



УДК 578.832.1.А : 578.112.6

*А. Ф. Шевалье, В. В. Самуков, В. И. Офицеров,
В. В. Калашиников, Г. А. Мизенко, А. А. Колоколцов*

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 124—144 ЛЕЙКОЦИТАРНОГО
ИНТЕРФЕРОНА ЧЕЛОВЕКА $\alpha 2$**

*Всероссийский научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
ИПО «Вектор» Минмедбиопроста СССР, пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Синтезированы пептиды, соответствующие аминокислотным последовательностям 124—138, 129—144 и 124—144 человеческого лейкоцитарного интерферона $\alpha 2$ (IFN- $\alpha 2$). Синтез проведен конденсацией защищенных пептидных сегментов ДСС/НОВТ-методом в растворе. Пептидные сегменты получали методом активированных эфиров с использованием удаляемой основаниями 2-[(4-фенилазобензил)сульфонил]этильной группы в качестве COOH-концевой защиты. После деблокирования действием 1 М метансульфокислоты в смеси трифторуксусной кислоты, тиаоизола и м-крезола пептиды были очищены препаративной обращенно-фазовой хроматографией. Изучено взаимодействие пептидов с кроличьей антисывороткой к IFN- $\alpha 2$. Показано, что в районе 124—144 локализована по крайней мере одна минорная антигенная детерминанта. Антисыворотки кроликов к пептидам 124—138 и 129—144 обладали способностью специфически связывать рекомбинантный IFN- $\alpha 2$ и ингибировать его антивирусную активность *in vitro*. Свободные пептиды и их конъюгаты с бычьим сывороточным альбумином не обладали антивирусной активностью и не ингибировали антивирусную активность IFN- $\alpha 2$.

Проблема структурно-функциональной организации интерферона (IFN) остается нерешенной и продолжает привлекать к себе внимание вследствие ее большого теоретического и прикладного значения. Для решения этой проблемы были использованы различные методы: конструирование гибридных молекул, направленный мутагенез, химическая модификация, протеолитическая фрагментация [1—4]. В последнее время активно развиваются иммунохимические методы, получен большой набор моноклональных антител к IFN- α [5—7]. Установлено, что некоторые моноклональные антитела ингибируют антивирусную активность IFN, тогда как другие не оказывают такого влияния [8]. Локализация эпитопов для антител обоих типов имела бы большое значение при построении моделей структурно-функциональной организации IFN. Однако определение таких эпитопов связано со значительными экспериментальными трудностями и может приводить к неоднозначным выводам при использовании разных методов, как, например, в случае моноклональных антител НК-2 [5, 6]. Альтернативным подходом для иммунохимического изучения структурно-функциональной организации IFN является использование антител, место связывания которых на молекуле IFN точно известно. Такие антитела могут быть получены путем иммунизации животных синтетическими фрагментами IFN [7].

Настоящая работа посвящена синтезу пептидов из района 124—144 человеческого IFN- $\alpha 2$ и изучению их иммунохимических и биологических свойств. Выбор для синтеза этой области молекулы объясняется несколькими причинами. Анализ аминокислотных последовательностей интерферонов [9] показывает, что участок 120—145 консервативен во всем

Принятые сокращения: Acst — S-ацетамидометил, НОВТ — 1-гидроксибензотриазол, Pse — 2-[(4-фенилазобензил)сульфонил]этил, БСА — бычий сывороточный альбумин, ИФА — иммуноферментный анализ, Mts — мезитилсульфонил, For — формил.

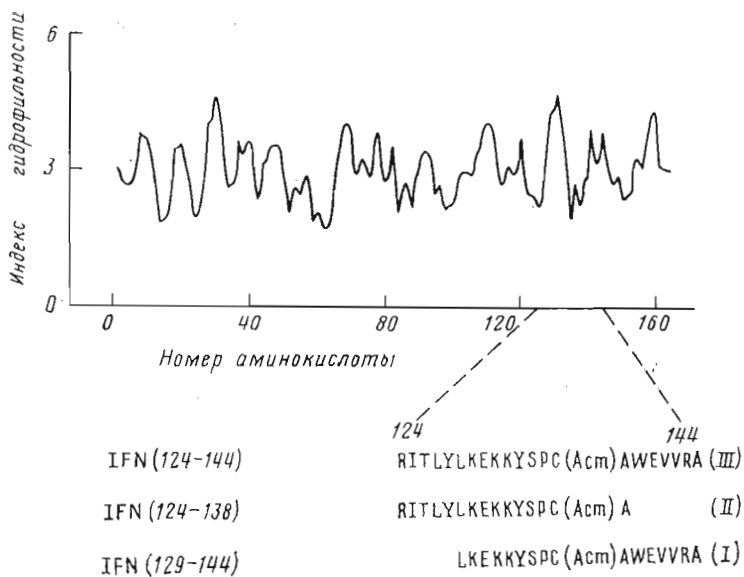


Рис. 1. Профиль гидрофильности IFN- α 2 человека построенный по методике работы [10]. Расчет проводили по усредненным коэффициентам гексапептидных фрагментов. Для удобства профиль поднят на 3 единицы. Ниже приведены последовательности синтезированных S-Асm-фрагментов

семействе лейкоцитарных интерферонов и более чем на 60% гомологичен соответствующему участку IFN- β . Интересно, что последовательность 129—133 IFN- α 2 совпадает с последовательностью 16—20 α -тимозина и, кроме того, соответствует глобальному максимуму на профиле гидрофильности IFN- α 2 (рис. 1). Весьма вероятно, что выбранный для синтеза участок аминокислотной последовательности может быть существенным для проявления биологической активности IFN- α 2.

