



УДК 577.112.083.3 : 615.371

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ВИРУСА ЯЩУРА
IV *. СИНТЕЗ И ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ
ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА VP₁ ВИРУСА ЯЩУРА ШТАММА A₂₂

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. *,
Иванющенко В. Н. *, Бурдов А. Н. *

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

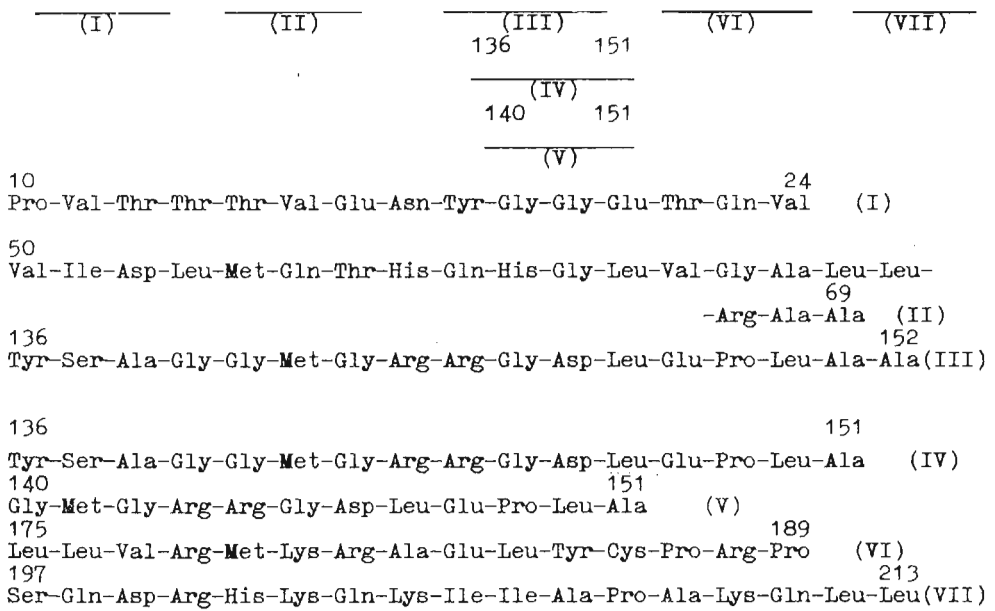
* Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт, Владимир

Описан синтез новых фрагментов белка VP₁ вируса ящура штамма A₂₂. Изучение иммуногенных свойств синтетических пептидов на лабораторных животных показало, что фрагмент 136—152 в свободном виде и в виде KLN-конъюгата, а также KLN-конъюгат пептида 197—213 индуцируют 60—80% защиту морских свинок от заболевания ящуром. Фрагменты 10—24, 50—69 и 175—189 не обладают протективной активностью. Обнаружено, что пептиды 175—189 и 197—213 способны в свободном виде индуцировать образование противопептидных антител, не обладающих вируснейтрализующей активностью. Показано, что иммунизация животных смесью VP₁-пептидов 136—152 O₁K и 175—189 A₂₂ приводит к подавлению иммунного ответа на фрагмент 136—152.

Работы по созданию искусственной противоящурной вакцины на основе синтетических пептидов позволили определить основной иммуногенный район поверхностного белка VP₁ вируса ящура штамма O₁K, включающий последовательность белка 130—160 [2—5]. Иммунизация пептидами с последовательностью фрагментов этого района в виде конъюгата с белком-носителем [2, 3], либо в свободном виде [4, 5] вызывает защиту лабораторных животных от заболевания ящуром. Изучение биологической активности пептидов, не относящихся к основному иммуногенному району белка VP₁, показало, что KLN-конъюгат пептида последовательности 200—213 индуцирует образование вируснейтрализующих антител, однако титр антител значительно ниже, чем в случае пептидов последовательности 130—160. Иммунизация животных конъюгатом пептида 200—213 с белком-носителем обеспечивает лишь частичную (50%) защиту лабораторных животных от заболевания ящуром [2]. Образование химической связи между VP₁-пептидами 200—213 и 140—160 существенно повышает активность фрагмента основного иммуногенного района белка [6]. В то же время пептид последовательности (135—213) O₁K не проявляет протективного действия [7]. Показано, что пептиды N-концевой части белка VP₁ 9—24, 17—32 и 25—41 не индуцируют образования вируснейтрализующих антител [2]. Мы предположили, что различные фрагменты белка VP₁ могут регулировать противовирусный иммунный ответ, индуцируемый пептидами основного иммуногенного района, и, следовательно, заслуживают внимания при изучении подходов к созданию синтетической противоящурной вакцины. Также представляется актуальной работа по поиску

* Сообщение III см. [1].

Сокращения: DCC — дициклогексилкарбодиимид, DMF — диметилформамид, DIEA — диизопропилэтиламин, НОВТ — 1-гидроксибензотриазол, OVA — овалбумин, TFA — трифторуксусная кислота, Bm — бензильоксиметил, VzCl₂ — 2,6-дихлорбензил, ZCl — 2-хлорбензилкарбонил, Acm — ацетамидометил, Aoc — трет-амилоксикарбонил, ONp — *n*-нитрофениловый эфир, PAM — фенилацетамидометил, ИД — инфекционная доза вируса, ТЦД — тканевая цитотоксическая доза вируса, KLN — гемоцианин улитки, PBS — 0,01 М раствор NaH₂PO₄ (pH 7,4).

Рис. 1. Синтетические фрагменты белка VP₁

новых фрагментов белка, обладающих протективной активностью. С этой целью была запланирована работа по синтезу серии фрагментов белка VP₁ вируса ящура штамма А₂₃ [8], эндемичного для ряда районов СССР.

