



УДК 578.112.083.3 : 578.835'224 : 615.371

© 1991 г.

А. В. Павлов, С. С. Рыбаков, В. Н. Иванющенков,
А. В. Ченуркин, В. Н. Петров, Н. Н. Дрягалин,
А. Н. Бурдов

ЗАЩИТА ОТ ЯЩУРА ЕСТЕСТВЕННО-ВОСПРИИМЧИВЫХ ЖИВОТНЫХ ЛИНЕЙНЫМ ПОЛИМЕРОМ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА

Всероссийский научно-исследовательский ящурный институт, г. Владимир

Синтезирован VP_1 -(142—155) $_n$ -пептид вируса ящура A_{22550} . Мономер данного пептида имел низкую иммуногенную активность. Полимерная форма пептида индуцировала образование вируснейтрализующих антител у кроликов и защищала 100% морских свинок. Однократная иммунизация овец и двукратная иммунизация крупного рогатого скота обеспечивали защиту животных от ящура при заражении их вирулентным гомологичным вирусом.

Противоящурной вакцины в мире производится и применяется больше, чем какой-либо другой, включая и вакцины, используемые в медицине [1]. Разрабатываемые в настоящее время синтетические вакцины будут иметь ряд преимуществ перед традиционными вакцинами, изготавливаемыми из целого вириона [2, 3]. В связи с этим в ряде стран интенсивно ведутся исследования по созданию противоящурных вакцин на основе антигенов, полученных методами генетической инженерии и химического синтеза.

В настоящее время синтезирован и испытан ряд пептидов, представляющих собой детерминанты иммуногенного полипептида VP_1 (1D) вируса ящура разных типов [4—9]. Наибольшую активность показали два пептида — пептид длиной 40 аминокислотных остатков, включающий в себя основную и С-концевую антигенные детерминанты VP_1 вируса ящура O_1 Кауфбюрен [6] и пептид VP_1 -(135—159) вируса ящура A_{22} [8]. Первый защищал крупный рогатый скот, второй — крупный рогатый скот и овец от заболевания ящуром при контрольном заражении животных вирулентным гомологичным вирусом.

Цель данной работы — синтез пептида с минимальным количеством аминокислотных остатков, защищающего естественно-восприимчивых к ящуре животных от заболевания при заражении вирусом ящура A_{22550} .

Одним из путей повышения антигенности коротких пептидов является их полимеризация. Однако получение полимерных форм пептидов — антигенных детерминант VP_1 вируса ящура — с использованием глутарового альдегида не дало ожидаемых результатов в плане повышения их иммуногенной активности [10, 11].

Для достижения поставленной цели нами был получен полимерный пептид (XVIII) с аминокислотной последовательностью VP_1 -(142—155) $_n$ вируса ящура A_{22550} :

142

155

 $(\text{Gly-Arg-Arg-Gly-Asp-Leu-Glu-Pro-Leu-Ala-Ala-Arg-Val-Ala})_n$

Сокращения: АПА, АВА и ВНА — антипептидные, антивирусные и вируснейтрализующие антитела, BSA — бычий сывороточный альбумин, KLN — гемоцианин улитки, ЛАФ и НАФ — полный и неполный адьювант Фрейнда, НОВТ — 1-гидроксибензотриазол, OFm — 9-флуоренилметилокси, Bros — 2-(*n*-бисфенил)пропил(2)оксикарбонил, OPf — пентафторфенилокси, TFA — трифторуксусная кислота.

Синтез этого пептида осуществляли классическим жидкофазным методом с использованием стратегии максимального блокирования остатков трифункциональных аминокислот группами *трет*-бутильного типа (схема 1).

Пептидные фрагменты синтезированы ступенчатым наращиванием с использованием в основном оксисукцинимидных эфиров. Влочные конденсации осуществляли карбодимидным методом. Для предотвращения побочных реакций аргинина в положениях 143, 144 и 153 заменяли на орнитин. После проведения полимеризации и удаления защитных групп орнитиновые остатки переводили в аргининовые путем обработки пептида (XVII) 1-амидино-3,5-диметилпиразолнитратом [12]. Превращение орнитина в аргинин контролировалось аминокислотным анализом и обычно превышало 90%. Активированный эфир пептида (XV) с защищенными боковыми группами и свободной концевой группой NH₂ [13] подвергали полимеризации, получая линейный регулярный полимер типа «голова к хвосту».

Для того чтобы исключить рацемизацию остатка аланина-155 в ходе полимеризации, при разработке стратегии синтеза остаток глицина-142 был перемещен в С-конец пептидной цепи, что позволило получить полимерный пептид, макромолекулы которого содержат в своем составе участки с последовательностью 142—155.

