



УДК 578.891.083.3:577.112.6

© 1993 Ю. А. Семилетов, Т. В. Фирсова, В. А. Шибнев,
С. О. ВязовСИНТЕЗ И АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ ИЗ СОСТАВА
CORE- И NS3-БЕЛКОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва

Посттрансузионный гепатит ни-А, ни-В, обозначаемый в настоящее время как гепатит С [1], имеет повсеместное распространение и является одной из наиболее опасных, высококонтагиозных вирусных инфекций человека. Полученные в последнее время результаты указывают на то, что комбинация антигенов, состоящая из белка нуклеокапсида (core) и фрагмента 409-1-1 неструктурного белка NS3, по-видимому, обеспечивает более эффективную диагностику гепатита С по сравнению с иными сочетаниями вирусспецифических белков [2]. В настоящем сообщении приведены результаты первого этапа работы по локализации иммунодоминантных эпитопов, входящих в состав белков core и NS3.

Нами осуществлен синтез и исследованы антигенные свойства пептида 20—34 (Gln-Asp-Val-Lys-Phe-Pro-Gly-Gly-Gly-Gln-Ile-Val-Gly-Gly-Val) из состава белка core и его фрагмента 22—34, а также пептида 1269—1282 (Ser-Lys-Ala-His-Gly-Phe-Asp-Pro-Asn-Ile-Arg-Thr-Gly-Val) из области 409-1-1 белка NS3 вируса гепатита С (HCV). Аминокислотная последовательность пептидов соответствует полученной американскими исследователями [3] в результате клонирования и последующего секвенирования кДНК HCV.

При выборе пептидов из состава core учитывались данные эпитопного картирования [4]. Пептид 1269—1282 выбран по результатам анализа относительной гидрофильности аминокислотной последовательности области 409-1-1 из расчета ее вторичной структуры по известной программе [5]. Наибольший интерес в составе этого пептида, на наш взгляд, представляет расположенный между двумя протяженными β -слоями неупорядоченный участок Asp-Pro-Asn-Ile-Arg, имеющий β -изгиб, стабильности которого могут способствовать противоположно заряженные ионогенные боковые функции Asp-1275 и Arg-1279.

Пептиды были синтезированы на твердой фазе (тефлон с радиационно привитым полистиролом) с использованием *трет*-бутилоксикарбонил-бензил (Boc-Bzl)-стратегии и применением активированных эфиров и симметричных ангидридов Boc-аминокислот в соответствии с методологией, предложенной в работе [6]. После отщепления от полимера действием трифторметансульфокислоты в трифторуксусной кислоте в присутствии тиоанизола пептиды были очищены гель-хроматографией на сефадексе G-10 и полупрепаративной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (табл. 1).

Антигенную активность тестируемых пептидов определяли по степени их взаимодействия в реакциях иммуноферментного анализа (ИФА) с сыворотками больных хроническим гепатитом С, содержащими анти-HCV-антитела по данным

Характеристика синтезированных пептидов

Пептид *	$[\alpha]_D^{20}$, град	Концентрация, растворитель	R_f **	Количественный аминокислотный анализ ***	Выход, %
(20—34)-Cys (Acм)	-73	1,0; 10% AcOH	0,76	Asp 1,06 (1), Glu 2,15 (2), Gly 5,32 (5), Val 2,87 (3), Ile 0,93 (1), Phe 1,0 (1), Lys 0,96 (1), Pro 1,05 (1)	16
(22—34)-Cys (Acм)	-54	1,0; 10% AcOH	0,88	—	27
(1269—1282)-Cys (Acм)	-74,5	1,0; H ₂ O	0,82	Asp 2,06 (2), Thr 1,08 (1), Ser 1,11 (1), Gly 2,11 (2), Ala 1,0 (1), Val 0,96 (1), Ile 1,91 (2), Lys 1,01 (1), His 0,96 (1), Arg 0,85 (1), Pro 1,04 (1)	20

* С-Концевой остаток 3-ацетамидометил-L-цистеина вводили в пептиды для их последующего конъюгирования с белками.

** На пластинках «Cellulose F» (ТСХ в системе пропанол — 25% водный аммиак — вода, 6 : 3 : 1).

*** Содержание остатков Cys количественно не определяли.

реакции с коммерческим диагностикумом фирмы «ОРТНО» (ФРГ). Отрицательным контролем служили сыворотки крови больных гепатитом А и здоровых доноров. В качестве положительного контроля на антитела к белку нуклеокапсида использовался генно-инженерный препарат белка core *. Методика проведения ИФА с использованием синтетических пептидов описана в работе [6]; сыворотки исследованы в разведении 1 : 100. Результаты представлены в табл. 2.

