



УДК 577.112.083.3:615.371

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ВИРУСА ЯЩУРА

И. * СИНТЕЗ ПРОТЕКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОСНОВНОГО ИММУНОГЕННОГО РАЙОНА
БЕЛКА VP₁ ВИРУСА ЯЩУРА ШТАММА A₂₂

*Вольпина О. М., Суровой А. Ю., Ульяшин В. В.,
Иванов В. Т., Чепуркин А. В. *, Иванюценков В. Н. *,
Бурдов А. Н. *, Дрягилин Н. Н. **

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

** Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт, Владимир*

Синтезированы фрагменты белка VP₁ вируса ящера штамма A₂₂, обладающие защитным противоящурным действием. Синтез фрагментов 131–149, 131–139, 140–149 и 90–98 осуществлен классическим методом. Иммунизация лабораторных животных пептидами 131–149 и 140–149 без дополнительной конъюгации с белком-носителем обеспечивала 50–80% защиту от заболевания ящуром, вызываемого вирусом штамма A₂₂.

Синтетические пептиды, моделирующие протективные эпитопы различных вирусов, привлекают внимание исследователей как наиболее перспективные препараты для создания искусственных противовирусных вакцин [2, 3]. Наибольшие успехи в индукции противовирусного иммунного ответа у лабораторных и природновосприимчивых животных при помощи синтетических пептидов достигнуты при изучении вируса ящера [4–6]. Однако изучение иммуногенности синтетических противоящурных пептидов традиционно проводили на вирусе лабораторного штамма O₁K, в то время как наибольший практический интерес представляют штаммы, распространенные в природе. В 1986 г. была установлена последовательность генома вируса ящера штамма A₂₂, эндемичного для ряда районов СССР [7]. Настоящая работа посвящена локализации и синтезу протективных фрагментов поверхностного белка VP₁ вируса ящера штамма A₂₂.

Результаты изучения протективных свойств серии пептидов последовательности VP₁ вируса ящера штамма O₁K позволили локализовать пептид 136–152, обеспечивающий без дополнительной конъюгации с белком-носителем защиту лабораторных животных от заболевания ящуром [1, 8]. Однако прямой перенос данных, полученных для вируса штамма O₁K, на штамм A₂₂ невозможен, так как эти вирусы относятся к различным серотипам и не наблюдается гомологии между белками VP₁ этих вирусов. Особенно велика вариабельность основного иммуногенного района 130–160 VP₁. Теоретический анализ антигенной структуры VP₁ вируса ящера штамма A₂₂ [7] проведен по методам, описанным в работе [9]. Графические изображения профилей гидрофильности, акрофильности, антигенности, а также вероятных α-спиральных участков и β-изгибов приведены на рис. 1. Согласно данным теоретического анализа, наиболее вероятные антигенные детерминанты основного иммуногенного района локализованы в участке 131–149. Этот участок обладает высокими акрофильными и гидрофильными свойствами, также высока вероятность появления β-изгибов.

С целью локализации протективных эпитопов наряду с пептидом 131–149(1) были получены фрагменты 131–139(2) и 140–149(3)

* Сообщение I см. [1]; там же – приняты сокращения; Aoc – изоамплосикарбонил.