Синтез мономерной формы пептида 142—155 (XXXII) осуществляли классическим методом в растворе (схема 2). Для защиты гуанидиновой функции аргинина использовали тозилную или нитрогруппы, для защиты α -карбоксильных функций глутаминовой и аспарагиновой кислот — бензальные группы. Последовательность 142—155 разбивали на три фрагмента: 142—145, 146—151 и 152—155, которые синтезировали ступенчатым присоединением оксисукцинимидных эфиров или смешанных ангидридов защищенных аминокислот. Конденсацию фрагментов 146—151 и 152—155 провели с использованием метода ДСС/НОВТ, полученный пептид конденсировали со смешанным ангидридом фрагмента 142—145. После очистки и деблокирования защищенного пептида (XXXI) получили пептид 142—155 (XXXII).

Синтез пептидов проводили в условиях, гарантирующих минимальную рацемизацию аминокислотных остатков [14]. В процессе синтеза все промежуточные защищенные пептиды характеризовали методом ТСХ. Значения и выходы продуктов представлены в табл. 1. Структуры пептидных фрагментов и целевого пептида подтверждали данными аминокислотного анализа после кислотного гидролиза (табл. 2).

Полученный полимер фракционировали методом препаративной гель-эксклюзионной хроматографии на колонке с биогелем Р-30. Молекулярные массы, определенные методом аналитической микроколоночной гель-эксклюзионной хроматографии, для полученных пяти фракций полимера равны соответственно 34, 30, 23, 20 и 10 кДа. Степени полимеризации этих фракций равны соответственно 24, 20, 16, 14 и 7. Молекулярные массы (M_r) вычисляли по следующему уравнению, предполагая, что анализируемые пептиды имеют глобулярную структуру:

$$\lg M_r = 5,060 - 0,443V_e/V_0,$$

где V_e — объем удерживания вещества, V_0 — свободный объем колонки.

Уравнение получили по результатам хроматографирования модельной смеси, состоящей из бычьего сывороточного альбумина (M_r 66 000), трипсиногена (M_r 24 000), лизоцима (M_r 14 300) и инсулина (M_r 6000). Профили элюции пептида (XVIII) и модельной смеси приведены на рисунке.

Иммуногенные свойства мономера (XXXII) и полимера (XVIII) изучали на лабораторных и естественно-восприимчивых к ящуру животных.

Результаты испытаний пептида (XXXII) и его конъюгатов на кроликах показали (табл. 3), что мономер (XXXII) в свободном виде и в виде конъюгата имеет низкую иммуногенную активность. Двукратная иммунизация морских свинок мономером в дозе 400 мкг защищала не более

Схема 2

142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155
С1у	Arg	Arg	С1у	Asp	Leu	С1и	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Val	Ala
								Z-0Su H	08a ^t			Z-0Su H	08a ^t
								Z	08a ^t			Z	08a ^t
							Z	XXII	08a ^t			Z	08a ^t
							Z	XXIIa	08a ^t			Z	08a ^t
								XXIII	08a ^t				
								XXIIIa	08a ^t				
								XXIV	08a ^t				
								XXIVa	0H				
								XXV	0H 8oc				
								XXVa	0H 8oc				
								XXVI	0H H				
								XXVIa	0H H				
								XXVII	08zL				
								XXVIIa	08zL				
								XXVIII	08zL				
								XXVIIIa	08zL				
								XXIX	08zL				
								XXIXa	08zL				
								XXX	0H				
								XXXa	0H				
								XXXI	0H				
								XXXII	0H				

Синтез VP_Г(142-155)-пептида (XXXII) вируса ящура А₂₉550

Выходы и хроматографические подвижности пептидов

Пептид	Выход, %	Значение R_f (система) *	Пептид	Выход, %	Значение R_f (система) *
I	82	0,82(A), 0,89(B)	XVI	99	н.о.
II	92	0,77(A), 0,89(B)	XVII	98	»
III	86	0,71(A), 0,86(B)	XVIII	45	»
IV	67	0,22(B), 0,19(Г)	XIX	82	0,81(A), 0,86(B)
V	74	0,15(B), 0,07(Г)	XX	67	0,35(A), 0,60(B)
VI	81	0,19(B), 0,08(Г)	XXI	81	0,10(B), 0,20(B)
VII	74	0,84(A), 0,90(B)	XXII	89	0,85(A), 0,91(B)
VII _a	57	0,17(B), 0,19(Д)	XXIII	87	0,76(A), 0,86(B)
VIII	69	0,33(B), 0,59(B)	XXIV	72	0,72(A), 0,85(B)
IX	79	0,27(B), 0,64(B)	XXV	89	0,25(B), 0,50(B)
X	56	0,26(B), 0,11(Г)	XXVI	88	0,20(B), 0,46(B)
XI	90	0,80(A), 0,88(B)	XXVII	54	0,28(B), 0,70(Д)
XII	75	0,67(A), 0,83(B)	XXVIII	82	0,41(A), 0,62(B)
XII _a	86	0,12(B), 0,40(B)	XXIX	65	0,19(A), 0,45(B)
XIII	61	0,34(B), 0,62(Д)	XXX	77	0,23(B), 0,80(Д)
XIV	96	0,85(B), 0,92(Д)	XXX _a	82	0,12(B), 0,67(Д)
XV	93	0,15(B), 0,53(Д)	XXXI	81	0,23(B), 0,60(Д)
			XXXII	64	0,32(Д), 0,30(Е)

