



УДК 557.112.083.3:615.371

## СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ИММУНОАКТИВНЫХ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА VP<sub>1</sub> ВИРУСА ЯЩУРА ШТАММА A<sub>22</sub>

© 2000 г. М. А. Куприянова<sup>#</sup>, М. Н. Жмак, Д. О. Короев,  
А. В. Чепуркин\*, О. М. Вольпина, В. Т. Иванов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных, Владимир

Поступила в редакцию 13.06.2000 г. Принята к печати 15.08.2000 г.

На основе иммуноактивных фрагментов (135–159), (170–190) и (197–213) белка VP<sub>1</sub> вируса ящура штамма A<sub>22</sub> синтезированы пептидные конструкции, содержащие от 44 до 53 а.о. Изучены иммуногенные и протективные свойства пептидных конструкций в экспериментах на мышах трех линий и на морских свинках. Показано, что конструкции обладают способностью индуцировать более высокий уровень антител и проявляют большую протективную активность, чем входящие в их состав пептиды. В ряду изученных пептидов наибольшей активностью обладает конструкция, включающая фрагменты VP<sub>1</sub>-(135–160) и VP<sub>1</sub>-(170–190). Показано, что данная конструкция обеспечивает защиту свиней от заболевания при экспериментальном заражении их вирусом ящура.

*Ключевые слова:* пептиды, синтетические конструкции; иммуногенность, протективный эффект; вирус ящура.

### ВВЕДЕНИЕ

Одно из перспективных направлений в создании противовирусных вакцин нового поколения – синтез пептидных конструкций, включающих набор фрагментов вирусных белков, способных при введении в организм имитировать развитие противовирусного иммунного ответа [1]. Для использования такого подхода необходима информация о структуре иммуноактивных участков вирусных белков и поиск наиболее эффективных методов их представления в виде единой молекулы.

Одним из наиболее изученных в иммунологическом и вирусологическом аспектах к настоящему времени является вирус ящура. Вирус ящура относится к семейству пикорнавирусов, его капсид образован четырьмя белками. Белок VP<sub>1</sub> со-

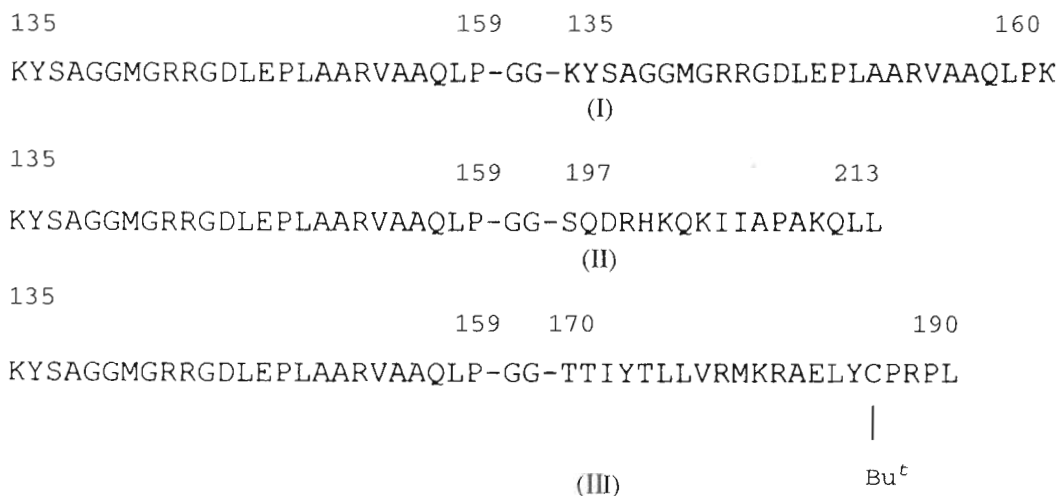
держит главные иммуноактивные участки, ответственные за индукцию противоящурной защиты. Основной и минорный иммуногенные районы VP<sub>1</sub>, соответственно 135–160 и 200–213, содержат вируснейтрализующие В-эпитопы [2]. Т-хелперные участки VP<sub>1</sub> вируса локализованы в последовательностях 20–41 [3] и 170–189 белка [4]. В литературе описан ряд синтетических пептидных конструкций, включающих различные сочетания фрагментов В-эпитопов белка (135–160), (200–213) и Т-эпитопа (20–41). Однако иммунизация этими препаратами природновосприимчивых к ящуру животных – овец и крупного рогатого скота не приводила к индукции устойчивого протективного эффекта [5, 6]. Ранее нами была получена пептидная конструкция, ацилированная по N-концу пальмитиновой кислотой и включающая основной иммуногенный район 135–158 и Т-эпитоп 170–188, которая проявила протективную активность в испытаниях на овцах и на крупном рогатом скоте [7].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель настоящей работы – изучение вклада различных иммуноактивных участков белка VP<sub>1</sub> вируса ящура штамма A<sub>22</sub> в развитие протективного иммунитета и создание высокоактивных противоящурных пептидных препаратов. В работе был использован вирус штамма A<sub>22</sub>, вакцина-

