



УДК 577.112.083.3:615.374

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ВИРУСА ЯЩУРА
V *. ЗАЩИТА ПРИРОДНОВОСПРИИМЧИВЫХ ЖИВОТНЫХ
ОТ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЯЩУРОМ С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКОГО
ПЕПТИДА

*Яров А. В., Гельфанов В. М., Гречанинова Л. А.,
Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т.,
Чепуркин А. В.*, Дрягалин Н. Н.*, Иванюценков В. Н.**

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук
СССР, Москва;*

** Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт, Владимир*

Синтезирован фрагмент 135–159 белка VP₁ вируса ящура штамма А₂₂, вызывающий 100% защиту морских свинок от заболевания ящуром. Двукратная иммунизация синтетическим пептидом крупного рогатого скота и однократная иммунизация овец приводит к полной защите животных от заболевания при заражении их вирусом ящура штамма А₂₂.

Цель настоящей работы — синтез пептида последовательности белка VP₁ вируса ящура штамма А₂₂, обеспечивающего защиту сельскохозяйственных животных от заболевания ящуром, вызываемого вирусом штамма А₂₂. Традиционной моделью для изучения протективной активности противоящурных пептидов служат морские свинки, однако невысокая степень адекватности этой модели экспериментам на естественновосприимчивых животных не позволяет прямо переносить результаты по защите лабораторных животных на крупный рогатый скот [2]. В настоящее время описано несколько пептидных фрагментов белка VP₁ вируса ящура штамма О₁К, проявляющих активность на морских свинках [3–5], но лишь для одного из них, 40-членного пептида последовательности Cys-Cys-200–213-Pro-Pro-Ser-141–158-Pro-Cys-Gly, показана защита крупного рогатого скота от заболевания.

При изучении активности синтетических фрагментов VP₁ вируса ящура штамма А₂₂ было обнаружено, что иммунизация пептидами последовательности 131–149, 140–149 и 136–152 вызывает 50–80% защиту морских свинок [1, 6]. Очевидно, что описанные пептидные фрагменты не могут обеспечить 100% протективный эффект на крупном рогатом скоте. Изучение индукции противопептидных антител показало, что иммунный ответ на фрагменты района 131–152 является видоспецифическим и находится под контролем Ig-гена. Кроме того, известно, что участок 131–139 не содержит функционально важных эпитопов [6, 7]. Мы предположили, что удлинение описанных пептидов с С-конца до остатка 159 по аналогии с противоящурными пептидами штамма О₁К [3, 4] повысит активность 136–152-фрагмента VP₁ штамма А₂₂ против вируса ящура. Можно было надеяться, что включение новых функционально важных участков района 153–159 позволит обойти видоспецифичность и приведет к индукции противопептидного и противовирусного иммунитета у кроликов, а также повысит противовирусный иммунитет у морских свинок и позволит обеспечить защиту крупного рогатого скота.

Пептид последовательности 135–159 VP₁ штамма А₂₂ Lys-Tyr-Ser-Ala-Gly-Gly¹³⁵-Met-Gly-Arg-Arg-Gly-Asp-Leu-Glu-Pro-Lcu-Ala-Ala-Arg-Val - Ala - Ala-Glu-Leu-Pro¹⁵⁹ был синтезирован твердофазным методом на РАМ-полимере [8]. Для защиты NH₂-функции применяли Вос-группу, в ходе син-

* Сообщение IV см. [1], сокращения см. там же.

Иммуногенность VP₁-пептида 135-159 штамма A₂₂ на лабораторных животных

VP ₁ -пептид штамма A ₂₂	Доза, мкг		Кролики *		Морские свинки **	
	1-я иммуни- зация	2-я иммуни- зация	Титр ППА, -log ₁₀	Титр ВНА, -log ₂	Титр ВНА, -log ₂	N _{защ} /N _{зар}
135-159	200	200	3,8	4,2	4,0	5/5
	50	-			4,0	5/5
136-152 [1]	200	200	<1,0	<1,0	2,5	3/5

* ППА — противонептидные антитела, ВНА — вируснейтрализующие антитела. Заражение животных проводили вирусом штамма A₂₂ в дозе, равной 500 ИД₅₀.

** N_{защ}, N_{зар} — число защищенных и зараженных животных.

Таблица 2

Протективная активность VP₁-пептида 135-159 штамма A₂₂ на крупном рогатом скоте

Пептид шта- ма A ₂₂	Животное	Доза, мг		Титр ВНА *, -log ₂	Защита **
		1-я иммуни- зация	2-я иммуни- зация		
135-159	1	1	1	5,76	+
	2	1	1	6,00	+
	3	5	-	4,66	-
	4	5	-	5,23	+
136-152	5	1	1	2,32	-
	6	1	1	<1,0	-
Контроль	7	-	-	<1,0	-
	8	-	-	<1,0	-

* ВНА — вируснейтрализующие антитела.