* Системы для хроматографии: хлороформ — этилацетат — этанол, 6:3:1(A), 3:2:1(B), хлороформ — этанол — бутанол — этилацетат — вода, 10:6:4:3:1(B), хлороформ — этанол — уксусная кислота, 85:10:5(Г), бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1(Д), этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 5:3:1:2(Е), н.о. — не определяли.

Таблица 2

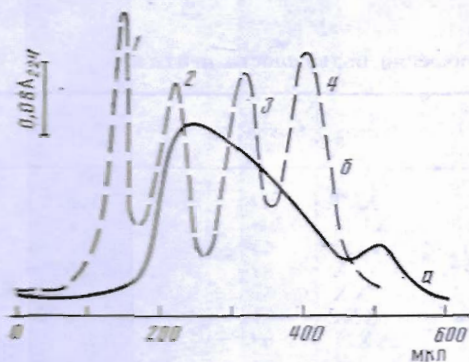
Данные аминокислотного анализа

Пептид	Asp	Glu	Gly	Arg	Ala	Pro	Val	Leu	Orn
VI			1,16(1)		2,97(3)		1,09(1)	0,91(1)	
IX	1,00(1)*	1,03(1)				1,15(1)		0,83(1)	
X	1,04(1)	1,10(1)	1,05(1)		2,87(3)	1,20(1)	1,00(1)	1,81(2)	0,87(1)
XII			1,00(1)						2,08(2)
XIII	0,96(1)	1,05(1)	2,05(2)		3,06(3)	1,19(1)	1,04(1)	1,86(2)	2,78(3)
XVIII	1,07(1)	1,21(1)	1,90(2)	2,50(3)	2,97(3)	1,22(1)	1,00(1)	1,90(2)	0,21(0)
XXI				0,78(1)	1,85(2)		1,00(1)		
XXVI	1,09(1)	0,91(1)			0,90(1)	0,92(1)		2,0(2)	
XXVII	0,90(1)	1,16(1)		0,93(1)	2,74(3)	1,21(1)	1,00(1)	1,72(2)	
XXX _a			1,00(1)	0,81(1)					
XXXI	1,00(1)	1,20(1)	2,13(2)	2,55(3)	2,72(3)	1,20(1)	1,07(1)	2,19(2)	
XXXII	1,10(1)	1,09(1)	2,20(2)	2,62(3)	3,02(3)	1,20(1)	1,00(1)	1,87(2)	

* В скобках указано теоретическое содержание аминокислот.

20% животных. Протективный эффект полимера (XVIII) был значительно выше. Двукратная иммунизация морских свинок 20 мкг полимера обеспечивала их 100% защиту (табл. 4). Необходимо отметить, что, несмотря на низкий титр вируснейтрализующих антител у некоторых животных (1,23; 1,33; 1,5 log₂), они были защищены от ящура при контрольном заражении. Вероятно, этот факт можно объяснить тем, что антитела против вируса нейтрализуют вирус *in vivo* более эффективно, чем *in vitro* [15].

Иммуногенные свойства отдельных фракций полимера были изучены на лабораторных животных. Несмотря на значительно различающуюся молекулярную массу фракций, все они в дозе 100 мкг вызывали индукцию одинакового уровня нейтрализующих антител у кроликов после двукратной иммунизации (табл. 3). Двукратная иммунизация морских свинок различными фракциями полимера в дозе 20—50 мкг также вызывала одинаковый уровень нейтрализующих антител и обеспечивала 100%



Микроколоночная гель-эксклюзионная хроматография пептида (XVIII) (а) и модельной смеси белков (б). 1 — BSA, 2 — трипсиноген, 3 — лизоцим, 4 — инсулин. Условия хроматографии см. в «Экспер. части»

защиту животных (табл. 4). Различия выявить не удалось, очевидно, из-за относительно высоких доз фракций, взятых для иммунизации.

