



УДК 547.466.96

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ β_2 -ГЛИКОПРОТЕИНА-I

© 1996 г. М. Е. Палькеева[#], М. В. Сидорова, Т. В. Кузнецова, А. Г. Кобылянский, В. А. Тищенко, Е. Л. Насонов, Ж. Д. Беспалова, Р. П. Евстигнеева*

Кардиологический научный центр РАМН, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15-а;

*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 19.02.96 г.

Осуществлен синтез ряда пептидов – фрагментов β_2 -гликопротеина-I твердофазным методом с использованием Fmoc-схемы синтеза. Методом твердофазного иммуоферментного анализа определена их антигенная активность, показано ингибирующее влияние пептида FCKNKEKKCS с AcM-защитой на остатке цистеина на связывание антикардиолипиновых антител с кардиолипином.

Ключевые слова: антигенная детерминанта, β_2 -гликопротеин-I, антитела к кардиолипину, пептиды синтетические, твердофазный синтез.

Большое внимание исследователей и клиницистов различных областей медицины привлекает антифосфолипидный синдром, основные проявления которого (повторные тромбозы, акушерская патология) связаны с выработкой в организме больных аутоантител, реагирующих с отрицательно заряженными фосфолипидами, в частности с кардиолипином [1]. В настоящее время установлено, что связывание антител с фосфолипидами происходит при участии β_2 -гликопротеина-I (аполипопротеина H), который, взаимодействуя с различными анионными макромолекулами, вовлекается в процессы свертывания крови [2]. Его аминокислотная последовательность (рис. 1) охарактеризована в работе [2].

Механизмы, определяющие влияние белка β_2 -gp-I на связывание антифосфолипидных антител с фосфолипидами, изучены недостаточно. Некоторые исследователи полагают, что сам немодифицированный белок может быть антигеном, с которым реагируют антифосфолипидные антитела [3]. Предложены две гипотезы, согласно которым антитела связываются с эпитопом, образующимся в процессе взаимодействия фосфо-

липида и белка β_2 -gp-I, или с неоантигеном, открываемым на этом белке после его взаимодействия с фосфолипидом [4, 5]. Подвергнутый ферментативному расщеплению по связи Lys³¹⁷-Thr³¹⁸, белок β_2 -gp-I теряет способность к связыванию с кардиолипином и антителами к последнему [6]. Это позволило заключить, что фосфолипидсвязывающий участок должен находиться в С-концевой части белка. Тестирование синтетических пептидов, покрывающих С-концевую область, показало, что участок Cys²⁸¹-Cys²⁸⁸, имеющий высокий положительный заряд, способен связываться с кардиолипином и антикардиолипиновыми антителами [7]. Следует отметить, что это связывание специфично и обусловлено наличием цистеиновых остатков в последовательности данного участка, поскольку аналогичный октапептид с серином в положениях 1 и 8 не проявил фосфолипидсвязывающей активности [7].

С учетом предположения об антигенности β_2 -гликопротеина-I, самого либо в комплексе с фосфолипидом, нам представлялось интересным проанализировать всю аминокислотную последовательность белка и выявить другие возможные иммунодоминантные участки. Таким образом, целью настоящего исследования является компьютерный анализ антигенной структуры белка β_2 -gp-I, выбор антигенных детерминант, их синтез и биологическое тестирование.

Для анализа аминокислотной последовательности белка и выбора антигенных детерминант был использован коммерческий пакет программ

Использованы сокращения, рекомендованные Номенклатурной комиссией IUPAC-IUB, а также: AcM – ацетамидометил; ELISA – метод твердофазного иммуоферментного анализа; β_2 -gp-I – β_2 -гликопротеин-I; ESI-MS – масс-спектрометрия с электроспреемным ионным источником; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; HOBt – 1-гидроксибензотриазол; HONSu – N-гидроксиsuccинимид; Mtg – 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил; NMP – N-метилпирролидон; PBS – фосфатно-солевой буфер, pH 7.4; aКл – антитела к кардиолипину.

[#] Автор для переписки.