Сокращения: Acst – ацетамидометил; DIPC – N,N'-диизопротилкарбодимид; DIEA – N-диизопропилэтиламин; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DMS – диметилсульфид; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; НОВТ – 1-гидроксibenзотриазол; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; PBS – 0.01 M Na-фосфатный буфер (рН 7.4); ТВТУ – тетрафторборат 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилмочевины; МНС – главный комплекс гистосовместимости; НМРВ–МВНА – 4-метилбензгидриламид 4-гидроксиметил-3-метоксифеноксипутановой кислоты; ПАФ – полный адъювант Фрейнда; НАФ – неполный адъювант Фрейнда; ТПА – титр противопептидных антител; ТВА – титр вируснейтрализующих антител.

<sup>#</sup>Автор для переписки (тел.: (095) 336-57-77; e-mail: fmdv@ibch.ru).



Синтетические пептидные конструкции. Показаны номера остатков соответствующих фрагментов белка VP<sub>1</sub> вируса ящура.

ция против которого актуальна для многих районов России. Исследовано включение в пептидные конструкции трех участков белка VP<sub>1</sub>: 135–159, 170–190 и 197–217. Ранее нами было установлено, что иммунодоминантный фрагмент (135–159) белка VP<sub>1</sub> содержит вируснейтрализующие В-эпитопы и вирусспецифические Т-эпитопы [8] и защищает животных от заболевания ящуром [9]. Участок 170–189 содержит вирусспецифический Т-эпитоп, однако в последовательности этого фрагмента отсутствуют вируснейтрализующие В-эпитопы [4]. С-Концевой участок 197–213 белка, содержащий минорный вируснейтрализующий В-эпитоп, способен индуцировать частичную защиту животных от заболевания лишь после конъюгации с белком-носителем [10].

В настоящей работе были синтезированы три пептидные конструкции (I)–(III), включающие перечисленные иммуноактивные участки белка VP<sub>1</sub> (рисунок). Все пептидные конструкции содержат основной иммуногенный район 135–159, соединенный через диглициновый мостик с различными иммуноактивными участками белка VP<sub>1</sub>.

Конструкция (I) содержит две копии основного иммуногенного района. Такая конструкция получена с целью более эффективного представления иммунной системе протективного участка 135–159, а также для сравнительного анализа активности данной конструкции и других синтетических конструкций с близкими значениями молекулярной массы.

В конструкцию (II) включены основной и минорный иммуногенные участки. Конструкция синтезирована в расчете на дополнительный вклад в протективную активность минорного иммуногенного района 197–213, к которому возможно образование вируснейтрализующих антител при его

представлении иммунной системе в сочетании с Т-хелперным эпитопом участка 135–159. Кроме того ранее была описана высокая противоящурная активность пептидных конструкций, содержащих эти две последовательности [11].

Пептидная конструкция (III) содержит кроме иммунодоминантного участка 135–159 вирусспецифический Т-хелперный эпитоп 170–190, включенный в конструкцию для усиления образования вируснейтрализующих антител против фрагмента 135–159. Конструкция (III) сходна с описанной нами ранее конструкцией Palm-(135–158)-GGA-(170–188)-Asn [7]. Основное различие этих двух соединений заключается в отсутствие остатка пальмитиновой кислоты на N-конце пептида (III), что позволяет исключить влияние пальмитоильной группы на иммуногенность конструкции. Боковая функция остатка Cys186 защищена в конструкции (III) *тrem*-бутильной группой для предотвращения ее окисления, приводящего к химической неоднородности конечного продукта.