** Заражение после иммунизации вирусом штамма A₂₂ проводили в дозе, равной 10 000 ИД₅₀.

Таблица 3

Протективная активность пептида 135-159 штамма A₂₂ на овцах

Пептид штамма A ₂₂	Животное	Доза, мг		Титр ВНА *, -log ₂	Защита **
		1-я иммуни- зация	2-я иммуни- зация		
135-159	1	1	0,1	10,50	+
	2	1	0,1	10,50	+
	3	1	0,1	10,67	+
	4	1	-	10,77	+
	6	1	-	7,76	+
Контроль	7	-	-	<1,0	-
	8	-	-	<1,0	-

*** См. табл. 2.

теза использовали следующие производные трифункциональных аминокислот: Boc-Lys(Z), Boc-Tyr(BzlCl₂), Boc-Ser(Bzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Asp(OBzl), Boc-Glu(OBzl). Конденсации проводили последовательно методом симметричных ангидридов и ДСС/НОВТ-методом до полноты протекания реакции >99%. После отделения от полимерного носителя и деблокирования пептид обессоливали на колонке с сефадексом G-10 и очищали ионообменной хроматографией. Выход пептида в расчете на первую аминокислоту составил 78%. Пептид охарактеризован данными аминокислотного анализа, анализа N-концевой аминокислоты, масс-спектрометрии и ВЭЖХ.

Изучение иммуногенности синтетического фрагмента 135–159 VP₁ на лабораторных животных показало (табл. 1), что двукратная иммунизация пептидом (по 200 мкг) индуцирует у кроликов образование противопептидных и вируснейтрализующих антител с высоким титром, в то время как ранее описанный фрагмент VP₁-(136–152)A₂₂ [1] не проявляет активности на этих животных. Двукратная (по 200 мкг) иммунизация морских свинок (135–159)A₂₂-фрагментом также приводит к появлению высокого титра вируснейтрализующих антител и обеспечивает 100% защиту животных. Протективный эффект пептида (136–152)A₂₂ существенно ниже и составляет лишь 60%. Высокая активность фрагмента 135–159 продемонстрирована в опытах по однократной иммунизации морских свинок пептидом в дозе 50 мкг (20 нмоль). Столь небольшая доза 25-членного пептида обеспечивает полную защиту животных от заболевания, в то время как наиболее активный из описанных противоящурных пептидов, содержащий 40 аминокислотных остатков, защищает в дозе 25 нмоль на животное лишь 3 морских свинки из 4 [9]. Однако сравнение этих результатов не вполне корректно, так как заражение животных в одном случае проводилось введением 500 ИД₅₀ вируса A₂₂, а в другом — 3000 ИД₅₀ вируса O₁K.

Протективные свойства 135–159-пептида были изучены на крупном рогатом скоте (табл. 2). Двукратная иммунизация описанным пептидом в дозах 1 мг стимулирует образование вируснейтрализующих антител с высоким титром и защиту животных от заболевания при введении им 10 000 ИД₅₀ вируса штамма A₂₂. Иммунизация крупного рогатого скота пептидом 136–152 в тех же дозах не обеспечивает протективного эффекта. Однократная иммунизация пептидом 135–159 в дозе 5 мг приводит к защите одного животного из двух. Сравнение протективных доз 25-членного пептида и ранее описанного противоящурного 40-членного пептида [5] в пересчете на наномоли на 1 кг живого веса показывает, что полная защита крупного рогатого скота наступает при суммарном введении (для двух иммунизаций) 1,7 нмоль/кг 40-членного пептида либо 1,8 нмоль 25-членного пептида. Таким образом, активности этих пептидов практически равны.

Иммунизация овец 1 мг пептида и повторное введение им 0,1 мг пептида приводят к защите всех животных от заболевания (табл. 3). Показано, что протективный эффект достигается даже при однократном введении животным 1 мг пептида.

Таким образом, удлинение VP₁-(136–152)A₂₂-фрагмента до остатка 159 существенно повышает способность пептида индуцировать образование противопептидных и вируснейтрализующих антител, а также увеличивает протективную активность синтетического пептида. Фрагмент 135–159 является самым коротким из описанных противоящурных пептидов, обеспечивающих защиту естественновосприимчивых животных от заболевания.

Экспериментальная часть

В работе использовали реактивы и производные аминокислот фирм Reanal, Fluka, Serva, PRF, Merck. Растворители очищали согласно известным методикам [10]. Кислотный гидролиз пептидов проводили 45 мин при 160°С смесью 6 н. HCl — TFA (2 : 1) или 24 ч при 110°С 6 н. HCl.

