



УДК 577.412.6.083.3

© 1990 г.

В. А. Пар, Е. А. Макаров, В. В. Юровский,
Е. А. Мецержакова, Т. М. Андропова, В. Т. Иванов*

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ИММУНОГЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА ПОВЕРХНОСТНОГО БЕЛКА ВИРУСА ЯЩУРА

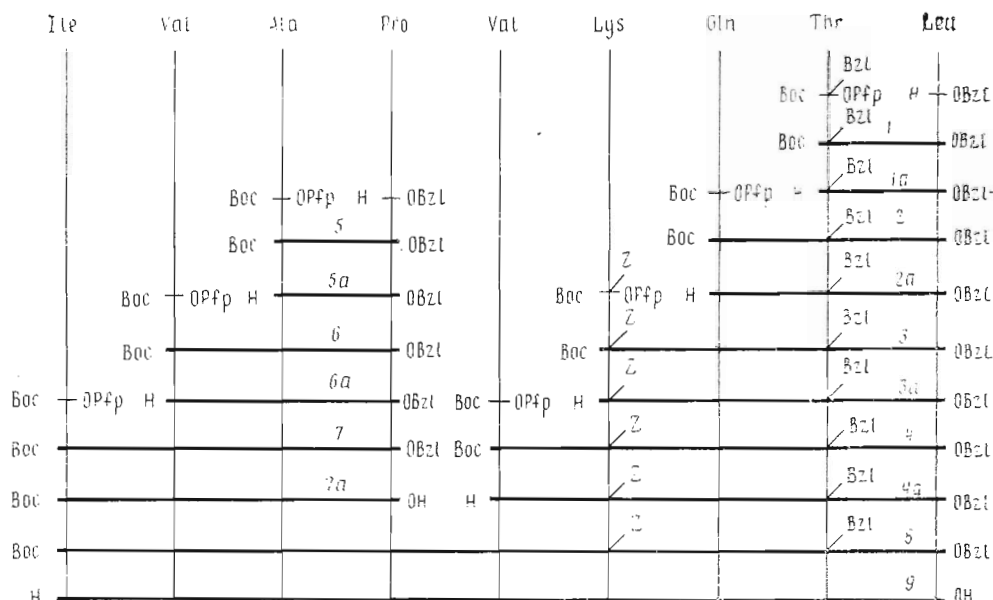
Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина АН СССР, Москва;

** Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шелякина АН СССР,
Пушино Московской обл.*

В ходе разработки путей создания синтетических иммуногенных комплексов были синтезированы конструкции, состоящие из С-концевого пептида 205—213 поверхностного белка VP₁ вируса ящура O₁K, синтетического адьюванта глюкозаминилмураомилдипептида (GMDP) и полиионных синтетических носителей: разветвленного полимера poly[(D, L-Ala)_n Lys] и сополимера малеинового ангидрида с винилпирролидоном (MAVP). Получены также полимеризованный пептид и конъюгат пептида с BSA. Была исследована иммуногенность полученных конструкций, при этом высокоиммуногенным оказался только конъюгат пептида с BSA. Обсуждаются возможности использования синтетических конструкций для создания иммуногенных комплексов.

Получение высокоиммуногенных комплексов с заданной специфичностью является основой создания синтетических вакцин. Широкие исследования в области определения иммунодоминантных районов различных белков и синтеза соответствующих пептидов позволили выяснить роль дискретных эпитопов в иммунном ответе. Иммунизация синтетическими пептидами вызывает индукцию иммунного ответа [1, 2], поэтому их можно использовать в качестве инструментов для выяснения механизма узнавания антигена и функционирования клеток иммунной системы в ответ на антиген. Однако иммуногенность синтетических пептидов, как правило, недостаточна для использования их в качестве вакцинирующих препаратов. В настоящее время ведется интенсивный поиск способов повышения иммуногенности синтетических антигенных детерминант. Большинство исследователей используют методы статистической конъюгации пептида с иммуногенными природными белками, чаще всего с гемоцианином улитки (KLH), BSA или столбнячным анатоксином. Однако использование природных белков в качестве носителей для получения вакцин имеет ряд недостатков. Во-первых, иммунизация такими конъюгатами излишне стимулирует иммунную систему, индуцируя широкий спектр антител против молекулы носителя. Во-вторых, предварительная иммунизация белковым носителем, а затем конъюгатом гаптена с тем же носителем приводит к эпитопной супрессии [3]. Альтернативным подходом к построению иммуногенной молекулы является ковалентное присоединение пептидных антигенных детерминант и синтетических адьювантов к искусственному полимерному носителю. Несколько лет назад появились об-

Сокращения: ABC — л-аминобензилцеллолоза, Aca — ε-аминокапроновая кислота, BSA — бычий сывороточный альбумин, GMDP — N-ацетил-D-глюкозаминил-β(1 → 4)-N-ацетилмураоил-аланил-D-изоглутамин, HOEt — 1-гидроксibenзотриазол, MAVP — сополимер малеинового ангидрида и винилпирролидона, MDP — N-ацетилмураоил-аланил-D-изоглутамин, OA(Suc) — сукцинизированный овальбумин, TEA — триэтиламин, TFA — трифторуксусная кислота, THF — тетрагидрофуран, WSC — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, НАФ — неполный адьювант Фрейнда, Pept — пептид 205—213 поверхностного белка VP₁ вируса ящура (штамм O₁K), ПАФ — полный адьювант Фрейнда, Pfp — пентафторфенил.



