



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 578.891.083.3 : 577.112.6

© 1993 г. Ю. А. Семилетов, Т. В. Фирсова, С. Н. Кузин,
Ю. Е. Худяков, В. А. ШибневСИНТЕЗ И АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ
ИЗ С-КОНЦЕВОЙ ЧАСТИ НЕСТРУКТУРНОГО NS4-БЕЛКА
ВИРУСА ГЕПАТИТА С

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

Вирус гепатита С (HCV), недавно идентифицированный патогенный вирус человека, впервые был описан в 1989 г. [1, 2]. HCV, по-видимому, является главной причиной посттрансфузионного гепатита в случаях, когда в крови доноров не обнаруживается HBsAg [2]. В настоящее время для диагностики HCV-инфекции широко используется рекомбинантный антиген С100, охватывающий С-конец NS3-белка и почти полностью NS4-белок HCV [2, 3]. Цель данного исследования — идентификация антигенно активных участков в составе С-концевой части NS4-белка HCV, граничащей с областью С100.

Нами осуществлен синтез и исследованы антигенные свойства пептида 1921—1940 (Ala-Phe-Ala-Ser-Arg-Gly-Asn-His-Val-Ser-Pro-Thr-His-Tyr-Val-Pro-Glu-Ser-Asp-Ala) из состава белка NS4, а также его фрагментов 1926—1940, 1930—1940 и 1921—1931. Аминокислотная последовательность пептидов соответствует кДНК HCV, полученной американскими исследователями [4] в результате клонирования и последующего секвенирования. При выборе пептидного фрагмента для синтеза учитывались результаты компьютерного анализа относительной гидрофильности аминокислотной последовательности области С100 и расчета ее вторичной структуры [5]. Вторичная структура неупорядоченного участка 1921—1940 предполагает наличие трех β -изгибов в районе остатков Gly¹⁹²⁶ и Pro¹⁹³⁶, которые могли бы способствовать формированию антигенных сайтов.

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 Вос-аминокислот [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 ВЭЖХ (табл. 1).

Антигенную активность синтетических пептидов определяли методом прямого твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) по их взаимодействию с сыворотками крови пациентов с диагнозом острый гепатит С (ОГС) и хронический гепатит С (ХГС), содержащими анти-HCV-антитела по данным ИФА с коммерческим диагностикомом второго поколения фирмы «Ortho Diagnostics» (ФРГ). Для сравнительной оценки способности пептидов к специфическому связыванию

Характеристика синтезированных пептидов

Пептиды *	$[\alpha]_D^{20}$, град (с 0,5, H ₂ O)	R_f^{**}	Количественный аминокислотный анализ ***	Выход, %
(1921—1940)-Cys(Acm)	-80	0,57	Ala 3,08 (3) Phe 1,00 (1) Ser 3,11 (3) Arg 0,89 (1) Gly 1,05 (1) Asp 2,14 (2) His 1,90 (2) Val 1,92 (2) Pro 2,06 (2) Thr 1,10 (1) Tyr 0,96 (1) Glu 1,08 (1)	22
(1926—1940)-Cys(Acm)	-72	0,61	--	30
(1930—1940)-Cys(Acm)	-86	0,65	--	26
(1921—1931)-Cys(Acm)	-76	0,75	Ala 2,00 (2) Phe 1,02 (1) Ser 2,08 (2) Arg 0,91 (1) Gly 1,05 (1) Asp 1,08 (1) His 0,93 (1) Val 0,95 (1) Pro 1,03 (1)	18

* 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.

с антителами в табл. 2 приведены данные иммуноблотинга сывороток в RIBA-* тесте с антигеном С100 из коммерческого набора «RIBA-II; Chiron Corp., Emeryville, CA and Ortho Diagnostics». Методика проведения ИФА с использованием синтетических пептидов описана в работе [6]; сыворотки исследованы в разведении 1:100. Отрицательным контролем служили сыворотки крови здоровых доноров, исследованные на отсутствие анти-НСV-антител. Положительными считали пробы, в которых значения величины относительного связывания S/N были более 2,1 (S — значение поглощения в лунках с исследуемой сывороткой, N — среднее арифметическое поглощения в лунках с нормальными сыворотками).

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что активность синтетических пептидов достаточно высока и сравнима с активностью рекомбинантного антигена С100, только в случае с сывороткой 211, слабо положительной по С100, пептиды показали негативную реакцию. Полноразмерный пептид 1921—1940 взаимодействовал с четырьмя из пяти (80%) сывороток пациентов с ОГС, тогда как рекомбинантный антиген С100 — лишь с тремя аналогичными сыворотками и с 56% сывороток пациентов с ХТС. Антигенная активность С-концевых фрагментов

*RIBA — recombinant immunoblot assay.