H-G-R-T-C-P-K-P-D-D-L-P-F-S-T-V-V-P-L-K-T-F-Y-E-P-G-	25
E-E-I-T-Y-S-C-K-P-G-Y-V-S-R-G-G-M-R-K-F-I-C-P-L-T-	50
G-L-W-P-I-N-T-L-K-C-T-P-R-V-C-P-F-A-G-I-L-E-N-G-A-	75
V-R-Y-T-T-F-E-Y-P-N-T-I-S-F-S-C-N-T-G-F-Y-L-N-G-A-	100
D-C-A-K-C-T-E-E-G-K-W-S-P-E-L-P-V-C-A-P-I-I-C-P-P-	125
P-S-I-P-T-F-A-T-L-R-V-Y-K-P-S-A-G-N-N-S-L-Y-R-D-T-	150
A-V-F-E-C-L-P-Q-H-A-M-F-G-N-D-T-I-T-N-T-T-H-G-N-W-	175
T-K-L-P-E-C-R-E-V-K-C-P-F-P-S-R-P-D-N-G-F-V-N-Y-P-	200
A-K-P-T-L-Y-Y-K-D-K-A-T-F-G-C-H-D-G-Y-S-L-D-G-P-E-	225
E-I-E-C-T-K-L-G-N-W-S-A-M-P-S-C-K-A-S-C-K-V-P-V-K-	250
K-A-T-V-V-Y-Q-G-E-R-V-K-I-Q-E-K-F-K-N-G-M-L-H-G-D-	275
K-V-S-F-F-C-K-N-K-E-K-K-C-S-Y-T-E-D-A-Q-C-I-D-G-T-	300
I-E-V-P-K-C-F-K-E-H-S-S-L-A-F-W-K-T-D-A-S-D-V-K-P-C-OH	326

Рис. 1. Аминокислотная последовательность β_2 -гликопротеина-I [2]. Выделенные участки соответствуют синтезированным фрагментам.

“Microgenic sequence analysis program” фирмы Beckman, в котором применены известные методы предсказания иммунодоминантных структур:

– метод предсказания гидрофильности участков аминокислотной последовательности [8];

– метод предсказания подвижности α -углеродного атома аминокислот, входящих в полипептидную цепь [9];

– метод, учитывающий встречаемость различных сочетаний аминокислот в известных детерминантах [10].

В результате компьютерного анализа были получены диаграммы (рис. 2) и с учетом максимальных параметров каждой из них выбраны потенциальные антигенные детерминанты белка β_2 -gp-I и синтезированы пептиды:

1–10	Gly-Arg-Thr-Cys-Pro-Lys-Pro-Asp-Asp-Leu – П1
1–13	Gly-Arg-Thr-Cys-Pro-Lys-Pro-Asp-Asp-Leu-Pro-Phe-Ser – П2
96–112	Tyr-Leu-Asn-Gly-Ala-Asp-Cys-Ala-Lys-Cys-Thr-Glu-Glu-Gly-Lys-Trp-Ser – П3
120–138	Pro-Ile-Ile-Cys-Pro-Pro-Pro-Ser-Ile-Pro-Thr-Phe-Ala-Thr-Leu-Arg-Val-Tyr-Lys – П4
280–289	Phe-Cys-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys-Cys-Ser – П5
313–326	Leu-Ala-Phe-Trp-Lys-Thr-Asp-Ala-Ser-Asp-Val-Lys-Pro-Cys – П6.

Следует отметить, что пептиды П1 и П6 отвечают соответственно N- и C-концевым участкам белка β_2 -gp-I.

Пептиды были синтезированы твердофазным методом на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems, модель 431 А, с использованием коммерческих Fmoc-аминоациллолимеров (смола Ванга, степень замещения 0.5–0.7 ммоль/г). Для блокирования α -аминофункции применяли Fmoc-группу, отщепляемую после каждого шага синтеза действием 20% пиперидина в NMP. Для блокирования функциональных групп боковых цепей использовались кислотостабильные защитные трет-бутильного типа – Boc для остатка лизина и Bzl для серина, треонина, СBzl – для аспарагиновой и

глутаминовой аминокислот. Для защиты гуанидиновой функции аргинина вводилась Mtg-группа, для блокирования сульфгидрильной функции остатков цистеина – Asp-защита. Аспарагин и глутамин присоединяли в виде *n*-нитрофениловых активированных эфиров. Триптофан использовали с незащищенной боковой функцией. Активацию Fmoc-аминокислоты (10-кратный молярный избыток) проводили в присутствии 10 экв. DCC/NOBt в NMP.

