



УДК 616-097:577.112.083.3

## СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИСКУССТВЕННЫХ АНТИГЕНОВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА, СООТВЕТСТВУЮЩЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 280–289 БЕЛКА $\beta_2$ -gpI

© 1998 г. М. Е. Палькеева<sup>#</sup>, М. В. Сидорова, А. С. Молокоедов, Т. В. Кузнецова, В. А. Тищенко, А. Г. Кобылянский, Ж. Д. Беспалова, Е. Л. Насонов, Р. П. Евстигнеева\*

Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ,  
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., д. 15а;

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

Поступила в редакцию 27.01.98 г. Принята к печати 11.03.98 г.

Осуществлен синтез ряда искусственных антигенов на основе пептида FC(Asm)KNKEKKS(Asm)S из последовательности белка  $\beta_2$ -гликопротеина I. Получены липофильные аналоги пептида, его конъюгат с BSA и мультиплетный комплекс с лизиновым ядром, содержащий восемь копий пептида. Описаны метод ацилирования пептида остатками жирных кислот на твердой фазе и анализ ацилпептидов методом ВЭЖХ. Проведена оценка антигенных свойств полученных соединений методом CL-ELISA.

*Ключевые слова:* антигенный эпитоп,  $\beta_2$ -гликопротеин I, антитела к кардиолипину, пептиды синтетические, мультиплетные антигенные пептиды, твердофазный синтез.

Гликопротеин плазмы  $\beta_2$ -gpI – фосфолипид-связывающий белок, присутствие которого необходимо для связывания “антифосфолипидных” аутоантител с анионными фосфолипидами, чаще всего с кардиолипином [1]. Механизмы, определяющие взаимодействие аутоантител с фосфолипидами, пока неясны. Существует ряд гипотез о природе антигена, распознаваемого этими антителами. Большинство исследователей полагает, что истинный антиген, с которым реагируют антифосфолипидные антитела при аутоиммунных заболеваниях, – это белок  $\beta_2$ -gpI или его комплекс с фосфолипидом, а не фосфолипид [2–5].

Крилизом с сотр. [5] было исследовано влияние синтетических пептидов, являющихся фраг-

ментами 5-го (С-концевого) домена белка, на связывание аутоантител с кардиолипином и белком  $\beta_2$ -gpI. Было найдено, что пептид, соответствующий участку Cys<sup>281</sup>–Cys<sup>288</sup> белка  $\beta_2$ -gpI, подавляет связывание аутоантител с комплексом белка и кардиолипина в конкурентных тестах [6].

Ряд исследователей полагают, что последовательность Cys<sup>281</sup>–Cys<sup>288</sup> является фосфолипидсвязывающим сайтом белка, в то время как на роль антигенного эпитопа белка  $\beta_2$ -gpI претендует участок Gly<sup>274</sup>–Phe<sup>280</sup> [7] либо Lys<sup>268</sup>–Ser<sup>278</sup> [8].

Нами в предыдущих публикациях были описаны синтез и тестирование ряда пептидов из последовательности белка  $\beta_2$ -gpI, а также аналогов пептида FCKNKEKKS, соответствующего участку Phe<sup>280</sup>–Ser<sup>289</sup> [9, 10]. Было показано, что пептид FC(Asm)KNKEKKS(Asm)S конкурирует с белком за связывание с аутоиммунными антителами [9]. Позднее мы установили, что не только высокий положительный заряд лизиновых остатков, но и специфичность аминокислотной последовательности Phe<sup>280</sup>–Ser<sup>289</sup> обуславливают распознавание ее аутоантителами [10]. В связи с этим можно предположить, что данная последовательность входит в состав антигенного эпитопа белка  $\beta_2$ -gpI.

Попытки изучения антигенных свойств пептида FC(Asm)KNKEKKS(Asm)S (в дальнейшем П5(Asm<sub>2</sub>)) в отсутствие белка  $\beta_2$ -gpI не дали положительного результата, поэтому мы решили с целью повышения антигенных свойств данного пеп-

Использованы сокращения, рекомендованные Номенклатурной комиссией IUPAC-IUB, а также: Asa –  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота; Asm – ацетамидометил; BSA – бычий сывороточный альбумин; CL – кардиолипин; DIPCDI – *N,N'*-диизопропилкарбодиимид; DMAP – 4-диметиламинопиридин; ELISA – метод твердофазного иммуноферментного анализа;  $\beta_2$ -gpI –  $\beta_2$ -гликопротеин I; ESI-MS – масс-спектрометрия с электроспрейным ионным источником; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; HOBt – 1-гидроксибензотриазол; HONSu – *N*-гидроксисукцинимид; MAP – мультиплетный антигенный пептид; PBS – фосфатно-солевой буфер, pH 7.4; Suc – сукцинил; TFS – *N*-трифторацетоксисукцинимид; TFMSA – трифторметансульфоуксид; Cap, Lau, Mup, Palm, Ste – остатки каприновой, лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 414-67-16; факс: (095) 414-67-86; e-mail: Pal'keeva.csc@ias.adonis.msk.ru).