Ряд таких пептидов получен в настоящей работе (рис. 1). Выбор фрагментов проводился на основе теоретических методов предсказания потенциальных антигенных детерминант [9], анализа вариабельности аминокислотной последовательности белков VP₁ различных субтипов вируса и с учетом литературных данных по иммуногенности фрагментов белка VP₁ [2—5].

Выбор фрагмента 10—24 (I) основан на теоретических прогнозах его высокой гидрофильности и наличия β-изгиба [9, 5]. Известно, что белок VP₁ содержит высоковариабельный район последовательности 40—60 [3], и, кроме того, согласно теоретическим методам анализа вторичной структуры, район 60—70 представляет собой α-спираль [9, 5], поэтому следующим участком для синтеза был выбран фрагмент 50—69 (II). Ранее было показано, что VP₁-пептиды последовательности 140—149 и 131—149 вызывают соответственно 50 и 80% защиту лабораторных животных от заболевания ящуром [5]. Для более точной локализации участка белковой цепи, ответственного за вируснейтрализующую активность, был синтезирован фрагмент 136—152 (III). Кроме того, для проведения работ по локализации В- и Т-эпитопов были синтезированы укороченные аналоги этого фрагмента: 136—151 (IV) и 140—151 (V). Анализ вариабельности белковых цепей VP₁ вирусов различных штаммов [3] выявил еще один район, представляющий интерес при изучении иммуногенных свойств фрагментов VP₁, — участок 175—189 (пептид (VI)). Этот пептид соответствует консервативному и гидрофильному району белка и по аналогии с консервативным районом гемагглютинина вируса гриппа [10] может оказаться функционально значимым при индукции противоящурного иммунного ответа. Фрагмент 197—213 (VII) был выбран для синтеза на основе литературных данных об активности участка 200—213 [2], однако решено было удлинить синтетический пептид на гидрофильный участок 197—199.

Синтез пептидов (I)—(III) и (VI), (VII) проводили твердофазным методом в ручном варианте последовательным наращиванием цепи с С-конца [11]. Пептиды (I), (VI), (VII) синтезированы на хлорметилованном

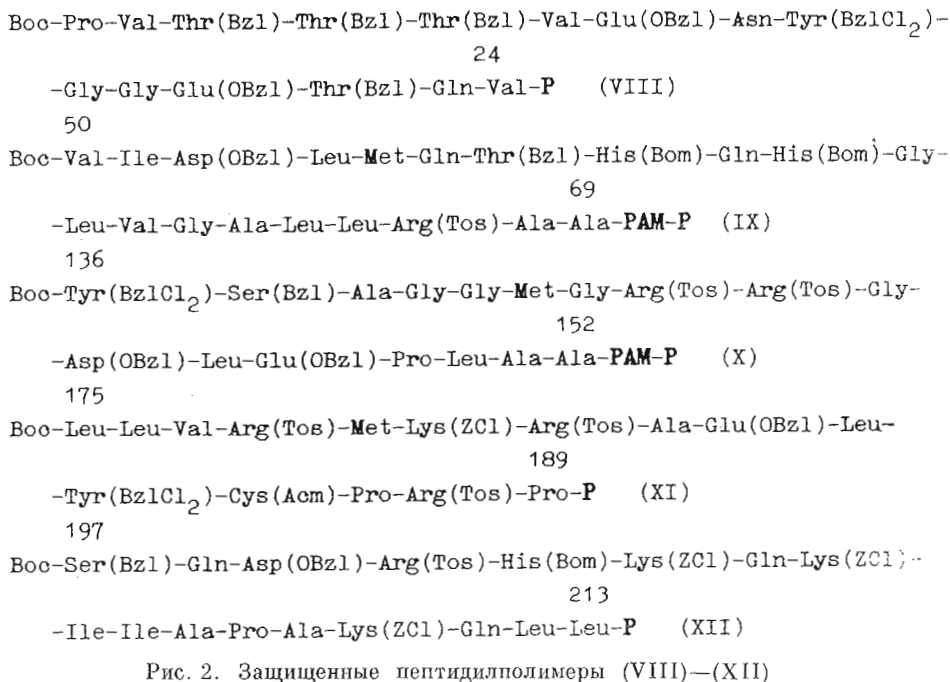


Рис. 2. Защищенные пептидилполимеры (VIII)–(XII)

сополимере стирола с дивинилбензолом [12], а пептиды (II), (III) — на ПАМ-полимере [13]. Для защиты α-аминофункции использовали Вос-группу. Защитные группы боковых функций аминокислот, кроме остатка Cys(Acm), были выбраны с расчетом на конечное деблокирование жидким фтористым водородом. Защищенные пептидилполимеры представлены на рис. 2.

Реакцию конденсации проводили двукратно, первоначально методом симметричных ангидридов, а затем ДСС/НОВТ-методом с предварительной активацией аминокислоты. В ходе синтеза пептидов (II) и (III) при неполном протекании реакции конденсацию повторяли третий раз ДСС/НОВТ-методом. При этом достигалась полнота протекания реакции >99%. При синтезе пептидов (I), (VI) и (VII) стандартно проводилась двукратная конденсация и выходы реакции изменялись от 86 до 99,5%. Остатки Вос-Asn и Вос-Gln вводили в реакцию методом *n*-нитрофениловых эфиров, остаток Вос-Arg(Tos) — ДСС-методом и конденсацию повторяли ДСС/НОВТ-методом. Каждый цикл синтеза заканчивали ацилированием непрореагировавших аминогрупп уксусным ангидридом. После введения в пептидную цепь остатка Met удаление Вос-группы во избежание окисления и алкилирования атома серы проводили в присутствии меркаптоэтанола. Деблокирование пептидов и отщепление с полимерного носителя жидким фтористым водородом для предотвращения нежелательных процессов проводили в два этапа: смесью HF—Me₂S—*n*-крезол, а затем смесью HF — *n*-крезол [14]. Для очистки деблокированных пептидов использовали ионообменную хроматографию.