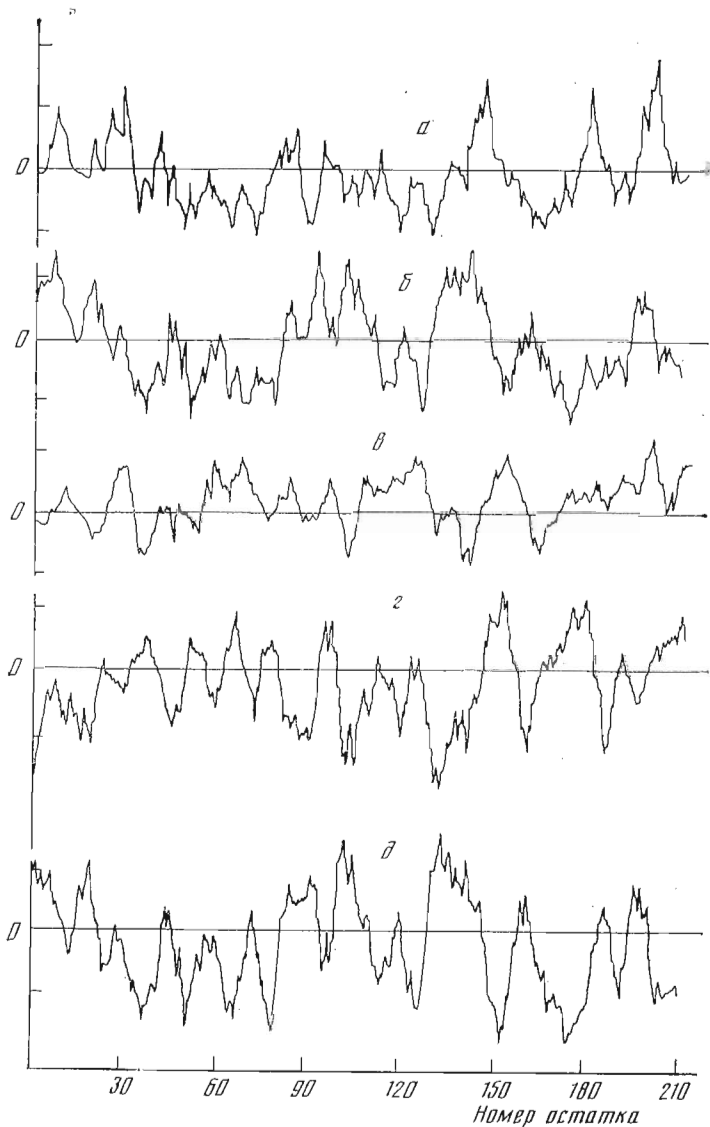


Рис. 1. Данные теоретического анализа гидрофильных (а), акрофильных (б), антигенных (в), α -спиральных (г) участков и β -изгибов (д) белка VP1. Расчет проводили по усредненным коэффициентам гексапептидных фрагментов [9]

(рис. 2). Кроме того, был синтезирован пептид 90–98(4). Этот район, согласно теоретическим расчетам, обладает высокой акрофильностью и, вероятно, спирализован (рис. 1).

Синтез пептидов (2) и (3) проведен по схемам 1 и 2. Пептид (1) получали конденсацией защищенных сегментов (13а) и (21) методом *n*-нитрофениловых эфиров с последующим деблокированием образовавшегося нонадекапептида (22). Пептид (4) получен по схеме 3. В ходе синтеза применяли N^{α} -Boc- и N^{α} -Aoc-группы и постоянные защитные группы бензильного типа. Для образования пептидной связи преимущественно использовали методы *n*-нитрофениловых эфиров и смешанных ангидридов, а для блочной конденсации применяли также метод пентафторфениловых эфиров. Деблокирование пептидов (22) и (13) осуществляли при помощи 25% HF в диметилсульфиде [10], а пептидов (21) и (30) — методом переносного гидрирования. Продукты реакции очищали экстракцией, переосаждением и кристаллизацией. О гомогенности защищенных пептидов судили по данным тонкослойной хроматографии на сп-

140	141	142	143	144	145	146	147	148	149
Gly	Met	Gly	Tos	Tos	Gly	OBz1		OBz1	Pro
			Arg	Arg		Asp	Leu	Glu	H+OBz1
								Boc+OH	5
								Boc+	+OBz1
				Acc+OH	H+OBz1		Boc+OH	H+	5a
				8					6
				Acc+	+OBz1		Boc+		+OBz1
				8a					6a
			Acc+OH	H+	+OBz1	Boc+OH	H+		+OBz1
				9					7
				Acc+	+OBz1	Boc+			+OBz1
				9a					7a
					OH	H+			+OBz1
									+OBz1
						10a			+OBz1
		Boc+ONp	H+						+OBz1
		Boc+				11			+OBz1
						11a			+OBz1
	Boc+ONp	H+							+OBz1
	Boc+					12			+OBz1
						12a			+OBz1
Boc+ONp	H+								+OBz1
Boc+						13			+OBz1
						13a			+OH
						3			+OH

Схема 1.
Синтез пептида 140-149

131	132	133	134	135	136	137	138	139
Asn	Gly	Bz1	Gly	Lyz	Bz1	Bz1	Ala	Gly
							Boc+OH	H+OMe
								14
							Boc+	+OMe
								14a
						Boc+OH	H+	+OMe
						Boc+		+OMe
						Boc+ONp	H+	+OMe
								16
		Boc+OH	H+OMe		Boc+			+OMe
		18						16a
		Boc+	+OMe	Boc+OH	H+			+OMe
		18a						17
Boc+OH	H+		+OMe	Boc+				+OMe
		19						17a
Boc+			+OMe	Boc+				+OH
		19a						17b
Boc+			+OH	H+				+OH
Boc+				20				+OH
				20a				+OH
Boc+ONp	H+			21				+OH
Boc+				2				+OH
H+								+OH