тида синтезировать несколько искусственных антигенов с различной химической структурой на его основе.

Известен ряд способов получения антигенных конструкций: конъюгация с белками, полиаминокислотами, синтетическими полиэлектролитами; включение пептидов, ацилированных высшими жирными кислотами, в состав мицелл [11], синтез мультиплетных антигенных пептидов (МАР) в виде “дендримеров” [12]. Из перечисленных структур МАР имеют ряд преимуществ: наиболее высокую гаптенную плотность, заданную молекулярную структуру; они высокоспецифичны и подобны маленькому белку с молекулярной массой более 10 кДа [12].

Таким образом, цель настоящего исследования – синтез разного типа конструкций на основе пептида П5(Асm<sub>2</sub>): ацилирование с N-конца остатками каприновой, лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот; конъюгация пептида с BSA; синтез октавалентного конъюгата – МАР-П5(Асm<sub>2</sub>), представляющего собой гептализиновое ядро, соединенное с остатком ε-аминокапроновой кислоты в качестве “ножки” и содержащее восемь копий пептида П5(Асm<sub>2</sub>) (схема), а также изучение антигенных свойств полученных соединений.

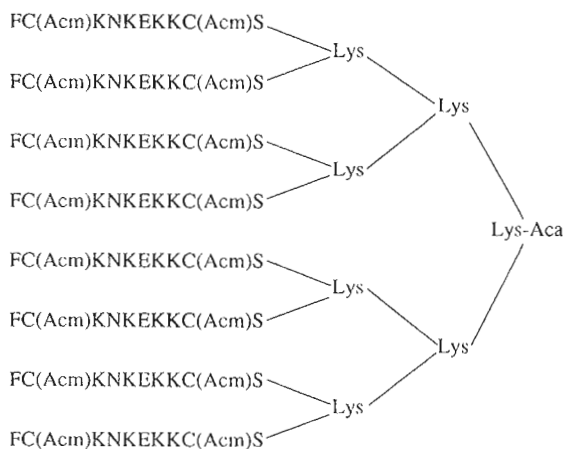


Схема конъюгата МАР-П5(Асm<sub>2</sub>).

Пептид П5(Асm<sub>2</sub>) был синтезирован твердофазным методом в автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 431A с использованием Fmoc-техники, как описано в работе [9]. Было решено модифицировать пептид непосредственно на твердой фазе. Такой способ очень удобен, так как позволяет исчерпывающе провести реакцию ацилирования за счет применения больших избытков ацилирующего агента, одновременно снимая проблему растворимости ацилпептида.

Для подтверждения индивидуальности синтезированного на твердой фазе пептида П5(Асm<sub>2</sub>) было проведено пробное деблокирование небольшо-