Для синтеза аминокислотная последовательность 124—144 IFN- α 2 была разбита на 4 сегмента: 124—127, 129—133, 134—138 и 139—144. Защищенные сегменты (IV)—(VII) (см. таблицу) синтезировали методом активированных эфиров в растворе. Для временной защиты N $^{\alpha}$ -аминогрупп использовали *трет*-бутилоксикарбонильную группу, боковые радикалы трифункциональных аминокислот защищали группами, удаляемыми ацидозом: бензильную для Glu и Tyr, бензилоксикарбонильную (Z) для Lys, N $^{\epsilon}$ -метилсульфонильную (Mts) для Arg. Остатки Ser и Thr вводили с незащищенными гидроксильными группами, для Cys использовали селективно удаляемую S-ацетамидометильную группу, для Trp — формильную группу, С-концевые карбоксильные группы защищали 2-[(4-фенилазо)бензилсульфонил]этильной группировкой. Эта хромогенная защитная группа, удаляемая основаниями по механизму β -элиминирования, использовалась нами ранее в синтезе фрагментов гемагглютина вируса гриппа [11]. Выбранный размер сегментов в 5—6 аминокислотных остатков позволяет наиболее полно использовать преимущества Pse-группы. На первых циклах ацилирования эта группа упрощает как выделение продуктов реакции, так и анализ реакционных смесей тонкослойной хроматографией: оранжевые пятна исходного аминокислотного компонента и продукта ацилирования хорошо видны на пластинке в видимом и УФ-свете. С другой стороны, защищенные пептиды такого размера возможно, в случае необходимости, очистить колоночной хроматографией на силикагеле. Характеристики защищенных пептидных сегментов приведены в таблице.

Для получения пептидных сегментов со свободной карбоксильной группой Pse-защиту удаляли 30% пиперидином в диметилформамиде, смеси разбавляли этилацетатом и экстрагировали 5% раствором лимонной кислоты для удаления пиперидина и его аддукта с 4-фенилазобензилвинилсульфоном. После упаривания растворителя получали Вос-пептиды, го-

Защищенные сегменты, синтезированные методом активированных эфиров

Последовательность	Пептид	Выход [*] , %	Т. пл., °С	R _f (система)	[α] _D ²²	Масс-спектр m/z (M+H)
139—144 (IV)	Boc-Trp(For)-Glu(OBzl)-Val-Val-Arg(Mts)-Ala-OPse	46	210—213	0,29 (A) 0,1 (Б)	-10,6 (с 1,6)	
134—138 (V)	Boc-Tyr(Bzl)-Ser-Pro-Cys(Acm)-Ala-OPse	72	118—120	0,3 (A) 0,14 (Б)	-33,7 (с 1,6)	
129—133 (VI)	Boc-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OPse	78	195—196	0,61 (A) 0,52 (Б)	-10,3 (с 1,3)	
124—127 (VII)	Boc-Arg(Mts)-Ile-Thr-Leu-OPse	68	139—141	0,26 (A)	-10,2 (с 2,2)	
134—138 (Va)	Boc-Tyr(Bzl)-Ser-Pro-Cys(Acm)-Ala-OH	86	109—111	0,24 (A) 0,56 (Б)	-38,4 (с 1,0)	802
129—133 (VIa)	Boc-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OH	82	139—141	0,52 (Б)	-12,8 (с 1,0)	1016
124—127 (VIIa)	Boc-Arg(Mts)-Ile-Thr-Leu-OH	94	119—120	0,27 (A) 0,83 (Б)	-5,1 (с 1,5)	784

* Выход в расчете на Pse-эфир C-концевой аминокислоты; для последних трех пептидов дан выход на стадии удаления Pse-защиты.

могенные по данным ТСХ и аналитической ВЭЖХ. Строение синтезированных сегментов (таблица) подтверждено данными аминокислотного анализа и масс-спектрами FAB*.