Схема 2.
Синтез пептида 131-139

90	91	92	93	94	95	96	97	98
					OBz1			
Pro	Asn	Gly	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Leu
							Вос+ONp	H+OBz1
							28	
							Вос+	+OBz1
							23a	
						Вос+OH	H+	+OBz1
							24	
						Вос+		+OBz1
							24a	
					Вос+OH	H+		+OBz1
							25	
					Вос+			+OBz1
							25a	
	Вос+ONp	H+OBz1		Вос+OH	H+			+OBz1
	28						26	
	Вос+	+OBz1		Вос+				+OBz1
	28a						26a	
Вос+OH	H+	+OBz1	Вос+ONp	H+				+OBz1
	29						27	
Вос+		+OBz1	Вос+					+OBz1
	29a						27a	
Вос+		+OH	H+					+OBz1
				30				
Вос+				4				+OBz1
H+								+OH

Схема 3.
Синтез пептида 90-98

ликагеле. Чистоту всех продуктов блочных конденсаций оценивали при помощи эксклюзионной ВЭЖХ, сравнивая профиль элюции очищенного продукта и его искусственной смеси с исходными блоками (см., например, рис. 3). Свободные пептиды очищали ионообменной хроматографией, а для характеристики гомогенности выделенных продуктов использовали обращенно-фазовую ВЭЖХ (например, рис. 4). В табл. 1 приведены времена удерживания всех синтезированных свободных пептидов в различных системах. Все полученные соединения также охарактеризованы данными аминокислотного анализа (табл. 2), а для продуктов блочных конденсаций — данными N-концевого анализа после удаления Вос-группы.

Протективные свойства синтетических пептидов были изучены на морских свинках, как описано в работе [1]. Показано, что иммунизация КЛН-конъюгатом пептида 131-149 и свободными пептидами 131-149 и 140-149 вызывает 50-80% защиту животных от заболеваний (табл. 3). N-Концевой фрагмент изучаемого района 131-139 и фрагмент 90-98 не проявляют протективной активности.

Таблица 1

Времена удерживания пептидов (1)-(4) в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ*

Пептид	Время удерживания, мин				
	а	б	в	г	д
131-149(1)	14,25	20	—	12,1	—
131-139(2)	—	—	—	—	21,6
140-149(3)	—	15,75	17,50	11,90	17,1
90-98(4)	—	—	14,71	13,30	—

* Хроматографию проводили на колонке Ultrasphere ODS, 4,6×150 мм при скорости потока 1 мл/мин в системах из смеси буферов А (50 мМ NH₄OAc, pH 7,5) или Б (0,01% CF₃COOH) с раствором ацетонитрила в тех же буферах. Режимы элюирования: а) 6 мин 5% CH₃CN в буфере А, затем 20-минутный линейный градиент до 35% CH₃CN в буфере А; б) 6 мин буфер А, 40-минутный градиент до 50% CH₃CN в А; в) 6 мин 5% CH₃CN в А, 20-минутный градиент до 18% CH₃CN в А; г) 6 мин 14% CH₃CN в Б, 10-минутный градиент до 28% CH₃CN в Б; д) 6 мин Б, 30-минутный градиент до 70% CH₃CN в Б. Поглощение регистрировали при 226 нм.