Выход пептидов (I), (VI), (VII) составил 12–15% в расчете на первую аминокислоту. Выход пептидов (II), (III), синтезированных на ПАМ-полимере, был существенно выше: 70–80%. Низкий выход пептидов (I), (VI), (VII), вероятно, объясняется известной побочной реакцией отщепления растущей пептидной цепи от полимера [13], потери от этого нежелательного процесса составили ~30%. С другой стороны, неудовлетворительными оказались результаты стандартной двукратной конденсации, и по результатам анализа количества непрореагировавших аминогрупп [15, 16] потери от получения в ходе синтеза укороченных пептидов варьировались в интервале 50–60%. Сравнение результатов синтеза пептидов (I), (VI), (VII) и (II), (III) подтвердило преимущества ПАМ-поли-

Хроматографические подвижности и выходы пептидов, полученных в растворе

Пептид	Выход, %	R_f (система*)	Пептид	Выход, %	R_f (система*)
XIII	98	0,89 (А) 0,82 (Б) 0,78 (В)	XXII	52	0,55 (Б) 0,41 (Ж) 0,50 (К)
XIV	97	0,78 (Ж) 0,70 (Б) 0,69 (И)	XXIIa	96	0,56 (З) 0,51 (Л)
XV	84	0,70 (Ж) 0,76 (Б) 0,72 (К)	XXIII	52	0,51 (Б) 0,83 (З) 0,45 (К)
XVI	91	0,38 (Ж) 0,41 (Б) 0,35 (К)	XXIV	93	0,51 (Д) 0,87 (Ж) 0,79 (Б)
XVII	92	0,32 (Ж) 0,62 (Б) 0,55 (К)	XXV	83	0,53 (Е) 0,76 (Ж) 0,70 (К)
XVIII	72	0,40 (Г) 0,76 (Ж) 0,69 (Б)	XXVI	86	0,53 (Б) 0,76 (Ж) 0,48 (К)
XIX	87	0,72 (Б) 0,68 (Ж) 0,70 (К)	XXVIa	81	0,81 (З) 0,79 (Л)
XX	58	0,70 (Б) 0,62 (Ж) 0,64 (К)	XXVII	95	0,83 (З) 0,48 (К)
XXI	83	0,44 (Б) 0,53 (Ж) 0,39 (К)	IV	82	0,37 (М)
			V	73	0,32 (М)

* Системы для хроматографии: хлороформ — метанол — этилацетат, 10 : 1 : 1 (А), 9 : 3 : 1 (Б), 3 : 1 : 1 (В), 9 : 1 : 1 (Г), 10 : 10 : 1 (Д), 4 : 1 : 1 (Е), этилацетат — уксусная кислота — вода, 10 : 1 : 1 (Ж), 4 : 1 : 1 (З), хлороформ — метанол — этилацетат — уксусная кислота, 10 : 1 : 1 : 0,1 (И), 3 : 1 : 1 : 0,1 (К), бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Л), бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 42 : 24 : 30 : 4 (М).

мера перед хлорметилированным полимером и еще раз продемонстрировало неудовлетворительность стандартного подхода к проведению реакции конденсации в твердофазном методе синтеза пептидов.

Пептиды 136—151 (IV) и 140—151 (V) были получены классическим методом синтеза с использованием блочной конденсации фрагментов по приведенной схеме. В синтезе применяли временную N^{α} -Вос-группу, для защиты $COOH$ -функции использовали бензильные или метилловые эфиры, для защиты боковых функций аминокислот — защитные группировки бензильного типа. Реакции конденсации в ходе получения блоков проводили методом смешанных ангидридов или *n*-нитрофениловых эфиров. Блочные конденсации осуществляли методом смешанных ангидридов и карбодимидным методом с добавкой пентафторфенола. Очистка всех промежуточных соединений достигалась экстракцией. Для оценки степени гомогенности промежуточных соединений использовали ТСХ. Характеристики полученных пептидов приведены в табл. 1, 2. Конечное деблокирование пептидов проводили фтористым водородом в два этапа [14]. Для очистки свободных пептидов (IV) и (V) использовали ионообменную хроматографию на CM -сефадексе.

Все полученные пептиды (I) — (VII) охарактеризованы данными аминокислотного анализа после кислотного гидролиза, а в случае полученных классическим методом пептидов (IV) и (V) — дополнительно данными аминокислотного анализа после ферментативного гидролиза (табл. 3).

Данные аминокислотного анализа защищенных пептидных блоков последовательности 136-151

Пептид	Asr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Leu	Tyr	Met	Arg
XVII	1,05 (1)	—	1,00 (1)	1,02 (1)	—	1,00 (1)	1,98 (2)	—	—	—
XXII	—	—	—	—	3,05 (3)	—	—	—	1,00 (1)	1,54 (2)
XXVI	—	0,58 (1)	—	—	0,94 (1)	1,00 (1)	—	0,62 (1)	—	—
XXIII	1,11 (1)	—	1,00 (1)	1,12 (1)	3,19 (3)	1,00 (1)	2,08 (2)	—	0,86 (1)	1,43 (2)
XXVII	1,13 (1)	0,63 (1)	0,91 (1)	1,05 (1)	4,20 (4)	1,94 (2)	1,94 (2)	0,73 (1)	0,73 (1)	1,56 (2)

Таблица 3

Данные аминокислотного анализа свободных пептидов (I)–(VII)