При синтезе всех пептидов, кроме П6(Asn), пептидную цепь наращивали последовательно по одной аминокислоте. В случае синтеза пептида П6(Asn), содержащего на C-конце фрагмент -Pro-Cys, склонный к образованию diketopiperazina [11],

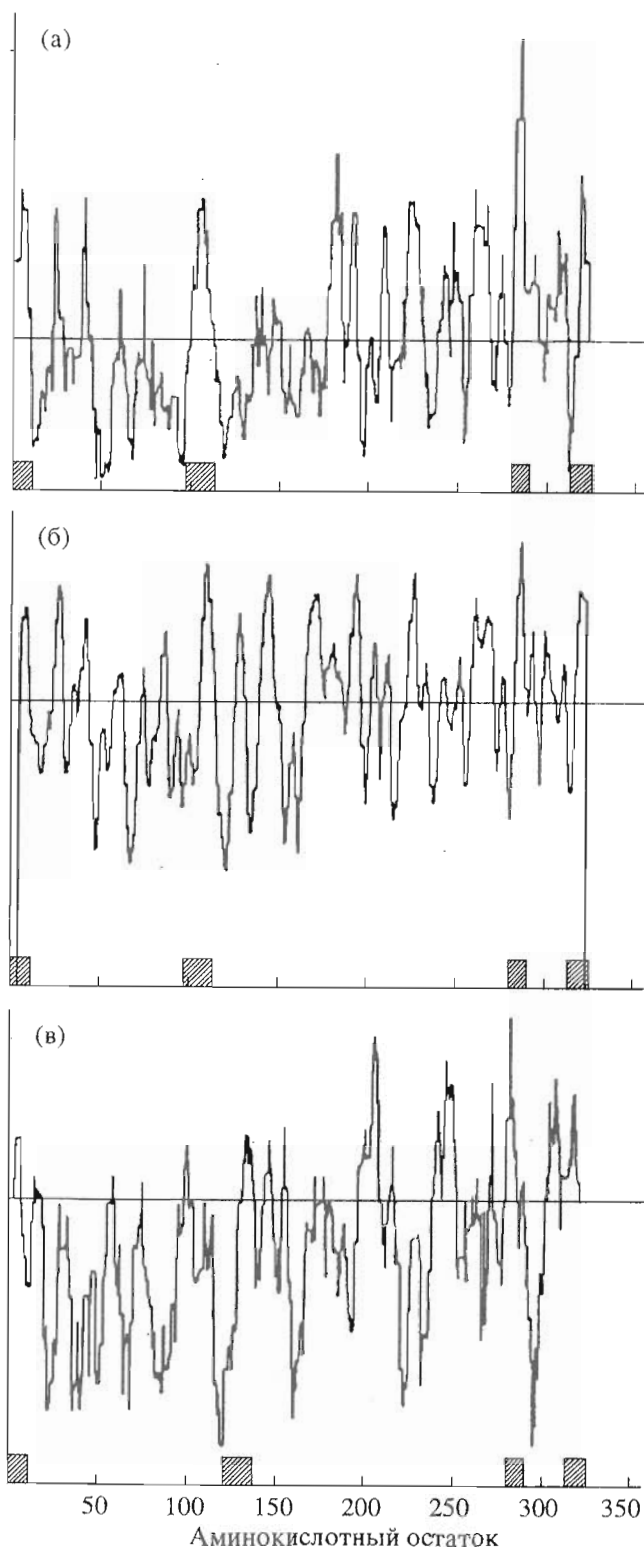


Рис. 2. Профили гидрофильности (а), подвижности α -углеродного атома (б) и встречаемости различных сочетаний аминокислот в белках (в) для β_2 -гликопротеина-I. Заштрихованные участки соответствуют синтезированным пептидам.

было решено во избежание этой побочной реакции на втором шаге синтеза присоединить к Cys(Acm)-полимеру пептидный фрагмент Fmoc-Val-Lys(Boc)-Pro-OH (III). Трипептид синтезировали в растворе методом активированных N-гидроксисукцинимидных эфиров с использованием Na-солей соответствующих аминокислотных компонентов в водно-органической среде (рис. 3). По окончании синтеза Z-защита с трипептида снималась каталитическим гидрогенолизом, полученный продукт (II) очищали с помощью ВЭЖХ и превращали в N $^{\alpha}$ -Fmoc-производное действием FmocONSu с удовлетворительным выходом (64%). Трипептид (III) вводили в пептидную цепь DCC/HOBt-методом, полностью протекая конденсации определяли реакцией с нингидрином.

По окончании синтеза пептиды от носителя отщепляли действием TFA в присутствии этандиола, тиоанизола и деионизованной воды, одновременно удалялись боковые защитные группы, кроме S-ацетамидометильной. Целевых соединений в продуктах синтеза после деблокирования, по данным аналитической ВЭЖХ, содержалось от 60 до 90% (табл. 1). Количество наиболее заметных примесей в неочищенных продуктах составляло при этом 5–8% (рис. 4а), за исключением пептида П4(Acm), который помимо основного вещества (80%) содержал единственную примесь в количестве 19% (рис. 4б). Полученная смесь была разделена методом ВЭЖХ на обращенной фазе, а выделенные вещества проанализированы с помощью аминокислотного анализа. Если основное вещество имело корректный аминокислотный состав, то примесь содержала 2 вместо 3 экв. изолейцина. Хроматограмма очищенного пептида П4(Acm) представлена на рис. 4в.

