



УДК 577.112.083.3:615.371

СИНТЕЗ И ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДОВ – ФРАГМЕНТОВ ИММУНОДОМИНАНТНЫХ РАЙОНОВ БЕЛКА VP1 ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА АЗИЯ-1

© 1998 г. В. Н. Петров[#], С. С. Рыбаков, О. Н. Петрова, А. В. Чепуркин, В. М. Гуленкин*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных МСХиП РФ,
600900, Владимир, пос. Юрьевец*

Поступила в редакцию 02.10.97 г. Принята к печати 19.05.98 г.

На основании результатов теоретического анализа антигенной структуры белка VP1 вируса ящура типа Азия-1 предложены его потенциальные иммунодоминантные эпитопы. Твердофазным методом синтезированы пептиды, соответствующие фрагментам 140-153, 136-153, 132-153, 143-157, 137-157 и 193-208 белка VP1. Иммуногенные свойства пептидов изучены на морских свинках. Самый короткий пептид, проявивший протективную активность, соответствовал фрагменту 140-153. Синтетические конструкции Plm-(Gly)₃-(140-153)-(Gly)₂-Lys(Plm)-Leu и [Ac-(140-153)-(Gly)₃]₈-(Lys)₇-Gly в сочетании с адьювантами обеспечивали защиту от поражения ящуром до 80% иммунизированных животных.

Ключевые слова: пептиды синтетические; детерминанты антигенные; вирус ящура; радиоиммунологический анализ.

Иммунный ответ животных, иммунизированных инактивированным вирусом ящура, направлен против эпитопов поверхностного белка VP1, к остальным капсидообразующим белкам – VP2, VP3 и VP4 – антитела не вырабатываются [1, 2]. Характерное свойство генома вируса ящура – высокая мутационная изменчивость, что объясняет существование более 60 антигенных вариантов, объединенных по серологической реактивности в 7 типов [3]. Наибольшая частота мутаций выявлена для участка генома, кодирующего последовательность 130-160 белка VP1 [4, 5], которая является его основным иммуногенным районом [6]. Синтез уникальных типоспецифичных фрагментов белка VP1 вируса ящура, имитирующих антигенные детерминанты, актуален для создания безвирусных диагностических и вакцинных препаратов.

Настоящая работа посвящена изучению иммуногенной активности пептидов – фрагментов потенциальных антигенных детерминант белка VP1 вируса ящура типа Азия-1: Вирус данного типа был причиной возникновения ящура, зарегистрированного в ряде стран Европы и Азии, в том числе и в сопредельных с территорией бывшего

СССР [3]. Одно из основных типоспецифичных отличий вируса ящура типа Азия-1 проявляется в том, что он индуцирует образование антител со сравнительно низкой нейтрализующей активностью [7]. Одинаковые дозы инактивированной вакцины, изготовленной из вируса ящура типов А, О и Азия-1, индуцировали разный иммунный ответ. Иммуногенная активность вакцины против вируса типа Азия-1 была ниже, чем против вируса типов А или О. Данная особенность характерна как для традиционной вакцины [8], так и для препаратов, полученных методами генетической инженерии [9].

С целью локализации потенциальных антигенных детерминант нами был проведен теоретический расчет профилей гидрофильности [10], антигенности [11], экспонированности [12] и подвижности основной цепи [13] белка VP1 вируса ящура типа Азия-1, первичная структура которого была определена в работе [14]. Согласно данным расчетов и результатам прогноза вторичной структуры белка [15, 16], наиболее вероятные антигенные детерминанты локализованы в двух участках белка: 137-156 и 196-202. Выбранные для синтеза последовательности соответствуют фрагментам 132-153, 136-153, 140-153, 137-157, 143-157, 193-208 (рисунок) и обладают характерными признаками потенциальных Т- и В-эпитопов. Эти фрагменты содержат с большой степенью вероятности амфипатичные α -спиральные участки, а также β -изгибы или неструктурированные участки, образованные остатками положительно и отрицательно заряженных аминокислот.

Сокращения: РИА – радиоиммунологический анализ; ИД – инфекционная доза вируса; ТЦД – тканевая цитотоксическая доза вируса; НД – нейтрализующая доза; ВНА – вируснейтрализующие антитела; ВСА – вирусспецифические антитела; Асп – ацетамидометил; Cl₂Z – 2,4-дихлорбензильоксикарбонил; НОВТ – 1-гидроксibenзо[триазол; Plm – пальмитоил; Pam – фенилацетамидометил; TFMSA – трифторметансульфонокислота.