Пептид	I	II	III	IV *	V *	VI	VII
Val	3,40(3)	2,12(2)	—	—	—	1,13(1)	—
Leu	—	3,97(4)	2,00(2)	1,95(2) 2,00	1,97(2) 2,01	3,03(3)	2,05(2)
Ile	—	0,97(1)	—	—	—	—	1,96(2)
Gly	2,23(2)	2,21(2)	4,12(4)	4,16(4) 4,10	2,35(3) 3,06	—	—
Ala	—	3,03(3)	2,95(3)	1,98(2) 2,12	1,00(4) 0,98	0,98(1)	2,10(2)
Pro	0,95(1)	—	1,06(1)	0,98(1) 1,11	1,00(1) 1,02	2,01(2)	1,06(1)
Glu	3,25(3)	2,07(2)	1,00(1)	1,00(4) 1,00	1,00(4) 0,96	0,98(1)	2,93(3)
Asp	1,17(1)	0,98(1)	0,96(1)	1,00(1) 0,96	1,00(1) 1,00	—	1,03(1)
Arg	—	0,91(1)	2,03(2)	2,15(2) 1,99	1,54(2) 1,94	2,87(3)	1,00(1)
Tyr	0,75(1)	—	0,82(1)	0,69(1) 0,98	—	0,82(1)	—
Thr	3,35(4)	—	—	—	—	—	—
Met	—	0,88(1)	0,92(1)	0,82(1) 1,03	1,00(4) 1,10	0,94(1)	—
His	—	2,05(2)	—	—	—	—	1,12(1)
Ser	—	—	0,78(1)	0,73(1) 1,00	—	—	0,80(1)
Lys	—	—	—	—	—	1,12(1)	3,07(3)
Cys	—	—	—	—	—	0,87(1)	—

* В нижней строке представлены данные ферментативного гидролиза.

Гомогенность пептидов подтверждена данными ВЭЖХ (табл. 4), анализа N-концевых аминокислот и масс-спектрометрии (табл. 5).

Иммуногенность синтетических пептидов изучали на кроликах и морских свинках. Животных дважды иммунизировали свободными пептидами и их КЛН-конъюгатами. Первую иммунизацию проводили с полным адъювантом Фрейнда, а вторую — через 44 дня с неполным адъювантом Фрейнда. Протективную активность пептидов изучали на морских свинках путем введения иммунизированным животным на 55-е сут после первой иммунизации 500 ИД₅₀ вируса ящура штамма А₂₂. Сыворотку у кроликов отбирали на 55-е сут после первой иммунизации и определяли титр противопептидных антител методом иммуноферментного анализа [17] и титр вируснейтрализующих антител против 100 ТЦД₅₀ вируса ящура штамма А₂₂ в реакции нейтрализации вируса в культуре ткани свиной почки [18].

Время удерживания пептидов (I)–(VII) при ВЭЖХ в минутах

Система	I	II	III	IV	V	VI	VII
1	15,0	21,1	15,8	15,6	14,2	17,0	16,8
2	18,2	22,5	18,7	18,5	17,8	20,2	19,4

Условия хроматографии:

1. Скорость потока 1 мл/мин; градиент В в А от 0 до 100% за 35 мин (А : 0,05% ТГА, В : 70% CH_3CN в А).
2. Скорость потока 1 мл/мин; градиент В в А от 0 до 100% за 70 мин (А : 0,05 М NaH_2PO_4 (рН 3,0), В : 70% CH_3CN в А).

Таблица 5

Данные масс-спектрометрического анализа пептидов (I)–(VII)

Соединение	А	Б	Соединение	А	Б
I	1596	1594,7	V	577	575,7
II	2144	2143	VI	1846	1845,3
III	1722	1721	VII	1975	1974,3
IV	1651	1649,8			

Примечание. А — экспериментальные величины MH^+ , Б — теоретические молекулярные массы.

Результаты испытаний представлены в табл. 6. Пептиды 10–24 (I) и 50–69 (II) не проявляют противоящурной активности: в свободном виде эти фрагменты не индуцируют кроликов образования антител и не защищают морских свинок от заболевания ящуром. КЛН-конъюгаты этих пептидов стимулируют у кроликов образование противопептидных антител, но последние не ингибируют роста вируса ящура в культуре клеток и не проявляют протективной активности. Результаты испытаний пептида 136–152 (III) принципиально не отличаются от ранее полученных результатов испытаний фрагментов 140–149 и 131–149 VP_1 вируса ящура [5]. Пептид 136–152 (III) не индуцирует у кроликов образования ни противопептидных, ни противовирусных антител, но в то же время проявляет протективную активность на морских свинках (67% защиты), т. е. иммунный ответ на свободный пептид 136–152 видоспецифичен. Когда же с помощью КЛН-конъюгата удастся индуцировать у кроликов противопептидный иммунный ответ, эти антитела оказываются вируснейтрализующими. Протективная активность КЛН-конъюгата пептида (III) составляет 82%.

До сих пор был известен один район белка VP_1 , не требующий для стимуляции иммунного ответа конъюгации с белком-носителем. Это основной иммуногенный район 130–160 [4, 5]. Результаты испытаний показали, что свободные пептиды 175–189 (VI) и 197–213 (VII) вызывают образование противопептидных антител у кроликов, однако антитела против этих пептидов не являются вируснейтрализующими и иммунизация свободными пептидами не вызывает защиты морских свинок от заболевания. В то же время КЛН-конъюгат пептида 197–213 проявляет 60% протективную активность на морских свинках. Известно, что пептид, последовательности 136–152 VP_1 штамма O_1K также индуцирует у кроликов образование лишь слабо нейтрализующих вирус противопептидных антител, но в то же время вызывает защиту морских свинок от заболевания [1]. Это означает, что один и тот же пептид на разных видах животных может индуцировать образование антител, различающихся по способности нейтрализовать вирус. Не исключено, что способность пептидов 175–189 и 197–213 вызывать образование противопептидных антител у кроликов при иммуни-

Иммуногенность синтетических фрагментов белка VP₁ вируса ящура штамма A₂₂

Иммуноген	Носитель	Кролики *		Морские свинки **	
		Титр ППА, —log ₁₀	Титр ВНА, —log ₂	N _{защ} /N _{зар}	Защита, %
10-24	KLH	3,8	<1,0	0/5	0
	—	<1,0	<1,0	0/5	0
50-69	KLH	3,8	<1,0	0/5	0
	—	<1,0	<1,0	0/5	0
136-152	KLH	3,8	7,0-7,7	5/6	82
	—	<1,0	<1,0	4/6	67
175-189	KLH	4,3	<1,0	0/5	0
	—	4,9	<1,0	0/5	0
197-213	KLH	4,2	<1,0	3/5	60
	—	3,5	<1,0	0/5	0

* Условия иммунизации см. в работе [1], ППА — противопептидные антитела, ВНА — вируснейтрализующие антитела.