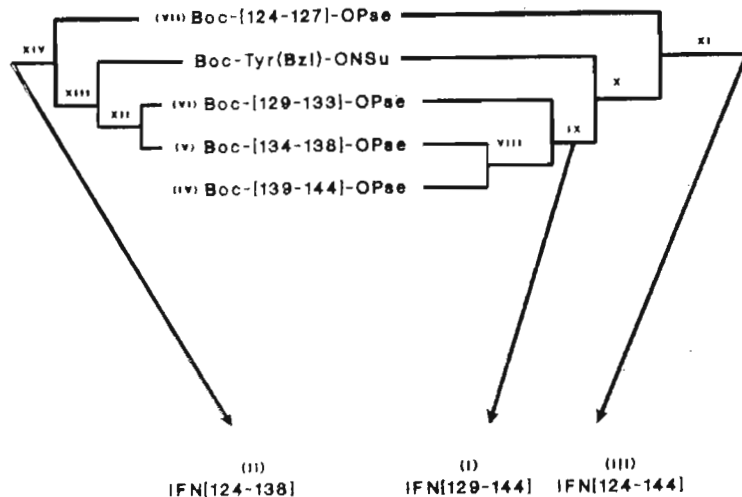
Сборку пептидов 124—138, 129—144 и 124—144 из полученных защищенных сегментов проводили ДСС/НОВТ-методом в соответствии со схемой. Полноту протекания реакций оценивали методом Кайзера, как описано нами ранее [11]. Продукты конденсации очищали переосаждением из DMF в ацетон или этилацетат. Гомогенность защищенных пептидов оценивали аналитической ВЭЖХ (с пептидов предварительно удаляли Pse- и Boc-защиты для повышения растворимости в хроматографических системах), строение подтверждено данными аминокислотного анализа.

По окончании синтеза с пептидов удаляли последовательно Pse- и Boc-защиты. Исследованиями на защищенном сегменте 139—144 было установлено, что при удалении Pse-защиты 30% пиперидином в DMF одновременно происходит количественное отщепление For-группы с остатка Trp. Пептиды с удаленными концевыми защитами деблокировали 1 М метансульфо-кислотой в трифторуксусной кислоте, содержащей 10% тиоанизола и 5% *m*-крезола. После осаждения эфиром пептиды очищали гель-хроматографией на сефадексе G-15 и препаративной обращенно-фазовой хроматографией. Чистота пептидов, по данным аналитической ВЭЖХ, была не менее 97—98%, структура подтверждена данными аминокислотного состава.

Синтезированные S-Acm-фрагменты (I), (III) реагируют в твердофазном иммуноферментном анализе с иммуноглобулиновой фракцией кроличьей антисыворотки против IFN-α₂ (рис. 2). Специфичность реакции доказана методом конкурентного радиоиммуноанализа (рис. 3). В качестве ¹²⁵I-меченого пептида был выбран наиболее протяженный фрагмент 124—144 (пептид (III)), содержащий 2 остатка тирозина. Характер конкуренции пептидов 124—144 и 129—144 с [¹²⁵I]пептидом (III) сходен, полное ингибирование связывания метки наблюдалось при низких концентрациях свободных пептидов. Полученные данные свидетельствуют о локализации в участке 124—144 как минимум одной антигенной детерминанты. Эта антигенная детерминанта, по-видимому, не является иммунодоминантной, так как связывание пептидов в твердофазном ИФА наблюдается только

* FAB — бомбардировка ускоренными атомами.

Синтез фрагментов IFN- α 2



- VIII Boc-Tyr(Bzl)-Ser-Pro-Cys(Acm)-Ala-Trp(For)-Glu(OBzl)-Val-Val-Arg(Mts)-Ala-OPse
- IX Boc-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Ser-Pro-Cys(Acm)-Ala-Trp(For)-Glu(OBzl)-Val-Val-Arg(Mts)-Ala-OPse
- X Boc-Tyr(Bzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Ser-Pro-Cys(Acm)-Ala-Trp(For)-Glu(OBzl)-Val-Val-Arg(Mts)-Ala-OPse
- XI Boc-Arg(Mts)-Ile-Thr-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Ser-Pro-Cys(Acm)-Ala-Trp(For)-Glu(OBzl)-Val-Val-Arg(Mts)-Ala-OPse
- XII Boc-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Ser-Pro-Cys(Acm)-Ala-OPse
- XIII Boc-Tyr(Bzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Ser-Pro-Cys(Acm)-Ala-OPse
- XIV Boc-Arg(Mts)-Ile-Thr-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Ser-Pro-Cys(Acm)-Ala-OPse

при высоких суммарных концентрациях иммуноглобулинов (рис. 2). Сопоставляя результаты по связыванию пептидов с высоким значением локальной гидрофильности района 124—144 (рис. 1), мы пришли к выводу, что профиль гидрофильности хорошо предсказывает поверхностную локализацию участков последовательности IFN- α 2, но не расположение иммунодоминантных эпитопов. Несовпадение максимумов на профилях гидрофильности с иммунодоминантными эпитопами обсуждается в литературе [12].

Пептиды 124—138 (II) и 129—144 (I) конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (БСА) с помощью бифункционального сшивающего реагента N-оксисулфинимидного эфира 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты [13]. В результате иммунизации кроликов конъюгатами были получены антисыворотки с высоким титром антипептидных антител. По данным твердофазного ИФА, титр антисывороток (50% максимума оптической плотности) составил $1 : 10^4$ для пептида 129—144 и $1 : 10^5$ для пептида 124—138. Антипептидные сыворотки реагировали также с с иммобилизованным на подложке IFN- α 2. Связывание этих сывороток с IFN заметно слабее, чем с гомологичными пептидами (титр 250—350), однако проявляется при разведении сывороток до $1 : 10^4$ (рис. 4) и специфически ингибируется добавлением соответствующего свободного пептида (рис. 5).