[#] Автор для переписки (тел./факс: (0922) 24-36-75).

132	140	150	157
GKNNYGEETSRRGDLAAI VQRLS RL			
(I), (VII), (VIII)			
(II)			
(III)			
(IV)			
(V)			
193	200	208	
DTTQDRRKQE I I APEK			
(VI)			

Последовательность участков 132-157 и 193-208 белка VP1 вируса ящура типа Азия-1 и соответствующие их фрагментам синтезированные пептидные продукты (I)–(VIII).

Пептиды синтезировали твердофазным методом в ручном варианте последовательным наращиванием цепи с С-конца. Все защитные группы, за исключением кислотоустойчивой ацетамидометильной, были выбраны с расчетом на конечное деблокирование смесью реагентов, содержащей TFMSA. В синтезе пептида (III) остаток Lys присоединяли в ходе предпоследнего синтетического цикла в виде N^α-Boc, N^ε-Z-производного. Для синтеза пептида (VI), в последовательности которого остатки Lys расположены в середине и С-концевом положении, использовали производное аминокислоты с более устойчивой к ацидозу Cl₂Z-защитной группой на N^ε-аминогруппе (табл. 1).

Реакцию конденсации в каждом синтетическом цикле проводили дважды: первый раз методом симметричных ангидридов, повторно –

DCC/НОВТ-методом. Остатки Boc-Asn и Boc-Gln первоначально вводили в конденсацию в виде *n*-нитрофениловых эфиров, а остатки Boc-Arg(Tos) и Boc-Lys(Plm) – DCC-методом, конденсацию повторяли DCC/НОВТ-методом. Концевую N^α-аминогруппу пептида (VII) ацилировали остатками пальмитиновой кислоты с помощью DCC/НОВТ-метода. Во избежание побочной реакции образования пироглутаминовой кислоты аминогруппы остатков Gln и Glu ацилировали симметричными ангидридами защищенных аминокислот, реакцию конденсации проводили в DMF. В конце каждого цикла непрореагировавшие аминогруппы ацилировали уксусным ангидридом. Завершив последний синтетический цикл, начинали деблокирование пептидов с удаления N^α-Boc-группы. Деблокированную α-аминогруппу пептида (VIII) ацилировали смесью CH₂Cl₂–Ac₂O–пиридин (60 : 20 : 20), свободные α-аминогруппы пептидов (I)–(VI) не ацилировали.

Далее пептиды отщепляли от полимера с одновременным деблокированием в два этапа: смесью TFMSA–TFA–*m*-крезол–нуклеофильный реагент, затем TFMSA–TFA–*m*-крезол. Для первичного деблокирования пептидов (I)–(III) в качестве нуклеофильного реагента использовали тиоанизол, для пептидов (IV)–(VIII) – диметилсульфид, использование которого предпочтительнее [17]. Деблокированные пептиды (I)–(VI) и (VIII) обессоливали методом гель-хроматографии и дополнительно очищали на колонках с сорбентами Toyopearl HW 40S или CM-Toyopearl 650M. Пептид (VII) очищали переосаждением из реакционной смеси, а затем из DMF в эфир. Чистоту полученных пептидов (I)–(VI) определяли методом ВЭЖХ, пептида (VIII) – с помощью микроколоночной гель-хроматографии. Во всех случаях доля примесей не пре-

Таблица 1. Защищенные пептидилполимеры и конечные пептидные продукты

Пептид	Защищенный пептидилполимер*	Конечные пептидные продукты
(I)	Boc-R ^I -Cys(Acm)-полимер	(140-153)-Cys(Acm)
(II)	Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-R ^I -Cys(Acm)-полимер	(136-153)-Cys(Acm)
(III)	Boc-Gly-Lys(Z)-Thr(Bzl)-Tyr(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-R ^I -Cys(Acm)-полимер	(132-153)-Cys(Acm)
(IV)	Boc-R ^{II} -Cys(Acm)-полимер	(143-157)-Cys(Acm)
(V)	Boc-Gly-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-R ^{II} -Cys(Acm)-полимер	(137-157)-Cys(Acm)
(VI)	Boc-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Gln-Asp(OBzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Lys(Cl ₂ Z)-Gln-Glu(OBzl)-Ile-Ile-Ala-Pro-Glu(OBzl)-Lys(Cl ₂ Z)-полимер	(193-208)
(VII)	Plm-Gly-Gly-Gly-R ^I -Gly-Gly-Lys(Plm)-Leu-полимер	Plm-(Gly) ₃ -(140-153)-(Gly) ₂ -Lys(Plm)-Leu
(VIII)	(Boc-R ^I -Gly-Gly-Gly) ₈ -(Lys) ₇ -Gly-Pam-полимер	[(Ac-(140-153)-(Gly) ₃] ₈ -(Lys) ₇ -Gly

R^I = Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Gly-Asp(OBzl)-Leu-Ala-Ala-Ile-Val-Gln-Arg(Tos)-Leu.