Входящие в пептидные конструкции исходные фрагменты (135–160), (170–190) и (197–213) получали отдельно для сравнения их иммуногенных и противоящурных свойств со свойствами соответствующих конструкций.

Пептиды получены твердофазным методом в ручном варианте. Защитные группы боковых функциональных групп аминокислотных остатков выбраны с расчетом на конечное деблокирование TFA. Для защиты боковых функций остатков Thr, Tyr, Ser, Cys использовали Bu<sup>t</sup>-группу, для Asp, Glu – OBU<sup>t</sup>-группу, для Lys – Boc, для Arg – Pbf, для His – Trt-группы. В качестве временной N<sup>α</sup>-защиты служила Fmoc-группа.

Пептиды (135–160), (170–190) и (197–213) получали последовательным наращиванием пептидной

**Таблица 1.** Иммуногенная активность пептидных конструкций (I)–(III) и исходных фрагментов белка VP<sub>1</sub> вируса ящура в экспериментах на мышах различных линий

Иммуноген	Титр противопептидных антител, –lg		
	C57/Bl	СВА/J	Valb/c
135–160	3.2	<1.0	3.2
170–190	4.5	4.5	4.1
197–213	<1.0	<1.0	<1.0
Конструкция (I)	3.1	<1.0	3.5
Конструкция (II)	1.6	4.1	3.1
Конструкция (III)	4.5	5.1	4.2

**Таблица 2.** Иммуногенная активность пептидных конструкций (I)–(III) в экспериментах на морских свинках

Иммуноген	Антиген на планшете	ТПА, –lg	ТВА, –log <sub>2</sub>
Конструкция (I)	135–160	4.5	3.5
	Конструкция (I)	4.5	
Конструкция (II)	135–160	4.5	3.5
	197–213	<1.0	
Конструкция (III)	Конструкция (II)	4.8	
	135–160	4.8	6.0
	170–190	<1.0	
	Конструкция (III)	5.1	

цепи с С-конца на *n*-алкоксибензильном полимере ТВТУ-методом, используя пятикратный избыток аминокислоты.

Пептидные конструкции получали блочной конденсацией фрагментов VP<sub>1</sub>-(135–145) и VP<sub>1</sub>-(146–159)-GG, которые синтезировали последовательным наращиванием пептидной цепи на кислоталабильном НМРВ–МВНА-полимере. Защищенные фрагменты затем отщепляли от полимерного носителя обработкой 1% TFA и последовательно присоединяли ТВТУ-методом к защищенным пептидил-полимерам (135–160)-OP, (170–190)-OP или (197–213)-OP (где P – *n*-алкоксибензильный полимер), используя 3-кратные избытки фрагментов.

Отщепление синтезированных пептидов от полимера с одновременным деблокированием осуществляли смесью TFA с добавками, предотвращающими протекание побочных реакций. После деблокирования пептиды обессоливали с помощью гель-фильтрации и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Индивидуальность полученных соединений подтверждена данными аминокислотного анализа, масс-спектрометрии и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Сравнительный анализ способности синтезированных пептидных конструкций стимулировать

образование антител был проведен на мышах трех линий C57/Bl, СВА/J и Valb/c, различающихся типом H-2-локуса МНС (b, k и d соответственно). Мышей дважды иммунизировали незащищенными пептидами без их конъюгации с белком-носителем. Полученные сыворотки исследовали методом ИФА на связывание с незащищенными пептидами, нанесенными на планшет. Данные представлены в табл. 1.