Интересно было изучить влияние полученных антисывороток на антивирусную активность IFN- α 2 и сравнить полученный эффект с имею-

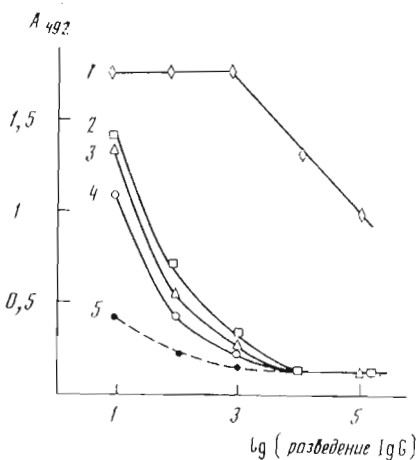


Рис. 2

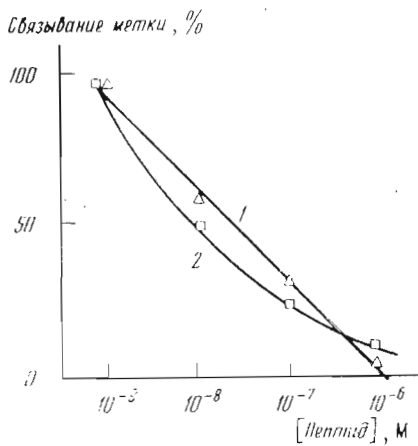


Рис. 3

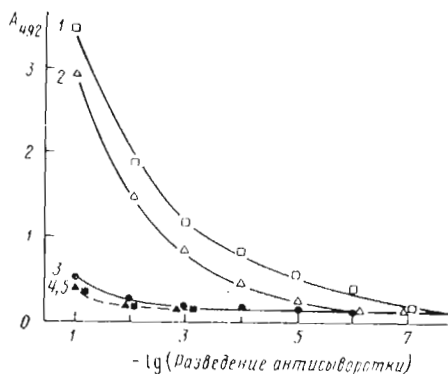


Рис. 4

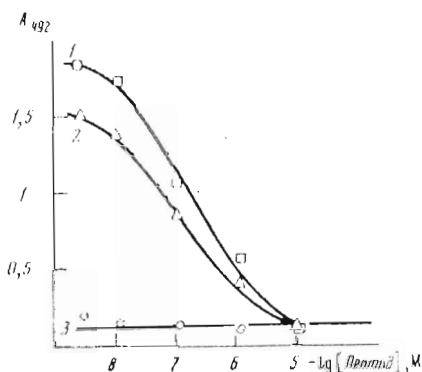


Рис. 5

Рис. 2. Связывание анти-(IFN α -2)-IgG с иммобилизованными антигенами: IFN- α 2 (1), IFN-(124—144) (2), IFN-(129—144) (3), IFN-(124—138) (4) и с лунками планшетов, обработанных БСА (5)

Рис. 3. Конкурентное ингибирование связывания 125 I-меченого пептида IFN-(124—144) с анти-IFN α (2)-IgG-пептидами IFN-(129—144) (1) и IFN-(124—144) (2)

Рис. 4. Связывание иммобилизованного IFN- α 2 с кроличьими сыворотками: анти-IFN-(124—138) (1), анти-IFN-(129—144) (2), нормальной сывороткой (3). Кривые 4 и 5 показывают связывание антипептидных сывороток с лунками планшета без IFN- α 2

Рис. 5. Ингибирование пептидами IFN-(124—138) и IFN-(129—144) связывания иммобилизованного IFN- α 2 с кроличьими сыворотками анти-IFN-(124—138) (1), анти-IFN-(129—144) (2), нормальной сывороткой (3). Ингибирование связывания определялось с использованием того же пептида, против которого получена данная антисыворотка

щимися в литературе данными по нейтрализующей активности ряда моноклональных антител. В качестве критерия нейтрализующей активности ранее было предложено [14] использовать количество единиц (N) активности IFN, уменьшающееся до единицы под действием определенной концентрации антител. Для моноклональных антител существует предельное значение N_{\max} , не увеличивающееся с дальнейшим ростом концентрации антител [15]. Степень нейтрализации (N_{\max}) может служить удобной характеристикой нейтрализующих свойств моноклональных антител и антипептидных поликлональных антисывороток. При разведениях 1 : 30 значение N_{\max} находится в пределах 32—64 для обеих антипептидных антисывороток. Для ряда нейтрализующих моноклональных антител значения N_{\max} лежат в пределах от 10 до 200 [15]. Например, для широко используемых в практике антител НК-2 $N_{\max} = 10$. Таким образом, полученные нами антисыворотки ингибируют антивирусную активность IFN- α 2.