В иммунологической части работы использовали прибор Uniscan Plus (Flow laboratories), платы для иммуноферментного анализа (Dynatech), о-фенилендиамин (Sigma), конъюгаты пероксидазы хрена с антителами козы к иммуноглобулинам кролика и морской свинки (Bio-Rad).

Вос-Lys(Z)-Tyr(BzlCl₂)-Ser(Bzl)-Ala-Gly - Gly - Met - Gly - Arg(Tos)-Arg(Tos)-Gly-Asp(OBzl)-Leu-Glu(OBzl)-Pro - Leu-Ala - Ala-Arg(Tos)-Val-Ala-Ala-Gln-Leu-Pro-РАМ-полимер (I). Вос-пролил-РАМ-полимер получали по методу [8] исходя из аминокетилполимера фирмы PRF (0,2 ммоль NH₂ на 1 г полимера). Синтез защищенного пептидил-полимера (I) проводили исходя из 2 г Вос-Pro-РАМ-полимера (0,2 ммоль Pro на 1 г поли-

мера), используя следующий протокол для каждого синтетического цикла (10–15 мл растворителя на 1 г полимера):

- 1) CH_2Cl_2 (2×1 мин);
- 2) CH_2Cl_2 – TFA, 1 : 1 (1 мин);
- 3) CH_2Cl_2 – TFA, 1 : 1 (30 мин);
- 4) CH_2Cl_2 (5×1 мин);
- 5) DIEA – CH_2Cl_2 , 5 : 95 (2×2 мин);
- 6) CH_2Cl_2 (3×1 мин);
- 7) 3 экв. симметричного ангидрида Вос-аминокислоты в CH_2Cl_2 (2 ч);
- 8) CH_2Cl_2 (3×1 мин);
- 9) DIEA – CH_2Cl_2 , 5 : 95 (2×2 мин);
- 10) CH_2Cl_2 (2×1 мин);
- 11) DMF (2×1 мин);
- 12) 3 экв. гидроксibenзотриазолового эфира Вос-аминокислоты в DMF (2 ч);
- 13) DMF (3×1 мин);
- 14) CH_2Cl_2 (2×1 мин);
- 15) изопропанол (3×1 мин);
- 16) ацилирование смесью CH_2Cl_2 – As_2O – пиридин, 60 : 20 : 20 (1 ч);
- 17) CH_2Cl_2 (3×1 мин);
- 18) изопропанол (3×1 мин).

Для получения симметричного ангидрида защищенной аминокислоты к 6 экв. Вос-аминокислоты в 10 мл CH_2Cl_2 приливали раствор 3 экв. DCC в DMF при 0° С. После перемешивания в течение 30 мин выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали, раствор использовали для проведения реакции конденсации.

Гидроксibenзотриазоловые эфиры получали реакцией 3 экв. Вос-аминокислоты, 3 экв. НОВТ и 3 экв. DCC в DMF при 0° С в течение 10 мин. Образовавшуюся дициклогексилмочевину отфильтровывали, раствор использовали для проведения реакций конденсации.

Присоединение остатка Вос-Gln проводили как описано в протоколе, но в отличие от пункта 7 вместо симметричных ангидридов использовали 3 экв. *n*-нитрофениловых эфиров этих аминокислот.

Присоединение к остаткам Gly и Glu проводили только с помощью растворов симметричных ангидридов в DMF во избежание побочной реакции образования пироглутаминовой кислоты.

После присоединения остатка Met-141 на стадиях 2 и 3 протокола вместо смеси CH_2Cl_2 – TFA (1 : 1) использовали смесь CH_2Cl_2 – TFA – 2-меркаптоэтанол, 48 : 48 : 4.

Контроль за полнотой протекания реакций конденсации проводили после стадий 10 и 14 протокола с помощью нингидринового и пикринового тестов [11, 12].

Lys-Tyr-Ser-Ala-Gly-Gly-Met-Gly-Arg-Arg-Gly-Asp - Leu-Glu-Pro - Leu-Ala-Ala-Arg-Val-Ala-Ala-Gln-Leu-Pro (II). С 500 мг пептидполимера (I) удаляли Вос-группу по протоколу (пункты 1–6), затем пептид отщепляли от полимера с одновременным деблокированием в два этапа с использованием прибора фирмы Toho Kasei. На первом этапе пептидполимер обрабатывали 10 мл смеси HF – диметилсульфид – *n*-крезол (25 : 65 : 10) при 0° С в течение 2 ч. Фтористый водород и диметилсульфид отгоняли в вакууме, твердый остаток промывали эфиром (3×30 мл) и сушили. На втором этапе обработку проводили 10 мл смеси HF – *n*-крезол (90 : 10) в течение 1 ч при 0° С. После удаления фтористого водорода остаток промывали эфиром (5×30 мл), сушили, экстрагировали пептид 10% раствором уксусной кислоты. Раствор лиофилизировали, пептид обессоливали дважды на колонке (2,5×60 см) с сефадексом G-10 (Pharmacia) в 0,1 *n*. уксусной кислоте, а затем очищали с помощью ионообменной хроматографии на колонке (1,5×40 см) с сорбентом CM-Toyopearl (Toyo Soda) в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 4,5). Выход пептида 194 мг (78% в пересчете на C-концевую аминокислоту).