** Заражение вирусом A₂₂ в дозе, равной 500 ИД₅₀, проводили после двукратной иммунизации по 200 мкг пептида; N_{защ} — число защищенных животных; N_{зар} — число зараженных животных.

Таблица 7

Иммуногенность смесей пептидов на кроликах

Иммуноген	Антиген	Титр ППА *, —log ₁₀
136-152 O ₁ K	136-152 O ₁ K	4,4
136-152 O ₁ K+197-213 A ₂₂	136-152 O ₁ K	4,4
	197-213 A ₂₂	3,5
136-152 O ₁ K+10-24 A ₂₂	136-152 O ₁ K	4,4
	10-24 A ₂₂	<1,0
136-152 O ₁ K+175-189 A ₂₂	136-152 O ₁ K	2,5
	175-189 A ₂₂	4,5

* ППА — противопептидные антитела, условия иммунизации см. в работе [1].

зации природновосприимчивых животных проявится в индукции вируснейтрализующих антител.

Ранее была показана возможность стимуляции противопептидного иммунного ответа при совместном введении кроликам VP₁-(136-152)-пептида штамма O₁K и VP₁-(131-149)-пептида штамма A₂₂ [1]. Для изучения взаимного влияния пептидов на образование противопептидных антител различные фрагменты белка VP₁ штамма A₂₂ были введены совместно с VP₁-(136-152)-пептидом штамма O₁K. Введение пептида 136-152 O₁K совместно с пептидами 10-24 A₂₂ (I) или 197-213 A₂₂ (VII) не оказывает взаимного влияния на способность индуцировать образование антител каждым из этих пептидов (табл. 7).

Иммунизация смесью пептидов 136-152 O₁K и 175-189 A₂₂ приводит к частичному подавлению иммунного ответа на 136-152 O₁K-пептид. Если свободный 136-152 O₁K-пептид индуцирует образование антител, определяемых в разведении 1/25600 (lg = -4,4), то при введении смеси пептидов титр антител против пептида 136-152 O₁K снижается до 1/320 (lg = -2,5), т. е. в 80 раз.

Детальное изучение механизмов стимуляции и депрессии иммунного ответа при введении смесей пептидов, а также значимость найденных эффектов и индукции противоящурного иммунного ответа является предметом наших дальнейших исследований.

Экспериментальная часть

В работе использовали реактивы и производные аминокислот фирм Reanal, Fluka, Serva, PRF, Merck, хлорметилированный сополимер стирола и 1% дивинилбензола фирмы Bio-Rad (1,34 ммоль Cl на 1 г полимера), аминотетилированный сополимер стирола и 1% дивинилбензола фирмы PRF (0,2 ммоль NH₂-группы на 1 г полимера). Растворители очищали согласно известным методикам [18]. Обработку пептидилполимеров жидким фтористым водородом проводили в приборе фирмы Toho Kasei. Для колоночной хроматографии использовали сефадекс G-10 (Pharmacia), DEAE-Trisacryl (LKB), CM-Toyopearl (Toyo Soda). Для высокоэффективной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии использовали прибор фирмы LKB и колонку TSK-ODS (4,6 × 250 мм, частицы 5 мкм). Кислотный гидролиз пептидов и пептидилполимеров проводили 45 мин смесью 6 н. HCl-TFA (2 : 1) при 160° С или 24 ч 6 н. HCl при 110° С. Масс-спектр снимали на приборе Kratos MS 50 TC методом FAB*. Тонкослойную хроматографию промежуточных продуктов проводили на пластинках с силикагелем (Merck). Приборы и реактивы для иммуноферментного анализа описаны в сообщении [1].

Вос-Ala-РАМ-полимер получали согласно работе [13] исходя из аминотетильного полимера.

Вос-аминоацил-полимеры для соединений (VIII), (XI), (XII) получали реакцией цезиевых солей Вос-аминокислот и хлорметилированного полимера [12].

10

Boc-Pro-Val-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Val-Glu(OBzl)-Asn-Tyr(BzlCl₂)-Gly-Gly-Glu(OBzl)-Thr(Bzl)-Gln-Val-полимер (VIII) получали исходя из 1 г Вос-Val-полимера (нагрузка 1,0 ммоль Val на 1 г полимера). Использовали следующий протокол каждого синтетического цикла (10—15 мл растворителя на 1 г полимера):

- 1) CH₂Cl₂ (2 × 1 мин),
- 2) CH₂Cl₂ — TFA, 1 : 1 (1 мин),
- 3) CH₂Cl₂ — TFA, 1 : 1 (30 мин),
- 4) CH₂Cl₂ (5 × 1 мин),
- 5) DIEA — CH₂Cl₂, 5 : 95 (2 × 2 мин),
- 6) CH₂Cl₂ (3 × 1 мин),
- 7) 3 экв. симметричного ангидрида Вос-аминокислоты в CH₂Cl₂ (2 ч),
- 8) CH₂Cl₂ (3 × 1 мин),
- 9) DIEA — CH₂Cl₂, 5 : 95 (2 × 2 мин),
- 10) CH₂Cl₂ (2 × 1 мин),
- 11) DMF (3 × 1 мин),
- 12) 3 экв. НОВТ-эфира Вос-аминокислоты в DMF (2 ч),
- 13) DMF (3 × 1 мин),
- 14) CH₂Cl₂ (2 × 1 мин),
- 15) изопропанол (3 × 1 мин),
- 16) ацилирование смесью CH₂Cl₂ — Ac₂O — пиридин, 60 : 20 : 20 (1 ч),
- 17) CH₂Cl₂ (3 × 1 мин),
- 18) изопропанол (3 × 1 мин).