Пептид (20—34) реагировал со всеми исследованными сыворотками, а его «укороченный» вариант (22—34) — с частью из них. Этот результат, вероятно, означает, что пептид (20—34) включает в себя иммунодоминантный сайт, содержащий множественные высокоиммуногенные эпитопы; структура некоторых из них, видимо, нарушается при удалении двух аминокислотных остатков с N-конца цепи. Нельзя также исключить возможности того, что в результате потери этих двух остатков иммунодоминантный сайт приобретает иную конформацию, препятствующую связыванию с некоторыми клонами специфических антител.

Положительная реакция трети исследованных сывороток с пептидом (1269—

* Препарат белка core любезно предоставлен Т. И. Калининой (Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва).

Взаимодействие синтетических пептидов с сыворотками крови больных хроническим гепатитом С*

Антигены	Общее количество сывороток	Количество положительных сывороток	
		абс.	%
1. Core-(20—34)	18	18	100,0
2. Core-(22—34)	18	13	72,0
3. NS3-(1269—1282)	18	6	33,3
4. Core**	18	18	100,0

* 5 образцов сывороток здоровых доноров и 9 образцов сывороток больных гепатитом А с исследованными пептидами и core-белком не взаимодействовали.

** Генно-инженерный препарат белка core.

1282) позволяет говорить о выявлении одного из антигеноактивных участков молекулы белка NS3. Тот факт, что не все исследованные сыворотки связывались с этим пептидом, может иметь несколько объяснений. Во-первых, пептид (1269—1282) (в отличие от пептида (20—34)) может не включать целиком иммунодоминантный сайт, т. е. комбинацию эпитопов, распознаваемых всеми индивидуумами высокоаутбредной популяции. Возможно также, что в число исследованных сывороток вошли образцы, не содержащие антител к NS3-белку. Это объяснение, однако, кажется нам менее вероятным, поскольку известно, что большая часть сывороток больных хроническим гепатитом С содержит антитела как к core, так и к NS3-белкам вируса гепатита С [7]. Для окончательного решения вопроса о локализации иммунодоминантного сайта белка NS3 необходимо проведение дополнительных исследований, в частности с использованием пептидов, соответствующих последовательностям, граничащим с позициями 1269 и 1282.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Choo Q.-L., Kuo G., Weiner A. J., Overby L. R., Bradley D. W., Hosoda Y.//Science. 1989. V. 244. P. 359—362.
2. Kim J. P., Simonsen C. C., Su W., Moeckli E. A., Chow T., Shin D. J., Warmerdam M., Yun K., Sun O., Kwon J. W., Gish R. G., Fong S. K., Reyes G. T.//Program and Abstracts. Third International Symposium on HCV. Strasburg, France. 1991. V36.
3. Choo Q.-L., Richman K. H., Han J. H., Berger K., Lee C., Dong C., Gallegos C., Coit D., Medina-Selby A., Barr P. J., Weiner A. J., Kuo G., Houghton M.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 2451—2455.
4. Bahl C., Rodriguez-Del Valle M., Kochesky R., Parks E., Nelles M.//Program and Abstracts. Third International Symposium on HCV. Strasburg, France. 1991. V41.
5. Chou P. Y., Fasman G. D.//Ann. Rev. Biochem. 1978. V. 47. P. 251—276.
6. Семилетов Ю. А., Карпова В. А., Жудяков Ю. Е., Павлюченкова Р. П., Вязов С. О., Смирнов В. Д., Прокуронова Е. И., Желтухина Г. А., Евстигнеева Р. П.//Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 2. С. 252—262.
7. Chemello L., Cavaletto D., Belussi F., Bortolotti F., Talato F., Cavaletto L., Alberti A.//Program and Abstracts. Third International Symposium on HCV. Strasburg, France. 1991. E71.

Поступило в редакцию
14.VII.1992

Yu. A. SEMILETOV, T. V. FIRSOVA, V. A. SHIBNEV, S. O. VIAZOV
**SYNTHESIS AND ANTIGENIC ACTIVITY OF THE PEPTIDES FROM
THE CORE AND NS3 PROTEINS OF THE HEPATITIS C VIRUS**

*D. I. Ivanovsky Institute of Virology,
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow*

We synthesized the 20—34 and 22—34 fragments of the core and 1269—1282 fragment of the NS3 protein of the hepatitis C virus. The peptides were prepared by the solid-phase synthesis using activated esters and symmetrical anhydrides of Boc-amino acids. Peptide 20—34 demonstrated positive reaction in ELISA with all individual sera from HCV chronic patients. Peptide 1269—1282 reacted with 33% patients sera.