Синтез пептида 205—213 белка VP₁ вируса ящура (штамм O₁K)

надеживающие работы по получению иммуногенных комплексов на основе синтетических неиммуногенных полимеров — разветвленных молекул poly[(D,L-Ala)_nLys]. На примерах 21-членного пептида поверхностного белка бактериофага MS-2 и 14- и 18-членных пептидов дифтерийного токсина было показано, что иммунизация конъюгатами этих пептидов с poly[(D,L-Ala)_nLys] в полном адьюванте Фрейнда приводит к высокому иммунному ответу [4, 5]. Так, при иммунизации конъюгатом 21-членного пептида с poly[(D,L-Ala)_nLys] были получены антитела, способные нейтрализовать бактериофаг, а иммунизация конъюгатами 14- и 18-членных пептидов с poly[(D,L-Ala)_nLys] индуцировала образование антипептидных антител с титром, сравнимым с полученным при конъюгации тех же пептидов с BSA. Кроме того, в этих работах успешно прошла замена полного адьюванта Фрейнда синтетическим адьювантом MDP. При этом в случае пептидного фрагмента бактериофага эффективным оказалось ковалентное присоединение MDP к конъюгату, а в случае пептида дифтерийного токсина — как ковалентное присоединение, так и совместное введение синтетического конъюгата с MDP. Однако на пептидах других белков эти результаты повторить не удалось. На пептидах холерного токсина теми же авторами было показано, что высокий иммунный ответ вызывают конъюгаты пептида с белковым носителем (столбнячным анатоксином), а конъюгаты пептида с poly[(D,L-Ala)_nLys] неиммуногенны [6].

Другим подходом к созданию искусственных вакцин является использование в качестве носителя неприродных полиэлектролитов, обладающих адьювантной активностью. Конъюгат, полученный путем присоединения антигенной детерминанты геммагглютинина вируса гриппа к сополимерам N-винилпирролидона с малеиновым ангидридом или акриловой кислотой, вызывает при иммунизации в физиологическом растворе первичный иммунный ответ против вируса гриппа [7].

В настоящей работе была предпринята попытка получить полностью синтетические иммуногенные конструкции на основе пептидного антигена, полимерного носителя и гликопептидного адьюванта. В этих конструкциях варьировались способы присоединения к носителю и эпителиальная плотность пептида и адьюванта.

В качестве антигенной детерминанты был взят пептид Ile-Val-Ala-Pro-Val-Lys-Gln-Thr-Leu (Pept) из C-концевой области поверхностного белка VP₁ вируса ящура O₁K — фрагмент 205—213. Известно, что пептиды из этой области способны вызывать синтез вируснейтрализующих ан-