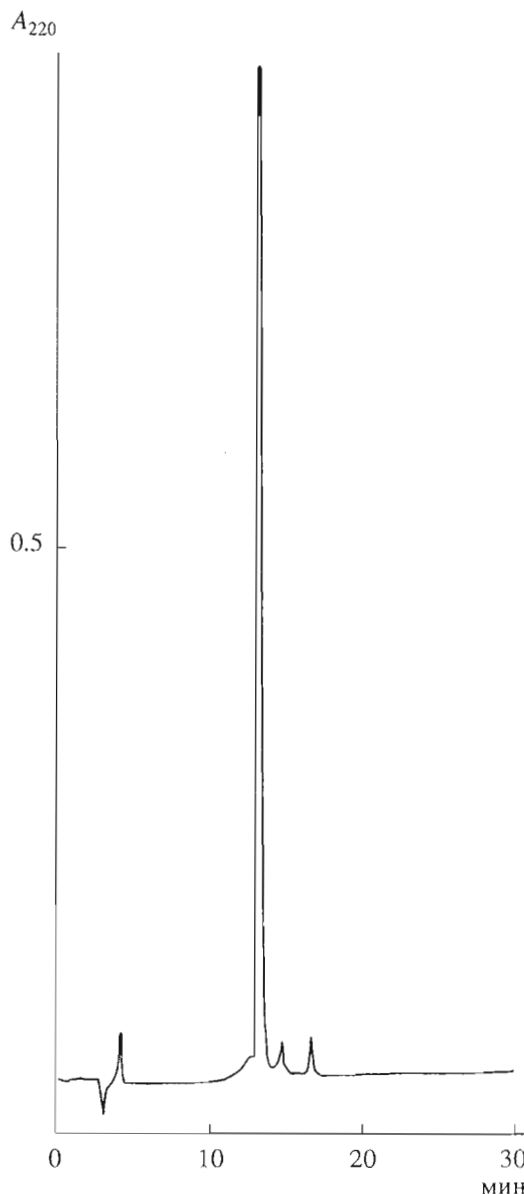


Рис. 1. Профиль ВЭЖХ сырого продукта твердофазного синтеза пептида П5(Асm<sub>2</sub>). Условия: колонка 4.6 × 250 мм, Beckman (Ultrasphere ODS); градиентная элюция буфером Б (0 → 60%, 30 мин) в буфере А. Буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А; скорость элюции 1 мл/мин.

го количества пептидполимера. Сырой продукт был проанализирован методами ВЭЖХ, количественного аминокислотного анализа и масс-спектрометрии, которые показали, что пептид синтезирован с высокой чистотой (94% основного вещества по данным ВЭЖХ, рис. 1) и имеет корректный аминокислотный состав и молекулярную массу.

Остатки жирных кислот присоединяли к П5(Асm<sub>2</sub>)-полимеру в виде соответствующих ONSu-эфиров в присутствии HOBT в автоматичес-

**Таблица 1.** Характеристики *N*-оксисукцинимидных эфиров жирных кислот

Соединение (шифр)	Выход, %	Температура плавления, °С	
		эксп.	лит.(ссылка)
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COONSu (CapONSu)	75.8	67–68	68–69 [13]
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COONSu (LauONSu)	90.1	77–78	76–77 [14]
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COONSu (MyrONSu)	92.0	83.5–85	85–86 [14]
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COONSu (PalmONSu)	94.2	88–89	90 [13]
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COONSu (SteONSu)	66.0	87.5–88	93–94 [14]

**Таблица 2.** Характеристика липофильных аналогов Acyl-П5(Асм<sub>2</sub>)

Acyl	Молекулярная масса, <i>M<sub>r</sub></i>	Данные ESI-MS, [ <i>M</i> + <i>H</i> ] <sup>+</sup>	ВЭЖХ, <i>R<sub>t</sub></i> , мин	ТСХ, <i>R<sub>f</sub></i>		Выход*, %
				А	Б	
Cap	1510.5	1511.5	9.38	0.31	0.27	46.9
Lau	1538.5	1540.2	11.64	0.34	0.30	50.8
Myr	1566.6	1567.2	13.51	0.35	0.32	54.5
Palm	1594.6	1595.4	15.71	0.37	0.33	49.1
Ste	1622.7	1623.4	17.18	0.39	0.35	44.8

\* Выход приведен в расчете на стартовую аминокислоту пептида.

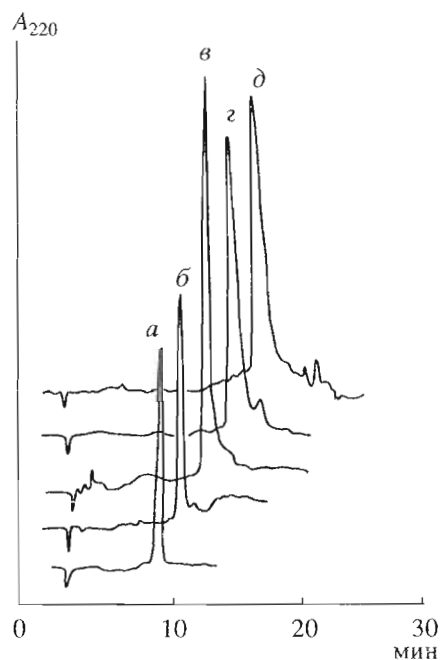
ком твердофазном синтезаторе Applied Biosystems 431A. ONSu-эфир стеариновой кислоты был получен реакцией ее хлорангидрида с *N*-гидроксисукцинимидом, а ONSu-эфиры остальных жирных

кислот синтезировали с помощью *N*-трифторацетоксисукцинимида (реagenta Сакакибары) [13] (табл. 1). Индивидуальность полученных липофильных *N*<sup>α</sup>-производных пептида П5(Асм<sub>2</sub>) [Acyl-П5(Асм<sub>2</sub>)] была подтверждена методами ТСХ и ВЭЖХ на обращенной фазе; анализ синтезированных веществ методом масс-спектрометрии показал, что молекулярные массы соответствуют ожидаемым значениям (табл. 2). Таким образом, примененный нами метод синтеза позволяет получать подобные соединения с высокой чистотой.