Для получения симметричного ангидрида защищенной аминокислоты к 6 экв. Вос-аминокислоты в 10 мл CH₂Cl₂ приливали раствор 3 экв. DCC в DMF при 0° С. После перемешивания в течение 30 мин выпавшую дидиклогексилмочевину отфильтровывали, раствор использовали для проведения реакции конденсации.

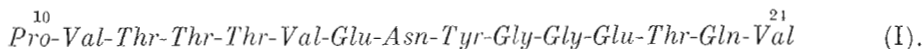
Гидроксibenзотриазоловые эфиры получали реакцией 3 экв. Вос-аминокислоты, 3 экв. НОВТ и 3 экв. DCC в смеси CH₂Cl₂ — DMF при 0° С в течение 10 мин. Образовавшуюся дидиклогексилмочевину отфильтровывали, раствор использовали для проведения реакций конденсации.

Присоединение остатков Вос-Gln и Вос-Asn проводили аналогично, но в отличие от пункта 7 вместо симметричных ангидридов использовали смесь 3 экв. *n*-нитрофениловых эфиров этих аминокислот и 3 экв. НОВТ.

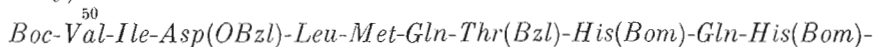
* Метод бомбардировки ускоренными атомами.

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

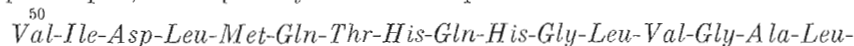
Контроль протекания реакций конденсации осуществляли после стадий 10 и 14 протокола с помощью нингидринового [15] и пикринового [16] тестов.



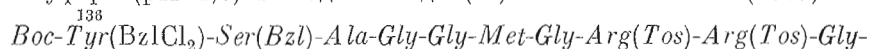
С 500 мг пептидилполимера (VIII) удаляли Вос-группу по протоколу (пункты 1—6), затем пептид отщепляли от полимера с одновременным деблокированием в два этапа. На первом этапе пептидилполимер обрабатывали 2 ч 10 мл смеси HF — диметилсульфид — *n*-крезол (25 : 65 : 10) при 0° С. Фтористый водород и диметилсульфид 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 лиофилизовали, пептид обессоливали дважды на колонке (2,5 × 40 см) с сефадексом G-10 в 0,1 н. AcOH, а затем очищали с помощью ионообменной хроматографии на колонке (1,5 × 25 см) с сорбентом DEAE-Trisacryl в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (pH 7,5). Выход пептида (I) 30 мг (12,5% в пересчете на С-концевую аминокислоту).



$\text{Gly-Leu-Val-Gly-Ala-Leu-Leu-Arg(Tos)-Ala-Ala-PAM-полимер}^{69}$ (IX) синтезировали исходя из 2 г Вос-Ala-PAM-полимера (0,2 ммоль Ala на 1 г полимера) как описано для пептидилполимера (VIII). После присоединения остатка Met-54 на стадиях 2 и 3 протокола вместо смеси CH₂Cl₂—TFA (1 : 1) использовали смесь CH₂Cl₂ — TFA — 2-меркаптоэтанол (48 : 48 : 4). Для остатков Val-50, Leu-61, Leu-65 не была достигнута желаемая полнота протекания реакции конденсации и конденсацию проводили в третий раз, повторяя пункты 6—8 протокола.

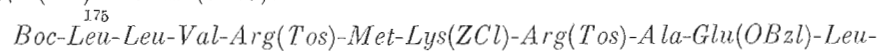


$\text{Leu-Arg-Ala-Ala}^{69}$ (II) (500 мг) деблокировали как описано для пептида (I). После обессоливания на сефадексе G-10 в 0,1 н. AcOH и очистки на колонке с сорбентом CM-Toyorearl (2,5 × 40 см) в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (pH 4,5) выход пептида (II) составил 149 мг (70%).



$\text{Asp(OBzl)-Leu-Glu(OBzl)-Pro-Leu-Ala-Ala-Pam-полимер}^{152}$ (X) синтезировали исходя из 2 г Вос-Ala-PAM-полимера (0,2 ммоль Ala на 1 г полимера) как описано для пептидилполимера (VIII).

$\text{Tyr-Ser-Ala-Gly-Gly-Met-Gly-Arg-Arg-Gly-Asp-Leu-Glu-Pro-Leu-Ala-Ala}^{136}$ (III) (500 мг) деблокировали как описано для пептида (I). После обессоливания на сефадексе G-10 в 0,1 н. AcOH пептид очищали на колонке с CM-Toyorearl в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (pH 4,5). Выход пептида (III) 135 мг (82%).



$\text{Tyr(BzlCl}_2\text{)-Cys(Acm)-Pro-Arg(Tos)-Pro-полимер}^{189}$ (XI) получали исходя из 2 г Вос-Pro-полимера (0,3 ммоль Pro на 1 г полимера) как описано для пептидилполимера (VIII). В ходе присоединения остатков Leu-175, Leu-176, Val-177, Glu-183, Leu-184 реакцию конденсации проводили в третий раз (повторяя пункты 6—8 протокола).