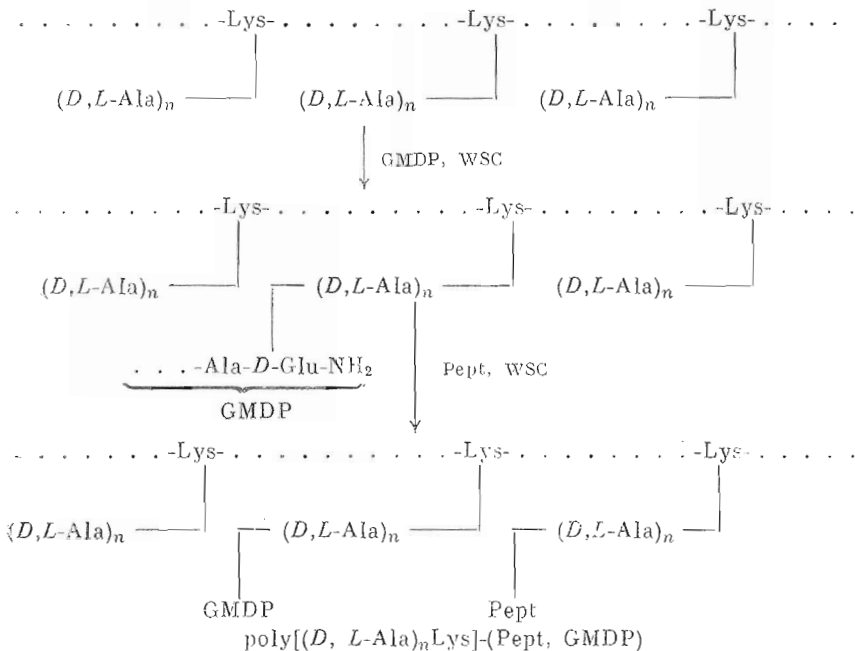
Состав конъюгатов пептида с носителями

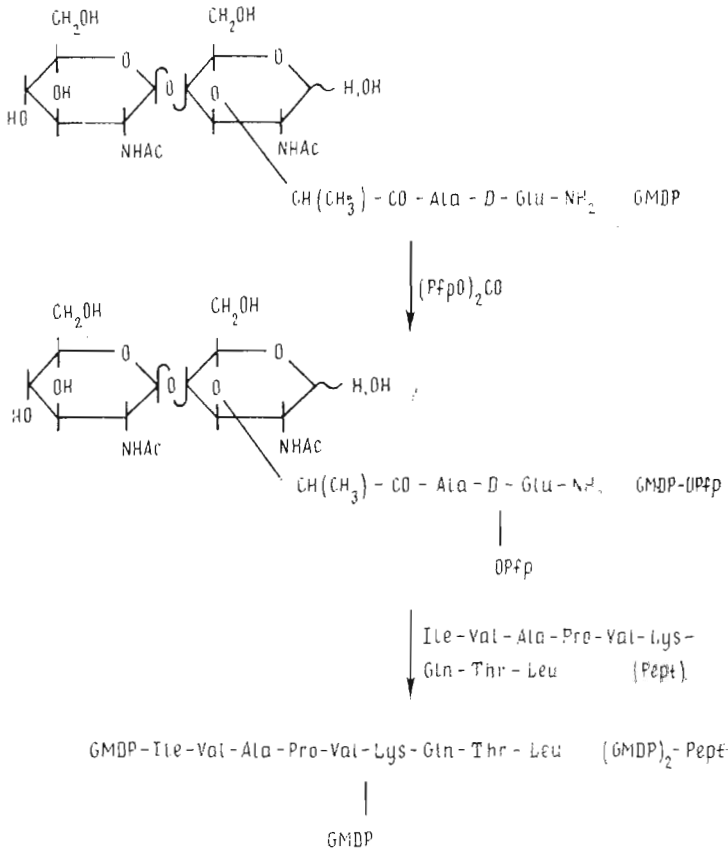
Конъюгаты	Структура	Состав, вес. %	
		Pept	GMDP
I	poly[(D, L-Ala) _n Lys]-Pept	3,5	—
II	»	7	—
III	»	10	—
IV	poly[(D, L-Ala) _n Lys]-(Pept, GMDP)	5	5
V	»	6	5,5
VI	»	5	12
VII	»	2	31
VIII	poly[(D, L-Ala) _n Lys]-(Pept-(GMDP) ₂	2	3,5
IX	»	11	16,5
X	MAVP-Pept	3	—
XI	»	11	—
XII	MAVP-(Pept, GMDP)	3	1,5
XIII	»	6	2
XIV	»	13,5	4
XV	MAVP-Aca-Pept	6	—
XVI	»	3	—
XVII	MAVP-Aca-(Pept, GMDP)	1	1
XVIII	»	2	2
XIX	»	4,5	1,5
XX	»	1	2,5
XXI	BSA-Pept	7	—
XXII	poly(Pept)	100	—

тител [8]. Синтез пептида Pept осуществлен в растворе с использованием защит бензильного типа (рисунок). В качестве носителей использованы poly[(D, L-Ala)_nLys] (мол. масса 130 000, Ala/Lys 14:1) и MAVP (мол. масса 50 000). Синтетическим адъювантом служил GMDP [9]. Синтезированные конструкции представлены в табл. 1.

На основе полимера poly[(D, L-Ala)_nLys] получены комплексы (I) — (IX), синтезированные с применением водорастворимого карбодимида.

Схема 1

Синтез конструкций на основе poly[(D, L-Ala)_nLys]

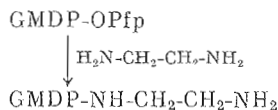
Синтез конъюгатов poly[(D,L-Ala)_n Lys]-(Pept-(GMDP)₂)

Причем в случае конъюгатов (IV)—(VII) на первой стадии к полимеру в присутствии HOBT и WSC был присоединен GMDP (схема 1), а при получении соединений (VIII) и (IX) вначале методом активированных эфиров был синтезирован гликопептид (GMDP)₂-Pept, в котором остатки GMDP присоединены к N-концевому изолейцину и ε-аминогруппе лизина (схема 2).

На основе сополимера MAVP осуществлен синтез конъюгатов (X)—(XX) (табл. 1). Для присоединения GMDP к MAVP методом активированных эфиров синтезирован этилендиаминовый аналог GMDP (GMDP-NH-C₂H₄-NH₂, схема 3). Соединения (X)—(XIV) получены путем прямой

Схема 3

Синтез этилендиаминового производного GMDP



конденсации пептида или пептида и производного GMDP с MAVP за счет раскрытия ангидридных групп полимера (схема 4). В случае соединений (XVII)—(XX) антиген и адъювант присоединены к полимеру через ε-аминокапроновую кислоту (Аса). С этой целью MAVP был вначале обработан Аса, а затем полученный полимер MAVP-Аса был активирован N-оксисукцинимидным эфиром трифторуксусной кислоты. После присоединения пептида и адъюванта к активированному полимеру проведен гидролиз остаточных N-оксисукцинимидных групп в присутствии имидазоля (схема 5).

Антипептидный иммунный ответ, полученный методом ELISA

Иммуноген	Состав, вес. %		Доза, мг/мышь	Адъювант	Связывание антисыворотки с ABC-Pept
	Pept	GMDP			
X	3	—	0,2	ф/р, GMDP	+
			0,04	»	+
			0,2	НАФ, GMDP	—
			0,04	»	—
XI	11	—	0,2	ПАФ	—
			0,04	»	—
			0,2	ф/р, GMDP	—
			0,04	»	—
XII	3	1,5	0,2	НАФ, GMDP	—
			0,04	»	—
			0,2	ПАФ	—
			0,04	»	—
XIII	3	1,5	0,2	ф/р	+
			0,04	»	+

Примечание: ф/р — физиологический раствор.

Таблица 3

Титры антипептидных антител, полученные методом ELISA

Иммуноген	Состав, вес. %		Доза, мг/мышь	Адъювант	Титр антипептидных антител (тест-антиген BSA—Pept)
	Pept	GMDP			
XXI	7	—	0,2	ПАФ	1/8000 *
XXII	100	—	0,7	»	1/2000
X	3	—	1	»	1/128
XI	11	—	1	»	1/50
XII	3	1,5	1	НАФ	1/128
XIII	6	2	1	»	1/50
XIV	13,5	4	1	»	1/50

* Тест-антигеном служил конъюгат OA(Suc)-Pept.

все остальные соединения, представленные в табл. 1, оказались неиммуногенными. Однако применение в качестве тест-антигена конъюгата пептида с *n*-аминобензилцеллюлозой [ABC-Pept] позволило выявить иммуногенность некоторых конъюгатов на основе MAVP. Следует отметить, что метод ELISA * с применением в качестве тест-антигена конъюгата [ABC-Pept] требует большого количества антигенсодержащего материала (0,2 мг конъюгата на ячейку). Этот метод позволил провести качественную оценку наличия специфических антител в сыворотке.