Следует отметить, что анализ липофильных ацильных производных пептидов методом ВЭЖХ особенно проблематичен вследствие их высокой гидрофобности, затрудняющей десорбцию с обращенно-фазных носителей, стандартно используемых при анализе пептидов. Нам удалось проанализировать ацильные производные пептида П5(Асм<sub>2</sub>) на носителе Лихросорб RP-2 (рис. 2).

Конъюгат BSA с пептидом П5(Асм<sub>2</sub>) получали реакцией *N*-оксисукцинимидного эфира сукцинированного белка с Асм-защищенным пептидом; активированный эфир BSA синтезировали с помощью реagenta Сакакибары по методике, приведенной в работе [13]. Эпитопную плотность конъюгата рассчитывали по данным аминокислотного анализа, она составила 0.065 мкмоль пептида на 1 мг конъюгата.

Синтез конъюгата MAP-П5(Асм<sub>2</sub>) был осуществлен твердофазным методом, предложенным Тамом [12], с использованием Fmoc-техники. В качестве твердофазной подложки использовался *n*-алкоксибензильный полимер ("смола



**Рис. 2.** Профили ВЭЖХ липофильных аналогов Acyl-П5(Асм<sub>2</sub>): а – Cap-П5(Асм<sub>2</sub>); б – Lau-П5(Асм<sub>2</sub>); в – Myr-П5(Асм<sub>2</sub>); г – Palm-П5(Асм<sub>2</sub>); д – Ste-П5(Асм<sub>2</sub>). Условия: колонка 4.6 × 250 мм, Alltech (Lichrosorb RP-2); градиентная элюция буфером Б (30 → 90%, 30 мин) в буфере А. Буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А; скорость элюции 1 мл/мин.

Ванга”) с содержанием гидроксиметильных групп 0.45 ммоль/г. В качестве “ножки” использовали  $\epsilon$ -аминокапроновую кислоту, остаток которой вводили в полимер в виде Fmoc-производного. Количество реагентов брали с таким расчетом, чтобы получить полимер со степенью замещения 0.04 ммоль/г. Конденсацию Fmoc-Аса-ОН с полимером осуществляли с помощью эквивалентных количеств DIPCDI и DMAP. Оставшиеся свободными гидроксиметильные функции полимера ацетилировали действием уксусного ангидрида (10-кратного избытка) в присутствии DIPEA. Синтез разветвленного гептализинового ядра проводили в сосуде для ручного твердофазного синтеза в DMF. Каждый новый уровень ядра получался путем введения  $N^\alpha, N^\epsilon$ -ди-Fmoc-лизина. Содержание  $NH_2$ -групп носителя по уровням возрастало по схеме 0.04  $\rightarrow$  0.08  $\rightarrow$  0.16  $\rightarrow$  0.32 ммоль/г за счет удвоения количества реакционноспособных  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -аминогрупп лизина после деблокирования (схема).

Активацию Fmoc-Lys(Fmoc)-ОН (10-кратный избыток) проводили в присутствии эквивалентного количества DIPCDI/HOBt в DMF. Fmoc-группу после каждого шага синтеза отщепляли действием 30% пиперидина в DMF. Конечное содержание аминогрупп в полимере, определенное с помощью спектрофотометрии [15], составило 0.31 ммоль/г, что близко к ожидаемому.

Полученный (Fmoc<sub>8</sub>Lys<sub>7</sub>)Аса-полимер далее использовали в качестве подложки для твердофазного синтеза конъюгата MAP-П5(Асм<sub>2</sub>). Синтез проводили в автоматическом синтезаторе Milligen Biosearch 9600 по стандартной программе с использованием Fmoc-стратегии.

Попытка отщепления целевого продукта от полимера действием TFA оказалась неудачной и привела к 10% выходу вещества. Повторная обработка MAP-П5(Асм<sub>2</sub>)-полимера смесью TFA с 10% TFMSA в присутствии тиоанизола дала возможность полностью отщепить целевой продукт от полимера.

Для очистки MAP-П5(Асм<sub>2</sub>) были применены последовательный диализ против 0.9% NaCl, затем против воды, а также гель-фильтрация на сефадексе G-50. Продукт гель-фильтрации был гомогенен и не содержал высокомолекулярных примесей и солей. Очищенный мультиплетный комплекс был охарактеризован данными количественного аминокислотного анализа.