Изучение протективных свойств полимера (XVIII) на естественно-восприимчивых к ящуру животных (табл. 5) показало, что двукратная иммунизация крупного рогатого скота различным сочетанием доз указанного полимера обеспечивала защиту более 70% животных. При этом двум незащищенным животным при повторной иммунизации было введено по 1 мг полимера (XVIII) и лишь у одного животного из пяти дважды иммунизированных 3 мг полимера уровень нейтрализующих антител был недостаточен для его защиты от заболевания при контрольном заражении. Полимер оказался эффективным и при замене адьюванта Фрейнда синтетическим маслом.

В опытах на крупном рогатом скоте отмечена корреляция между уровнем нейтрализующих антител и защитой животных при заражении вирулентным гомологичным вирусом.

Однократная иммунизация овец полимером в дозе 5 мг, а также двукратная иммунизация по 1 или 3 мг обеспечивали полную защиту их от заболевания (табл. 5).

Таким образом, показано, что линейная полимеризация относительно короткого 14-членного пептида VP₁ вируса ящура заметно усиливает его иммуногенные свойства.

Экспериментальная часть

В работе использовали реактивы и производные аминокислот фирм Reanal (Венгрия), Fluka (Швейцария), Sigma (США) и Merck (ФРГ). Тонкослойную хроматографию промежуточных продуктов осуществляли на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄. Для определения аминокислотного состава гидролиз пептидов проводили 24 ч 6 н. HCl при 110° С. В процессе синтеза промежуточные защищенные пептиды (VIII)–(X), (XII), (XIII), (XXIV) — (XXVII) и (XXXI) подвергали очистке методом гель-эксклюзионной хроматографии на колонке с сефадексом LH-20 (Pharmacia) в этаноле. Пептиды (I), (XIX) и (XXII) очищали перекристаллизацией из смеси эфира с гексаном, (II), (XI) и (XX) — из смеси этилацетата с эфиром, (III), (IV) и (XXI) — из смеси этанола с этилацетатом и добавлением эфира, (V) — из смеси диметилформамида с этанолом и добавлением этилацетата. Пептид (XIIa) очищали переосаждением из эфира гексаном, (VI) — из диметилформамида смесью эфира с гексаном, (XXX) — из хлороформа эфиром.

Пептид (XXVIII) очищали обработкой гексаном, (XXXa) — этилацетатом. Пептиды (IIa), (VIIa), (XV), (XVII), (XXa), (XXIa), (XXVa), (XXVIIa), (XXVIIIa), (XXIX) и (XXIXa) очищали обработкой эфиром, пептиды (XIV) и (XVI) — смесью эфира с гексаном. Пептид (XVIII) очищали диализом против воды, (XXXII) — гель-эксклюзионной хроматографией на колонке с сефадексом G-10 (Pharmacia).

Аналитическую микроколоночную гель-эксклюзионную хроматографию выполняли на хроматографе «Милихром» (СССР). На колонку (0,25 ×

Антигенность мономера 142—155 (XXXII), полимера (142—155)_n (XVIII) и его фракций для кроликов *

Антиген	Доза, мкг	Титр ВНА, log ₂ **	Антиген	Доза, мкг	Титр ВНА, log ₂ **
142—155	400	0,66	Фракция 1	100	1,0—5,5
142—155/BSA	400	0,66	2	100	1,5—2,5
142—155/КЛН	400	0,66	3	100	1,5—3,0
(142—155) _n	400	3,5—3,75	4	100	1,0—3,33
»	100	1,75—4,33	5	100	2,33—2,77

* В опыте на каждый вариант было взято по 3 животных.

** Титр ВНА определяли на 60-е сут после первой иммунизации.

Таблица 4

Антигенность и иммуногенность мономера 142—155 (XXXII), полимера (142—155)_n (XVIII) и его фракций для морских свинок

Антиген	Количество животных	Доза, мкг	Защита, % *	Титр ВНА, log ₂ **	Титр АПА, Ig	Титр АВА, Ig
142—155	7	400	20(1/5)	<1,0(2)		н.о.
142—155/BSA	8	350	0(0/5)	<1,0(3)		»
(142—155) _n	32	400	100(20/20)	1,33—5,17(12)		»
»	7	50	100(4/4)	1,23(3)		»
»	17	20	100(10/10)	1,5—4,33(7)	4,6	3,2
Фракция 1	5	50	100(5/5)	н.о.		н.о.
	8	20	100(5/5)	2,0—2,66(3)	4,6	3,0
2	7	20	100(4/4)	2,0—4,5(3)	4,6	3,0
3	9	20	100(5/5)	2,0—2,76(4)	4,4	2,8
4	7	20	100(4/4)	2,0—2,66(2)	3,8	3,0
5	3	20	100(3/3)	н.о.		н.о.
Контроль	8	50	100(4/4)	1,0—3,66(3)	4,1	2,6
	10	—	0(0/5)	<1,0(5)		н.о.