Из табл. 2 видно, что связывание антипептидных антител с [ABC-Pept] отмечено у сывороток, полученных после иммунизации конъюгатами [MAVP-Pept] и MAVP-(Pept, GMDP) с низкими гаптенными плотностями как пептида, так и адъюванта. Интересно, что в условиях проведения опыта использование адъюванта GMDP в физиологическом растворе оказалось более эффективным, чем применение полного адъюванта Фрейнда. Иммунизация конъюгатом, в конструкции которого имеется ковалентно связанный GMDP, также привела к положительному результату без использования полного адъюванта Фрейнда. Увеличение общей дозы конъюгатов на основе MAVP при иммунизации (с 40—200 мкг до 1 мг на мышь) не привело к получению значительного титра антипептидных антител, однако, как видно из табл. 3, иммунный ответ (тест-антиген — конъюгат пептида с BSA) был получен при использовании конъюгатов с низкой гаптенной

* Enzyme linked immunosorbent assay.

плотностью как пептида (конъюгат (X)), так и пептида и адьюванта (конъюгат (XII)). Кроме того, использование GMDP в составе конъюгата заменяет применение микобактериального компонента в ПАФ (переход (X) → (XII)). Следует отметить, что достаточно высокий титр антипептидных антител был получен при иммунизации полимеризованным пептидом (XXII) в общей дозе 700 мкг/мышь (табл. 3).

Из изложенного следует, что ни в одном случае полностью синтетическая конструкция не вызывала иммунный ответ, равнозначный полученному после иммунизации конъюгатом [пептид — белковый носитель].

Получение иммунного ответа на гаптен при иммунизации конъюгатами на основе MAVP, вероятно, связано со слабыми иммуногенными свойствами носителя (титр анти-MAVP-антител 1 : 64). Недавно также было показано [10], что замена неиммуногенного носителя poly[(D,L-Ala)_nLys] на иммуногенный путем присоединения к N-концевым остаткам Ala остатков Tyr и Glu (T,G-poly[(D,L-Ala)_nLys]) привела к тому, что иммунизация конъюгатом (пептид-г, G-poly[(D,L-Ala)_nLys]) в отличие от конъюгата (Pept-poly[(D,L-Ala)_nLys]) вызвала высокий титр антипептидных антител, сравнимый с полученным после иммунизации конъюгатом [пептид—столбчатый анатоксин].

Вероятно, для получения иммунного ответа на пептидный гаптен (не вызывающий иммунный ответ в свободном состоянии) требуется присутствие иммуногенного остатка, обеспечивающего иммунологическое распознавание гаптена Т-хелперными клетками. Использование GMDP с неиммуногенным конъюгатом (poly[(D,L-Ala)_nLys]-Pept не изменяет свойств пептидного гаптена и не вызывает образования антипептидных антител. На модели синтетической конструкции, содержащей пептид Pept, слабоиммуногенный носитель MAVP и ковалентно присоединенный GMDP, показано, что встроенный адьювант может заменять при иммунизации использование микобактерий в полном адьюванте Фрейнда, что указывает на возможные перспективы применения гликопептидных адьювантов при создании новых вакцин.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: 1-гидроксibenзотриазол (PRF, Япония), BSA (Milas Lab), овальбумин (Reanal), диизопропилэтиламин (Fluka, Швейцария), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (Bio-Rad), глутаровый альдегид (Sigma), *n*-аминобензилцеллюлозу (Reanal), дипентафторфенилкарбонат (Институт белка АН СССР), MAVP (Институт иммунологии Минздрава СССР), GMDP (НПО «Биолар», Олайнский завод химреактивов), конъюгат пероксидазы хрена с антимышными IgG (Bio-Rad). Для синтеза пептидов использовали аминокислоты и их производные фирмы Reanal. Температуры плавления веществ определяли на нагревательном столике Voetius (ГДР) без коррекции. Кислотный гидролиз проводили в 6 н. HCl при 120° С в течение 24 ч. Аминокислотный состав полученных веществ определяли на анализаторе Durrum Mark (США). Данные элементного анализа для синтезированных соединений соответствуют расчетным значениям.

Индивидуальность полученных соединений контролировали ТСХ на стеклянных пластинках Silica gel 60 (Merck) в следующих системах растворителей: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 2 : 1 : 1 (А), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Б), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 85 : 10 : 5 (В), хлороформ — метанол, 9 : 1 (Г), хлороформ — метанол — вода, 6 : 4 : 1 (Д).

Колоночную хроматографию осуществляли на сорбентах сефадекс G-25, G-50 (f), DEAE-сефадекс А-25, CM-сефадекс С-25 (Pharmacia), Toyopearl HW-40, HW-55 (Toyo Soda). ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex-340 (США). Пептиды очищали препаративно на колонке (16 × 250 мм) с силикагелем Silasorb C8 (5 мкм). Для аналитической ВЭЖХ использовали колонки Ultrasphere ODS (4,6 × 250 мм; Altex), Zorbax C8, Zorbax C18 (4,6 × 250 мм; Du Pont).

Физико-химические характеристики пептидов и гликопептидов

Соединения *	Т. пл., °С	R_f				
		А	Б	В	Г	Д
1	75–77				0,93	
2	117–120			0,94	0,49	
3	125–128			0,95	0,48	
4	218–220		0,95		0,47	
5	Масло				0,84	
6	117–118				0,73	
7	Масло				0,71	
7а	»			0,86	0,21	
8	177–179			0,89	0,48	
9		0,62				
10			0,41			0,57
12		0,21				

* Нумерация соединений из «Экспериментальной части».