Для очистки Cys(Acm)-пептидов после деблокирования была применена препаративная ВЭЖХ на обращенной фазе. Пептид П2(Acm) очищали на колонке с Toyopearl HW-40 в 2% уксусной кислоте. Все вещества получены с относительно высокими выходами – 35–65% в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру (табл. 1). Гомогенность полученных соединений была подтверждена методом ВЭЖХ, пептиды были охарактеризованы данными количественного аминокислотного анализа и масс-спектрометрии; молекулярные массы и аминокислотный состав веществ соответствовали ожидаемым значениям (табл. 1).

Представлялось интересным сравнить биологическую активность двух форм пептидов – с блокированными и свободными сульфгидрильными группами остатков цистеина. Для отщепления Acm-защитных групп применялся ацетат ртути (2 экв. на каждую SH-функцию) в 30% уксусной кислоте. За 1.5–2 ч достигалось количественное деблокирование SH-групп. Для последующего

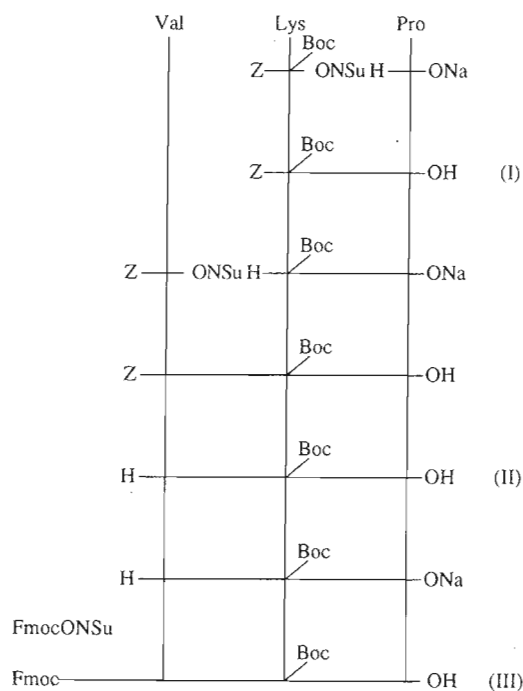


Рис. 3. Схема синтеза трипептида Fmoc-Val-Lys(Boc)-Pro-OH (III).

удаления ионов ртути использовался 20-кратный избыток 2-меркаптоэтанола, обеспечивающий количественное связывание ионов металла (образующийся органический меркаптит ртути полностью выпадает в осадок при таких условиях).

После деблокирования SH-функций пептиды обессоливали на колонке с сефадексом G-10 в 2% уксусной кислоте. Полноту отщепления Acm-групп контролировали с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе в условиях, обеспечивающих полное разрешение пиков, соответствующих защищенной и деблокированной формам пептида (табл. 1). Реакция деблокирования протекала однозначно, появления побочных веществ не наблюдалось, содержание основного вещества в S-Acm- и SH-пептидах было практически одинаково и составляло 95–98%. Кроме того, наличие свободных SH-групп подтверждалось качественной реакцией с реактивом Элмана. Выходы целевых SH-пептидов после обессоливания были достаточно высоки и составляли 52–91% в расчете на Acm-производное (потери вещества были чисто механическими) (табл. 1).

Влияние пептидов на связывание белка β_2 -gp-I с аКл и кардиолипином оценивалось модифицированным методом твердофазного иммуоферментного анализа [6, 7] по конкурентному ингибированию пептидами реакции связывания аутоантител с кардиолипином в присутствии β_2 -гликопротеина-I. Реакции проводили на 96-луночных планшетах, для тестирования использовали S-Acm-пептиды и полностью деблокированные пептиды. Контрольный эксперимент – ингибирование β_2 -гликопротеином-I связывания антикардиолипиновых антител с кардиолипином в отсутствие пептидов, принятое за 100% ($A_{492} = 0.9-1$ ОЕ). Показано, что максимальным ингибирующим эффектом в данной

