

含两种不同肽段的血吸虫多抗原肽疫苗的合成与生物活性

曹胜利, 蔡孟深*, 石佑恩¹(北京医科大学药学院生物有机化学系, 北京 100083; ¹ 同济医科大学基础医学院, 武汉 430030)

摘要 目的:合成由曼氏血吸虫 28 Ku GST 抗原肽段 26-43(P₂₆)、141-153(P₁₄₁)和日本血吸虫 26 Ku GST 抗原肽段 187-202(J₁₈₇)中的两种不同肽段组成的血吸虫多抗原肽疫苗,通过活性试验考察其抗原性、免疫原性及对实验动物的保护性免疫效果。**方法:**用 Boc 化学和 Fmoc 化学相结合的策略合成含两种不同抗原肽的多抗原肽疫苗,产物经斑点酶联免疫吸附试验测定抗原性,在无免疫佐剂存在下接种小鼠,ELISA 试验检测血清抗体,并用日本血吸虫尾蚴攻击感染,6 周后剖杀小鼠进行体内成虫和肝内虫卵计数。**结果:**合成多抗原肽能不同程度地与感染日本血吸虫的病人或病兔血清结合,并能诱导昆明小鼠产生对日本血吸虫天然抗原特异的抗体应答。接种(P₂₆)₂(J₁₈₇)₂-MAP、(P₂₆)₂(P₁₄₁)₂-MAP 和 (P₂₆)₄(P₁₄₁)₄-MAP 的昆明小鼠,与对照组比较成虫检获数分别减少 40.1%, 61.1% 和 34.4%; 每克肝脏虫卵数分别减少 48.4%, 67.1% 和 47.4%。**结论:**含两种不同抗原肽的合成血吸虫多抗原肽疫苗能够诱导昆明小鼠产生显著的抗日本血吸虫感染的保护性免疫力,选择更好的肽段结合在一起将有可能获得免疫保护作用更强的多抗原肽疫苗分子。

关键词 血吸虫; 合成多肽疫苗; 多抗原肽

前文^[1]报道了含曼氏血吸虫 28 Ku 谷胱甘肽 S-转移酶(Sm28GST)抗原肽段 26-43(P₂₆)、141-153(P₁₄₁),日本血吸虫 26 Ku 谷胱甘肽 S-转移酶(Sj26GST)抗原肽段 187-202(J₁₈₇)的血吸虫多抗原肽疫苗的合成及其抗原性和对小鼠的保护性免疫试验结果。据文献^[2-4]报道,曼氏血吸虫 28 Ku GST 肽段 24-43 含有增加特异性抗体产生的辅助性 T 细胞表位,而肽段 140-153 含有对 IgA 抗体特异的 B 细胞表位。大量动物试验证实,抗血吸虫感染免疫力的建立是 T、B 细胞依赖性的,因此理想的抗血吸虫合成多肽疫苗除应具有强免疫原性外,还应同时

含有 B 细胞表位和 T 细胞表位^[2]。而且,含多种抗原表位的多肽疫苗应还有利于克服宿主 MHC 多态性限制和寄生虫的变异^[5]。此外,将 Sm28GST 和 Sj26GST 的表位多肽结合在一起免疫接种,有可能诱导动物产生有效的抗日本血吸虫感染的保护性免疫力。为此,本文合成了 3 个含两种不同抗原肽的 MAP(multiple antigenic peptide, 多抗原肽)^[6]分子: (P₂₆)₂(J₁₈₇)₂-MAP、(P₂₆)₂(P₁₄₁)₂-MAP 和 (P₂₆)₄(P₁₄₁)₄-MAP(图 1),并通过活性试验,考察其抗原性、免疫原性及对小鼠的保护性免疫效果。