R^{II} = Arg(Tos)-Gly-Asp(OBzl)-Leu-Ala-Ala-Ile-Val-Gln-Arg(Tos)-Leu-Ser(Bzl)-Asn-Arg(Tos)-Leu.

* Пептиды (I)–(VII) синтезированы на сополимере стирола и 1% дивинилбензола, пептид (VIII) – на Pam-полимере.

Таблица 2. Характеристика синтезированных пептидов – фрагментов белка VP1

Пептид	Выход, %*	t, мин** ВЭЖХ	Результаты аминокислотного анализа***			
(I)	15	15.6	D 1.20 (1) A 2.36 (2) T 0.90 (1)	E 1.20 (1) V 0.81 (1) I 0.96 (1)	G 1.11 (1) L 2.00 (2)	R 2.95 (3) S 0.89 (1)
(II)	20	14.5	D 1.16 (1) A 2.34 (2) T 0.95 (1)	E 3.18(3) V 0.86(1) I 0.84(1)	G 1.85(2) L 1.82(2) Y 0.85(1)	R 3.00(3) S 0.85(1)
(III)	7	15.0	D 0.82(1) A 2.40(2) T 3.26(3)	E 2.61(3) V 0.79(1) I 1.18(1)	G 3.20(3) L 2.10(2) Y 0.78(1)	R 2.55(3) S 1.15(1) K 0.93(1)
(IV)	12	14.1	D 1.70(2) A 2.40(2) I 1.18(1)	E 0.86(1) V 0.85(1)	G 0.91(1) L 2.61(3)	R 2.60(3) S 1.13(1)
(V)	10	13.7	D 2.40(2) A 2.10(2) T 1.19(1)	E 2.65(3) V 1.00(1) I 1.01(1)	G 2.32(2) L 2.61(3)	R 3.20(4) S 2.42(2)
(VI)	24	12.6	D 1.71(2) V 2.22(2)	E 3.45(4) T 1.64(2)	R 1.61(2) K 2.38(2)	A 1.18(1) P 1.22(1)
(VII)	8	н. о.	D 1.12(1) A 2.04(2) T 0.81(1)	E 1.14(1) V 0.90(1) I 0.81(1)	G 6.09(7) L 2.77(3)	R 2.58(3) S 0.80(1)
(VIII)	49	н. о.	D 1.00(1) A 2.17(2) T 0.77(1)	E 0.95(1) V 0.76(1) I 0.83(1)	G 4.99(4.13) L 2.00(2) K 1.12(0.88)	R 3.02(3) S 0.79(1)

* Выход в расчете на стартовую аминокислоту.

** Условия проведения хроматографии см. "Эксперимент. часть", н. о. – не определяли.

*** Содержание остатков Cys количественно не определяли, в скобках указано теоретическое содержание аминокислот.

вышала 10%. По данным ТСХ, чистота пептида (VII) оказалась приемлемой для использования его в дальнейших опытах. Индивидуальная схема очистки и анализа гомогенности дипальмитоилированного пептида (VII) была предпринята из-за плохой растворимости пептида в воде.

В расчете на С-концевую аминокислоту выход пептидов (I)–(VII), синтезированных на хлорметилированном полимере, составил 7–24%. Использование Ram-полимера [18] с кислотоустойчивой спейсерной группой позволило получить пептид (VIII) с заметно большим выходом – 49%. Обращенно-фазовая ВЭЖХ и результаты аминокислотного анализа, проведенного после кислотного гидролиза, подтверждают индивидуальность синтезированных пептидов (табл. 2).

Пептиды (I)–(V) помимо фрагментов основной антигенной детерминанты белка VP1 содержали в С-концевом положении дополнительные остатки Cys(Asn). Их вводили, предполагая конъюгировать пептиды с белками-носителями через сульфгидрильную группу. В дальнейшем нами бы-

ло показано, что антигенная активность неконъюгированных пептидов (I)–(V) в реакциях с антивирусными антителами *in vitro* была типоспецифичной и достаточно высокой [19, 20]. Учитывая данный факт и литературные сообщения о том, что синтетические фрагменты основной антигенной детерминанты белка VP1 вируса ящура типов А [21–24] и О [22] проявляли видоспецифичную для морских свинок Т-клеточную активность, в настоящей работе мы не реализовали возможность создания пептид-белковых конъюгатов.