* Число защищенных/число зараженных животных. н.о. — не определяли.

** В скобках указано количество животных.

Таблица 5

Антигенность и иммуногенность полимера (142—155)_n (XVIII) для естественно-восприимчивых к ящуру животных

Вид животных	Номера животных	Доза *, мг	Адъювант	Титр ВНА, log ₂ **			Защита животных **
				21	42	63	
Крупный рогатый скот	1	3,5	ПАФ, НАФ	3,76	7,0	9,0	+
	2	3,5		3,66	7,0	9,33	+
	3	3,0 п 1,0		<1,0	5,5	4,66	—
	4	3,0 п 1,0		2,0	5,76	7,16	+
	5	1,0		1,25	2,17	4,66	—
	6	1,0		4,25	6,0	9,5	+
	7	3,0		4,33	6,76	9,0	+
	8	3,0		<1,0	1,5	3,66	—
	9	3,0		4,5	6,5	9,17	+
	10	3,0		<1,0	3,17	5,83	+
		11	3,0	Синтетическое масло	6,66	3,76	7,0
	12—15		Контроль	н.о.		<1,0	—
Овцы	1	5,0 **	ПАФ, НАФ	6,66	8,55	8,66	+
	2	5,0 **		5,17	6,5	9,23	+
	3	1,0		3,75	4,5	7,5	+
	4	1,0		4,23	7,33	10,7	+
	5	3,0		3,76	5,5	8,0	+
	6—10		Контроль	н.о.		<1,0	—

* Двукратная иммунизация с интервалом 42 сут, каждая — в указанной дозе.

** Однократная иммунизация.

** Через 21, 42 и 63 сут после первой иммунизации.

** «+» — не заболели, «—» — заболели с генерализацией.

× 10 см), заполненную биогелем P-30 (400 меш, Bio-Rad), наносили 10 мкг исследуемого пептида в 5 мкл буферного раствора. Элюцию 0,07 М фосфатно-натриевым буферным раствором с pH 7,8 вели со скоростью 20 мкл/мин, оптическое поглощение элюата регистрировали при 224 нм.

Woc-Ala-Gly-OBzl (I). К раствору 86 г (260 ммоль) Tos-OH·H-Gly-OBzl и 33 мл (300 ммоль) метилморфолина в 300 мл DMF при перемешивании при 20° С добавляли 57 г (200 ммоль) Woc-Ala-OSu, выдерживали 24 ч и выливали в смесь этилацетата с водой. Органический слой промывали 10% лимонной кислотой, 5% раствором NaHCO₃, водой, насыщенным раствором NaCl, высушивали над безводным Na₂SO₄, упаривали в вакууме и перекристаллизовывали. Получали 56 г защищенного пептида (I).

Пептиды (II), (III), (VII) — (IX), (XI), (XIX), (XXI), (XXII), (XXV), (XXVI) и (XXX) получали аналогично пептиду (I). Для пептидов (VIII), (IX), (XXI), (XXV), (XXVI) стадию промывки 5% раствором NaHCO₃ исключали.

Для удаления Woc-группы 38 г (105 ммоль) пептида (I) обрабатывали 1 ч 160 мл 50% раствора TFA в хлороформе, затем упаривали в вакууме, к остатку добавляли 100 мл хлороформа и упаривали снова. Операцию повторяли трижды. Получали трифторацетат пептида (Ia).

Трифторацетаты пептидов (IIa), (XXa), (XXIa), (XXIVa), (XXVa), (XXVIIa), (XXVIIIa) и (XXIXa) получали аналогично трифторацетату пептида (Ia).

Z-Ala-Orn(Woc)-Val-Ala-Gly-OH (IV). Раствор 34 г (50 ммоль) пептида (III) и 10,5 г (55 ммоль) Tos-OH·H₂O в 350 мл DMF гидрировали над палладиевой чернью в течение 1 сут. Ход гидрирования контролировали ТСХ. К полученному раствору тозилата пептида (IIIa) после фильтрования добавляли при перемешивании при 20° С 200 мл диметилсульфоксида, 9,4 мл (55 ммоль) диизопропилэтиламина, 16 г (50 ммоль) Z-Ala-OSu, через 1 ч еще 9,4 мл (55 ммоль) диизопропилэтиламина, выдерживали 24 ч и выливали в 2,5 мл 2% CH₃COOH. Через 24 ч выпавший осадок пептида (IV) отфильтровывали, промывали на фильтре водой, гептаном, высушивали на воздухе и перекристаллизовывали. Получали 22 г пептида (IV).