Результаты исследований показали, что фрагмент (135–160) вызывал образование противопептидных антител у мышей двух линий и не был активен на мышах линии СВА/J. Пептид (170–190) проявил высокую иммуногенную активность на мышах всех трех линий, а пептид (197–213) не индуцировал образования антител ни на одной линии мышей. Пептидная конструкция (I) индуцировала у мышей всех трех линий такой же уровень антител, как и исходный пептид (135–160). Конструкция (II) была высокоиммуногенна на мышах СВА/J, т.е. по сравнению с исходным неактивным на мышах СВА/J фрагментом (135–160) обладала более широкой МНС-специфичностью. Однако у мышей линии C57/Bl титр противопептидных антител к конструкции (II) был несколько ниже, чем к фрагменту (135–160). Пептидная конструкция (III) проявила значительно более высокую активность на мышах всех трех линий, чем исходный фрагмент (135–160). Поскольку конструкция индуцировала практически такой же уровень антител, как и входящий в него пептид (170–190), можно полагать, что именно этот участок, содержащий мощный Т-хелперный эпитоп, обеспечил высокую иммуногенную активность конструкции (III).

Таким образом, из трех изученных соединений наиболее высокую активность проявила конструкция (III). Иммуногенная активность пептидной конструкции (I) не отличалась от активности короткого пептида (135–160), а введение в конструкцию (II) участка (197–213) привело к появлению активности на не отвечающей линии мышей СВА/J.

Далее была изучена способность конструкций индуцировать образование вируснейтрализующих и противопептидных антител у морских свинок. Для этого животные были иммунизированы пептидами однократно в дозе 50 мкг, т.к. при иммунизации в более низкой дозе (10 мкг) образующиеся антитела невозможно зафиксировать [8].

Через 28 суток после иммунизации была измерена способность противопептидных сывороток морских свинок связываться с цельными конструкциями и с составляющими их фрагментами, а также их способность нейтрализовать вирус ящура. Полученные данные представлены в табл. 2.

Синтетическая конструкция (I) стимулировала образование высокого уровня противопептидных и вируснейтрализующих антител, направленных на участок 135–160. Конструкция (III) индуцирова-

**Таблица 3.** Протективная активность пептидных конструкций (I)–(III) и исходных фрагментов белка VP<sub>1</sub> вируса ящура в экспериментах на морских свинках

Иммуноген	Защита*
135–160**	4/7
170–190***	0/8
197–213***	0/8
Конструкция (I)**	7/8
Конструкция (II)**	5/8
Конструкция (III)**	8/8

\* Отношение числа незаболевших животных к общему числу зараженных; \*\* иммунизирующая доза 10 мкг; \*\*\* иммунизирующая доза 200 мкг.

ла такой же уровень вируснейтрализующих и противопептидных антител, как и конструкция (I), причем антитела образовывались только на иммунодоминантный участок 135–159. Ожидаемого же образования антител на участок 197–213 не наблюдалось.

Конструкция (III) стимулировала образование немного более высокого уровня противопептидных антител, чем две рассмотренные выше конструкции. Эти антитела также были направлены только на иммунодоминантный район белка 135–159, но по сравнению с антителами к двум другим конструкциям обладали значительно более высокой вируснейтрализующей активностью.

Таким образом, три конструкции обладали практически одинаковой способностью вызывать образование противопептидных антител, но вируснейтрализующая активность этих антител была различна. Наибольшую вируснейтрализующую активность проявили антитела против конструкции (III).

Для изучения протективной активности морские свинки были иммунизированы синтетическими пептидными конструкциями и исходными фрагментами однократно в дозе 10 мкг на животное. Столь низкая иммунизирующая доза была выбрана для выявления различий в протективном

эффекте пептидов. На 28 сутки после иммунизации животных заражали вирусом ящура, результаты экспериментов представлены в табл. 3. Пептид (135–160) вызывал защиту у 4 животных из 7 иммунизированных, пептиды (170–190) и (197–213) не проявляли протективной активности даже в более высокой иммунизирующей дозе 200 мкг. Конструкция (I) обладала более высокой протективной активностью, чем исходный (135–160)-фрагмент, и защищала 7 животных из 8. Протективная активность конструкции (II) составляла 5 животных из 8 и была немного выше активности пептида (135–160). Максимальную защиту животных от заболевания (8 из 8) вызвала конструкция (III), содержащая В-эпитоп участка 135–159 и мощный Т-хелперный эпитоп участка 170–190. Таким образом, в ряду изученных пептидных конструкций протективная активность возрастала в следующем порядке:

$$\text{конструкция (II)} < \text{конструкция (I)} < \text{конструкция (III)}.$$

На основании проведенных экспериментов для дальнейших исследований была выбрана пептидная конструкция (III), индуцирующая наибольший уровень противопептидных и вируснейтрализующих антител и проявляющая наиболее высокий протективный эффект в экспериментах на морских свинках. Для этой конструкции был изучен протективный эффект на природновосприимчивых к ящуру животных – свиньях, которых наиболее сложно защитить от заболевания даже с помощью традиционных противоящурных вакцин [12]. Две группы животных иммунизировали двукратно пептидной конструкцией (III): первый раз в дозе соответственно 1 и 4 мг на животное в первой и второй группах, а на 42 сутки после первого введения второй раз в дозе 1 мг. На 56 сутки после первой иммунизации животных заражали вирусом ящура. На 14, 28 и 56 сутки после первой иммунизации у животных обеих групп отбирали кровь и измеряли уровень вируснейтрализующих антител. Результаты представлены в табл. 4.

В дозе 1 мг пептидная конструкция (III) не вызвала образование вируснейтрализующих анти-

**Таблица 4.** Протективная активность синтетической пептидной конструкции (III) в экспериментах на свиньях

Доза иммунизации	Номер животного	Титр вируснейтрализующих антител, $-\log_2$			Защита
		14 сут	28 сут	56 сут	
1 мг	1	1.0	1.0	1.0	–
	2	1.0	1.0	1.0	–
	3	1.0	1.0	1.0	–
4 мг	4	1.0	3.3	5.8	+
	5	2.5	3.5	6.3	+
	6	3.0	3.5	6.5	+

тел и не обладала протективной активностью. В дозе 4 мг пептидная конструкция (III) стимулировала образование высокого уровня вируснейтрализующих антител у всех животных. Антитела появлялись уже на 14 сутки после первой иммунизации и возрастали к 28 и далее к 56 суткам. Все животные в этой группе были защищены от заболевания ящуром.

Таким образом, в результате проделанной работы показано, что наиболее эффективной по иммуногенным и протективным свойствам является пептидная конструкция на основе фрагмента 135–159 иммунодоминантного района белка VP<sub>1</sub>, содержащего вируснейтрализующий В-эпитоп и вирусспецифический Т-эпитоп, и фрагмента 170–190, несущего вирусспецифический Т-эпитоп. Данная конструкция способна индуцировать образование высокого уровня противопептидных и вируснейтрализующих антител и обеспечивать защиту от заболевания ящуром как лабораторных, так и природновосприимчивых животных.

Необходимо отметить, что несмотря на значительное число описанных в литературе синтетических фрагментов белка VP<sub>1</sub>, обладающих в экспериментах на лабораторных животных протективной активностью, защита от заболевания ящуром природновосприимчивых животных – крупного рогатого скота и свиней с помощью синтетических пептидов остается нерешенной проблемой. Наиболее активные из описанных противоящурных пептидных конструкций, включающие участки 200–213 и 141–158, а также конструкции, полученные на основе фрагментов 21–40, 138–156 и 196–209 белка VP<sub>1</sub>, при широкомасштабных испытаниях на крупном рогатом скоте не обеспечивали стабильного протективного эффекта [5, 6]. Мы полагаем, что полученная в настоящей работе высокоактивная пептидная конструкция, включающая участки 135–159 и 170–190 белка VP<sub>1</sub>, является перспективным препаратом для разработки на его основе противоящурной вакцины для крупного рогатого скота.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы и производные аминокислот для пептидного синтеза (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария), *n*-алкоксибензильный полимер (Merck, ФРГ), НМРВ–МВНА-полимер (Novabiochem). Для хроматографии защищенных пептидов применяли силикагель 60 (Fluka), для обессоливания – сефадекс G-10 (Pharmacia, Швеция); для ВЭЖХ – хроматограф System Gold (Beckman, США), колонки Beckman ODS, 5 мкм (4.6 × 250 мм) – для аналитической и TSK ODS-120T (4.6 × 250 мм) – для препаративной хроматографии. Гидролиз пептидов проводили смесью 6 н. HCl–TFA (2 : 1) в течение 45 мин при 170°C. Растворители очищали согласно известным методи-

кам [13]. Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания).