Иммуногенную активность пептидов изучали на морских свинках (табл. 3). В каждом опыте животных иммунизировали дважды смесью пептидов с адъювантами. В первом опыте доза однократного введения пептидов (I)–(V) составляла 400 мкг, при этом частичную защиту животных от поражения ящуром обеспечили лишь пептиды (I) и (II). В последующем опыте дозу указанных пептидов снизили вдвое, что не привело к заметному снижению их протективной активности. Вероятно, минимальная протективная доза пепти-

Таблица 3. Иммуногенная активность пептидов – фрагментов белка VP1*

Иммуноген	Доза пептида, мкг	Титры		Протективный эффект защищено/заражено
		ВСА, lg	ВНА, log ₂ (НД ₅₀ /0.1 мл)	
Пептид (I)	400	3.60–4.20	2.00–5.00	2/5
	200	3.55–3.60	3.00–4.17	5/10
(II)	400	3.60–3.90	<1.00–5.00	2/4
	200	3.18–2.32	<1.00–4.17	2/5
(III)	200	3.30–3.90	<1.00–3.55	0/5
(IV)	400	2.18–2.32	<1.00	0/5
(V)	400	2.18–2.32	<1.00	0/5
(VI)	200	<2.00	<1.00	0/5
(VII)	200	н.о.	<1.00	0/5
	200**	н.о.	<1.00	4/5
(VIII)	200	н.о.	4.50–8.33***	4/5
Сапонин, 1% раствор	0	н.о.	<1.00	0/5

* Условия приготовления препаратов и двукратной иммунизации морских свинок см. “Эксперимент. часть”, п. о. – не определяли.

** В качестве адъюванта использовали сапонин, в остальных случаях – ПАФ/НАФ.

*** Используемая доза вируса 100 ТЦД₅₀, в остальных случаях – 10 ТЦД₅₀.

дов (I) и (II) значительно меньше 200 мкг, поэтому пептиды (VII) и (VIII), аналоги пептида (I), вводили в дозе 200 мкг. Такую же дозу выбрали для пептида (VI) с аминокислотной последовательностью 193-208.

Иммуногенную активность пептидов анализировали, сравнивая титры антител и протективный эффект. При сравнении рассматривали диапазон титров антител, обнаруженных в индивидуальных сыворотках крови животных одной опытной группы. Вирусспецифическую активность (титр ВСА) антипептидных антител выявляли в непрямом твердофазном РИА, вируснейтрализующую активность (титр ВНА) – в реакции нейтрализации вируса в культуре клеток свиной почки. Вероятно, устойчивость комплексов антигена с антителами против частично перекрывающихся пептидов была разной и при одинаковом титре вирусспецифических антител, равном 2.18–2.321, сыворотки против пептида (II) нейтрализовали вирус, а сыворотки против пептидов (IV)–(V) были неактивными. Полученные нами результаты согласуются с наблюдением, что удлинение пептида не всегда приводит к увеличению иммуногенности [25]. Более длинные пептиды могут содержать большее число иммунокомпетентных эпитопов [26], однако существует вероятность понижения иммуногенности из-за изменения пространственной структуры удлиненного пептида и экранирования его отдельных эпитопов [27].

В наших экспериментах было отмечено описанное ранее, в частности в работах [22, 23], неполное соответствие между титрами вируснейтрализующих антител *in vitro* и протективным эффектом *in vivo*. Достаточно высокая активность

антител против пептида (III) в реакциях с вирусом *in vitro* не подтвердилась в опытах *in vivo*. Возможно, что максимальная концентрация антител 3.55 НД₅₀/0.1 мл была недостаточной для нейтрализации вируса, тогда как протективные пептиды (I), (II) и (VIII) индуцировали выработку антител с максимальным титром, превышающим указанную величину.

Напротив, дипальмитоилированный пептид (VII) в сочетании с сапонином обеспечивал защиту от поражения ящуром морских свинок без индукции заметного количества ВНА. Известно, что ацилирование остатками пальмитиновой кислоты является одним из способов повышения иммуногенной активности пептидов [28]. Нами не изучены особенности иммунного ответа на данный препарат, состав которого, возможно, стимулировал клеточный иммунитет, вызывая образование лимфокинактивированных и цитотоксических лимфоцитов. Сапонин, введенный в том же количестве без пептида, не проявлял протективной активности. В смеси с более эффективными иммуностимуляторами – адъювантами Фрейнда – пептид (VII) оказался слабым иммуногеном.