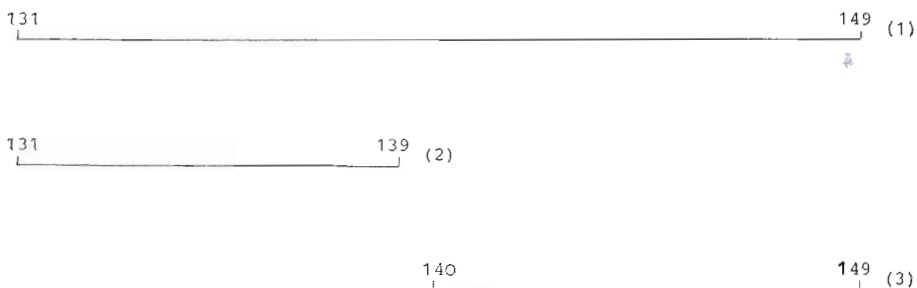


Рис. 2. Синтетические пептиды белка VP₁ штамма А₂₂ вируса ящура

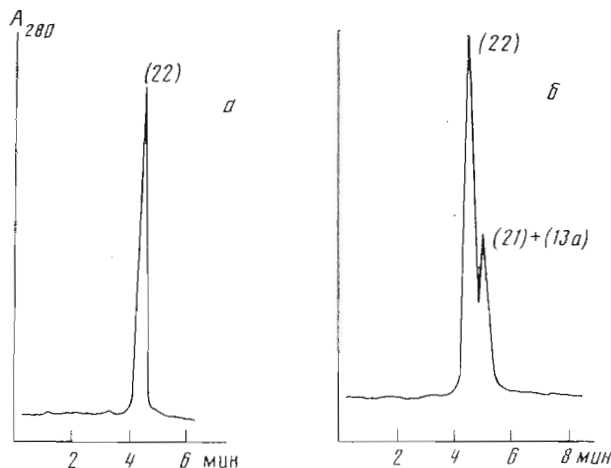


Рис. 3. ВЭЖХ защищенного пептида 131-149 (22) (а) и искусственной смеси этого пептида и составляющих его блоков 131-139 (21) и 140-149 (13а) (б) в режиме эксклюзии на колонке (5,2×250мм) Silasorb 60 в DMF при скорости потока 1 мл/мин

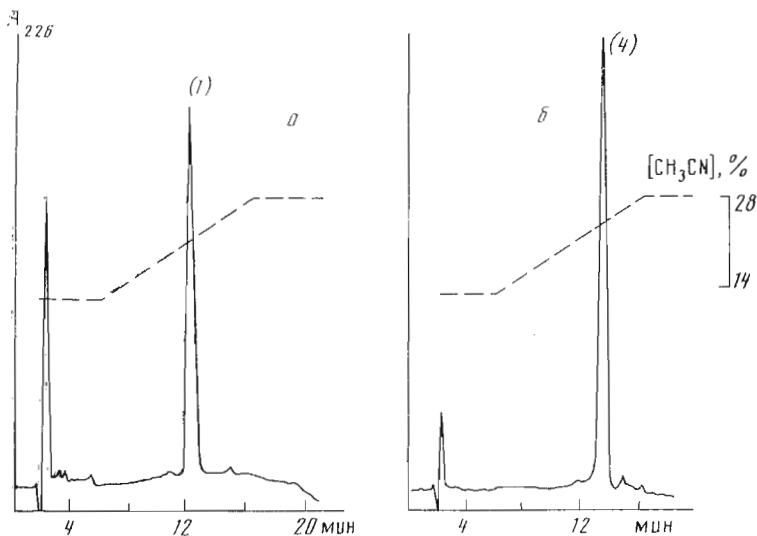


Рис. 4. ВЭЖХ пептидов 131-149 (1) (а) и 90-98 (4) (б) на колонке (4,6×150 мм) Ultrasphere ODS в водном ацетонитриле, содержащем 0,01% CF₃COOH. Скорость элюирования 1 мл/мин, форма градиента показана пунктиром

Протективный эффект синтетических пептидов белка VP₁ *

Антиген	Носитель	Число зараженных/ число заболевших животных	Эффективность защиты, %
Вирус **	—	5/0	100
131-149	KHL	4/1	75
131-149	—	5/1	80
131-139	KHL	4/4	0
140-149	—	4/2	50
90-99	—	4/4	0

* Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 44 сут 200 мкг свободного пептида либо пептида, конъюгированного с КЛН. Для первой иммунизации использовали полный адъювант Фрейнда, для второй — неполный адъювант Фрейнда. Протективный эффект определяли путем заражения морских свинок на 35-е сут после первой иммунизации 200—500 ИД₅₀ вируса ящура штамма А₂₂. Заражение проводили в подушечки лап.

** Доза очищенного инактивированного вируса А₂₂ составляла 5 мкг.

Таблица 4

Условия ТСХ *

Растворитель	Объемные соотношения компонентов в системе																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Хлороформ	10	9	8	4	3	30	—	—	—	12	4	1	2	20	—	—	—	10	20
MeOH	1	1	1	1	1	10	—	—	—	1	2	1	1	10	—	90	85	10	10
Этилацетат	1	1	1	1	1	15	10	4	8	1	1	1	1	10	—	—	—	1	10
CH ₃ COOH	—	—	—	—	—	—	1	1	2	—	—	—	—	—	4	1	1	—	—
25% NH ₃	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
Вода	—	—	—	—	—	—	1	1	1	—	—	—	—	—	30	10	15	—	—
Бутанол	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	42	—	—	—	—
Пиридин	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24	—	—	—	—

* Для хроматографии использовали пластинки фирмы Merck: в системах 1—15, 18 и 19 — DC-Fertigplatten Kieselgel 60, а в системах 16 и 17 — HPTLC Fertigplatten RP-18 (Merck, ФРГ).