В иммунохимических исследованиях применяли полный и неполный адъюванты Фрейнда (ПАФ и НАФ) (Sigma, США), антитела козы против иммуноглобулинов мышей, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), 96-луночные платы из полистирола (Nunc Maxisorb, Дания). Для иммунизации использовали самок мышей линий Balb/c, C57/B1, CBA/J весом 18–20 г, самок морских свинок весом 200–400 г, самок свиней весом 20–30 кг.

**Синтез пептидов.** Твердофазный синтез пептидов – фрагментов (135–160), (170–190) и (197–213) белка VP<sub>1</sub> вируса ящура проводили на *n*-алкоксибензильном полимере с содержанием гидроксильных групп 0.5 ммоль/г, а защищенных пептидов Fmoc-(135–145) и Fmoc-(146–159)-GG – на НМРВ–МВНА-полимере с содержанием гидроксильных групп 0.87 ммоль/г. Для присоединения первой аминокислоты исходный полимер промывали DMF, эфиром и высушивали. В 15 мл DMF суспендировали 300 мг полимера, добавляли 150 мг НОВТ (10 экв.), 24 мг DMAР (0.2 ммоль) и 10 экв. стартовой Fmoc-защищенной аминокислоты. К суспензии приливали 172 мкл DIPС (10 экв.) и перемешивали в течение 4 ч при 0°C. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и обрабатывали 5 мл смеси Ac<sub>2</sub>O–пиридин–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 : 20 : 60) в течение 1 ч, после чего полимер промывали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, изопропанолом и снова CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Нарращивание пептидной цепи вели в проточном реакторе по следующему протоколу для каждого синтетического цикла (из расчета 8–10 мл растворителя на 300 мг исходного полимера), при проведении реакций конденсации (операция 9) использовали объем реакционной смеси 3–4 мл:

- 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 2 мин); 2) DMF (2 × 2 мин); 3) 55% пиперидин в DMF (20 мин); 4) DMF (2 × 2 мин); 5) диоксан–вода, 2 : 1 (2 × 5 мин); 6) DMF (3 × 2 мин); 7) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 2 мин); 8) DMF (2 × 2 мин); 9) конденсация: 5 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (2 ч); 10) DMF (2 × 2 мин); 11) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 2 мин); 12) ацилирование: Ac<sub>2</sub>O–пиридин–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 : 20 : 60 (30 мин); 13) изопропанол (3 × 2 мин).

Для преактивации аминокислот к раствору 5 экв. Fmoc-защищенной аминокислоты и 5 экв. TB-TU в 3–4 мл DMF добавляли 5 экв. DIEA, раствор перемешивали 10 мин. Контроль за содержанием непрореагировавших аминогрупп проводили с помощью нингидринового или, в случае *N*-концевого пролина, пикринового тестов после операции 11 синтетического протокола [14, 15]. При положительном тесте цикл конденсации (операции 9–11) повторяли.

Отщепление защищенных пептидов Fmoc-(135–145) и Fmoc-(146–159)-GG от НМРВ–МВНА-

полимера осуществляли обработкой 1% TFA в 10 мл хлористого метилена в течение 2 мин, процедуру повторяли 5 раз. TFA нейтрализовывали пиридином (1 экв.) и упаривали избыток хлористого метилена, пептид осаждали 5% уксусной кислотой. После очистки на открытой колонке с силикагелем в хлористом метилене выходы пептидов составили 90 и 87% соответственно (в пересчете на С-концевую аминокислоту). Полученные защищенные пептиды Fmoc-(146–159)-GG и Fmoc-(135–145) последовательно присоединяли к пептидилполимерам (135–160)-OP, (170–190)-OP или (197–213)-OP, используя 3-кратные избытки защищенных сегментов и TBTU-метод. Реакцию конденсации проводили в течение 48 ч, контролировали с помощью нингидринового теста и при необходимости повторяли.

Отщепление пептида от полимера с одновременным деблокированием проводили, используя аликвоту пептидилполимера 300 мг в 5 мл смеси TFA–этандитиол–DMS–*m*-крезол в объемном соотношении 91 : 3 : 3 : 3 в течение 2 ч. Смесь отфильтровывали от полимера. Раствор упаривали при пониженном давлении. Затем добавляли 100 мл этилового эфира, продукт отщепления отфильтровывали и промывали эфиром (5 × 20 мл). Осадок перемешивали в 5 мл 10% AcOH 20 мин, отфильтровывали и промывали 5 мл 10% AcOH. Полученный раствор пептида лиофилизировали и обессоливали на колонке (2.5 × 60 см) с сефадексом G-10 в 0.1 М AcOH. Очистку пептида проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила в 0.1% TFA (от 10 до 70% за 40 мин) при расходе элюента 4 мл/мин, поглощение элюата регистрировали при длине волны 226 нм.