Наибольшую иммуногенную активность обнаружил пептид (VIII). При его синтезе стандартным твердофазным методом первоначально была создана разветвленная матрица из семи остатков лизина. Затем N^α- и N^ε-аминогруппы четырех остатков служили для наращивания восьми идентичных аминокислотных последовательностей, соответствующих участку 140-153 белка VP1 вируса ящур типа Азия-1. Структура пептида (VIII) аналогична структуре созданной нами конструкции, содержащей фрагмент 142-158 белка VP1 ви-

руса ящура типа А [29]. Пептид (VIII) не обеспечил 100% защиту животных от поражения ящуром после контрольного введения вируса, хотя индуцировал образование большого количества ВНА. Важно отметить, что пептиды-фрагменты VP1 вируса ящура типов О [22] и А [24] обеспечивали защиту всех иммунизированных морских свинок, индуцируя образование меньшего количества ВНА.

Таким образом, данный факт и обнаруженное для пептидов (I)–(V) отсутствие строгой корреляции между вируснейтрализующей активностью антипептидных антител и протективным эффектом согласуется с наблюдением, что зависимость между концентрацией антител и долей нейтрализованного вируса типа Азия-1 по сравнению с вирусом других типов менее выражена, а характер иммунного ответа животных при заражении вирусом типа Азия-1 отличается типоспецифическими особенностями [7]. Типоспецифические особенности нейтрализации вируса ящура являются следствием эволюции вируса, так как в разных районах планеты вирусы эндемичных типов приспособились к существованию в организме разных видов животных [3].

Исследования антипептидных сывороток в РИА показали (табл. 4), что пептид (I) индуцировал выработку антител и перекрестно реагировал с сыворотками против пептидов (II)–(V). Можно предположить, что в общей для пептидов (I)–(V) аминокислотной последовательности, соответствующей участку 143-153 белка VP1, локализованы видоспецифичные для морских свинок В- и Т-эпитопы. Данный вывод согласуется с результатами аналогичного испытания свойств более длинного пептида 137-157-Cys(Acm) (V). Пептид (V) также вызывал образование антипептидных антител и перекрестно реагировал с сыворотками против пептидов (I)–(IV). Вероятно, из-за лучшей сорбции пептида (V) на подложке его антигенная активность была несколько выше активности пептида (I).

Таким образом, теоретический прогноз о локализации иммунокомпетентных эпитопов в последовательности 136-157 белка VP1 вируса ящура подтвержден экспериментальными результатами. Пептид 193-208 (VI), имитирующий потенциальный иммунодоминантный эпитоп 196-202, оказался неиммуногенным. Наиболее эффективно нейтрализовали вирус ящура типа Азия-1 антитела против линейных пептидов (I), (II) и пептида (VIII), имеющего разветвленную конструкцию и содержащего фрагмент 140-153 белка VP1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов. В работе использовали хлорметиловый сополимер стирола и 1% дивинилбензола (Fluka, Швейцария), реагенты и Вос-

L-аминокислоты (Fluka, Reanal, Венгрия; Merck, ФРГ; Sigma, США), в том числе с защищенными функциями боковых радикалов: Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(Bzl), Asp(OBzl), Glu(OBzl), Arg(Tos), Lys(Z), Lys(Cl₂Z) и Cys(Acm).

Для получения Вос-Lys(Plm)-ОН 1 экв. Вос-Lys(Z)-ОН гидрировали над палладиевой чернью в метаноле в присутствии 1.5 экв. уксусной кислоты. Ход реакции контролировали методом ТСХ на пластине DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄. Катализатор удаляли фильтрованием, растворители упаривали при пониженном давлении. Выход Вос-Lys-ОН · CH₃COOH составил 80%. К раствору 1.8 г (5.88 ммоль) ацетата N^α-Вос-Lys-ОН и 0.82 мл (5.88 ммоль) триэтиламина в 120 мл хлороформа добавили 1.87 г (5.29 ммоль) оксисулцинимидного эфира пальмитиновой кислоты, через 1 ч к смеси добавили еще 0.82 мл (5.88 ммоль) триэтиламина. Смесь, перемешивая, выдерживали 16 ч при 20°C и выливали в смесь этилацетата с водой. Органический слой промывали 10% лимонной кислотой, водой, насыщенным раствором NaCl, высушивали над безводным Na₂SO₄, упаривали в вакууме. Получено 2.11 г (4.3 ммоль) Вос-Lys(Plm)-ОН с выходом 82%. Чистоту продукта подтвердили с помощью ТСХ в системе хлороформ-метанол-вода, 65 : 25 : 4, R_f 0.57.