Вследствие низкой аффинности и высокой гетерогенности антифосфолипидных антител связывание их с белком в растворе (в отсутствие кардиолипина) незначительно [16]. Поэтому в настоящее время наиболее разработанным (стандартизованным) методом изучения антигенных свойств белка  $\beta_2$ -gpI и поиска его антигенных эпитопов является метод CL-ELISA, использующий в качестве анти-



Рис. 3. Связывание антикардиолипидных антител с кардиолипином: в присутствии белка  $\beta_2$ -gpI (контрольный эксперимент) (а); конъюгата MAP-П5(Асм<sub>2</sub>) (б); конъюгата BSA-П5(Асм<sub>2</sub>) (в); белка  $\beta_2$ -gpI и конъюгата MAP-П5(Асм<sub>2</sub>) (г); белка  $\beta_2$ -gpI конъюгата и BSA-П5(Асм<sub>2</sub>) (д). Представлены усредненные результаты 4 экспериментов ( $\pm$  стандартная ошибка метода).

гена комплекс белка  $\beta_2$ -gpI с кардиолипином [1]. Мы применили данный метод для оценки антигенных свойств синтезированных соединений как в отсутствие белка  $\beta_2$ -gpI, так и в конкурентном тесте. В качестве источника антикардиолипидных антител была использована плазма больного с тяжелыми проявлениями антифосфолипидного синдрома, имеющая высокий титр IgG, реагирующих с кардиолипином только в присутствии белка  $\beta_2$ -gpI.

К сожалению, оценить антигенность  $N^\alpha$ -ацильных производных П5(Асм<sub>2</sub>) нам не удалось, так как жирные кислоты и ацилпептиды плохо растворялись в водных буферных системах, используемых в данном методе анализа, и полученные результаты было трудно интерпретировать.

Степень связывания конъюгата MAP-П5(Асм<sub>2</sub>) с аутоантителами, как и для белка  $\beta_2$ -gpI, составила 103% (рис. 3а, 3б), в то время как пептид П5(Асм<sub>2</sub>) в составе конъюгата с BSA не проявил антигенной активности (рис. 3в). В присутствии белка  $\beta_2$ -gpI конъюгаты BSA-П5(Асм<sub>2</sub>) и MAP-П5(Асм<sub>2</sub>) подавили связывание гликопротеина с аутоантителами на 36% (рис. 3г, 3д).

Полученные нами данные подтверждают, что пептид П5(Асм<sub>2</sub>) соответствует одному из антигенных эпитопов белка  $\beta_2$ -gpI. Основной причиной проявления разной активности конъюгатами BSA-П5(Асм<sub>2</sub>) и MAP-П5(Асм<sub>2</sub>) в реакции с аутоантителами в отсутствие белка  $\beta_2$ -gpI может быть различие в химической структуре данных соединений. Так, в конъюгате BSA-П5(Асм<sub>2</sub>) пептид присоединен к белку преимущественно через  $\alpha$ - и частично  $\epsilon$ -аминогруппы, в то время как к лизиновому ядру мультиплетного антигена молекулы пептида присоединены своими С-концевыми карбоксильными группами, что, вероятно, позволяет полностью реализовать специфичность аминокислотной последовательности пептида П5(Асм<sub>2</sub>).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *L*-аминокислоты и их производные фирм Reanal (Венгрия), Bachem, Fluka (Швейцария), жирные кислоты ("Реахим", Россия), BSA (Sigma, США), *N*-оксисукцинимид и стеарилоилхлорид (Fluka, Швейцария), полимер Ванга (Bachem, Швейцария) с содержанием гидроксиметильных групп 0.45 ммоль/г.

*N*-Трифторацетоксисукцинимид, *N*-оксисукцинимидные эфиры жирных кислот и сукцинилированного производного BSA синтезировали по методикам [13].

ТСХ осуществляли на хроматографических пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в системах растворителей бутанол – пиридин – уксусная кислота – вода, 21 : 12 : 2 : 15 (А); бутанол – пиридин – уксусная кислота – вода, 30 : 20 : 6 : 2 (Б). Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлорбензидинового реагента или иода.

DMF перегоняли над нингидрином и окисью бария, хлористый метилен промывали концентрированной серной кислотой и водой, сушили над CaCl<sub>2</sub>, перегоняли над CaCl<sub>2</sub>, затем над гидридом кальция. Использовали пиперидин, DMAP и DIPCDI фирмы Applied Biosystems (США).