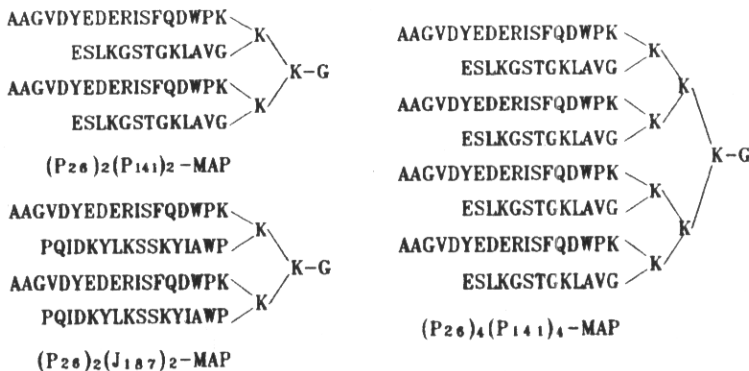


Fig 1 Schematic representation of the structure of the MAPs containing two different antigenic peptides derived from Sm28GST or Sj26GST.

收稿日期: 1999-05-10

基金项目: 卫生部科学研究基金资助项目(94-Y-15)

* 联系人 Tel: (010)62091504, Fax: (010)62015584, E-mail: zjh@mail.bjmu.edu.cn

材 料 与 方 法

材料与仪器 所有 N-Boc 和 N-Fmoc 保护氨基酸, N-Boc-glycine Pa m 树脂 (0.34 mmol Boc-glycine/lg resin, 1% cross-linked, 200~400 mesh), DCC, HOBT, TFA, BOP 试剂, N,N-二异丙基乙酰胺 (DIPEA), Sephadex G-25, G-50 均购自 Sigma 公司。Boc-氨基酸的侧链保护基为: Asp(Obz), Arg(Tos), Glu(Obz), Lys(2-Cl-Cbz), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(2,6-Cl₂Bzl)。Fmoc-氨基酸的侧链保护基为: Arg(Tos), Asp(O^t-Bu), Glu(O^t-Bu), Lys(^t-Boc), Ser(^t-Bu)。酶标记 Protein A 购自华美生物工程公司。

Hitachi-835-50 型氨基酸自动分析仪。

实验动物 昆明纯种小鼠, 6~8 周龄, 每只体重 20 g 左右, 随机分组。

受试对象 病人血清采自湖北血吸虫病流行区 10 名患者, 混合备用。病兔血清取自 10 只人工感染日本血吸虫的家兔, 混合备用。

固相多肽合成(通法) 首先在 Boc-Gly-OCH₂-Pa m 树脂上合成寡聚赖氨酸基质。称取 Boc-Gly-OCH₂-Pa m 树脂置多肽合成反应器中, 加入二氯甲烷充分溶胀。50% TFA/DCM 脱去 Boc 保护基后, 再用 10% DIEA/DCM 中和。加入相当于树脂氨基当量 3 倍的 Na⁺, Nε-di-Boc 赖氨酸二环己胺盐, 以 BOP 试剂为偶联剂、DMF 为溶剂, 接第一级赖氨酸, 得到 [Boc-Lys(Boc)]-Gly-OCH₂-Pa m 树脂。为了合成含两种不同抗原肽的 MAP, 最后一级赖氨酸的 α 和 ε 氨基分别用对酸稳定的 Fmoc 和对碱稳定的 Boc 基团选择性地保护。如在基质的第三级接上 Fmoc-Lys(Boc), 则可得到 4 个 Boc 和 4 个 Fmoc 保护的末端氨基。TFA 脱去 Boc 保护基后在 ε-NH₂ 上按文献^[1]所述的 Boc 化学依次接上第一种抗原肽的氨基酸。此时, DIPEA 的中和时间缩短为 1 min, 以减少 Fmoc 保护基的脱落。

在 Boc-氨基酸肽链合成结束后, 用哌啶脱去赖氨酸 α-NH₂ 上的 Fmoc 保护基, 再用 Fmoc 保护氨基酸逐步合成第 2 种抗原肽。Fmoc 氨基酸肽链的合成步骤如下: (1) DMF 洗涤, 1 min/次 × 3; (2) 哌啶/DMF(1:1, VOL/VOL) 洗涤 1 min; (3) 哌啶/DMF(1:1, VOL/VOL) 脱保护, 20 min; (4) DCM 洗涤, 1 min/次 × 3; (5) MeOH 洗涤, 1 min/次 × 3;