Для синтеза пептидов (I)–(VII) стартовую аминокислоту в виде цезиевой соли присоединяли к хлорметилованному сополимеру. Вос-Gly-Pam-полимер для синтеза пептида (VIII) получали, модифицируя тот же сополимер по методикам работы [18]. Нарастивание пептидной цепи проводили в основном по стандартному протоколу синтетического цикла [23], но для удаления Вос-групп использовали 4 н. HCl в диоксане, как описано в работе [29].

Целевые пептиды отщепляли от полимера и деблокировали растворами TFMSA в TFA [17]. На первом этапе защищенные пептидилполимеры пептидов (I)–(III) обрабатывали 80 мин при 0°C деблокирующей системой 1 М TFMSA – тиоанизол в TFA, содержащей 5% м-крезола. Пептидилполимеры пептидов (IV) и (VIII) обрабатывали 4 ч при 0°C смесью TFMSA–TFA–м-крезол–DMS, 10 : 50 : 10 : 30. Полимер отфильтровывали, реак-

Таблица 4. РИА перекрестной активности антипептидных сывороток с пептидами (I) и (V)

Антисыворотки к пептидам	Активность с пептидами, Ig*	
	(I)	(V)
(I)	3.25 ± 0.4	3.36 ± 0.4
(II)	3.07 ± 0.5	3.48 ± 0.2
(III)	2.34 ± 0.4	3.20 ± 0.3
(IV)	3.00 ± 0.4	3.66 ± 0.5
(V)	3.15 ± 0.4	3.73 ± 0.4

* См. "Эксперимент. часть".

ционную смесь осаждали 20-кратным избытком эфира и осадок центрифугировали.

После высушивания осадков проводили вторую стадию деблокирования – удаление Tos-групп с остатков Arg смесью TFMSA–TFA–*m*-крезол, 1 : 9 : 1. Реакцию вели 1 ч при 0°C. Осаждение целевых пептидов (I)–(VIII) после второй стадии деблокирования и слабощелочную обработку пептидов (I)–(VI) и (VIII) для обращения возможной N → O-ацильной миграции на остатках Ser и Thr проводили как описано нами ранее [29].

Дипальмитоилированный пептид (VII) после деблокирования осаждали из реакционной смеси 20-кратным избытком эфира. Осадок отделяли центрифугированием, сушили, растворяли в DMF. Пептид из раствора осаждали эфиром, собранный после центрифугирования осадок сушили. Процедуру пересаживания выполняли четырежды, осадок промывали этилацетатом и высушивали при пониженном давлении. Осадок растворяли в 0.5 М водном аммиаке, раствор выдерживали 30 мин при 0°C для осуществления O → N-ацильной миграции. Раствор упаривали досуха. Чистоту пептида анализировали методом ТСХ со следующими системами растворителей: хлористый метилен–этилацетат–этанол, 6 : 3 : 1 (А) и *n*-бутанол–уксусная кислота–пиридин–вода, 15 : 3 : 10 : 6 (Б). Обнаружено незначительное количество примеси. В системе А пятно пептида (VII) на пластине не мигрировало, R_f примесного соединения 0.85. В системе Б R_f пептида (VII) 0.78, R_f примеси 0.90.

Пептиды (I)–(III) и (VI) растворяли в 10% уксусной кислоте и обессоливали на колонках (3 × 50 см) с сефадексом G-10 (Pharmacia, Швеция), уравновешенным 0.1 н. уксусной кислотой. Для обессоливания пептидов (IV) и (V) использовали колонку (3 × 50 см) с сефадексом G-15, уравновешенным 0.1 М ацетатно-аммониевым буфером, pH 7.8. Наличие вещества в собранных фракциях элюата определяли, измеряя оптическое поглощение при 224 нм. Фракции, содержащие пептид, объединяли и лиофилизовали.

Пептиды (I)–(V) очищали на колонке (2 × 50 см) с Toyopearl HW 40S, уравновешенным 0.05 М аммоний-карбонатным буфером, pH 8.5. Пептид (VI) очищали на колонке (1.5 × 30 см) с CM-Toyopearl 650M (Toyo Soda, Япония), элюируя пептид 0.1 М аммоний-ацетатным буфером, pH 4.5.