$\text{Leu-Leu-Val-Arg-Met-Lys-Arg-Ala-Glu-Leu-Tyr-Cys(Acm)-Pro-Arg-Pro}^{175}$ (VIa). Отщепление пептида (VIa) от полимерного носителя (500 мг) с одновременным деблокированием проводили аналогично описанному для

пептида (I). После обессоливания на сефадексе G-10 в 0,1 н. АсОН пептид очищали на колонке с CM-Toyorearl в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 4,8). Выход 50 мг (15%).

¹⁷⁵Leu-Leu-Val-Arg-Met-Lys-Arg-Ala-Glu-Leu-Tyr-Cys-Pro-Arg-Pro¹⁸⁹ (VI). К раствору 50 мг пептида (VIa) в 6 мл АсОН (рН 4) добавляли 120 мг ацетата ртути, перемешивали 3,5 ч, добавляли 1,2 мл меркаптоэтанола и выдерживали 15 ч при 5° С. Выпавший осадок отфильтровывали, водный раствор лиофилизовали и остаток растворяли в 0,1 н. АсОН. После обессоливания на сефадексе G-10, в 0,1 н. АсОН выход составил 35 мг (70%).

¹⁹⁷Вос-Ser(Bzl)-Gln-Asp(OBzl)-Arg(Tos)-His(Bom)-Lys(ZCl)-Gln-Lys(ZCl)-Ile-Ile-Ala-Pro-Ala-Lys(ZCl)-Gln-Leu-Leu-полимер²¹³ (XII) получали исходя из 2 г Вос-Leu-полимера (1,0 ммоль Leu на 1 г полимера) аналогично синтезу пептида (VII).

¹⁹⁷Ser-Gln-Asp-Arg-His-Lys-Gln-Lys-Ile-Ile-Ala-Pro-Ala-Lys-Gln-Leu-Leu²¹³ (VII) (500 мг) деблокировали аналогично описанному для пептида (I). После обессоливания на колонке с сефадексом G-10 в 0,1 н. АсОН пептид очищали на колонке с CM-Toyorearl (1,5 × 22 см) в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 4,5). Выход пептида (VII) составил 61 мг (14%).

Вос-Leu-Ala-OBzl (XIII). Смесь 10 ммоль (2,46 г) Вос-Leu-ОН и 10 ммоль (1,1 мл) N-метилморфолина в 5 мл DMF охлаждали до -15° С, добавляли 10 ммоль (1,37 мл) изобутилхлорформата и перемешивали при -15° С в течение 2 мин. Затем добавляли по каплям 10 ммоль (2,16 г) HCl·H-Ala-OBzl и 10 ммоль (1,1 мл) N-метилморфолина в DMF. Реакционную массу перемешивали 30 мин при -15° С, 30 мин при 30° С и выливали в 100 мл этилацетата. Органический слой промывали 5% раствором NaHCO₃ (100 мл × 3), водой (100 мл × 3), 10% лимонной кислотой (100 мл × 3), водой (100 мл × 3). После этого органический слой высушивали над безводным Na₂SO₄ и упаривали растворитель в вакууме. Получали защищенный пептид (XIII).

5 ммоль пептида (XIII) обрабатывали 40 мин 80 мл 70% водной TFA, затем упаривали, к остатку добавляли 30 мл толуола, упаривали снова. Операцию повторяли трижды. Получали 3,8 г (98%) трифторацетата пептида (XIIIa).

Пептиды (XIV) — (XIX) получали аналогично пептиду (XIII) (выходы и значения R_f см. в табл. 1).

Вос-Gly-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Gly-OMe (XX). Раствор, содержащий 10 ммоль (2,69 г) Вос-Gly-ONp, 10 ммоль (8,51 г) трифторацетата пептида (XIXa), 10 ммоль (1,1 мл) N-метилморфолина и 20 ммоль (2,7 г) НОВТ в 5 мл DMF перемешивали 15 ч при 20° С. Далее обработку реакционной массы проводили как описано для пептида (XIII). Получали пептид (XX), а после удаления Вос-группы — (XXa). Пептиды (XXI)—(XXII) получали аналогично пептиду (XX).

Вос-Gly-Met-Gly-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Gly-OH (XXIIa). К 1 ммоль (1,08 г) пептида (XXII) добавляли 6 мл 0,1 н. NaOH в метаноле, выдерживали 40 мин, раствор подкисляли АсОН до рН 5,0, упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, промывали 100 мл 5% лимонной кислоты, водой и упаривали, получали пептид (XXII).

H-Gly-Met-Gly-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Gly-Asp(OBzl)-Leu-Glu(OBzl)-Pro-Leu-Ala-OBzl (XXIIIa). Пептид (XXIII) получали методом смешанных ангидридов, процесс осуществляли как описано для пептида (XIII), в реакцию брали эквимольные количества пептида (XXIIa) и пептида (XVIIa). После удаления Вос-группы получали пептид (XXIIIa).

Пептиды (XXIV)—(XXV) получали аналогично пептиду (XIII).

Пептид (XXVI) получали аналогично пептиду (XX), пептид (XXVIa) омыляли как описано для пептида (XXIIa).

¹³⁶Вос-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ala-Gly-Gly-Met-Gly-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Gly-Asp-

(OBzl)-Leu-Glu(OBzl)-Pro-Leu-Ala-OBzl (XXVII). К раствору 0,35 ммоль (0,24 г) пептида (XXVIa) в DMF добавляли 0,42 ммоль (0,08 г) DCC и 0,70 ммоль (0,08 г) НОВТ, перемешивали 30 мин, затем добавляли смесь 0,35 ммоль (0,70 г) трифторацетата пептида (XXIIIa) и 0,35 ммоль (0,04 г) N-метилморфолина в DMF. Реакционную массу перемешивали 2 ч, добавляли AcOH до pH 5,0, мочевины отфильтровывали, а полученный пептид (XXVII) осаждали эфиром.