Растворы пептидов, где это указано, промывали 5% раствором NaHCO_3 , водой, 10% раствором лимонной кислоты, водой, насыщенным раствором NaCl . Растворы сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме при 30–40° С.

Характеристики синтезированных пептидов приведены в табл. 4. Содержание пептидов и GMDP в конъюгатах определяли аминокислотным анализом.

1. *Voc-Thr(Bzl)-Leu-OBzl (1)*. К раствору 4,71 г (12 ммоль) толуолсульфоната *Leu-OBzl* в 25 мл водного THF добавляли 4,75 г (10 ммоль) *Voc-Thr(Bzl)-OPfr* и 1,01 г (12 ммоль) NaHCO_3 . Смесь перемешивали 4 ч, затем раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате, раствор промывали, сушили, кристаллизовали из гексана. Выход 3,67 г (72%).

2. *Voc-Gln-Thr(Bzl)-Leu-OBzl (2)*. К 2,6 г (5 ммоль) дипептида (1) добавляли 20 мл 50% раствора TFA в хлороформе. Через 1 ч раствор упаривали, остаток растирали с сухим эфиром, осадок отфильтровывали и высушивали. Получили 2,52 г (96%) трифторацетата дипептида (1а).

К раствору 1,32 г (2,5 ммоль) трифторацетата (1а) в 15 мл водного THF добавляли 1,2 г (2,9 ммоль) *Voc-Gln-OPfr* и 0,21 г (2,5 ммоль) NaHCO_3 . Смесь перемешивали 4 ч, раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали, сушили, кристаллизовали из смеси этилацетат — эфир. Выход 1,27 г (79%).

3. *Voc-Lys(Z)-Gln-Thr(Bzl)-Leu-OBzl (3)*. 2,56 г (4 ммоль) трипептида (2) обрабатывали раствором TFA как описано в опыте 2. Получили 2,56 г (98%) трифторацетата трипептида (2а).

К раствору 1,96 г (3 ммоль) трифторацетата трипептида (2а) в 15 мл DMF добавляли 1,97 г (3,5 ммоль) *Voc-Lys(Z)-OPfr* и 0,41 г (3 ммоль) ТЕА. Смесь перемешивали 4 ч, раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали, сушили, кристаллизовали из смеси этилацетат — эфир. Выход 2,35 г (87%).

4. *Voc-Val-Lys(Z)-Gln-Thr(Bzl)-Leu-OBzl (4)*. К 1,98 г (2,2 ммоль) тетрапептида (3) добавляли 10 мл 70% раствора TFA в воде. Через 1 ч раствор упаривали, затем добавляли толуол и вновь упаривали, остаток растирали с сухим эфиром, осадок отфильтровывали и высушивали. Получили 1,97 г (98%) трифторацетата тетрапептида (3а).

К раствору 1 г (1,09 ммоль) трифторацетата тетрапептида (3а) в 10 мл DMF добавляли 0,5 г (1,31 ммоль) *Voc-Val-OPfr* и 0,15 г (1,09 ммоль) ТЕА. Через 6 ч раствор упаривали, остаток растворяли в *n*-бутаноле, промывали, сушили, кристаллизовали из смеси метанол — этилацетат. Выход 0,92 г (84%). Аминокислотный анализ: Val 0,97 (1), Lys 0,97 (1), Glu 1,14 (1), Thr 1,00 (1), Leu 1,00 (1).

5. *Boc-Ala-Pro-OBzl* (5). К раствору 5,1 г (21 ммоль) гидрохлорида *Pro-OBzl* в 40 мл водного THF добавляли 6,2 г (17,4 ммоль) *Boc-Ala-OPfr* и 1,76 г (21 ммоль) NaHCO_3 . Смесь перемешивали 4 ч, раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали, сушили. Выход 5,75 г (88%).

6. *Boc-Val-Ala-Pro-OBzl* (6). 2,78 г (7,4 ммоль) дипептида (5) обрабатывали раствором TFA как описано в опыте 2. Получили 2,9 г (100%) трифторацетата дипептида (5a) в виде масла.

К раствору 2,9 г (7,4 ммоль) трифторацетата дипептида (5a) в 20 мл водного THF добавляли 2,3 г (6 ммоль) *Boc-Val-OPfr* и 0,84 г (10 ммоль) NaHCO_3 . Смесь перемешивали 4 ч, затем раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали, сушили, кристаллизовали из смеси эфир — пентан. Выход 2,08 г (73%).

7. *Boc-Ile-Val-Ala-Pro-OBzl* (7). 1,33 г (2,8 ммоль) трипептида (6) обрабатывали раствором TFA как описано в опыте 2. Получили 1,37 г (100%) трифторацетата трипептида (6a) в виде масла.

К раствору 1,37 г (2,8 ммоль) трифторацетата трипептида (6a) в 10 мл водного THF добавляли 1,39 г (3,5 ммоль) *Boc-Ile-OPfr* и 0,42 г (5 ммоль) NaHCO_3 . Смесь перемешивали 4 ч, затем раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали, сушили. Выход 1,1 г (67%). Аминокислотный анализ: Ile 0,74 (1), Val 0,84 (1), Ala 1,00 (1), Pro 1,09 (1).

8. *Boc-Ile-Val-Ala-Pro-OH* (7a). 0,59 г (1 ммоль) тетрапептида (7) гидрировали 4 ч в метаноле с Pd-чернью, отфильтровывали катализатор, упаривали, остаток пересаждали из метанола эфиром. Выход 0,47 г (94%).