Обращенно-фазовую ВЭЖХ очищенных пептидов выполняли на хроматографе (Altex, США). Использовали колонку (4.6 × 250 мм) с сорбентом Lichrospher 100 CN-C 8, 5 мкм (Merck, ФРГ). Элюент – градиент концентрации от 10 до 50% ацетонитрила в 0.1% TFA, создаваемый за 30 мин. Оптическое поглощение элюата измеряли при 230 нм. Времена удерживания пептидов при скорости элюции 1 мл/мин указаны в табл. 2.

Пептид (VIII) очищали и анализировали методом микроколоночной гель-хроматографии так же, как аналогичную конструкцию, содержащую

лизиновую матрицу и фрагмент 142-158 VP1 вируса ящера A₂₂550 [29].

Пептиды гидролизовали 1 ч при 150°C в парах HCl в приборе (Millipore Waters, США). Результаты аминокислотного анализа представлены в табл. 2.

Иммунизация морских свинок. Животным массой 0.5 кг вводили внутримышечно препарат, составленный смешением равных объемов масляного адьюванта и раствора пептида в натрий-фосфатном буферном растворе, pH 7.4–7.6. Для первой иммунизации использовали полный адьювант Фрейнда, для второй – неполный адьювант Фрейнда (Difco, США). Реиммунизацию проводили через 42 сут. В случае использования в качестве адьюванта сапонина (Merck, ФРГ) пептид (VII) растворяли в смеси DMSO–0.1 н. уксусная кислота–этанол, 1 : 19 : 5. Сапонин добавляли до концентрации 1%.

Отбор проб крови и контрольное заражение вирусом ящера, адаптированным к морским свинкам, проводили на 14-е сутки после повторной иммунизации. Суспензию, содержащую 500–1000 ИД₅₀ вируса в объеме 0.1 мл, вводили интраплантарно. Результаты учитывали как в работе [20].

Реакцию нейтрализации вируса in vitro ставили, используя монослойную культуру клеток свиной почки [22].

Твердофазный непрямой РИА антипептидных сывороток выполняли на полиэтиленовой пленке (НПО “Пластик”, Москва) по авторской методике [20]. Анализ проводили с постоянным (5 мкг/проба) количеством пептида. Активность выражали через десятичный логарифм величины обратного разведения сыворотки крови, среднеквадратичное отклонение определяемой величины (табл. 4) рассчитывали по пяти измерениям.

Выполнение работы частично финансировалось грантом № 95-03-09557 Российского фонда фундаментальных исследований. Авторы благодарны сотрудникам института Ю.А. Холину за анализ состава синтезированных пептидов, А.А. Луговскому и А.В. Павлову за помощь в проведении экспериментов и А.В. Щербакову за участие в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Laporte J., Grosclaude J., Wantyghem J., Bernard S., Rouce P. // C. R. Acad. Sci. Paris. 1973. V. 276. P. 3399–3401.
2. Meloen R.H., Rowlands D.J., Brown F. // J. Gen. Virol. 1975. V. 45. P. 761–763.
3. Бурдов А.Н., Дудников А.И., Малярец П.В., Иванющенко В.Н., Рахманов А.М., Шажко Ж.А. Ящур. М.: ВО Агропромиздат, 1990.
4. Sobrino F., Martinez M.A., Carrilo C., Beck E. // Virus Res. 1989. V. 14. P. 273–280.