(6) DMF 洗涤, 1 min/次 × 3, 抽干; (7) 称取相当于树脂氨基当量 3 倍的 Fmoc-氨基酸、DCC 和 HOBT 加入反应器中, 以 DMF 为溶剂, 室温振摇反应; (8) DMF 洗涤, 1 min/次 × 3; (9) MeOH 洗涤, 1 min/次 × 3; (10) DCM 洗涤, 1 min/次 × 3; (11) DMF 洗涤, 1 min/次 × 3; (12) DCM 洗涤, 1 min/次 × 3, 抽干; (13) 茚三酮法^[7]检测偶联反应完成情况, 若阴性, 接下一个氨基酸; 若阳性, 则重复 7~13 步, 直至检测结果为阴性。

Fmoc-氨基酸链合成结束后, 用哌啶/DMF(1:1, Vol/Vol) 脱去 Nα-Fmoc 保护基, 再用 TFA/DCM(1:1, Vol/Vol) 脱去 Nα-Boc 保护基及部分侧链保护基。Low-high HF 法^[8]脱去侧链保护基并切下树脂。用 10% 醋酸抽提, 冷冻干燥得粗品肽。粗品肽经 Sephadex G-25 或 G-50 凝胶渗透色谱法仔细纯化, 冻干。最终产物用氨基酸自动分析仪测定氨基酸残基组成。

斑点酶联免疫吸附实验 见文献^[1]。

小鼠免疫实验 免疫方案及体内成虫、肝脏虫卵的检获见文献^[1]。末次注射后 d 10, 小鼠尾部取血并分离血清, 以日本血吸虫虫卵和成虫混合抗原作包被抗原, 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清抗体。

结 果 与 讨 论

用 Boc 化学和 Fmoc 化学相结合的策略合成了含两种不同抗原肽的血吸虫多抗原肽疫苗, (P₂₆)₂(J₁₈₇)₂-MAP、(P₂₆)₂(P₁₄₁)₂-MAP 和 (P₂₆)₄(P₁₄₁)₄-MAP 的收率分别为 38.9%、41.1% 和 40.4%。表 1 为合成多抗原肽的氨基酸组成分析结果, 均与计算值相符。

用斑点酶联免疫吸附试验测定了合成多抗原肽与感染日本血吸虫的病人与病兔血清的结合能力。结果表明当浓度为 2 000 μg·mL⁻¹ 时, (P₂₆)₂(J₁₈₇)₂-MAP 仅与 1:100 稀释的病人血清呈阳性反应; 当浓度为 500 μg·mL⁻¹ 时, (P₂₆)₂(P₁₄₁)₂-MAP 与 1:100, 1:50 稀释的病人血清以及 1:100 稀释的病兔血清呈阳性反应; 而当浓度为 1 000 μg·mL⁻¹ 时, (P₂₆)₄(P₁₄₁)₄-MAP 可与 1:100, 1:50 稀释的病人血清以及 1:100 稀释的病兔血清呈阳性反应。可见 (P₂₆)₂(P₁₄₁)₂-MAP 和 (P₂₆)₄(P₁₄₁)₄-MAP 的抗原性较强, 而 (P₂₆)₂(J₁₈₇)₂-MAP 的抗原性则较差。

Tab 1 Amino acid composition analysis of the synthetic MAPs^a

Peptide	Asx ^b	Thr	Ser	Glx ^b	Gly	Ala	Val	Ile	Ieu	Tyr	Phe	Lys	Arg	Pro	Trp
(P ₂₆) ₂ (J ₁₈₇) ₂ ⁻ MAP	3.8 (4)	-	3.4 (3)	4.0 (4)	1.8 (1.5)	3.1 (3)	1.0 (1)	2.5 (3)	1.1 (1)	2.5 (3)	0.8 (1)	5.5 (5.5)	1.2 (1)	3.1 (3)	d (2)
(P ₂₆) ₂ (P ₁₄₁) ₂ ⁻ MAP	3.0 (3)	1.0 (1)	2.8 (3)	4.1 (4)	4.5 (4.5)	3.2 (3)	2.0 (2)	1.0 (1)	1.8 (2)	0.7 (1)	1.0 (1)	4.8 (4.5)	1.1 (1)	1.0 (1)	d (1)
(P ₂₆) ₄ (P ₁₄₁) ₄ ⁻ MAP	3.1 (3)	1.0 (1)	2.5 (3)	4.0 (4)	4.2 (4.3)	3.3 (3)	2.1 (2)	1.0 (1)	1.8 (2)	0.8 (1)	1.1 (1)	5.1 (4.8)	1.1 (1)	1.0 (1)	d (1)

