



УДК 578.816.1'204

**ИНАКТИВАЦИЯ ИНФЕКЦИОННОСТИ ФАГА MS2
ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭТИЛЕНИМИНОВ***Будовский Э. П., Залеская М. А., Лещинская В. П.*,
Костяновский Р. Г.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва;
Институт химической физики Академии наук СССР, Москва*

При действии любого инактивирующего агента на вирусы происходит как модификация нуклеиновой кислоты, что вызывает инактивацию инфекционности, так и модификация других компонентов вириона, что вызывает изменение эффективности и специфичности иммунного ответа. Поэтому для получения убитых противовирусных вакцин необходимы агенты, преимущественно модифицирующие полинуклеотиды.

Скорость модификации каждого из компонентов вириона зависит от их реакционной способности и концентрации реагента. Избирательное увеличение скорости модификации одного из компонентов вириона возможно, если реагент обладает специфическим сродством к нему и, следовательно, наблюдается повышение локальной концентрации реагента вблизи этого компонента.

Катионы в растворе концентрируются вблизи полианионов. Степень концентрирования (отношение локальной концентрации вблизи полианиона к общей концентрации катиона в растворе) повышается при увеличении заряда катиона [1]. В связи с этим при увеличении положительного заряда реагента должна повышаться скорость модификации единственного полианиона в составе вируса — нуклеиновой кислоты. Степень концентрирования катионов быстро падает по мере удаления от полианиона и уже на расстоянии 1 нм практически равна единице [2]. Так как толщина оболочки вирионов значительно больше 1 нм, увеличение положительного заряда реагента не должно приводить к увеличению скорости модификации антигенных детерминант, расположенных на поверхности вириона.

В настоящей работе для выяснения влияния положительного заряда на его локальную концентрацию вблизи полинуклеотида была исследована кинетика модификации РНК при действии этиленимина и его олигомеров общей формулы $(\text{CH}_2)_n\text{N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_n\text{H}$ ($n=0, 1, 2$ и 3). Эти соединения были синтезированы по способу [3] и перегнаны над металлическим натрием. Тетрамер представлял собой смесь линейной и разветвленной форм.

Этиленимины алкилируют нуклеофильные группы компонентов белков и нуклеиновых кислот [4]. Реакционноспособной формой этилениминов являются соединения, протонированные по азиридиновому атому азота [5]. Алкилирование этого атома приводит к уменьшению реакционной способности в $\sim 1,5$ раза [6].

Алкилирование этилениминами компонентов полинуклеотидов блокирует их репликацию, что является причиной инактивации инфекционности вирусов при действии этих реагентов. В качестве критерия скорости модификации нуклеиновой кислоты использовали скорость инактивации инфекционности бактериофага MS2, так как он является РНК-содержащим вирусом, для инактивации инфекционности которых достаточно образования одного модифицированного звена, блокирующего репликацию генома, вне зависимости от его положения в геноме.

Скорость инактивации инфекционности фага MS2 под действием олигомеров этиленимина при pH 7,5 постоянна, что свидетельствует о постоян-

Константы скорости инактивации инфекционности фага MS2
($M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) под действием олигомеров этиленimina в 0,15 M
NaCl при 20° C

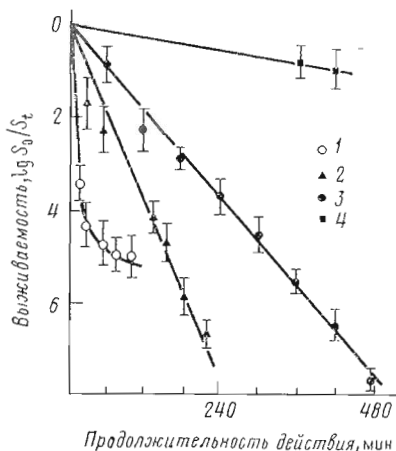
pH	Мономер	Димер	Тример	Тетрамер
6,5	—	1,20±3 *	—	—
6,9	—	35±2,3	—	—
7,5	1,5±0,7	13±1,4	47±2,7	150±12,5
8,5	—	1,7±0,5	—	—

* Константа определена по начальному участку кривой выживаемости.