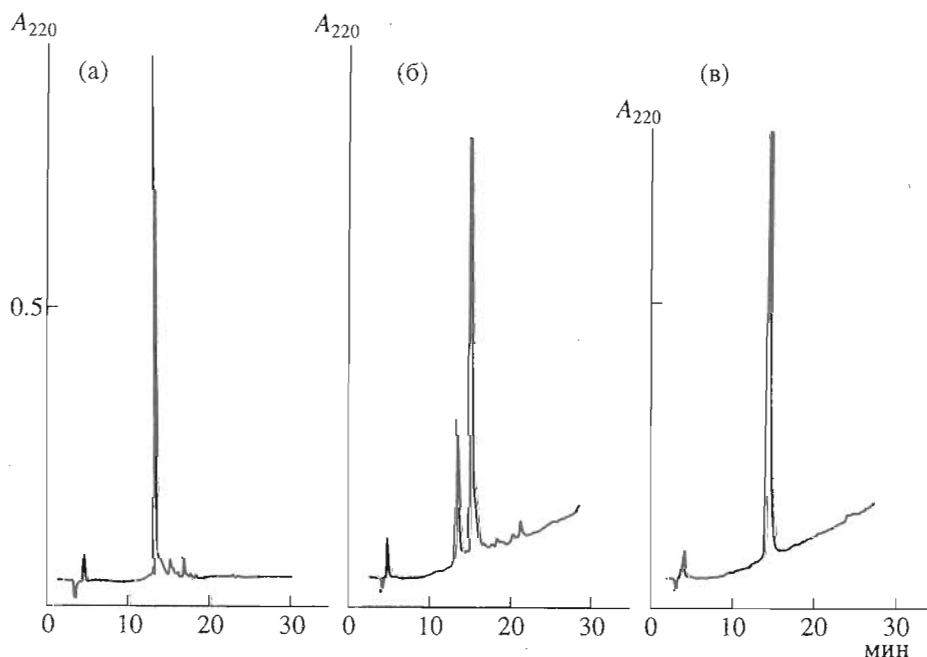


Рис. 4. ВЭЖХ сырых продуктов твердофазного синтеза П5(Acm) (а) и П4(Acm) (б) после деблокирования пептид-полимера и очищенного П4(Acm) (в). Условия ВЭЖХ – см. "Экспер. часть" и табл. 1.

Таблица 1. Характеристики синтезированных пептидов

Пептид	Данные аминокислотного анализа*	ВЭЖХ**		Данные ESI-MS [M + H] ⁺ , M _r (в скобках расчетная мол. масса)	Выход, %***	[α], град (с 1, Н ₂ O)
		Время вы- хода, мин	Содержание целевого пептида, %			
П1(Асм)	D 1.8 (2); T 0.5 (1); G 1.2 (1); L 1.0 (1); K 0.96 (1); R 0.7 (1)	14.51	76	1172.1 (1172.3)	60	-30.05
П1		15.15			91	
П2(Асм)	D 2.0 (2); T 0.5 (1); G 1.1 (1); L 1.0 (1); F 1.01 (1); K 1.01 (1); R 0.97 (1)	19.81	90	1503.5 (1503.7)	54	-99.00
П2		20.13			80	
П3(Асм)	N + D 2.04 (2); T 0.9 (1); E 2.4 (2); G 1.99 (2); A 2.08 (2); L 1.0 (1); Y 0.9 (1); K 2.02 (2)	18.10	60	2017.5 (2017.2)	35	-47.33
П3		19.32			75	
П4(Асм)	T 1.6 (2); S 0.8 (1); A 0.7 (1); V 1.2 (1); I 2.86 (3); L 1.0 (1); Y 1.2 (1); F 0.95 (1); K 1.4 (1); R 0.5 (1)	17.01	79	2184.3 (2184.7)	39	-132.50
П5(Асм)	N 1.1 (1); S 0.6 (1); E 1.2 (1); F 1.0 (1); K 3.7 (4)	12.61	82	1356.2 (1356.6)	62	-32.33
П5		13.30			52	
П6(Асм)	D 1.9 (2); T 0.92 (1); S 0.96 (1); A 1.6 (2); V 1.03 (1); L 1.0 (1); K 1.8 (2)	16.08	78	1651.8 (1651.9)	65	-28.50
П6		17.35			80	

* Cys, Pro, Trp не определяли.

** Обращенно-фазовая аналитическая ВЭЖХ S-Асм-защищенных пептидов (см. "Экспер. часть"). Градиент буфера B в A (30 мин) составлял 10 → 70% (для пептидов П1(Асм) – П3(Асм)), 30 → 80% (для П4(Асм)), 0 → 60% (П5(Асм)), 20 → 80% (П6(Асм)).

*** Выход S-Асм-пептидов определен в расчете на стартовую аминокислоту после очистки методом ВЭЖХ, выход SH-пептидов – в расчете на Асм-производное.