a. The synthetic peptides reacted with 6 mol·L⁻¹ HCl for 3 hours at 120 °C; b. Asx: Asp and/or Asn; Glx: Glu and/or Gln; c. The numbers in parentheses correspond to the expected composition of the synthetic MAPs; d. Trp was decomposed in the course of acid hydrolysis.

在昆明小鼠末次免疫后 10 天,尾部取血并分离血清,以日本血吸虫虫卵和成虫混合抗原作包被抗原,用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清抗体。表 2 给出了相当于抗体存在量的光密度(OD)值。从表中可以看出 3 种合成多抗原肽均能诱导小鼠产生显著的抗体应答,而且被免疫小鼠的血清与日本血吸虫天然抗原具有交叉反应性。

用合成多抗原肽接种昆明小鼠,末次注射后 2 周,人工感染日本血吸虫尾蚴 40 ± 2 条/只。6 周后剖杀小鼠,进行体内成虫及肝内虫卵计数,结果见表 3。从表中可以看出,免疫组小鼠体内成虫和肝内虫卵检获数均较对照组显著减少,表明合成多抗原肽均能诱导小鼠产生抵抗血吸虫感染的免疫力,而且曼氏血吸虫的抗原肽能够引起针对日本血吸虫的交

叉免疫力。P₂₆ 和 P₁₄₁ 组成的八聚体的减虫率和减卵率均低于其四聚体,这可能是因为前者的分子量近于后者的两倍,而给药量却同为 200 μg/0.1 mL/只,即由于给药体积相同但摩尔浓度不同所致。从表中还可看出,各组的减卵率均略高于减虫率,而且组与组之间有着明显的平行关系,说明虫卵的减少可能是由于体内成虫的减少而降低了产卵量。

Tab 2 Antibody responses in Kunming mice immunized with the synthetic MAPs

Peptide	Animal number	Serum antibody(OD)
(P ₂₆) ₂ (J ₁₈₇) ₂ ⁻ MAP	9	0.64
(P ₂₆) ₂ (P ₁₄₁) ₂ ⁻ MAP	8	0.41
(P ₂₆) ₄ (P ₁₄₁) ₄ ⁻ MAP	8	0.50
Control	10	-

Tab 3 Protective efficacy in mice vaccinated with the synthetic MAPs

Peptide	Animal number	Average worm number ± s	WRR ^a / %	P value ^c	Average egg number/1 g liver ± s	ERR ^b / %	P value ^c
(P ₂₆) ₂ (J ₁₈₇) ₂ ⁻ MAP	9	20.0 ± 8.8	40.1	< 0.001	19536 ± 4609	48.4	< 0.001
(P ₂₆) ₂ (P ₁₄₁) ₂ ⁻ MAP	8	13.0 ± 5.6	61.1	< 0.001	12452 ± 2508	67.1	< 0.001
(P ₂₆) ₄ (P ₁₄₁) ₄ ⁻ MAP	8	21.9 ± 3.8	34.4	< 0.001	19921 ± 11187	47.4	< 0.001
Control	10	33.4 ± 2.1			37884 ± 7546		

a. Worm reduction rate (WRR) % = (1 - A/B), A: average number of worms in vaccinated mice; B: average number of worms in control mice. b. Egg reduction rate (ERR) % = (1 - A/B), A: average egg number per gram of liver in vaccinated mice; B: average egg number per gram of liver in control mice. c. T-test was used for comparisons of data. P value was calculated, comparing the average number of worms or the average egg number per gram of liver in the control group to that obtained in the vaccinated group in each experiment.