Чтобы выяснить, вовлечен ли участок 124—144 непосредственно в фор-

мирование функционально важных доменов IFN, мы попытались определить антивирусную активность синтезированных пептидов. Ни один из пептидов или их конъюгатов в концентрации до 1 мг/мл не обладал такой активностью и не ингибировал антивирусную активность IFN- α 2.

Из полученных нами данных трудно сделать однозначный вывод о причине нейтрализующей активности антисывороток. В этом смысле интерпретация отрицательных результатов была бы более простой задачей. В работе [7] было показано, что для антипептидных антител к участку 156—166 $N_{\max} = 1$, т. е. эти антитела не ингибируют антивирусную активность IFN. В результате был сделан вывод, что участок 156—166 находится на поверхности IFN в отдалении от функционально значимых доменов молекулы. Участок 124—144, возможно, находится вблизи «активного центра» IFN- α 2. Связывание антител с этим районом может создавать стерические препятствия для взаимодействия IFN с клеточными рецепторами, либо антитела вызывают конформационные изменения в белке, нарушающие структуру сайта связывания с рецептором. Можно надеяться, что полученные нами данные окажутся полезными при разработке моделей структурно-функциональной организации IFN- α 2.

Экспериментальная часть

В работе использовались *L*-аминокислоты (Reanal, Венгрия; Merck, ФРГ), Boc-Ser(Bzl) и Thr(Bzl) (Fluka, Швейцария); 4-диметиламинопиридин, ди-*трет*-бутилпрокарбонат, метансульфокислота и DCC (Fluka). Сведения о получении защищенных аминокислот и их активированных эфиров приведены в работе [11]. Кроличья антисыворотка против IFN- α 2 (иммуноглобулиновая фракция, концентрация антител 10 мг/мл) получена из ВНИИ особо чистых препаратов (Ленинград). Очищенный рекомбинантный IFN- α 2 с удельной активностью около 10^8 МЕ/мг предоставлен В. В. Кравченко (ВНИИ молекулярной биологии), конъюгат козьих антикроличьих IgG с пероксидазой хрена получен от А. М. Наякшина (Институт цитологии и генетики СО АН СССР). Вирус энцефаломиокардита мышей получен из Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, диплоидная культура клеток легкого эмбриона человека ДК-58 — из банка культур клеток ВНИИ молекулярной биологии.

Очистку растворовителей проводили по стандартным методикам, ацетонитрил для обращенно-фазовой хроматографии очищали перегонкой над $KMnO_4$ и P_2O_5 . Тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в системах хлороформ — метанол — уксусная кислота, 90 : 7 : 3 (А); хлороформ — этилацетат — пиридин, 80 : 15 : 5 (Б), этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 61 : 23 : 10 : 6 (В); *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 7 : 1 (Г); *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 5 : 5 : 1 : 4 (Д). Пятна обнаруживали в видимом или УФ-свете, а также медь-нингидриновым и хлор-бензидиновым реактивами.

Для ВЭЖХ пептидов использовали хроматограф Altex 322 с УФ-детектором от микроколоночного хроматографа «Обь-4». Аналитическую хроматографию проводили с использованием колонки ($3,2 \times 250$ мм) с носителем LiChrosorb RP-18 (10 мкм; Merck) в градиенте ацетонитрила (5—90% за 30 мин) в воде, содержащей 0,1% трифторуксусной кислоты. Скорость элюции 1 мл/мин. Препаративную ВЭЖХ проводили с использованием колонки (10×250 мм) с LiChrosorb RP-18 (10 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила (3—60% за 60 мин) в 0,1% водной трифторуксусной кислоте при скорости потока 5 мл/мин.

Аминокислотный анализ проводили после кислотного гидролиза (смесь 6 н. HCl — трифторуксусной кислоты, 2 : 1; 25 и 45 мин в запаянных ампулах при 165° С) на автоматическом аминокислотном анализаторе Biotronic LC-7000 (ФРГ).

УФ-спектры снимали на приборе Perkin — Elmer 550 (США), ИК-спектры записывали на AccuLab-8 (США). Оптическое вращение измеряли на приборе DIP-4 (Jasco, Япония). Масс-спектры регистрировали на при-

боре MS 7070 (VG Analytical, Англия) в режиме бомбардировки ускоренными атомами аргона (FAB).

Сведения о методах получения Pse-эфиров Вос-аминокислот и ступенчатого синтеза пептидов с использованием активированных эфиров Вос-аминокислот приведены в работе [11]. Суммарные выходы и свойства пептидных сегментов приведены в таблице.

Удаление Pse-группы с защищенных пептидов. Pse-эфир соответствующего пептида растворяли в минимальном объеме DMF, добавляли пиперидин до конечной концентрации 25—30% и выдерживали смесь 30 мин при комнатной температуре. Далее выделение пептида со свободной карбоксильной группой проводили двумя способами, в зависимости от растворимости продуктов. *Метод А* (для всех пептидных сегментов, приведенных в таблице): реакционную смесь разбавляли 150 мл этилацетата и промывали 5% раствором лимонной кислоты; органический слой сушили Na_2SO_4 и упаривали; остаток растирали с эфиром, промывали петролейным эфиром и переосаждали из ацетона в петролейный эфир, отфильтровывали и сушили в вакууме. Пептиды были гомогенны по данным ТСХ и аналитической ВЭЖХ. Выходы и физико-химические свойства приведены в таблице.