Синтезированные пептиды характеризовали данными аналитической ВЭЖХ, масс-спектрометрии (табл. 5) и аминокислотного анализа. Аналитическую ВЭЖХ проводили в условиях, аналогичных препаративной, при скорости потока элюента 1 мл/мин. Все синтезированные пептиды имели корректный аминокислотный состав.

**Иммунизация животных и получение сывороток.** Растворы незащищенных пептидов в PBS (концентрация 2 мг/мл) смешивали с равным объемом адьюванта. Мышей (по 7 в каждой группе) иммунизировали дважды в основание хвоста в дозе 100 мкг пептида в 100 мкл эмульсии. Первую иммунизацию проводили в ПАФ, вторую в НАФ на 44 сутки. Кровь отбирали на 55 сутки после первой иммунизации и определяли титры противопептидных антител.

В опытах по изучению иммуногенных свойств пептидных конструкций морских свинок иммунизировали внутримышечно однократно в ПАФ незащищенными пептидами в дозе по 50 мкг на животное. Образцы крови отбирали на 28 сутки и

**Таблица 5.** Времена удерживания пептидов в условиях аналитической ВЭЖХ, молекулярные массы пептидов и данные MS

Пептид	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	
		вычисленная	поданным MS
(135–160)	27.2	2686.11	2686
(170–190)(Bu <sup>t</sup> )	41.3	2596.22	2595
(197–213)	24.5	1974.35	1973
Конструкция (I)	34.0	5367.21	5365
Конструкция (II)	30.0	4655.45	4653
Конструкция (III)	43.8	5277.32	5277

определяли титр вируснейтрализующих и противопептидных антител.

Для изучения протективного эффекта пептидов морских свинок иммунизировали внутримышечно однократно в ПАФ исследуемыми веществами в дозе 10 мкг на животное за исключением пептидов (197–213) и (170–190), которые вводились в дозе 200 мкг.

Для изучения протективного эффекта конструкции (III) иммунизировали две группы свиней двукратно. При первой иммунизации использовали растворы незащищенного пептида (III) в PBS с концентрацией 0.5 мг/мл для первой группы животных и 2 мг/мл для второй, которые смешивали с равным объемом НАФ и вводили животным по 1 мл за каждое ухо внутримышечно. При второй иммунизации животным обеих групп вводили раствор пептида с концентрацией 0.5 мг/мл.

Сыворотки животных хранили при температуре –20°C.

**Определение титра противопептидных антител** проводили методом непрямого ИФА (IgG-ответ) как описано в работе [8]. ТПА рассчитывали как разведение сыворотки, выраженное в –lg, дающее поглощение не менее 0.1 ОЕ, превышающее фоновый уровень в два раза.

**Определение титра вируснейтрализующих антител.** Вируснейтрализующие антитела определяли на клетках свиной почки как описано в работе [16] против 100–320 ТЦД<sub>50</sub> (тканевая цитотоксическая доза вируса, вызывающая цитопатические изменения у 50% клеток). К клеткам добавляли вирус ящура штамма А<sub>22</sub>, предварительно инкубированный с сывороткой в различных разведениях. ТВА рассчитывали как разведение сыворотки, выраженное в –log<sub>2</sub>, при котором наблюдается 50% тканевый цитопатический эффект.

**Изучение протективного эффекта.** Для определения протективного эффекта морским свинкам на 28 сутки вводили 100 ИД<sub>50</sub> (доза вируса, вызывающая гибель 50% зараженных животных) вируса

ящура штамма А<sub>22</sub>. Защиту определяли как отношение числа незаболевших животных к общему числу зараженных животных.