从上述实验结果可以看出,合成的血吸虫混合多抗原肽能够不同程度地被特异性抗体识别与结合,并且不用免疫佐剂即可诱导昆明小鼠产生对日本血吸虫天然抗原特异的抗体应答。而且,用合成的杂化多抗原肽免疫接种,可使小鼠体内成虫检获数显著少于对照组,进而减少肝内虫卵检获数。由于虫卵引起的肉芽肿是导致血吸虫病的罪魁祸首^[9],因而这种作用对于抗血吸虫病疫苗非常重

要。可以肯定的是,合成多抗原肽的免疫保护作用由组成它的抗原肽段决定的,所以选择更好的肽段结合在一起将有可能获得免疫保护作用更强的多抗原肽疫苗分子。

References

- 1 Cao SL(曹胜利), Qin ZH(秦致辉), Cai MS(蔡孟深). Syntheses and bioactivities of multiple antigenic peptide

- vaccines against Schistosomiasis. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 1999, **34**: 368
- 2 Wolowczuk I, Auriault C, Gras-Masse H, *et al*. Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P-28-1. *J Immunol*, 1989, **142**: 1342
 - 3 Auriault C, Gras-Masse H, Wolowczuk I, *et al*. Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J Immunol*, 1988, **141**: 1687
 - 4 Auriault C, Gras-Masse H, Pierce RJ, *et al*. Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 Glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**: 1918
 - 5 Dunne DW, Hagan P, Abath FGC. Prospects for immunological control of schistosomiasis. *Lancet*, 1995, **345**: 1488
 - 6 Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 5409
 - 7 Sarin VK, Kent SBH, Tam JP. Quantitative monitoring of solid phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal Biochem*, 1981, **117**: 147
 - 8 Tam JP, Heath WF, Merrifield RB. SN₂ deprotection of synthetic peptide with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. *J Am Chem Soc*, 1983, **105**: 6442
 - 9 Zhao WX. *Human Parasitology*. The second edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994. 370 ~ 378

SYNTHESIS AND BIOACTIVITIES OF MULTIPLE ANTIGENIC PEPTIDE VACCINES CONTAINING TWO DIFFERENT SCHISTOSOMAL ANTIGENIC PEPTIDES

Cao Shengli(Cao SL), Cai Mengshen(Cai MS) and Shi Youen(Shi YE)¹

(Department of Bioorganic Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Beijing Medical University, Beijing 100083; ¹School of Basic Medical Sciences, Tongji Medical University, Wuhan 430030)

ABSTRACT **AIM:** To synthesize the multiple antigenic peptide (MAP) vaccines consisting of two different schistosomal antigenic peptides, 26-43 (AAGVDYEDERISFQDWPK, P₂₆) and 141-153 (ESLKGSTGKLAVG, P₁₄₁) derived from Sm28GST and 187-202 (PQIDKYLKSSKYIAWP, J₁₈₇) derived from Sj26GST, and to examine their antigenicities, immunogenicities and protective effects on experimental animals. **METHODS:** The multiple antigenic peptide vaccines consisting of two different antigenic peptides have been synthesized using both Boc and Fmoc chemistry and their antigenicities have been tested with dot-ELISA. Mice were bled to test antibody responses after vaccination with the synthetic MAPs, and were infected with *Schistosoma japonicum* cercariae. Six weeks after infection, the mice were killed to recover the adult worms and the eggs in liver. **RESULTS:** The synthetic MAPs could be bound to a certain extent by both patient and infected rabbit sera, and were able to elicit antibody responses specific to natural antigen of *Schistosoma japonicum*. Furthermore, immunization with (P₂₆)₂(J₁₈₇)₂-MAP, (P₂₆)₂(P₁₄₁)₂-MAP and (P₂₆)₄(P₁₄₁)₄-MAP in Kunming mice reduced, respectively, the worm burden by 40.1%, 61.1% and 34.4%, and reduced the liver eggs by 48.4%, 67.1% and 47.4%. **CONCLUSION:** More effective vaccines against schistosomiasis may be obtained by combination of suitable antigenic peptides into a MAP molecule.

KEY WORDS schistosome; synthetic peptide vaccine; multiple antigenic peptide