Таким образом, для штамма А₂₂ локализован фрагмент, обладающий протективной активностью как в свободном, так и в конъюгированном виде. Положение активного участка белка VP₁ штамма А₂₂ в целом аналогично обнаруженному для штамма О₁К [1], однако существуют штаммоспецифические различия, например фрагмент 140—149 А₂₂ проявляет протективную активность, в то время как пептиды 141—148 и 141—152 О₁К неактивны [1]. Результаты исследования иммуногенных и антигенных свойств синтетических пептидов штаммов О₁К и А₂₂ и изучение действия синтетических пептидов на Т-клеточном уровне будут описаны в последующих публикациях.

Экспериментальная часть

Основные материалы и методы, использованные в работе, описаны в предыдущем сообщении [1]. Условия хроматографии приведены в табл. 4. Условия получения и очистки всех синтезированных соединений приведены в табл. 5. Синтез проводили по стандартным методикам [1]: А — удаление Вос-группы; Б — метод смешанных ангидридов; В — метод *n*-нитрофениловых эфиров; Г — образование пентафторфенилового эфира; Д — метод пентафторфениловых эфиров; Е — удаление защитных групп гидрированием.

Ж. Удаление защитных групп жидким HF. Защищенный пептид обрабатывали смесью 65% диметилсульфида, 10% *n*-крезола и 25% жидкого HF 2 ч при 0° С, HF удаляли в вакууме, остаток растворяли в воде, 1—3 раза экстрагировали эфиром и водный слой лиофилизовали.

Условия получения и очистки пептидов (1) – (30)

Пеп- тид	Метод син- теза	Метод очистки	Вы- ход, %	R_f (№ системы)
(1)	Ж	О (СМ трис-акрил, 0,1 н. NH_4OAc , pH 5,03)	47	
(2)	А, Е	О (сефадекс G-10, 0,1 н. AsOH)	52	
(3)	Ж	О (сефадекс G-10, 0,1 н. AsOH)	61	
(4)	А, Е	Н (этанол – эфир), О (DEAE-сефа- декс, 0,1 н. NH_4OAc , pH 7,4)	85	0,27(15)
(5)	Б	Л	85	0,86(1)
(5а)	А	Л, М (эфир)	98	0,47(2), 0,27(7), 0,56(5)
(6)	Б	Л, М (эфир – гексан)	75	0,75(3), 0,73(7)
(6а)	А		97	0,57(5), 0,32(7), 0,32(3)
(7)	Б	Л, М (эфир – гексан)	73	0,64(3), 0,32(7)
(7а)	А		98	0,53(3), 0,25(4)
(8)	Б	Л, М (эфир)	72	0,4(2), 0,76(7), 0,69(5)
(8а)	А		97	0,32(5)
(9)	Б	Л, Н (эфир)	87	0,72(5), 0,68(7)
(9а)	Е	Н (эфир)	90	0,51(6), 0,27(7)
(10)	Б	Н (ЭА)	62	0,50(4), 0,68(2), 0,87(7)
(10а)	А	Н (эфир)	95	0,20(5), 0,14(7)
(11)	В	Л, М (ЭА)	91	0,50(4), 0,87(8)
(11а)	А	Н (эфир)	98	0,63(8), 0,21(4)
(12)	В	Л, М (ЭА)	75	0,87(8), 0,50(4)
(12а)	А	Н (эфир)	98	0,36(4), 0,30(7)
(13)	В	Л, М (ЭА)	76	0,75(5), 0,50(7), 0,47(16)
(13а)	А	Н (эфир)	96	0,15(17)
(14)	Б	Л	93	0,51(18), 0,87(7), 0,75(4)
(14а)	А		97	0,25(4), 0,32(7)
(15)	Б	Л, М (ЭА)	83	0,75(5), 0,93(7)
(15а)	А	Н (эфир)	95	0,51(7)
(16)	В	Л, М (ЭА)	86	0,53(5), 0,76(7)
(16а)	А	Н (эфир)	97	0,49(7)
(17)	Б	Л, М (ЭА)	81	0,71(5), 0,75(9)
(17а)	З	Н (эфир)	87	0,25(5), 0,91(7)
(17б)	А	Н (эфир)	95	0,50(4), 0,58(7)
(18)	Б	Л, М (ЭА – гексан)	95	0,87(18)
(18а)	А		99	0,87(18)
(19)	Б	Л, М (ЭА – гексан)	97	0,46(18), 0,89(8)
(19а)	З	Н (эфир)	75	0,43(8)
(20)	Г, Д	Н (эфир)	87	0,65(7), 0,52(5)
(20а)	А	Н (эфир)	95	0,32(8)
(21)	В	Н (ЭА)	89	0,50(8)
(22)	Г, Д	Н (CH_3OH)	91	0,51(4)
(23)	В	Л	89	0,51(10)
(23а)	А		96	0,23(7)
(24)	Б	Л	72	0,60(3), 0,80(7)
(24а)	А		92	0,31(7)
(25)	Б	Л, М (ЭА – эфир)	62	0,80(11), 0,75(7)
(25а)	А		98	0,41(13), 0,38(7)
(26)	Б	Л, М (ЭА)	64	0,75(13), 0,73(7)
(26а)	А		98	0,18(7), 0,23(12), 0,79(8)
(27)	Б	Л, М (ЭА)	66	0,71(13), 0,81(7)
(27а)	А		95	0,55(13), 0,23(7), 0,69(8)
(28)	В	Л	58	0,47(4), 0,83(7)
(28а)	А		97	0,32(8)
(29)	Б	Л, М (ЭА – эфир)	53	0,59(7), 0,53(4), 0,82(19)
(29а)	Е	Н (эфир)	93	0,34(19), 0,66(8)
(30)	Г, Д	Л, М (ЭА – эфир)	50	0,87(19), 0,86(8)