реакции обладает пептид П5(Асм) – 27% при его концентрации 25 мкг на лунку (рис. 5). Менее выраженный эффект проявил тот же пептид со свободными тиольными функциями Cys (18% от контроля). Влияние остальных пептидов на связывание аКл с кардиолипином не имело дозовой зависимости (данные для концентрации 5 мкг на лунку приведены в табл. 2).

Согласно [7], пептиды, соответствующие последовательностям 274–288 (GDKVSFFCKNKEK-KC) и 281–288 (СКНКЕКККС) β₂-гликопротеина-I, оказались способны подавить связывание аКл с кардиолипином на 90 и 72% соответственно. Более низкие по сравнению с данными Крилиса [7]

значения ингибирования, полученные в нашей работе, могут быть связаны с определенными методическими различиями при проведении соответствующих экспериментов. Так, в описанных в работе [7] экспериментах по конкурентному связыванию использовался очищенный белок β₂-gp-I. В нашем исследовании источником белка β₂-gp-I служила фетальная сыворотка, содержащая другие белки плазмы, способные исказить результаты тестирования методом ELISA.

Хотя нам не удалось показать высоких значений ингибирования для П5, установленная тенденция к подавлению связывания антикардиолипиновых антител с кардиолипином пептидом

последовательности FCKNKEKKCS, выбранной на основе расчета, свидетельствует об участии этого эпитопа в реакции взаимодействия фосфолипидов с β_2 -гликопротеином-I.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *L*-аминокислоты и их производные фирм Reanal (Венгрия), Bachem, Fluka (Швейцария). ТСХ осуществляли на хроматографических пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–уксусная кислота, 90 : 8 : 2 (А); хлороформ–метанол–50% уксусная кислота, 14 : 6 : 1 (Б). Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлорбензидинового реагента. Гидрирование пептидов осуществляли в токе водорода в присутствии 10% Pd/C (Merck) в количестве 5–10% веса пептидов.

DMF перегоняли над нингидрином и окисью бария, хлористый метилен промывали концентрированной серной кислотой и водой, сушили над CaCl₂, перегоняли над CaCl₂, затем над гидридом кальция. Использовали пиперидин и *N*-метилпирролидон фирмы Applied Biosystems (США), DCC – Merck (Германия).

Для экстракции из водных растворов, кристаллизации и хроматографии на силикагеле применяли растворители марок ч. и х. ч., для ВЭЖХ – ацетонитрил (Technopharm, Россия).

Удельное вращение определяли на поляриметре Perkin–Elmer 241 MC (США). Температуру плавления измеряли на нагревательном столике Voetius (Германия). Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных в 6 н. HCl с 2% фенола при 110°C в течение 24 и 48 ч, проводили на автоматическом анализаторе Biotronik LC 5001 (Германия). Цистеин, пролин и триптофан не определяли.

Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на приборе Gilson (Франция) на колонке (4.6 × 250 мм) Beckman (Ultrasphere ODS). Использовали градиентную элюцию буфером Б в буфере А (буфер А – 0.05 М KH₂PO₄ (рН 3.0), буфер Б – 70% ацетонитрила + 30% буфера А); скорость элюции 1 мл/мин, детекция при 220 нм. Препаративную ВЭЖХ проводили на колонке (24 × 250 мм) Диасорб 130 С16-Т, 5 мкм, на приборе Beckman (США) при длине волны 226 нм. Для элюирования использовали буферы: А – 0.1% TFA, Б – 80% ацетонитрила + 20% буфера А. Масс-спектрометрию выполняли методом ESI-MS на квадрупольном масс-спектрометре Finnigan MAT TSQ 700 (Германия) с электро-спрейным (API) ионным источником (Finnigan MAT).

Z-Lys(Вoc)-Pro-OH (I) К раствору 0.58 г (5 ммоль) пролина в 2.5 мл 2 н. NaOH приливали 20 мл DMF, добавляли 2.10 г (5.50 ммоль)



Рис. 5. Влияние П5(Асм) на связывание аКл с кардиолипином в твердофазном иммуоферментном анализе.

Z-Lys(Вoc)-ONSu. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, растворитель удаляли в вакууме, к остатку прибавляли 10 мл воды, подкисляли концентрированной серной кислотой до рН 2.0, экстрагировали этилацетатом, органический слой промывали водой до нейтральной реакции и упаривали досуха. Выход 1.35 г (94.22%) в виде масла. R_f 0.39 (А), 0.90 (Б).

H-Val-Lys(Вoc)-Pro-OH (II). Соединение (I) растворяли в этаноле и гидрировали 40 мин. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха, полученное масло растворяли в 2.5 мл 2 н. NaOH, приливали 20 мл THF, добавляли 1.74 г (5.00 ммоль) Z-Val-ONSu. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, удаляли растворитель и обрабатывали аналогично соединению (I). Полученный в виде масла продукт гидрировали аналогично (I) и очищали методом препаративной ВЭЖХ. Выход свободного пептида 0.72 г (65.35%). R_f 0.35 (Б).