Тозилаты пептидов (IVa), (Va), (VIa), (VIIa), (VIIIa), (IXa), (Xa), (XIa), (XIXa), (XXIIa) и (XXIIIa) получали аналогично тозилату пептида (IIIa). Пептиды (V), (VI), (XXIII) и (XXIV) получали аналогично пептиду (IV).

Wroc-Orn(Woc)-Orn(Woc)-Gly-OH (XIIa). Wroc-Orn(Woc)-OH, выделенный из 17,6 г (27 ммоль) Wroc-Orn(Woc)-OH·DCHA, растворяли в 80 мл THF, добавляли при перемешивании при -15° С 5,2 г (34,5 ммоль) НОВТ·H₂O, 4,7 г (23 ммоль) DCC и перемешивали 1 ч при -15° С и 3 ч при 4° С. Полученную смесь фильтровали и добавляли при перемешивании при 4° С к раствору 20 ммоль тозилата пептида (XIa) в 100 мл DMF, нейтрализованному 3,3 мл (30 ммоль) метилморфолина. Реакционную смесь выдерживали 48 ч при 4° С, обрабатывали аналогично пептиду (I), растворяли в 25 мл этанола и подвергали хроматографической очистке на колонке (4,7 × 135 см) с сефадексом LH-20 в этаноле. Элюирование вели со скоростью 0,25 мл/мин, отбирая фракции по 15 мл. Чистоту продукта контролировали ТСХ. Фракции, содержащие загрязненный продукт, подвергали повторной очистке. Фракции, содержащие чистый продукт, упаривали и растирали с гексаном. Получали 12,5 г пептида (XII).

Для смыления пептида (XII) к 12 г (14,5 ммоль) его раствора в 60 мл этанола добавляли по каплям в течение 0,5 ч при перемешивании при 20° С 30 мл 0,5 н. раствора едкого натра. Полученный раствор выдерживали 2 ч при 20° С, упаривали досуха, растворяли в 0,5 л воды, добавляли насыщенный раствор хлорида натрия до слабого помутнения и экстрагировали эфиром. К водному слою добавляли лед, подкисляли 10% лимонной кислотой и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный раствор промывали ледяной водой, сушили над безводным Na₂SO₄ при 4° С, упаривали и очищали переосаждением. Получали 10 г пептида (XIIa).

Пептиды (X), (XIII) и (XXVII) получали аналогично пептиду (XII).

После завершения реакции конденсации (18 ч при 20° С) реакционную смесь упаривали в вакууме и проводили повторную конденсацию со свежей порцией активированного карбоксильного компонента. Выделение неочищенных продуктов проводили так же, как описано выше для пептида (IV). Очищали эти пептиды аналогично вышеописанному для пептида (XII).

(*Gly-Arg-Arg-Gly-Asp-Leu-Glu-Pro-Leu-Ala-Ala-Val-Ala*)_n. К раствору 7,51 г (3,64 ммоль) пептида (XIII) и 6 мл пиридина в 24 мл DMF при перемешивании при 20° С добавляли 11,8 г (36,4 ммоль) динитрофенилсульфата и полученный раствор выдерживали 18 ч при 20° С. Реакционную массу обрабатывали 400 мл смеси эфира с гексаном (4 : 1). Выпавший осадок растирали с 500 мл той же смеси 3 раза. Получали 7,6 г активированного эфира пептида (XIV).

Раствор 7,6 г (3,48 ммоль) пептида (XIV) в 100 мл 1,5% TFA в хлороформе выдерживали 45 мин и осаждали 1 л эфира. Через 1 ч осадок отфильтровывали и промывали эфиром. Получали 6,7 г пептида (XV).

К раствору 6,7 г (3,2 ммоль) пептида (XV) в 10 мл диметилсульфоксида при перемешивании при 20° С добавляли 0,91 мл (6,5 ммоль) триэтиламина. Реакционную массу выдерживали 24 ч. Ход полимеризации контролировали методом микроколоночной гель-эксклюзионной хроматографии проб реакционной массы, обработанных как указано ниже. Наблюдалось быстрое возрастание вязкости реакционной смеси и увеличение молекулярной массы, которая достигла максимума за указанное время. Продукт осаждали 250 мл смеси эфира с гексаном (4 : 1), отфильтровывали и промывали той же смесью (2 × 100 мл). Получали 5,8 г защищенного пептида (XVI).

Раствор 5,8 г пептида (XVI) в 75 мл TFA выдерживали 2 ч при 20° С и осаждали 1 л эфира. После фильтрования и промывания эфиром получали 4,5 г пептида (XVII).