Индивидуальность полученного соединения подтверждали данными аминокислотного анализа: Tyr 0,82 (1), Lys 0,86 (1), Ser 0,86 (1), Ala

5,18 (5), Gly 4,11 (4), Met 0,98 (1), Arg 3,05 (3), Asp 1,05 (1), Leu 3,12 (3), Glu 1,95 (2), Val 1,10 (1), Pro 1,83 (2), масс-спектрометрии (метод FAB, прибор Kratos MS50 TC, экспериментальная величина MH^+ 2586, теоретическая 2586), обращенно-фазовой ВЭЖХ (прибор LKB, колонка TSK-ODS (4,6×250 мм), время выхода пептида 20,0 мин при скорости потока 1 мл/мин в градиенте ацетонитрила в 0,05% водной TFA от 0% до 70% за 35 мин). С помощью метода дапсилирования подтверждали наличие остатка Lys в N-концевой позиции.

Иммунизацию кроликов и морских свинок проводили как описано в сообщении III [7]. Иммунизацию телят массой 400–450 кг и овец массой 20–30 кг проводили дважды с интервалом в 44 сут подкожно в верхнюю треть шеи. Для первой иммунизации использовали полный адъювант Фрейнда, для второй — неполный. Отбор крови проводили на 60-е сут после первой иммунизации, а затем животных заражали, вводя 10 000 ИД₅₀ вируса ящура штамма А₂₂ под слизистую языка. Незаболевшими считались животные, у которых отсутствовали клинические признаки заболевания и вторичные язвы на губах, языке и ногах.

Титр вируснейтрализующих антител определяли в культуре клеток свиной почки, как описано в работе [7] против 100 ТЦД₅₀ вируса ящура штамма А₂₂.

Титр противопептидных антител определяли в иммуноферментном анализе непрямым методом, как описано в работе [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яров А. В., Гельфанов В. М., Гречанинова Л. А., Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Луговской А. А., Дрягалин Н. Н., Иванющенков В. Н., Бурдов А. Н. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1193–1205.
2. Brown F. // Vaccine. 1988. V. 6. № 4. P. 190–192.
3. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnie T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. // Nature. 1982. V. 298. № 5869. P. 30–33.
4. Pfaff E., Musgay M., Bohm H. O., Schulz G. E., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869–874.
5. Di Marchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., Mowat N. // Science. 1986. V. 232. № 4764. P. 639–641.
6. Вольпина О. М., Суровой А. Ю., Уляшин Б. В., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенков В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1363–1372.
7. Суровой А. Ю., Гельфанов В. М., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенков В. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1185–1192.
8. Mitchell A. R., Kent S. B. H., Engelgard M., Merrifield R. B. // J. Org. Chem. 1978. V. 43. № 14. P. 2845–2852.
9. Di Marchi R., Brooke G., Gale C., Doel T. Peptides. Chemistry and Biology. Ed. Marshall G. R. Leiden: Escom, 1980. P. 531–533.
10. Perrin D. D. Purification of laboratory chemicals. N. Y.: Pergamon Press, 1980. P. 1–563.
11. Sarin V. K., Kent S. B. H., Tam J. P., Merrifield R. B. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. № 2. P. 147–157.
12. Cisin B. F. // Anal. chim. acta. 1972. V. 58. № 1. P. 248–249.

Поступила в редакцию
2.III.1989

ANTIGENIC STRUCTURE OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS. V. PROTECTION OF SUSCEPTIBLE ANIMALS WITH THE USE OF A SYNTHETIC PEPTIDE

YAROV A. V., GELFANOV V. M., GRECHANINOVA L. A., SUROVOY A. Yu.,
VOL'PINA O. M., IVANOV V. T., CHERPURKIN A. V.*, DRYAGALIN N. N.*,
IVANYUSHCHENKOV V. N.*

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

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

We have synthesized the peptide representing 135–159 VP₁ sequence of A₂₂ strain of the foot-and-mouth disease virus (FMDV). The synthetic peptide induced 100% protection of guinea pigs against the disease. Two-fold immunization of cattle with the peptide and single immunization of sheep induced full protection of the animals against A₂₂ strain of FMDV.