7-й день. При получении вторичного иммунного ответа препарат (XXIVa) вводили подкожно в той же дозе 2 раза с 3-недельным перерывом. Разрешающую инъекцию антигена производили через месяц внутривентрально без адьюванта вместе с клетками карциномы Эрлиха (2·10⁶) [14]. Сыворотку крови в асцитную жидкость использовали в качестве источника антител. Контрольным животным вместо антител вводили забуференный фосфатами 0,15 M NaCl, pH 7,3.

Кроличьи и мышьиные антитела против политрипептида (Lys-Ser-Glu)_n выделяли методом аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованным на бромцвасефарозе 4В полипептидом по известной методике [15] и концентрировали в установке Amicon (фильтр XM100) до 200 мкг/мл. Концентрацию белка определяли с помощью ку-масси синего G-250 (Serva) [16].

Титр антител определяли микровариантом твердофазного иммуноферментного метода ELISA [17] в стандартных 96-луночных полистирольных планках.

Антитела классов IgM и IgG кроличьих антител из мышьиных сывороток были хредставлены О. П. Тереховым (Институт иммунологии МЗ СССР). Способность некоторых препаратов конкурентно подавлять реакцию антиген — антитело изучали путем разведения иммунных сывороток на растворе, содержащем 0,5% исследуемого ингибитора. Комплекс антитела с антигеном в лунках микрокамер выявляли с помощью антикроличьей сыворотки свины, к антителам которой была присоединена пероксидаза хрена (ORION). За титр антител принимали конечное разведение сыворотки, при котором окраска раствора не отличалась от фона. Об avidности взаимодействия антител с антигеном судили по данным конкурентного ингибирования в реакции ELISA. Препитаты комплексов антиген — антитело в агаре выявляли методом двойной диффузии по Оухтерлоуи [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Порошин К. Т., Шибнев В. А. Связь полнамнокислот и регулярных полипептидов. Душанбе: Дониш, 1968.
2. Johnson B. J. // J. Pharm. Sci. 1974. V. 63. № 3. P. 313—327.
3. Goren H. T. // CRC Critical Reviews in Biochemistry. 1974. № 3. P. 197—225.
4. The Antigens / Ed. Sela M. New York, San Francisco, London: Acad. Press, 1975. V. 3.
5. Петров Р. В., Хаитов Р. М. // Успехи соврем. биол. 1979. Т. 88. № 3. С. 6—19.
6. Makela O. // J. Immunol. 1965. V. 95. № 2. P. 368—386.
7. Dayhoff M. O. Atlas of Protein Sequences and Structures. National Biomedical Research Foundation, 1975. V. 5.
8. Ouchterlony O. // Acta pathol. et microbiol. scand. 1949. V. 26. P. 507.
9. Чипенс Г. И., Полевая Л. К., Веретникова Н. И., Крикис А. Ф. // Структура и функция низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980. С. 74—88.
10. Fletcher G. A., Jones J. H. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1972. V. 4. № 3. P. 347—371.
11. Fletcher G. A., Jones J. H. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1975. V. 7. № 2. P. 91—102.
12. Халиков Ш. Х., Исмаилов М. И., Алиева С. В. // Изв. АН ТаджССР. 1979. № 4. С. 117—119.
13. Халиков Ш. Х., Исмаилов М. И., Алиев С. В., Валиев Р. В. // Химия природ. соедин. 1982. № 1. С. 91—96.
14. Ярилин А. А., Мирошниченко И. В., Кочергина Н. И. // Иммунология. 1985. № 1. С. 24—27.
15. Novotzy A. Basic Exercises in Immunochemistry. Berlin, Heildelberg, New York: Springer-Verlag. 1979. P. 19—23.
16. Bradbod B. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1—2. P. 248—254.
17. Engval E., Perlmann P. // Innuochemistry. 1974. V. 8. P. 974.

Поступила в редакцию

18.II.1987

После доработки

10.XI.1987

SYNTHESIS OF POLYPEPTIDE CONTAINING LYSIN, SERIN
AND GLUTAMIC ACID RESIDUES AND STUDY
OF ITS ANTIGENIC AND IMMUNOGENIC PROPERTIES

HALIKOV Sh. H., VALIEV R. V., SHARETSKIY A. N.*,
ARISTOVSKAYA L. V.*

V. I. Lenin Tadjik State University, Dushanbe;
* *A. N. Sytin Research Institute of General and Communal Hygiene,*
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

We have synthesized oligo- and polypeptides containing lysin, serin and glutamic acid residues. Di- and tripeptides were prepared by the successive elongation of C-terminus by means of the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide or mixed anhydride methods. The oligopeptides were obtained by block condensation of pentafluorophenyl esters of tripeptides, and polypeptides by polycondensation of dipeptide 2,4,5-trichlorophenyl esters. The three amino acids (Lys, Ser, Glu) were shown to take part in formation of antigenic determinants, serin being probably the immunodominant amino acid, and dipeptide Ser-Glu- the most important component of the epitop Lys-Ser-Glu. Polypeptides (Lys-Ser-Glu)_n induced cross-reacting or heteroclitic antibodies. The expression of immune response depended on genotype of experimental animals.