К суспензии 10 г 1-амидино-3,5-диметилпиразолнитрата в 30 мл воды при перемешивании при 0° С добавляли по каплям 1 н. раствор NaOH до pH 9,5—10 и доводили объем водой до 80 мл. В полученном растворе при 0° С растворяли 3,5 г пептида (XVII) и выдерживали смесь при той же температуре 5 сут, поддерживая pH в пределах 9,5—10, периодически добавляя по каплям 1 н. раствор NaOH. После анализа против воды и лиофилизации получали 1,62 г пептида (XVIII).

450 мг полученного пептида растворяли в минимальном количестве 0,1 М раствора CH₃COOH и наносили на колонку (3 × 100 см) с биоге-лем Р-30 (100—200 меш), уравновешенным 0,1 М CH₃COOH. Элюирование вели со скоростью 0,1 мл/мин. Первые 150 мл элюата отбрасывали, затем отбирали пять фракций элюата по 70 мл и лиофилизировали их.

Woc-Arg(NO₂)-Val-Ala-OBu^t (XX). К охлажденному до -15° С раствору 6,39 г (20 ммоль) *Woc-Arg(NO₂)-OH* в 85 мл смеси DMF и THF (5 : 12) добавляли при перемешивании 2,25 мл (20 ммоль) метилморфолина, а затем 3,10 мл (20 ммоль) триметилацетилхлорида. Через 8 мин добавляли раствор 2,25 мл (20 ммоль) метилморфолина и 8,32 г (20 ммоль) *Tos-OH-Val-Ala-OBu^t* (XIXa) в 30 мл смеси DMF и тетрагидрофурана (2 : 1). Реакционную смесь перемешивали 30 мин при -15° С и 3 ч при 18° С. Растворители удаляли в вакууме, остаток растворяли в этилацетате, промывали 10% лимонной кислотой, 5% раствором NaHCO₃, водой, насыщенным раствором NaCl, высушивали над безводным Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. После перекристаллизации получали 7,41 г защищенного трипептида (XX). Пептиды (XXVIII) и (XXIX) получали аналогично пептиду (XX), реакцию вели в смеси ацетонитрила с DMF (10 : 7).

Z-Gly-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Gly-OH (XXXa). Для удаления OFm-защиты 2,6 г (2,44 ммоль) пептида (XXX) обрабатывали 2 ч 12 мл 10% раствора пиперидина в DMF, затем упаривали в вакууме, к остатку добавляли 7,5% раствор NaHCO₃ и исходное вещество экстрагировали этилацетатом. Водную фазу подкисляли 6 н. HCl до pH 2 и экстрагировали продукт *n*-бутанолом. Органический слой промывали насыщенным раство-

ром NaCl, сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Остаток растирали с этилацетатом, отфильтровали и сушили. Получали 1,77 г пептида (XXXa).

Z-Gly-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Gly-Asp(OBzl)-Leu-Glu(OBzl)-Pro-Leu-Ala-Ala-Arg(NO₂)-Val-Ala-OH (XXXI). В 2,4 мл смеси ацетонитрила, толуола и DMF (1 : 2 : 3) растворяли 0,331 г (0,374 ммоль) пептида (XXXa) и 41 мкл (0,374 ммоль) метилморфолина. Раствор охлаждали до -15°C и добавляли 45 мкл (0,374 ммоль) триметилацетилхлорида. Через 5 мин добавляли раствор 0,509 г (0,365 ммоль) трифторацетата пептида (XXVIIa) и 40 мкл (0,365 ммоль) метилморфолина в 2,1 мл смеси ацетонитрила, толуола и DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -15°C и 3 ч при 18°C , а затем добавляли по каплям к 0,1 М CH_3COOH . Выпавший осадок отфильтровывали и сушили. Получали 0,637 г неочищенного пептида (XXXI), который подвергли хроматографической очистке аналогично пептиду (XII).

Gly-Arg-Gly-Asp-Leu-Glu-Pro-Leu-Ala-Ala-Arg-Val-Ala (XXXII). 160 мг (74 мкмоль) пептида (XXXI) обрабатывали смесью 0,480 мл м-крезола и 1 мл 1 М раствора трифторметансульфокислоты и тиоанизола в TFA [16]. Смесью выдерживали 30 мин при 0°C и 4 ч при 18°C . К охлажденному до 0°C эфиру добавляли по каплям реакционную смесь, а затем абсолютный пиридин до концентрации 1%. Осадок отделяли центрифугированием и очищали хроматографически на колонке (2,5 × 40 см) с сефадексом G-10, уравновешенным смесью этанола с 0,1 н. уксусной кислотой (1 : 3). Элюирование вели со скоростью 0,3 мл/мин. Фракции, содержащие чистый продукт, упаривали, остаток растворяли в DMF и осаждали этилацетатом. Получали 80 мг пептида (XXXII).