9. *Boc-Ile-Val-Ala-Pro-Val-Lys(Z)-Gln-Thr(Bzl)-Leu-OBzl* (8). 2 г (2 ммоль) пентапептида (4) обрабатывали раствором TFA как описано в опыте 4. Получили 1,97 г (97%) трифторацетата пентапептида (4a).

К раствору 1,52 г (1,5 ммоль) трифторацетата пентапептида (4a) в 20 мл DMF добавляли 1 г (2 ммоль) тетрапептида (7a), 0,27 г (2 ммоль) HOBT , 0,26 мл (1,5 ммоль) диизопропилэтиламина. Смесь охлаждали до -5°C , затем прибавляли 0,33 г (1,6 ммоль) N,N' -дициклогексилкарбодимид. Смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 24 ч при 20°C . Дициклогексилмочевину отфильтровывали, добавляли сухой эфир, осадок отфильтровывали, сушили, хроматографировали на препаративной обращенно-фазной колонке в системе DMF — вода, 9 : 1. Выход 1,24 г (60%). Аминокислотный анализ: Ile 0,77 (1), Val 1,80 (2), Ala 1,00 (1), Pro 1,07 (1), Lys 1,00 (1), Glu 1,09 (1), Thr 0,95 (1), Leu 0,98 (1).

10. *Ile-Val-Ala-Pro-Val-Lys-Gln-Thr-Leu* (9). 1,2 г (0,87 ммоль) нонапептида (8) гидрировали 24 ч в муравьиной кислоте с Pd-чернью, катализатор отфильтровывали, упаривали муравьиную кислоту, добавляли эфир, выпавший осадок отфильтровывали, сушили, хроматографировали на препаративной обращенно-фазной колонке в градиенте 6—60% ацетонитрила в 0,1% TFA. Выход 0,48 г (57%). Вещество на колонке Zorbax C18 (метанол — 0,02 M ацетат триэтиламония (pH 6,0), 64 : 36; 1 мл/мин, 226 нм) выходит через 8,8 мл. Аминокислотный анализ: Ile 0,84 (1), Val 1,78 (2), Ala 1,00 (1), Pro 1,01 (1), Lys 0,94 (1), Glu 1,07 (1), Thr 0,94 (1), Leu 1,02 (1).

11. $\text{Poly}[(D,L\text{-Ala})_n\text{Lys}]$. Из полученного по методике [11] полилизина гель-фильтрацией на колонке с Toyopearl HW-40 выделяли фракцию с мол. массой около 16 000. Определение молекулярной массы проводили гель-фильтрацией на откалиброванной стандартными белками колонке TSK G 3000SW в 0,1 M фосфатном буфере (pH 7,0).

$\text{Poly}[(D, L\text{-Ala})_n\text{Lys}]$ получали по методике [12]. 0,25 г полилизина растворяли в 100 мл 0,013 M фосфатного буфера (pH 7,0) и добавляли 2,5 г карбоксигидрида *D,L*-аланина в 125 мл диоксана. Реакцию проводили 1 сут при 0°C , затем реакционную смесь упаривали и очищали полимер гель-фильтрацией на колонке с Toyopearl HW-55 (0,05 M ацетат аммония, pH 5,2). Выход 0,58 г.

12. Конъюгаты GMMP с $\text{poly}[(D,L\text{-Ala})_n\text{Lys}]$ получали по методике [13] с небольшими изменениями. К 0,194 г (0,28 ммоль) GMMP в 3 мл DMF добавляли 0,058 г (0,31 ммоль) WSC и 0,045 г (0,33 ммоль) HOBT . Актив-

вацию проводили 1 ч при 0° С, затем определенные объемы реакционной смеси добавляли к растворам poly[(D,L-Ala)_nLys] в 2% растворе NaHCO₃ с таким расчетом, чтобы на 80 мг полимера приходилось по 9, 19 или 80 мг GMDP, выдерживали 24 ч при 20° С, конъюгаты очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50.

13. Конъюгаты Pept с poly[(D,L-Ala)_nLys] (I—III, табл. I). К растворам, содержащим по 5,4 мг poly[(D,L-Ala)_nLys] в 1,3 мл смеси вода — DMF (8 : 5), добавляли 3,6 или 7,2 мг Pept, 0,7 или 1,4 мг WSC, 0,6 или 1,2 мг НОВт и 1 или 2 мкл ТЕА соответственно, выдерживали 48 ч при 20° С, конъюгаты очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50.

14. Конъюгаты GMDP и Pept с poly[(D,L-Ala)_nLys] (IV—VII, табл. I). К растворам, содержащим по 4 мг конъюгата GMDP с poly[(D,L-Ala)_nLys] с разным содержанием GMDP в 0,7 мл смеси вода — DMF (4 : 3), добавляли 1,7 или 4,6 мг Pept, 1,7 или 4,5 мг WSC, 1,2 или 3,2 мг НОВт и 0,8 или 1,9 мкл ТЕА, выдерживали 48 ч при 20° С, конъюгаты очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50.

15. Пентафторфениловый эфир GMDP (GMDP-OPfp) (10). 0,17 г (0,24 ммоль) GMDP растворяли в 1 мл DMF, добавляли 26 мкл (0,24 ммоль) N-метилморфолина и 0,126 г (0,32 ммоль) дипентафторфенилкарбоната. Через 15 мин раствор упаривали, остаток растворяли в метаноле и осаждали продукт эфиром. Выход 0,18 г (87%).