Метод Б (для защищенных сегментов перед полным деблокированием или перед аналитической ВЭЖХ): реакционную смесь разбавляли 8—10 объемами сухого эфира, промывали на фильтре эфиром и сушили; сухой осадок растворяли в уксусной кислоте и осаждали продукт эфиром.

Конденсация пептидных фрагментов

Woc-Tyr(Bzl)-Ser-Pro-Cys(Acm)-Ala-Trp(For)-Glu-(Bzl)-Val-Val-Arg-(Mts)-Ala-OPse (VIII). К 0,75 г (0,5 ммоль) трифторацетата, полученного из пентапептида (IV), в 3 мл DMF добавляли 0,5 г моногидрата *n*-толуолсульфокислоты и растворитель отгоняли в вакууме. Остаток переупаривали с хлороформом, растирали с эфиром и сушили в вакууме. Полученный тозилат аминокомпонента и 0,6 г (0,75 ммоль) пептида (Va) растворяли в 5 мл DMF. Раствор охлаждали до 0° С и добавляли 0,5 г (3,75 ммоль) НОВТ, 0,101 мл (1 ммоль) *N*-метилморфолина и 0,206 г (1 ммоль) DCC. Смесь выдерживали 2 ч при 0° С и 16 ч при 20° С. Полноту ацилирования определяли как описано ранее [11]. Выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали, промывали DMF (3 × 3 мл), объединенные фильтраты разбавляли равным объемом ацетона и выливали в 100 мл эфира. Осадок промывали эфиром, этилацетатом и переосаждали из 5 мл DMF в 50 мл этилацетата. Выход пептида составил 1,03 г (95%). т. пл. 203—205° С $[\alpha]_D^{22} -24^\circ$ (*c* 0,5; DMF). Аминокислотный состав соответствовал ожидаемому, соотношение диагностических аминокислот [16]: Ala 2,0 (2); Arg 0,95 (1).

Аналогично, в соответствии со схемой синтеза фрагментов исходя из тозилатов С-компонентов и пептидов (IVa)—(VIIa), получены следующие фрагменты (обозначения в соответствии со схемой): пептид (IX), выход 92%, т. пл. 224—223° С $[\alpha]_D^{22} -32^\circ$ (*c* 0,5; DMF), Leu 1,0 (1), Ala 2,1 (2); пептид (XI), выход 98%, т. пл. >300° С $[\alpha]_D^{22} -36,2^\circ$ (*c* 0,5; DMF); Ile 1,0 (1), Ala 1,2 (1); пептид (XII), выход 89%, т. пл. 198—201° С $[\alpha]_D^{22} -38,5^\circ$ (*c* 0,5; DMF), Leu 1,0 (1), Ala 1,05 (1); пептид (XIV), выход 94%, т. пл. 286—284° С, $[\alpha]_D^{22} -25,6^\circ$ (*c* 0,5; DMF), Arg 1,0 (1), Ala 1,1 (1).

Пептиды (X) и (XIII) получены ацилированием 2-кратным избытком Вос-Tyr(Bzl)-ONSu пептидов (IX) и (XII) (после удаления Вос-защиты). Для пептида (X) выход 99%, т. пл. 234—236° С, $[\alpha]_D^{22} -35,2^\circ$ (*c* 0,5; DMF), Tyr 1,89 (2), Leu 1,0 (1). Для пептида (XIII) выход 100%, т. пл. 241—244° С, $[\alpha]_D^{22} -40,3^\circ$ (*c* 0,5; DMF), Tyr 1,82 (2), Ala 1,0 (1).

Деблокирование пептидов. С защищенного пептида удаляли Вос- и Pse-группы, как описано выше. Частично деблокированный пептид растворяли в охлажденной до 0° С смеси трифторуксусной кислоты и

тиоанизола (9 : 1), содержащей 5% *n*-крезола, добавляли метансульфо-кислоту до концентрации 1 М (3—5-кратный избыток на каждую удаляемую группу) и выдерживали 1,5 ч при 0° С. Раствор разбавляли 10-кратным объемом охлажденного сухого эфира, осадок отделяли центрифугированием, промывали несколькими порциями эфира. Подсушенный осадок пересаждали из уксусной кислоты эфиром и снова промывали двумя порциями эфира, затем сушили в вакууме.

Очистка деблокированных пептидов

Пептид (I), IFN (129—144). Деблокированный S-Асм-пептид (I), полученный из 1 г защищенного пептида (IX), растворяли в 1 мл 1 М уксусной кислоты и хроматографировали на колонке (25 × 900 мм) с сефадексом G-15. Фракции, содержащие продукт, объединяли, концентрировали в вакууме и пептид рехроматографировали на колонке (15 × 400 мм) с TMS-силикагелем (30—40 мкм). Колонку промывали 0,1% водной трифторуксусной кислотой и продукт элюировали градиентом ацетонитрила 0—70%. Объем градиента 800 мл. Объем фракций 10 мл. Фракции 28—40 объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизовали. Выход 265 мг (29%), R_f 0,2 (Г); 0,54 (Д); аминокислотный состав: Ala 2,00; Arg 1,02; Glu 2,08; Leu 1,00; Pro 0,89; Tyr 0,95; Lys 3,06; Ser 0,86; Trp 0,76; Val 1,74. Содержание основного вещества, по данным аналитической ВЭЖХ, 98%; время удерживания 18,9 мин.