Конъюгацию пептида (XIX) с BSA и KLH осуществляли глутаровым альдегидом [5].

Проверку иммуногенной активности проводили на крупном рогатом скоте черно-пестрой породы массой 180—200 кг, овцах романовской породы массой 20—30 кг, кроликах массой около 2 кг и морских свинках массой 400—500 г.

Для первичной иммунизации раствор пептида смешивали с равным объемом ПАФ. Крупному рогатому скоту и овцам препарат вводили подкожно в объеме 2,0 мл, лабораторным животным — внутримышечно в объеме 0,5 мл. Повторную иммунизацию проводили через 42 сут, используя ПАФ.

Для контрольного заражения использовали афтозный вирус ящура А₂₂ 550. Крупному рогатому скоту вирус вводили интралингвально в дозе 10^4 ИД₅₀, овцам — в венчик копыта в дозе 10^5 ИД₅₀. Заражение проводили на 60-е сут после первой иммунизации. Морских свинок заражали интраплантарно вирусом, адаптированным к этому виду животных, в дозе 500 ИД₅₀ на 55-е сут после первой иммунизации.

Титр вируснейтрализующих антител в сыворотках крови определяли в первично трипсинолизированной культуре клеток почки поросенка, используя двукратные разведения сывороток и дозу вируса 30—100 ТЦД₅₀/0,1 мл.

Авторы выражают признательность сотрудникам ВНИ ящурного института Ю. А. Холину за проведение аминокислотного анализа, В. М. Гуленкину за помощь в работе по поиску антигенной детерминанты и Н. С. Мудрак за исследование сыворотки в ИФА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glosser Y. W. // Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz. 1988. V. 7. № 2. P. 223—237.
2. Brown F. // Ann. Rev. Microbiol. 1984. V. 3. P. 221—225.
3. Рыбачков С. С., Вурдов А. И. // С.-х. биология. 1984. № 6. С. 101—111.
4. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. // Nature. 1982. V. 298. № 5869. P. 30—33.
5. Pfaff E., Mussgay M., Böhm H. O., Schulz G. H., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869—874.

* ИД₅₀ — 50% инфекционная доза.

6. Di Marchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., Mowat G. N. // Science. 1986. V. 232. № 4764. P. 639—641.
7. Francis M. J., Fry C. M., Clarke B. E., Rowlands D. J., Brown F., Bittle J. L., Houghten R. A., Lerner R. A. // Vaccines 87: Mod. Appr. New Vac. N. Y.: 1987. P. 60—67.
8. Яров А. В., Гельфанов В. М., Гречанинова Л. А., Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Дрягалин Н. Н., Иващенко В. Н. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1313—1317.
9. Murdin A. D., Doel T. R. // J. Biol. Stand. 1987. № 15. P. 39—51.
10. Bittle J. L., Worrell P., Houghten R. A., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. // Mod. Appr. New Vac. N. Y.: 1984. P. 103—107.
11. Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иващенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1132—1135.
12. Habeeb A. I. S. A. // Meth. Enzymol. 1972. V. 25. Part B. P. 558—566.
13. Cowell R. D., Lones J. H. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1972. № 14. P. 1809—1819.
14. Вольпина О. М., Михалева И. И., Иванов В. Т. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 1. С. 5—49.
15. Ray T. W. F., Hungley P. G. // Vaccine. 1987. V. 5. № 1. P. 60—64.
16. Yajima H., Fujii N. // The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology. V. 5 / Eds. E. Gross, J. Meienhofer. New York; San Francisco; London: Acad. Press, 1983. P. 101—104.

Поступила в редакцию
9.IV.1990

После доработки
5.IX.1990

A. V. PAVLOV, S. S. RYBAKOV, V. N. IVANYUSHCHENKOV, A. V. CHERPURKIN,
V. N. PETROV, N. N. DRYAGALIN, A. N. BURDOV

PROTECTION OF SUSCEPTIBLE ANIMALS BY THE LINEAR POLYMER OF A SYNTHETIC FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS PEPTIDE

All-Union Research Foot-and-Mouth Disease Institute, Vladimir

Linear polymer of a peptide corresponding to the fragment 142—155 of the foot-and-mouth disease virus A₂₂550 protein (VP₁) was synthesized. Whereas the monomeric peptide was only slightly immunogenic, the polymer induced virus-neutralizing antibodies in rabbits and protected 100% guinea pigs. Sheep vaccinated once and cattle vaccinated twice were stable against infection with the homologous virulent foot-and-mouth disease virus.