Для определения протективного эффекта свиньям на 56 сутки вводили 10000 ИД<sub>50</sub> вируса ящура штамма А<sub>22</sub>. Защищенными считали животных с отсутствием вторичных афт на конечностях.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Towsend A.R.M.* // *Immunol. Res.* 1987. V. 6. P. 80–100.
2. *Strohmaier K., Franze R., Adam K.H.* // *J. Gen. Virol.* 1982. V. 59. P. 295–306.
3. *Collen T., Dimarchi D., Doel T.R.* // *J. Immunol.* 1991. V. 146. P. 749–755.
4. *Volpina O.M., Gelfanov V.M., Yarov A.V., Surovoy A.Yu., Chepurkin A.V., Ivanov V.T.* // *FEBS Lett.* 1993. V. 333. P. 175–178.
5. *Taboga O., Tami C., Carrillo E., Nunez J.I., Rodriguez A., Saiz J.C., Blanco E., Valero M.-L., Roig X., Camarero J.A., Andreu D., Mateu M.G., Giralt E., Domingo E., Sobrino F., Palma E.L.* // *J. Virol.* 1997. V. 71. P. 2606–2614.
6. *Mulcahy G., Gale C., Robertson P., Iyisan S., DiMarchi R.D., Doel T.R.* // *Vaccine.* 1990. V. 8. P. 249–256.
7. *Volpina O.M., Surovoy A.Yu., Zhmak M.N., Kupriyanova M.A., Koroev D.O., Chepurkin A.V., Toloknov A.S., Ivanov V.T.* // *Vaccine.* 1999. V. 17. P. 577–584.
8. *Гельфанов В.М., Гречанинова Л.А., Кан Е.С., Яров А.В., Суровой А.Ю., Вольпина О.М., Чепуркин А.В., Иванов В.Т.* // *Биоорганическая химия.* 1991. Т. 17. С. 596–605.
9. *Яров А.В., Гельфанов В.М., Гречанинова Л.А., Суровой А.Ю., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Чепуркин А.В., Дрягалин Н.Н., Иванющенко В.Н.* // *Биоорганическая химия.* 1989. Т. 15. С. 1313–1317.
10. *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.* // *Биоорганическая химия.* 1989. Т. 15. С. 1193–1205.
11. *DiMarchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., Mowat N.* // *Science.* 1986. V. 232. P. 639–641.
12. *Малярец П.В.* // *Сельское хозяйство за рубежом. Животноводство.* 1973. № 2. С. 29–33.
13. *Perrin D.D.* *Purification of Laboratory Chemicals.* N.Y.: Pergamon Press, 1980. P. 1–563.
14. *Sarin V.K., Kent S.B.H., Tam J.P., Merrifield R.B.* // *Anal. Biochem.* 1981. V. 117. P. 147–157.
15. *Gisin B.F.* // *Anal. Chim. Acta.* 1972. V. 58. P. 248–249.
16. *Суровой А.Ю., Гельфанов В.М., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Чепуркин А.В., Иванющенко В.Н., Дрягалин Н.Н., Бурдов А.Н.* // *Биоорганическая химия.* 1989. Т. 15. С. 1185–1192.

## Synthetic Peptide Constructs on the Basis of Immunoactive Fragments of the A<sub>22</sub> Strain VP<sub>1</sub> of the Foot-and-Mouth Disease Virus

M. A. Kupriyanova\*<sup>#</sup>, M. N. Zhmak\*, D. O. Koroev\*,  
A. V. Chepurkin\*\*, O. M. Volpina\*, and V. T. Ivanov\*

\**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

\*\**All-Russian Research Institute of Animal Protection, Vladimir, Russia*

Peptide constructs consisting of 44–53 aa were synthesized on the basis of sequences 135–159, 170–190 and 197–213 of VP<sub>1</sub> from the foot-and-mouth disease A<sub>22</sub> strain. Immunogenic and protective properties of the peptide constructs were studied in guinea pigs and mice of three lines. The constructs were shown to induce higher levels of antibodies and exhibit higher protective effects than the separate peptides. The most active among the peptides studied was the construct involving the VP<sub>1</sub> fragments 135–160 and 170–190: it protected pigs from the experimental infection by the foot-and-mouth disease virus.

*Key words: immunogenicity, peptides, synthetic constructs; protective effect against the foot-and-mouth disease virus*

<sup>#</sup> *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-5777; e-mail: fmdv@ibch.ru.*

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 12. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.