Пептид (II), IFN (124—138). Деблокированный S-Асм-пептид (II), полученный из 250 мг защищенного пептида (XIV), обессоливали на колонке с сефадексом G-15 в 1 М уксусной кислоте и выделяли препаративной ВЭЖХ. Выход пептида 55 мг (42%), R_f 0,26 (Г); 0,65 (Д); аминокислотный состав: Ala 1,00; Arg 1,95; Glu 1,00; Leu 2,10; Pro 0,95; Tyr 2,00; Lys 2,91; Ile 0,98; Thr 0,91; Ser 0,89. Содержание основного вещества, по данным аналитической ВЭЖХ, 98—99%; время удерживания 18,2 мин.

Пептид (III), IFN (124—144) получен аналогично пептиду (II) из 250 мг защищенного продукта (XI). Выход 65 мг (35%), R_f 0,34 (Г); 0,6 (Д); аминокислотный состав: Ala 2,00; Arg 1,94; Glu 2,05; Leu 2,00; Pro 0,96; Tyr 1,90; Lys 3,05; Ser 0,87; Ile 1,02; Thr 0,91; Trp 0,75; Val 1,81. Содержание основного вещества, по данным ВЭЖХ, 97—98%; время удерживания 21,4 мин.

Конъюгация пептидов с БСА. С остатка цистеина в пептидах (I) и (II) удаляли Асм-защиту действием ацетата ртути (II) и конъюгировали пептиды с БСА с помощью бифункционального реагента *N*-оксисукцинимидного эфира 3-(2-пиридилдигидро)пропионовой кислоты [13] по методике, описанной ранее [11]. По данным спектрофотометрических измерений высвобождающегося 2-тиопиридона и аминокислотного анализа, степень модификации составила 18—19 моль пептида на 1 моль БСА для пептида (I) и 24—25 моль пептида на 1 моль БСА для пептида (II).

Получение антисывороток. Кроликов и морских свинок иммунизировали подкожно 1—3 мг конъюгата, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда, последующие иммунизации проводили в течение 2 мес с интервалом в 2 нед тем же количеством антигена в неполном адьюванте Фрейнда. Кровь брали на 7-е и 9-е сут после последней поддерживающей иммунизации.

Твердофазный иммуноферментный анализ. В ячейки планшета для микротитрования (Иммунон-2, Dynatech) вносили по 100 мкл раствора антигена (10 мкг/мл для пептидов и 2 мкг/мл для IFN- α 2) в 0,05 М NaHCO₃. После инкубации в течение 8—12 ч при 5° С планшеты промывали и инкубировали 2 ч в трис-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20. Все последующие промывки и разведения антител осуществляли этим же буфером. Планшеты промывали 2 раза и вносили в ячейки по 100 мкл разведенной антисыворотки, выдерживали 2—3 ч при 20° С, промывали 3 раза и в ячейки вносили по 100 мкл раствора конъюгата козьих антител против IgG кролика с пероксидазой хрена. Выдерживали

1 ч, промывали 3 раза и в ячейки добавляли раствор *o*-фенилендиамина (0,5 мг/мл) и 0,006 % H_2O_2 в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере. Через 20 мин реакцию останавливали 1 М H_2SO_4 и планшет спектрофотометрировали при 492 нм. Для проведения реакций ингибирования антитела в разведении 1 : 1000 инкубировали в пробирке с различными концентрациями пептида (0,01—19 мкг/мл) в течение 16 ч при 4° С, затем смесь вносили в ячейки планшетов и анализировали как описано выше.

Конкурентное связывание пептидов с анти-(IFN- α 2)-IgG. В качестве ^{125}I -меченого антигена использовали радиоiodированный S-Асм-пептид 124—144 (III), полученный по методу [17], с удельной радиоактивностью около $2 \cdot 10^7$ имп/(мин·мкг). Немеченые пептиды (I) и (III) (концентрация от 10^{-9} до 10^{-5} М) в 50 мкл 0,05 М фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 0,15 М NaCl и 10% БСА, смешивали с 50 мкл антисыворотки (концентрация антител 1 мг/мл), выдерживали ночь при 4° С, затем добавляли ^{125}I -меченый пептид (III) ($150 \cdot 10^3$ имп/мин) в 50 мкл буфера, инкубировали еще 6—10 ч при 4° С. К реакционной смеси добавляли 800 мкл суспензии активированного угля (10 г угля, 0,6 г декстрана с M_r 500 000, 20 мл лошадиной сыворотки, 80 мл воды), выдерживали 10 мин при 4° С, центрифугировали и просчитывали радиоактивность супернатанта.