16. (GMDP)₂-Pept (11). 10 мг (0,01 ммоль) Pept растворяли в диметилсульфоксиде, добавляли 2,3 мкл (0,021 ммоль) N-метилморфолина, 40 мг (0,046 ммоль) активированного эфира (10) и перемешивали 24 ч при комнатной температуре. Продукт очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 и ионообменной хроматографией на DEAE-сефадексе А-25. Выход 9 мг (37%). Анализ показал отсутствие N-концевой аминокислоты. ВЭЖХ на колонке Zorbax C18 (метанол — 0,02 М ацетат триэтиламония (рН 6,0), 40 : 60; 1 мл/мин, 226 нм) показала наличие четырех аномерных пиков (7,2; 10; 13,6 и 15 мл).

17. Конъюгаты (GMDP)₂-Pept с poly[(D,L-Ala)_nLys] (VIII, IX, табл. I) К растворам, содержащим по 2 мг poly[(D,L-Ala)_nLys] и 1,2 или 2 мг соединения (11) в 200 мкл воды, добавляли по 0,6 мг НОВт, 0,8 мг WSC и 0,9 мкл ТЕА в 250 мкл DMF. Выдерживали 48 ч при 20° С, конъюгаты очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50.

18. Конъюгаты Pept с MAVP (X, XI, табл. I). К растворам, содержащим по 30 мг MAVP в DMF, добавляли 0,8 или 1,5 мкл ТЕА с соответственно 3 или 6 мг Pept, выдерживали 18 ч при 20° С, конъюгаты очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50.

19. GMDP-NH-C₂H₄-NH₂ (12). К раствору 0,86 г (1 ммоль) активированного эфира (10) в 4 мл DMF добавляли раствор 1,0 мл (15 ммоль) этилендиамина в 4 мл DMF. Через 5 ч раствор упаривали, остаток растворяли в метаноле и осаждали продукт сухим эфиром. Продукт очищали ионообменной хроматографией на колонке с CM-сефадексом С-25 в градиенте 0,05—0,25 М ацетата аммония (рН 6,0). Выход 0,29 г (39%). ВЭЖХ на колонке Zorbax C18 (ацетонитрил — 0,01 М TFA, 2 : 98; 1 мл/мин, 226 нм) показала наличие двух аномерных пиков (6,6 и 8,1 мл).

20. Конъюгаты Pept и GMDP с MAVP (XII—XIV, табл. I). К растворам, содержащим по 10 мг MAVP в 0,2 мл DMF, добавляли растворы, содержащие в 0,3 мл смеси вода — DMF (1 : 2) Pept, гликопептид (12) и ТЕА в количествах соответственно 2 мг, 2 мг, 1 мкл; 4 мг, 1 мг, 2 мкл; 4 мг, 2 мг, 2 мкл. Выдерживали 49 ч при 20° С, конъюгаты очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50.

21. MAVP, модифицированный Аса (MAVP-Аса). 0,5 г MAVP растворяли в 2,5 мл DMF, добавляли 0,45 г Аса в 1,5 мл воды и 0,4 мл N-метилморфолина. Выдерживали 4 ч при 20° С, упаривали, добавляли 10 мл воды и диализовали против 0,25 М раствора NaCl и дважды против воды. Выход после лиофилизации 0,30 г.

22. N-Оксисулфинимидный эфир MAVP-Аса. Из 0,3 г полимера MAVP-Аса получали по методике [14] 0,23 г активированного эфира полимера.

23. Конъюгаты Pept с MAVP (XV, XVI, табл. I). К растворам, содержа-

щим по 10 мг активированного полимера MAVP-Аса в 1,2 мл DMF каждый, добавляли по 2 или 6 мг Pept и 0,7 или 1,3 мкл ТЕА соответственно в 0,3 мл смеси вода — DMF, 2 : 1. Выдерживали 24 ч при 20° С. Для гидролиза остаточных N-оксисукцинимидных групп реакционную смесь упаривали, растворяли в 2 мл 5% раствора NaHCO₃, добавляли 2 мл DMF, 2 мг имидазола и образовавшуюся суспензию перемешивали 5 ч при 20° С. Конъюгаты очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50.

24. *Конъюгаты Pept и GMDP с MAVP (XVII—XX, табл. 1).* К растворам, содержащим по 10 мг активированного полимера MAVP-Аса, добавляли растворы, содержащие в 0,8 мл смеси вода — DMF (1 : 1) Pept, гликопептид (12) и N-метилморфолин в количествах соответственно 2 мг, 2 мг, 0,9 мкл; 2 мг, 6 мг, 1,8 мкл; 6 мг, 2 мг, 1,8 мкл; 6 мг, 6 мг, 2,7 мкл. Выдерживали 24 ч, дальнейшая обработка как в опыте 23.

25. *Полипептид (XXII, табл. 1).* К раствору 15 мг Pept в 0,8 мл воды и 0,5 мл DMF добавляли 3,5 мг WSC, 2,1 мг НОВt, 2,1 мкл ТЕА и перемешивали 24 ч. Затем реакционную смесь упаривали, наносили на колонку с сефадексом G-25 и собирали фракцию, выходящую в свободном объеме.

26. *Конъюгат Pept с BSA (XXI, табл. 1)* получали с использованием глутарового альдегида по методике [15].

27. *Конъюгаты Pept с овалбумином.* ОА (Suc) получали по методике [16]. 37 мг ОА(Suc) суспендировали в 3 мл DMF, затем добавляли 20 мг дипентафторфенилкарбоната и 6 мкл ТЕА и перемешивали 15 мин, после чего добавляли 20 мг Pept в 2 мл смеси вода — DMF, 1 : 1. Через 24 ч реакционную смесь упаривали, добавляли 3 мл воды и диализовали против 0,01 М ТЕА.