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

Температуру плавления (нескорректированную) определяли на нагревательном столике Воетиус (Германия). Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных 6 н. HCl с 2% тиогликолевой кислоты при 110°C в течение 24 ч, проводили на автоматическом анализаторе Biotronik LC 5001 (Германия). Цистеин не определяли.

Аналитическую ВЭЖХ пептида П5(Асм<sub>2</sub>) осуществляли на приборе Gilson (Франция) на колонке (4.6 × 250 мм) Beckman (Ultrasphere ODS); липофильные аналоги Асул-П5(Асм<sub>2</sub>) анализировали на колонке (4.6 × 250 мм) Alltech (Lichrosorb RP-2) (рис. 1, 2).

Для диализа использовали фильтр Spectrapor (США) с пределом эксклюзии 6-8 кДа.

Анализ внедрения стартовой аминокислоты в полимер осуществляли с помощью спектрометра Shimadzu UV-260 (Япония) при 301 нм.

Масс-спектрометрию выполняли методом ESI-MS на квадрупольном масс-спектрометре Finnigan MAT TSQ 700 (Германия) с электроспрейным (API) ионным источником (Finnigan MAT).

***N*-Оксисукцинимидный эфир стеариновой кислоты.** К раствору 1.7 г (15 ммоль) HONSu в хлористом метиле прибавляли 1.4 мл (13 ммоль) *N*-метилморфолина и через 1 мин 3.3 мл (10 ммоль) хлорангидрида стеариновой кислоты. Реакционную смесь перемешивали 15 мин. Растворитель

упаривали, остаток промывали на фильтре водой, 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой и этанолом. Осадок переосаждали из изопропилового спирта гексаном, отфильтровывали и сушили в вакууме. Выход 2.5 г (66.0%). Т. пл. 87.5-88°C.

Оксисукцинимидные эфиры остальных жирных кислот получали с помощью *N*-трифторацетоксисукцинимидом [13] (табл. 1).

**Твердофазный синтез пептида П5(Асм<sub>2</sub>)** осуществляли методом, описанным в работе [9]. Аминокислотный состав: N 1.1 (1), S 0.6 (1), E 1.2 (1), F 1.0 (1), K 3.7 (4). Cys не определяли. C<sub>51</sub>H<sub>87</sub>N<sub>15</sub>O<sub>15</sub>S<sub>2</sub>. M<sub>r</sub> 1356.6 (свободное основание), ESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> 1357.3; R<sub>t</sub> 12.92 мин.

**Типовая методика синтеза липофильных аналогов Асул-П5(Асм<sub>2</sub>).** 0.1 г декапептидилполимера H-FC(Асм)K(Вос)NK(Вос)E(OBu<sup>t</sup>)K(Вос)K(Вос)C-(Асм)S(Bu<sup>t</sup>)-P, содержащего 0.05 ммоль пептида, промывали DMF (5 × 1 мин) и перемешивали 12 ч с раствором 0.5 ммоль соответствующего *N*-оксисукцинимидного эфира жирной кислоты и 0.5 ммоль HOBT в 3 мл DMF. Пептидилполимер отфильтровывали, промывали DMF (1 мин × 5), DCM (1 мин × 5) и сушили. Полноту ацилирования контролировали с помощью нингидринового теста. При необходимости конденсацию повторяли в тех же условиях. Для отщепления ацилпептида от носителя соответствующий пептидилполимер обрабатывали 5 мл смеси TFA-H<sub>2</sub>O (9.5 : 0.5) и перемешивали 2 ч при 20°C. Полимер отфильтровывали, промывали TFA (2 × 1 мл), фильтрат упаривали, маслообразный остаток растирали с сухим эфиром, осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили (табл. 2).

**Конъюгат Suc-BSA-П5(Асм<sub>2</sub>).** К раствору 20 мг Suc-BSA-ONSu в 0.2 мл DMF прибавляли 0.020 мл 10% раствора *N*-метилморфолина в DMF и раствор 2 мг пептида П5(Асм<sub>2</sub>) в 0.2 мл DMF и перемешивали 24 ч при 20°C. Для отщепления остаточных ONSu-групп реакционную смесь перемешивали 30 мин с 0.020 мл 25% водного раствора аммиака, разбавляли дистиллированной водой до объема 20 мл и диализовали последовательно против 5 л 0.9% раствора хлористого натрия и 5 л воды. Получено 0.021 г конъюгата. Эпитопная плотность составила 0.065 ммоль пептида на 1 г конъюгата (определено на основании сравнения количественных аминокислотных анализов гидролизатов конъюгата и сукцинилированного BSA).