Определение нейтрализации антивирусной активности IFN- α 2 и пептидов. Антивирусную активность в интерфероновых образцах определяли по подавлению цитопатического действия (ЦПД) вируса энцефаломиокардита мышей на диплоидной культуре клеток человека ДК-58 в 96-луночных планшетах «Cel-Cult» (Sterilin, Великобритания), как описано в работе [18]. За титр IFN принимали такое разведение образца, при котором ЦПД вируса отсутствовало в 50% лунок, обработанных при одном разведении. Для оценки нейтрализующей активности сывороток в работе использовался метод «постоянной концентрации антител», предложенный ранее [14]. К исследуемым клеткам добавляли ряд смесей антипептидных антисывороток и IFN- α 2, в которых антитела были в постоянной концентрации (разведение антисыворотки 1 : 30), а IFN- α 2 — в серии 2-кратных разведений. Далее проводили стандартное определение концентрации IFN- α 2, результаты сравнивали с контрольным образцом, не содержащим антисыворотки. Определяли концентрацию IFN- α 2, уменьшающуюся до 1 ед./мл под действием антисыворотки. Это значение, выраженное в виде титра, обозначали как степень нейтрализации N_{max} по аналогии с работой [15]. Для определения нейтрализующей активности пептидов использовали растворы пептидов (1 мг/мл) вместо антисыворотки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Valenzuela D., Weber H., Weissmann C. // Nature. 1985. V. 313. № 6004. P. 698—700.
2. Pestka S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1983. V. 221. № 1. P. 1—37.
3. McGray J., Weil R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 16. P. 4299—4303.
4. Ackerman S., zur Nedden D., Hentzelman N., Hunkapiller M., Zoon K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 4. P. 1045—1047.
5. London N., Favre C., Vove S. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 24. P. 4131—4141.
6. Костров С. В., Чернышская Т. В., Ходова О. М., Борузов С. И., Рыжавская, А. С., Изотова Л. С., Строгина Л. Я. // Биохимия. 1985. Т. 50. № 11. С. 1859—1865.
7. Arnheiter H., Ohno M., Smith M., Gutte B., Zoon K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 9. P. 2539—2543.
8. Zoon K., zur Nedden D., Arnheiter H. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 9. P. 4695—4697.
9. Weissmann C., Weber H. // Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 1986. V. 33. № 2. P. 251—300.
10. Hoop T., Woods K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 15. P. 3824—3828.
11. Самуков В. В., Калашиников В. В., Офицеров В. И., Швалье А. Ф. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1037—1047.
12. Walter G. // J. Immunol. Meth. 1986. V. 88. № 2. P. 149—161.
13. Швалье А. Ф., Офицеров В. И., Самуков В. В. // Журн. общ. химии. 1985. Т. 55. № 9. С. 2152.
14. Kawade Y., Watanabe Y. // Immunology. 1985. V. 56. № 3. P. 496—514.
15. Kawade Y., Watanabe Y. // Immunology. 1985. V. 56. № 3. P. 489—495.

16. Tzougraki C., Makofske R., Gabriel T., Michalewsky J., Meienhofer J., Li C. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1980. V. 15. № 4. P. 377—398.
17. Greenwood F., Hunter W., Clover D. // J. Biochem. 1963. V. 89. № 1. P. 114—125.
18. Weck P., Apperson R., May L., Stebbing N. // J. Gen. Virol. 1981. V. 57. № 2. P. 233—237.

Поступила в редакцию
25.V.1989

После доработки
16.I.1990

A. F. SHEVALIER, V. V. SAMUKOV, V. I. OFITSEV, V. V. KALASHNIKOV,
G. A. MIZENKO, A. A. KOLOKOLTSOV

**IMMUNOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF SYNTHETIC
PEPTIDE FRAGMENTS FROM THE AMINO ACID SEQUENCE 124—144
OF THE HUMAN LEUKOCYTE INTERFERON $\alpha 2$**

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,
Novosibirsk Region*

Three peptides corresponding to the sequences 124—144, 124—138, 129—144 of the human leukocyte interferon $\alpha 2$ (IFN- $\alpha 2$) were synthesized. The synthesis was performed by DCC-HOBT coupling of protected peptide segments in solution. The segments were obtained by the active ester coupling methodology using base-labile 2-[4-(phenylazobenzyl)sulfonyl]ethyl (Pse) group as carboxyterminal protection. After complete deprotection with 1 M methanesulphonic acid in trifluoroacetic acid — thioanisole — *m*-cresol mixture the peptides were purified by reversed-phase chromatography. The studies of interaction of the peptides with rabbit antiserum against IFN- $\alpha 2$ revealed at least one minor antigenic determinant within the 124—144 region of IFN- $\alpha 2$ amino acid sequence. Rabbit antisera developed against peptides 124—138 and 129—144 showed ability of binding recombinant IFN- $\alpha 2$ and neutralizing its antiviral activity. Free peptides or their conjugates with bovine serum albumine did not display antiviral activity, neither could they inhibit the activity of IFN- $\alpha 2$.