28. *Конъюгат Pept с АВС.* 40 мг АВС суспендировали в 0,7 мл DMF, добавляли 20 мг Pept в 1 мл воды, 6 мкл ТЕА, 20 мг WSC. 9,3 мг НОВt и перемешивали 48 ч. Конъюгат отфильтровывали, промывали водой, метанолом, эфиром и высушивали.

29. *Определение иммуногенности конъюгатов.* Иммунизацию проводили на мышах Balb/C (самки весом 15—20 г), суммарная доза конъюгатов составляла 40, 200 или 1000 мкг на мыш. В случае конъюгатов, не содержащих GMDP, иммунизацию проводили в ПАФ, в смеси НАФ с GMDP или в 0,2 М NaCl с GMDP. Доза GMDP составляла 40 мкг на мыш. Для конъюгатов, в конструкцию которых входит GMDP, иммунизацию проводили в НАФ или 0,2 М NaCl. Животных иммунизировали внутрибрюшинно дважды с интервалом в 28 сут, сыворотку получали через 7 сут после последней иммунизации. Титр антипептидных антител в сыворотке определяли методом ELISA. При использовании в качестве тест-антигенов конъюгатов [BSA-Pept] или [ОА(Suc)-Pept] проводили их сорбцию на 96-луночных пластинках в количестве 0,5 мкг конъюгата на лунку при 4° С. После промывки лунки заполняли раствором желатина в фосфатном буфере и инкубировали 1 ч при 37° С. Антисыворотку наносили в фосфатном буфере с 0,05% твина 20 и сорбировали 18 ч при 4° С. Затем после промывки наносили конъюгат антимышиных IgG с пероксидазой хрена и инкубировали 1,5 ч при 37° С. Реакцию проводили в течение 15 мин с раствором о-фенилендиамина, содержащим 0,1% лимонной кислоты и 0,02% перекиси водорода. Оптическое поглощение измеряли при 492 нм на приборе Titertek Multiskan MCC. В случае, когда тест-антигеном служит конъюгат пептида с АВС, в лунки добавляли по 0,2 мг тест-антигена и по 50 мкл антисывороток. После 30 мин инкубации при 37° С твердую фазу осаждали центрифугированием и промывали трижды фосфатным буфером. Затем в лунки добавляли конъюгат антимышиных IgG с пероксидазой хрена и через 30 мин инкубации при 37° С проводили трехкратную отмывку, далее в лунки добавляли субстрат для пероксидазы (см. выше), через 30 мин инкубации твердую фазу отделяли центрифугированием, супернатант переносили в панель для микротитрования, добавляли по 50 мкл 2 н. H₂SO₄ и измеряли оптическое поглощение при 492 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sette A., Colizzi V., Appella E., Doria G., Adorini L. // Eur. J. Immunol. 1986. V. 16. № 1. P. 1—6.
2. Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванюченко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалов Н. Н. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 1132—1135.
3. Herzenberg L. A., Tokuhisa T. // Nature. 1980. V. 285. № 5767. P. 664—667.
4. Arnon R., Sela M., Parant M., Chedid L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 11. P. 6769—6772.
5. Audibert F., Jolivet M., Chedid L., Arnon R., Sela M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 16. P. 5042—5046.
6. Jacob C. O., Arnon R., Sela M. // Mol. Immunology. 1985. V. 22. № 12. P. 1333—1339.
7. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Лиознер А. Л., Фомина Л. А., Некрасов А. В., Степанова Е. К., Андреев С. М., Борисова В. К., Ракова О. А., Вольнская Н. А. // Иммунология. 1985. № 5. С. 24—27.
8. 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.
9. Ростовцева Л. И., Андреева Т. М., Малькова В. П., Сорокина И. Б., Иванов В. Т. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1843—1858.
10. Jacob C. O., Arnon R., Sela M. // Immunology Lett. 1986 / 1987. V. 14. № 1. P. 43—48.
11. Katchalsky E., Grossfeld I., Frankel M. // J. Amer. Chem. Soc. 1948. V. 70. № 6. P. 2094—2101.
12. Sela M., Katchalsky E., Gehatia M. // J. Amer. Chem. Soc. 1956. V. 78. № 4. P. 746—751.
13. Chedid L., Parant M., Parant E., Audibert F., Lefrancier F., Choay J., Sela M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 12. P. 6557—6561.
14. Андреев С. М., Сидорова М. В., Ракова О. А., Цветков Д. Е., Фомина Л. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. С. 696—700.
15. Reichlin M. // Methods. Enzymol. 1980. V. 70. P. 159—165.
16. Atassi M. Z., Kazim A. L., Sakata S. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 670. № 2. P. 300—302.

Поступила в редакцию
23.I.1989

После доработки
25.V.1989

V. A. RAR, E. A. MAKAROV, V. V. YUROVSKY*, E. A. MESHCHERYAKOVA,
T. M. ANDRONOVA, V. T. IVANOV

**SYNTHETIC IMMUNOGENIC COMPLEXES CONTAINING A PEPTIDE FROM
THE SURFACE PROTEIN OF THE FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS**

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

** Branch of M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Pushchino*

Synthetic constructions containing a peptide antigenic determinant (C-terminal peptide 205—213 of the surface VP₁ protein of the foot-and-mouth disease virus, O₁K strain), glucosaminylmuramyl dipeptide (GM DP), and polyionic synthetic carriers were prepared. The polymerized peptide and peptide-BSA conjugates were synthesized as well. Among the constructions obtained only peptide-BSA conjugate proved to be highly immunogenic. Application of synthetic constructions to design immunogenic complexes is discussed.