136

Tyr-Ser-Ala-Gly-Gly-Met-Gly-Arg-Arg-Gly-Asp-Leu-Glu-Pro-Leu-Ala (IV).

Для конечного удаления защитных групп пептид (XXVII) обрабатывали жидким фтористым водородом как описано для пептида (I). Пептид (IV) обессоливали на колонке с сефадексом G-10 в 0,1 н. CH₃COOH и затем хроматографировали на колонке с CM-Toyorearl (2,5 × 25 см) в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (pH 4,6).

Gly-Met-Gly-Arg-Arg-Gly-Asp-Leu-Glu-Pro-Leu-Ala (V). Защитные группы с пептида (XXIIIa) удаляли как описано для пептида (I). Полученный пептид (V) хроматографировали на колонке с сефадексом G-10 в 0,1 н. AcOH и на колонке (2,5 × 25 см) с CM-Toyorearl в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (pH 4,6).

Иммунизацию животных и получение сывороток проводили как описано в работе [1].

Получение KLN-конъюгатов. Конъюгацию пептидов с KLN проводили согласно [3]. 15 мг KLN и 3 мг пептида в PBS перемешивали 30 мин, затем в течение 1 ч добавляли 0,5 мл 0,5% водного раствора глутарового альдегида. Смесь оставляли на 15 ч на магнитной мешалке, после чего диализовали против PBS с 3-кратной сменой буфера.

Приготовление OVA-конъюгатов. 10 мг пептида и 20 мг OVA растворяли в PBS и при перемешивании в течение 1 ч добавляли 0,1 мл 20% водного раствора солянокислого 1-метил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимиды. Полученный раствор перемешивали 15 ч, после чего диализовали как описано выше.

Молярное соотношение пептид — носитель определяли по результатам количественного аминокислотного анализа согласно [19], которое составляло от 5 до 10 моль пептида на 1 моль носителя.

Определение титров противопептидных антител. Противопептидный титр кроличьих сывороток определяли в иммуноферментном анализе непрямом методом, как описано в работе [1]. OVA-конъюгаты пептидов (I), (II), (VI), (VII) в концентрации 10 мкг/мл и свободные пептиды (III) и 136—152 O₁K в концентрации 20 мкг/мл вносили в лунки 96-луночных плат. Образцы антисывороток вносили в лунки в разведениях 1 : 2 либо 1 : 5, начиная с разведения 1 : 20.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Суровой А. Ю., Гельфанов В. М., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Дрягалин Н. Н., Бурдов А. Н. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1185—1192.
2. Buttle 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.
3. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H. O., Schulz G. E., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869—874.
4. Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Снеткова Е. В., Волкова Т. Д., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1352—1362.
5. Вольпина О. М., Суровой А. Ю., Ульяшин В. В., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1363—1371.
6. Di Marchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., Mowat N. // Science. 1986. V. 232. № 4764. P. 639—641.
7. Di Marchi R., Brooke G., Gale C., Doel T. Peptides. Chemistry and Biology / Ed. Marshall G. R. Leiden: Escrom, 1980. P. 531—533.
8. Онищенко А. М., Петров Н. А., Блинов В. М., Василенко С. К., Сандагчиев Л. С., Бурдов А. Н., Иванющенко В. П., Перевозчикова Н. А. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 416—419.
9. Норр Т. Р. // J. Immunol. Meth. 1986. V. 88. № 1. P. 1—18.

10. Lamb J. R., McMichael A. J., Rothbard J. B. // *Human Immunol.* 1987. V. 19. P. 79—89.
11. Barany G., Merrifield R. B. *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology.* V. 2. / Eds Gross E., Meienhofer J. N. Y.: Acad. Press, 1980. P. 3—285.
12. Gisin B. F., Merrifield R. B. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1972. V. 94. № 10. P. 6165—6170.
13. Mitchell A. R., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B. // *J. Org. Chem.* 1978. V. 43. № 14. P. 2845—2852.
14. Tam J. P., Heath W. F., Merrifield R. B. // *J. Org. Chem.* 1983. V. 48. № 21. P. 6442—6455.
15. Sarin V. K., Kent S. B. H., Tam J. P., Merrifield R. B. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 117. № 2. P. 147—157.
16. Gisin B. F. // *Anal. chim. acta.* 1972. V. 58. № 1. P. 248—249.
17. Engvall E. // *Meth. Enzymol.* 1980. V. 70. P. 419—438.
18. Perrin D. D. *Purification of laboratory chemicals.* N. Y.: Pergamon Press, 1980. P. 1—563.
19. Brand J. P., Muller S., Van Regenmortel M. H. V. // *J. Immunol. Meth.* 1985. V. 78. № 1. P. 59—69.

Поступила в редакцию
2.III.1989

**ANTIGENIC STRUCTURE OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS.
IV. SYNTHESIS AND IMMUNOGENIC PROPERTIES OF NEW
FRAGMENTS OF VP₁ PROTEIN FROM A₂₂ STRAIN
OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS**

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

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

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

A synthesis of new fragments of VP₁ protein with the specificity of A₂₂ strain of foot-and-mouth disease virus is described. Immunization with the free 136—152 peptide and KLH-conjugates of the peptides 136—152 and 197—213 induced 60—80% protection of guinea pigs against challenge with the A₂₂ virus. Synthetic peptides corresponding to the 10—24, 50—69 and 175—189 sequences of VP₁ did not show any protective activity. We have found that uncoupled peptides 175—189 and 197—213 are able to induce anti-peptide antibodies. However, these antibodies did not possess any neutralizing activity. Immunization of animals with the mixture of (136—152)_{O₁K} and (175—189)_{A₂₂} has led to inhibition of the immune response to the (136—152)_{O₁K} fragment.