Таблица 2. Влияние синтетических пептидов (концентрация 5 мкг на лунку) на связывание аКл с кардиолипином в иммуоферментном твердофазном анализе

Пептид	Ингибирование связывания, %
П1(Асм)	13.4
П1	12.6
П2(Асм)	11.1
П2	12.1
П3(Асм)	16.8
П3	10.1
П4(Асм)	16.4
П5(Асм)	18.5
П5	18.0
П6(Асм)	16.4
П6	14.9

Fmoc-Val-Lys(Boc)-Pro-OH (III). К 2 мл охлажденного до 0°C раствора 0.72 г (1.60 ммоль) соединения (II) в 10% бикарбонате натрия по каплям в течение 1 ч прибавляли раствор 0.55 г (1.65 ммоль) FmocONSu в диоксане. Реакционную смесь упаривали, растворяли в воде, промывали эфиром, водный слой подкисляли концентрированной серной кислотой в присутствии этилацетата, экстрагировали этилацетатом, органический слой промывали водой до нейтральной реакции, сушили над сульфатом натрия, упаривали и остаток кристаллизовали из гексана. Полученный осадок отфильтровывали и сушили в вакуум-эксикаторе. Выход 0.67 г (64.25%). Т. пл. 97–100°C. R_f 0.55 (А), 0.78 (Б); $[\alpha]_D^{20}$ -24.67° (с 1, DMF).

Твердофазный синтез пептидов проводили в автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 431 А (США) с использованием коммерческих Fmoc-аминоацилполимеров (сополимер стирола с 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой) фирмы Bachem (0.1 ммоль полимера для каждого синтеза). Использовали стандартную программу однократной конденсации Fmoc-аминокислот. Синтетический цикл включал в себя: 1) 21-минутную активацию 1 ммоль (10 экв.) присоединяемой Fmoc-аминокислоты (или пептида (III)) в присутствии 10 экв. DCC и HOBT в NMP; 2) деблокирование N^α-Fmoc-аминогрупп пептидилполимера 20% раствором пиперидина в NMP в течение 17 мин; 3) конденсацию с 1 ммоль (10-кратным избытком) активированного Fmoc-ацилирующего агента в NMP в течение 37 мин; 4) все необходимые промежуточные промывки пептидилполимера. Для присоединения аспарагина и глутамина вводили 1 ммоль Fmoc-Asn-ONp (Fmoc-Gln-ONp) в присутствии 1 ммоль HOBT, а время конденсации увеличивали до 2 ч. Мониторинг осуществляли с помощью нингидринового теста. Во всех случаях на стадиях присоединения валина и изолейцина применяли двукратные конденсации.

По окончании синтеза N^α-Fmoc-группу отщепляли 20% пиперидином в NMP, пептидилполимер промывали на фильтре хлористым метиленом и сушили в вакуум-эксикаторе. Продукты твердофазного синтеза (Acst-защищенные пептиды) отщепляли от полимера действием трифторуксусной кислоты с добавками: пептиды ПЗ(Acst) и П8(Acst) обрабатывали смесью 9.5 мл TFA, 0.25 мл этандитиола, 0.25 г фенола; остальные Acst-пептиды – смесью 0.75 г фенола, 0.25 мл этандитиола, 0.5 мл тиаоизола, 0.25 мл деионизованной воды, 10 мл TFA (в расчете на 0.1–1 г пептидилполимера).

Высушенный пептидилполимер суспендировали в соответствующей смеси растворителей (см. выше) при 0°C и перемешивали 2 ч при комнатной температуре, а для пептидов, содержащих аргинин,

– 16 ч. Полимер отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме при 40°C. Остаток растирали в холодном сухом эфире, отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакуум-эксикаторе. Очистку Acst-защищенных пептидов осуществляли методом препаративной ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования; в случае пептида П2(Acst) использовали колонку с Toyopearl HW-40 в 2% уксусной кислоте (табл. 1).