3. Омыление метилового эфира пептида. Пептид растворяли в 0,1 н. NaOH в MeOH , через 40 мин раствор подкисляли AsOH до pH 5, упаривали, остаток растворяли в ЭА и промывали 5% лимонной кислотой, органический слой упаривали.

Для очистки продуктов реакции использовали: Л – экстракцию, М – кристаллизацию, Н – пересаживание, О – хроматографию (см. [1]).

КЛН-конъюгаты получали по методу, описанному в работе [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Сметкова Е. В., Волкова Т. Д., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1352-1362.
2. Townsend A. R. M. // Immunol. Res. 1987. V. 6. № 1-2. P. 80-100.
3. Milich D. R., McLachlam A., Moriarty A., Thornton G. B. // J. Immunol. 1987. V. 139. № 4. P. 1223-1231.
4. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnie T. M., Sutcliffe J. J. G., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. // Nature. 1982. V. 298. № 5869. P. 30-33.
5. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H. O., Schulz G. E., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869-874.
6. DiMarchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., Nowat N. // Science. 1986. V. 232. № 4764. P. 639-641.
7. Ошищенко А. М., Петров Н. А., Блинов В. М., Василенко С. К., Сандахчиев Л. С., Бурдов А. Н., Иванющенко В. Н., Перевозчикова Н. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 416-419.
8. Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1132-1135.
9. Horr T. P. // J. Immunol. Meth. 1986. V. 88. № 1. P. 1-18.
10. Tam J. P., Heath W. F., Merrifield R. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. № 21. P. 6441-6455.

Поступила в редакцию
25.IV.1988

ANTIGENIC STRUCTURE OF THE FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS. II. SYNTHESIS OF PROTECTIVE PEPTIDES FROM THE IMMUNODOMINANT REGION OF VP₁ PROTEIN OF FMDV A22 STRAIN

VOLPINA O. M., SUROVOY A. Yu., ULYASHIN V. V.,
IVANOV V. T., CHEPURKIN A. V.*, IVANYUSHCHENKOV V. N.*
BURDOV A. N.*, DRYAGALIN N. N.*

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

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

Earlier we found that the immune response and antiviral protection from FMDV can be achieved by immunization with uncoupled FMDV peptides. In a search of approaches to animal protection from FMDV A22 strain we prepared a series of peptides corresponding to the putative antigenic determinants. Synthetic 131-149 and 140-149 sequences afforded 50 to 80% protection, both in the free state and conjugated with keyhole limpet hemocyanin. We believe that the 140-149 segment is so far the smallest peptide capable of eliciting specific antiviral protection without conjugation with a high molecular carrier.