**Фмос-Аса-полимер.** К 3 г предварительно промытого смесью DMF/DCM (1 : 1) полимера Ванга (содержание гидроксиметильных групп 45 ммоль/г) прибавляли раствор 0.095 г (0.27 ммоль) *N*-Фмос-аминокапроновой кислоты в 10 мл смеси DMF/DCM (1:1), 0.042 мл (0.27 ммоль) DIPCDI и 2.7 мл 0.1 М раствора DMAP в DMF и перемешивали 2 ч при 20°C. Полимер отфильтровывали,

промывали (3 × 20 мл) смесью DMF/DCM (1 : 1), DCM (3 × 20 мл), MeOH (3 × 20 мл) и сушили. Степень замещения аминокислотного полимера, определенная спектрофотометрически [15], составила 0.04 ммоль/г. Незамещенные гидроксильные функции носителя ацетилировали 30 мин при 20°C смесью 1.2 мл уксусного ангидрида и 2.0 мл DIPEA в 20 мл DMF.

**(Fmoc<sub>8</sub>Lys<sub>7</sub>)Аса-полимер.** Синтез октавалентного лизинового ядра проводили ступенчато в сосуде для ручного твердофазного синтеза с использованием 2.50 г (0.10 ммоль) Fmoc-Аса-полимера. Каждый новый уровень ядра получали добавлением 10-кратного избытка Fmoc-Lys(Fmoc)-ОН в присутствии эквивалентных количеств НОВt и DIPCDI (1.0, 2.0, 4.0 ммоль последовательно). Синтетический цикл включал в себя: 1) 25-мин активацию Fmoc-Lys(Fmoc)-ОН; 2) деблокирование аминокислотных групп полимера 30% раствором пиперидина в DMF в течение 20 мин; 3) 2-ч конденсацию с активированным Fmoc-ацилирующим агентом; для промывки полимера использовали DMF (5 мин × 5). Полноту конденсации определяли с помощью бромфенолового синего [17] и нингидринового теста.

По окончании синтеза (Fmoc<sub>8</sub>Lys<sub>7</sub>)Аса-полимер промывали на фильтре хлористым метилом и сушили в вакуум-эксикаторе. Содержание аминокислотных групп полимера (определено спектрофотометрически [15]) составило 0.31 ммоль/г.

**Твердофазный синтез конъюгата MAP-P5(Асм<sub>2</sub>)** осуществляли в автоматическом твердофазном синтезаторе Milligen Biosearch 9600 с использованием 0.5 г (Fmoc<sub>8</sub>Lys<sub>7</sub>)Аса-полимера (0.16 ммоль) аналогично синтезу пептида P5(Асм<sub>2</sub>), описанному в работе [9].

По окончании синтеза N<sup>α</sup>-Fmoc-аминогруппу деблокировали 30% пиперидином в смеси DMF – толуол (1 : 1), пептидилполимер промывали на фильтре хлористым метилом и сушили в вакуум-эксикаторе. Высушенный пептидилполимер (0.2 г) обрабатывали смесью TFA с 10% TFMSA и 0.5% тиаоизола при 0°C и перемешивали 3 ч при комнатной температуре. Полимер отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме при 40°C. Остаток растирали с холодным сухим эфиром, отфильтровывали, растворяли в воде и диализовали против 5 л 0.9% NaCl, затем против 5 л воды не менее 3 раз, полученный продукт лиофилизировали. Выход 0.041 г (43.1% в расчете на ε-аминокапроновую кислоту). Аминокислотный состав (в расчете на одну копию пептида): D 0.95 (1), S 0.65 (1), E 1.02 (1), F 1.00 (1), K 4.80 (5). Cys не определяли.

**Тестирование искусственных антигенов с помощью метода CL-ELISA.** Кардиолипид сорбирова-ли на плашку (PVC, Flow Laboratories, Нидерланды) из этанольного раствора (50 мкг/мл) и выдер-

живали в течение ночи при 4°C до полного удаления спирта. Места неспецифического связывания кардиолипидов блокировали инкубацией с раствором 1% порошкового молока (“Очаково”) и 0.3% желатины в PBS (pH 7.4) в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве источника IgG использовали плазму больного с антифосфолипидным синдромом. В контрольном эксперименте определяли степень связывания антител с кардиолипином при добавлении белка β<sub>2</sub>-gpI, принятую за 100% (ОП = 0.70 ± 0.04 опт. ед. при А 492 нм). Реакцию антиген – антитело проводили, добавляя в лунки по 50 мкл смеси, содержащей: 1) 15 мкг IgG, очищенных на колонке Hi Trap Protein A-Sepharose (Pharmacia, Швеция) по методике, приведенной в работе [18]; 2) 50 мкг искусственного антигена. Результаты отражены на рис. 3а–3в.