5. Шербаков А.В., Дрыгин В.В., Перевозчикова Н.А., Гусев А.А. // Тез. докл. Всерос. научно-практ. конф. Владимир, 1995. С. 3.
6. Strohmaier K., Franze R., Adam K.H. // J. Gen. Virol. 1982. V. 59. P. 295-306.
7. Гневашев В.М., Кулаков В.Ю., Прунтова О.В., Черняев Ю.А., Бодин Б.Я. // Тез. докл. научн. конф., посвященной 30-летию ВНИИИ. Владимир, 1988. Ч. 1. С. 41-42.
8. Дудников Л.А., Бондаренко А.Ф., Белик Е.В., Глушко Б.А., Овчаренко И.В. // Тез. докл. научн. конф., посвященной 30-летию ВНИИИ. Владимир, 1988. Ч. 2. С. 34-36.
9. Андреев В.Г., Перевозчикова Н.А., Гусев А.А., Коробко В.Г. // Вестн. РАСХН. 1995. № 3. С. 55-58.
10. Horr T.P., Woods K.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 3824-3828.
11. Welling G.M., Weijer W.J., van der Zee R., Welling-Wesier S. // FEBS Lett. 1985. V. 188. P. 215-218.
12. Kute J., Doolittle R.F. // J. Mol. Biol. 1985. V. 157. P. 105-132.
13. Karplus P.A., Schulz G.T. // Naturwissenschaften. 1985. V. 72. P. 212-213.
14. Сосновцев С.В., Онищенко А.М., Петров Н.А., Мамаева Н.В., Калашникова Т.И., Перевозчикова Н.А., Иванющенко В.Н., Бурдов А.Н., Василенко С.К. // Молекулярн. генет., микробиол. и вирусол. 1989. № 12. С. 44-46.
15. Garnier J., Osquithorpe D.J., Robson B. // J. Mol. Biol. 1978. V. 120. P. 97-120.
16. Chou P.Y., Fasman G.D. // Ann. Rev. Biochem. 1978. V. 47. P. 251-276.
17. Tam J.P., Merrifield R.B. // The Peptides. V. 9 / Eds E. Gross, J. Meienhofer. N.Y. etc.: Acad. Press, 1987. P. 185-248.
18. Mitchell A.R., Kent S.B.H., Engelhard M., Merrifield R.B. // J. Org. Chem. 1978. V. 43. P. 2845-2852.
19. Petrov V.N., Rybakov S.S., Petrova O.N., Lugovskoy A.A., Pavlov A.V. // Foot-and-Mouth Dis. Newsletter. 1996. V. 1. P. 9-11.
20. Петров В.Н., Рыбаков С.С., Петрова О.Н., Луговской А.А., Павлов А.В. // Молекулярн. генет., микробиол. и вирусол. 1996. № 3. С. 23-31.
21. Вольпина О.М., Суровой А.Ю., Ульяшин В.В., Иванов В.Т., Чепуркин А.В., Иванющенко В.Н., Бурдов А.Н., Дрягалин Н.Н. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 1363-1371.
22. Суровой А.Ю., Гельфанов В.М., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Чепуркин А.В., Иванющенко В.Н., Дрягалин Н.Н., Бурдов А.Н. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1185-1192.
23. 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. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1193-1205.
24. Павлов А.В., Рыбаков С.С., Иванющенко В.Н., Чепуркин А.В., Петров В.Н., Дрягалин Н.Н., Бурдов А.Н. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 1193-1205.
25. Doel T.R., Gale C., Brooke G., DiMarchi R. // J. Gen. Virol. 1988. V. 69. P. 2403-2406.
26. Семилетов Ю.А., Круглов И.В., Карпова В.А., Яшина Т.А., Фаворов М.О. // Молекулярн. генет., микробиол. и вирусол. 1993. № 4. С. 34-37.
27. Расули А.М., Клепиков Н.Н., Андреев С.М., Сидоров М.В., Вафина М.Г., Сенюта Н.Б., Павлиши О.А., Сырцев А.В., Гурцевич В.Э. // Молекулярн. биология. 1993. Т. 27. С. 880-887.
28. Volpina O.M., Yarov A.V., Zhmak M.N., Kirgiano-va M.A., Chepurkin A.V., Toloknov A.S., Ivanov V.T. // Vaccine. 1996. V. 14. P. 1375-1380.
29. Луговской А.А., Рыбаков С.С., Иванющенко В.Н., Чепуркин А.В., Петров В.Н., Дрягалин Н.Н., Бурдов А.Н. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 942-950.

The Synthesis and Immunogenic Properties of Peptide Fragments of Immunodominant Regions of the VP1 Protein of the Asia-1 type Foot-And-Mouth Disease Virus

V. N. Petrov[#], S. S. Rybakov, O. N. Petrova, A. V. Chepurkin, and V. M. Gulenkin

National Research Institute for Animal Health, Ministry of Agriculture and Food of the Russian Federation, pos. Yur'evets, Vladimir, 600900 Russia

Potential immunodominant epitopes were predicted on the basis of a theoretical analysis of the antigenic structure of the VP1 protein of the type Asia-1 foot-and-mouth disease virus. Peptides corresponding to the 140-153, 136-153, 132-153, 143-157, 137-157, and 193-208 fragments of the VP1 protein sequence were synthesized by the solid phase method, and the immunogenic properties of the peptides were studied on guinea pigs. The shortest peptide exhibiting the protective effect was found to correspond to the 140-153 fragment of the VP1 sequence. The Plm-(Gly)₃-(140-153)-(Gly)₂-Lys(Plm)-Leu and [Ac-(140-153)-(Gly)₃]₈-(Lys)₇-Gly synthetic constructions in combination with adjuvants provided up to 80% protection of immunized animals against infection with the foot-and-mouth disease virus.

Key words: synthetic peptides, antigenic determinants, foot-and-mouth disease virus, radioimmunoassay

[#] To whom correspondence should be addressed; phonelfax: (0922) 24-3675.