Взаимодействие синтетических пептидов с сыворотками крови больных гепатитом С по данным ИФА

Сыворотки		Антигены				
характеристика	№	S/N *				RIBA **
		1921—1940	1926—1940	1930—1940	1921—1931	C100
ОГС	206	+++	+++	+++	-	+++
	210	+++	++	++	+++	-
	211	-	-	-	-	+
	214	+++	+++	+++	++	+++
	218	+++	-	-	-	-
ХГС	148	-	-	-	-	-
	156	+++	+++	+++	-	+++
	157	-	-	-	-	-
	158	+++	+++	+++	-	+++
	159	-	-	-	-	-
	163	+++	+++	+++	+++	+++
	164	+++	-	-	++	+
	166	-	+	-	-	+
	167	-	-	-	-	-
	93	+++	+++	-	-	н/а
	100	+++	+++	+++	+++	н/а
	101	-	-	-	-	н/а
	102	+++	-	-	-	н/а
	103	+++	+++	+++	+++	н/а
	106	-	-	-	-	н/а
	109	-	-	-	-	н/а
	111	+++	+++	+++	++	н/а
112	+++	+++	++	-	н/а	

* + 2,1 < S/N < 3,5; ++ 3,5 < S/N < 5,0; +++ 5,0 < S/N < 10,0; ++++ S/N > 10; — S/N < 2,1.

** Количественная оценка результатов исследования сывороток в RIBA-тесте проводилась согласно рекомендациям фирмы «Chiron Corp., Emeryville, CA and Ortho Diagnostics».

пептида 1921—1940 выше, чем активность N-концевого фрагмента 1921—1931, хотя в одном случае получен результат обратный — с сывороткой 164 реагируют полноразмерный (1921—1940) и N-концевой пептиды, в то время как пептиды 1926—1940 и 1930—1940 неактивны. Данные проведенного исследования позволяют предположить наличие на участке 1921—1940 нескольких индивидуальных антигенных детерминант. Две сыворотки 210 и 218 от пациентов с диагнозом острый гепатит С, не реагирующие с рекомбинантным антигеном С100, оказались высоко реактивны с синтетическими пептидами. Полученные результаты демонстрируют диагностическую значимость С-концевой части белка NS4, не входящей в состав рекомбинантного антигена С100, оканчивающегося 1930-м аминокислотным остатком.

В заключение следует отметить возможность практического использования пептида 1921—1940 из состава неструктурного NS4-белка вируса гепатита С и его фрагментов в диагностике HCV-инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Choo Q.-L., Kuo G., Weiner A. J., Overby L. R., Bradley D. W., Houghton M. // *Science*. 1989. V. 244. P. 359—362.
2. Kuo G., Choo Q.-L., Alter H. J., Gitnick G. L., Redeker A. D., Purcell R. H., Miyamura T., Dienstag J. L., Alter M. J., Stevens C. E., Tegtmeie G. E., Bonino F., Colombo M., Lee W.-S., Kuo C., Berger K., Shuster J. R., Overby L. R., Bradley D. W., Houghton M. // *Science*. 1989. V. 244. P. 362—364.
3. Chaudhary R. K., MacLean C. // *J. Clin. Microbiol.* 1991. V. 29. P. 2329—2330.
4. 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., Bradley D. W., Kuo G., Houghton M. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 2451—2455.
5. Chou P. Y., Fasman G. D. // *Ann. Rev. Biochem.* 1978. V. 47. P. 251—276.
6. Семилетов Ю. А., Карпова В. А., Смирнов В. Д., Вязов С. О. // *Биоорганич. химия*. 1993. Т. 19. № 3. С. 277—285.

Поступило в редакцию
21.V.1993

*Yu. A. Semiletov, T. V. Firsova, S. N. Kuzin,
Yu. E. Khudyakov, V. A. Shibnev*

SYNTHESIS AND ANTIGENIC ACTIVITY OF THE PEPTIDES FROM THE HEPATITIS C VIRUS NS4-PROTEIN C-TERMINAL REGION

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

A set of four peptides from the HCV NS4-protein C-terminal region (aa 1921—1940) were obtained by solid-phase synthesis using activated esters and symmetrical anhydrides of Boc-amino acids. Peptide 1921—1940 has demonstrated a positive reaction in ELISA with individual anti-HCV-positive sera from patients with acute and chronic hepatitis C (80% and 56%, respectively). We analysed the antigenic properties of the peptide 1921—1940 and its fragments and suggested at least two antibody recognizing sites to be contained in this region.