Связывание антикардиолипидных антител с комплексом кардиолипидов и белка β<sub>2</sub>-gpI в присутствии искусственных антигенов изучали, добавляя в лунки 6.6 мкг белка β<sub>2</sub>-gpI, выделенного из сыворотки крови здоровых доноров по методике [1] (рис. 3г, 3д). Все компоненты предварительно растворяли в PBS (pH 7.4), содержащем 1% порошковое молоко. Плашки инкубировали 3 ч при комнатной температуре. Иммуновый комплекс проявляли, добавляя 50 мкл раствора IgG-фракции козьих моноспецифических антител к IgG человека, меченных пероксидазой хрена (Sigma, США), с последующей инкубацией в тех же условиях. После каждой инкубации плашку трижды отмывали PBS.

Пероксидазную реакцию проводили в растворе хромогенного субстрата, содержащего орто-фенилендиамин и перекись водорода. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл серной кислоты и регистрировали оптическое поглощение при 492 нм.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-49338).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McNeil H., Simpson R., Krilis S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 4120–4124.
2. Jones J. // J. Rheumatol. 1992. V. 19. P. 1774–1777.
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. Matsuura E., Igarashi Y., Yasuda T., Triplett D., Koike T. // J. Exp. Med. 1994. V. 179. P. 457–462.
5. Hunt J., Simpson R., Krilis S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 2141–2145.
6. Hunt J., Krilis S. // J. Immunol. 1994. V. 152. P. 653–659.
7. Wang M., Kandiah D., Ichikawa K., Khamashta M., Hughes G., Koike T., Roubey R., Krilis S. // J. Immunol. 1995. V. 155. P. 1629–1636.

8. Lauer S., Hempel U., Gries A., Frank K. // Immunology. 1993. V. 80. P. 22–28.
9. Палькеева М.Е., Сидорова М.В., Кузнецова Т.В., Кобылянский А.Г., Тищенко В.А., Насонов Е.Л., Беспалова Ж.Д., Евстигнеева Р.П. // Биооргани. химия. 1996. Т. 22. С. 678–685.
10. Евстигнеева Р.П., Беспалова Ж.Д., Палькеева М.Е. // Докл. РАН. 1998. В печати.
11. Костина Г.И., Сидорова М.В., Андреев С.М., Фомина Л.А., Хаитов Р.М. // Молекуляр. иммунология и иммуногенетика. 1989. № 30. С. 20–24.
12. Tam J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 5409–5413.
13. Андреев С.М., Сидорова М.В., Ракова О.А., Цветков Д.Е., Фомина Л.А. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. С. 696–700.
14. Paquet A. // Can. J. Chem. 1979. V. 57. P. 2775–2778.
15. Fields G., Noble R. // Int. J. Pept. Protein Res. 1990. V. 35. P. 161–214.
16. Roubey R. // Arthr. Rheumat. 1996. V. 39. P. 1444–1454.
17. Krchnak V., Vagner J., Safar P., Lebl M. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1988. V. 53. P. 2542–2548.
18. Johnstone A., Thorpe R. Immunochimistry in Practice. Blackwell Sci. Publ., 1982.

## The Synthesis and Biological Properties of Artificial Antigens on the Basis of the 280–289 Fragment of $\beta_2$ -Glycoprotein I

**M. E. Pal'keeva\*<sup>#</sup>, M. V. Sidorova\*, A. S. Molokoedov\*, T. V. Kuznetsova\*, V. A. Tishchenko\*, A. G. Kobylanskiy\*, Zh. D. Bepalova\*, E. L. Nasonov\*, and R. P. Evstigneeva\*\***

\*Russian Cardiological Scientific Center, Russian Ministry of Health,  
ul. Tret'ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia

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

A series of artificial antigens were synthesized on the basis of the FC(Acm)KNKEKKC(Acm)S peptide from the  $\beta_2$ -glycoprotein I sequence: lipophilic analogues, the peptide-BSA conjugate, and multiple antigen peptide (MAP) containing eight copies of the peptide on an oligolysyl core. The solid phase method for acylation of the peptide with fatty acids and the HPLC analysis of the acylpeptides were described. Antigenic properties of the resulting compounds were evaluated by CL-ELISA.

*Key words:* antigenic epitope;  $\beta_2$ -glycoprotein I; cardiolipin antibodies; synthetic peptides; multiple peptide antigens; solid phase synthesis

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 414-6716; fax: +7 (095) 414-6786;  
e-mail: pal'keeva.csc@ias.adonis.msk.ru.