стве концентрации реагентов во время инактивации. Это позволяет рассчитать константы скорости инактивации (таблица). При увеличении длины цепи этилениминов константы скорости увеличиваются, хотя степень протонирования азиридинового азота уменьшается (рК 8,01; 5,15, 4,1; 3,0—3,3 соответственно для $n=0, 1, 2$ и 3). Однако суммарный положительный заряд реагента возрастает при увеличении n . В связи с этим можно утверждать, что причиной увеличения константы скорости инактивации инфекционности фага (скорости модификации фаговой РНК) при увеличении n является повышение локальной концентрации реагента вблизи внутрифаговой РНК. Для димера этиленимина ($n=1$) в интервале pH 6,9—8,5 константа скорости инактивации инфекционности возрастает примерно пропорционально концентрации активной (протонированной по азиридиновому азоту) формы реагента (рисунок). Но при переходе от pH 6,9 к 6,5 наблюдается резкое увеличение константы скорости инактивации, что коррелирует с увеличением концентрации активной формы реагента, но кривая выживаемости отклоняется от экспоненты и выходит на плато. Это свидетельствует об уменьшении концентрации реагента во время инактивации, что, по-видимому, обусловлено его катионной полимеризацией (ср. [7]).

Таким образом, скорость инактивации инфекционности резко возрастает при увеличении суммарного положительного заряда реагента, что, скорее всего, обусловлено повышением локальной концентрации реагента вблизи вирусной РНК. Понижение pH также приводит к увеличению скорости инактивации за счет повышения суммарного заряда и/или увеличения концентрации активной формы реагента. Следует подчеркнуть, что существует критическое значение pH, ниже которого расход реагента на побочные реакции оказывает существенное влияние на кинетику инактивации.

Инактивация инфекционности фага MS2 при действии диэтиленимина в 0,15 M NaCl при 20° C и pH: 1 — 6,5; 2 — 6,9; 3 — 7,5; 4 — 8,5. S_0 и S_t — инфекционность (титр) фага до и через t минут действия диэтиленимина



1. Morawetz H., Gordimer G. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 26, p. 7532-7536.
2. Dolar D., Peterlin A. J. Chem. Phys., 1969, v. 50, № 7, p. 3011-3015.
3. Bestian H. In: Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl). Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1958, B. XI/2, S. 227-229.
4. Wheeler G. P. Cancer Res., 1962, v. 22, № 6, p. 651-688.
5. Van Etten R. L., Dolhun J. J. J. Org. Chem., 1968, v. 33, № 10, p. 3904-3913.
6. Earley J. E., O'Rourke C. E., Clapp L. B., Edwards J. O., Jawas B. C. J. Amer. Chem. Soc., 1958, v. 80, № 13, p. 3458-3462.
7. Dermer O. C., Ham G. E. Ethylenimine and other aziridines. N. Y.-L.: Acad. Press, 1969, p. 241.

Поступило в редакцию
28.II.1985

INACTIVATION OF THE PHAGE MS2 INFECTIVITY BY THE ACTION OF ETHYLENEIMINES

BUDOWSKY E. I., ZALESSKAYA M. A., LESCHINSKAYA V. P. *,
KOSTYANOVSKY R. G. *

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

The rate constants of the phage MS2 infectivity inactivation by the action of ethylenimine and its oligomers have been determined. Decrease of pH results in the rate constant increase due to the rise of the concentration of the aziridine reactive (protonated) form. Increase of the reagent polymerization extent, despite the decrease of the aziridine ring pK_a , increases the inactivation rate constant due, most probably, to the increase of the reagent local concentration in the vicinity of the intraphage RNA.