Методика деблокирования SH-функций пептидов (отщепления Acst-защитных групп). К раствору 0.022 г (0.018 ммоль) пептида П1(Acst) в 1.5 мл 30% уксусной кислоты прибавляли 0.023 г (2 экв., 0.072 ммоль) ацетата ртути (II) в 0.5 мл 30% уксусной кислоты. Перемешивали реакционную смесь 1.5 ч при 20°C, затем добавляли 0.062 мл (20 экв., 0.72 ммоль) 2-меркаптоэтанола (Bachem) и перемешивали еще 1.5 ч при той же температуре. Образовавшийся белый осадок отфильтровывали, промывали на фильтре дважды 5% уксусной кислотой и дважды водой, полностью деблокирования контролировали с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе. Фильтрат обессоливали на колонке с сефадексом G-15 в 2% уксусной кислоте. Фракции, соответствующие целевому продукту, объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизировали. Наличие свободных SH-групп подтверждали качественной реакцией с реактивом Эллмана. Выход пептида П1 составил 0.020 г (91% в расчете на Acst-производное). SH-Функции остальных пептидов, кроме П4(Acst), деблокировали по аналогичной методике. Хроматографические характеристики и выходы SH-пептидов приведены в табл. 1.

Методика тестирования пептидов с помощью метода твердофазного иммуоферментного анализа. Кардиолипин сорбировали на плашку (PVC, Flow Laboratories, Нидерланды) из этанольного раствора (50 мкг/мл) и выдерживали в течение ночи в холодильнике до полного удаления спирта. Места неспецифического связывания кардиолипина блокировали инкубацией с раствором 3% порошкового молока ("Очаково") в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакцию антиген – антитело проводили, добавляя в лунки: 1) по 50 мкл смеси, содержащей фетальную сыворотку телят как источник белка β_2 -gp-I (10% смеси); 2) 15 мкг IgG больного с антифосфолипидным синдромом, очищенных на колонке Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia, Швеция) по методикам, приведенным в работах [12, 13]; 3) исследуемые пептиды в концентрации 2.5–25 мкг на лунку. Все компоненты предварительно растворяли в PBS, содержащем 3% порошковое молоко. Плашки инкубировали 3 ч при комнатной температуре, затем промывали трижды PBS. Иммуный комплекс проявляли, добавляя 50 мкл раствора конъюгата (Sigma, США), содержащего IgG козы против IgG человека, меченные пероксидазой

хрена. Все инкубации проводили в течение 1 ч при комнатной температуре; после каждой инкубации плашку трижды отмывали PBS. Peroксидазную реакцию проводили в растворе хромогенного субстрата, содержащего орто-фенилендиамин и перекись водорода. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 50% серной кислоты и регистрировали оптическое поглощение при 492 нм. Данные по ингибированию иммунной реакции пептидами представлены на диаграмме (рис. 5) и в табл. 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hughes G. // Lancet. 1993. V. 342. P. 341–344.
2. Lozier J., Takahashi N., Putnam F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 3640–3644.
3. Galli M., Comfurius P., Maasen C., Hemker H., De-Baets M., Van-Breda-Vriesman P., Barbui T., Zwaal R., Bevers E. // Lancet. 1990. V. 335. P. 1544–1547.
4. Jones J. // J. Rheumatol. 1992. V. 19. P. 1774–1777.
5. McNeil H., Simpson R., Krilis S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 4120–4124.
6. Hunt J., Simpson R., Krilis S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 2141–2145.
7. Hunt J., Krilis S. // J. Immunol. 1994. V. 152. P. 653–659.
8. Hopp T., Woods K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 3824–3828.
9. Karplus P., Shulz G. // Naturwissenschaften. 1985. V. 72. P. 212–213.
10. Welling G., Weijer W., Van der Zee R., Welling-West-er S. // FEBS Lett. 1985. V. 188. P. 215–218.
11. Stewart J.M., Young J.D. Solid Phase Peptide Synthesis. 2d. Ed. N.Y.: Pierce Chem. Company, 1984.
12. Johnstone A., Thorpe R. Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific Publications, 1982.
13. Ey P., Prowse S., Jenkin C. // Immunochemistry. 1978. V. 15. P. 429–436.

Synthesis and Antigenic Properties of Peptide Fragments of β_2 -Glycoprotein-I

M. E. Pal'keeva*, M. V. Sidorova*, T. V. Kuznetsova*, A. G. Kobylanskii*, V. A. Tishchenko*, E. L. Nasonov*, Zh. D. Bepalova*, and R. P. Evstigneeva**

*Cardiological Scientific Center, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Tre't'ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia

**Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

Abstract—A number of β_2 -glycoprotein-I peptide fragments were synthesized by using the Fmoc-scheme of the solid phase method. Antigenic properties of these peptides were determined by ELISA. Acn-protected FCKNKEKCS peptide was shown to inhibit binding of anti-cardiolipin antibodies to cardiolipin.

Key words: antigenic determinant, β_2 -glycoprotein-I, antibodies to cardiolipin, synthetic peptides, solid phase peptide synthesis.