



УДК 578.891.083.3:577.112.6

СИНТЕЗ И АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ ИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ БЕЛКА ORF3 ВИРУСА ГЕПАТИТА E

© 1995 г. Ю. А. Семилетов, Е. В. Дементьева, Т. Л. Яшина,
М. О. Фаворов, В. А. Шибнев

НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

Поступило в редакцию 29.07.94 г.

Ключевые слова: пептиды синтетические; антигенные детерминанты; вирус гепатита E.

Вирус гепатита E (HEV) – недавно открытый инфекционный агент энтерально передающегося гепатита ни А, ни В [1, 2]. Гепатит E является серьезной проблемой во многих развивающихся странах, включая среднеазиатские регионы бывшего СССР [2]. В результате клонирования и последующего секвенирования генома HEV были идентифицированы три открытые рамки считывания (ORF) [2], в том числе ORF3, кодирующая белок, содержащий 123 аминокислотных остат-

ка, функции которого пока не установлены. Недавно [3] один из иммунодоминантных участков ORF3 белка был выявлен между 91-м и 123-м аминокислотными остатками. Цель настоящего исследования – более точная локализация эпитопов в С-концевой части ORF3-белка HEV с помощью синтетических пептидов.

Нами осуществлен синтез и исследованы антигенные свойства пептидов 92 - 103, 99 - 116, 99 - 119, 102 - 116, 102 - 119, 111 - 123 из состава белка ORF3. Ниже приведены первичная и вторичная структуры выбранной для исследования последовательности 92 - 123:

Таблица 1. Характеристики синтезированных пептидов

Позиция пептида в белке ORF3	Данные аминокислотного анализа*	ВЭЖХ**, время выхода, мин	Выход***, %
92 - 103	D 1.89(2); T 0.90(1); S 0.95(1); P 2.88(3); G 0.93(1); A 1.00(1); V 0.94(1); L 1.04(1); H 0.83(1)	6.3	25
99 - 116	Не определено	8.8	27
99 - 119	D 1.00(1); T 0.96(1); S 0.94(1); E 1.05(1); P 5.86(6); G 0.91(1); A 1.00(1); V 2.84(3); L 3.94(4); H 0.86(1); R 0.85(1)	8.4	21
102 - 116	Не определено	7.1	28
102 - 119	То же	7.5	32
111 - 123	D 0.98(1); E 1.07(1); P 3.00(3); G 1.11(1); V 1.86(2); L 1.87(2); H 0.86(1); R 2.11(2)	6.8	18

* Аминокислотный состав пептидов определяли на анализаторе Hitachi (Япония). Кислотный гидролиз проводили 6 н. HCl при 110°C в течение 24 ч.

** Обращенно-фазовая ВЭЖХ на приборе Du Pont (США) в условиях: колонка Nucleosil C18, 7 мкм (10 × 250 мм; Macherey-Nagel, Германия), элюция 0.1% TFA в 30% ацетонитриле – 0.1% TFA в 60% ацетонитриле в течение 20 мин; скорость потока 4 мл/мин, детекция при 220 нм.

*** Выход пептидов определен в расчете на стартовую аминокислоту после очистки ВЭЖХ.

92 100 110 120
N P P D H S A P L G V T R P S A P P L P H V V D L P Q L G P R R
c t t c s c c t t t c c c t t c s c s c s c s c s c t t t c s s s

где предсказанные по методу Птицина и Финкельштейна [4] элементы вторичной структуры обозначены как *t* (β-изгиб), *c* (неупорядоченный клубок). Вторичная структура неупорядоченного участка 92 - 123 предполагает наличие четырех β-изгибов в местах расположения остатков Pro, которые могли бы способствовать формированию антигенных сайтов.

Пептиды были синтезированы на твердой фазе (тефлон с радиационно привитым полистиролом) с использованием Boc/Bzl-стратегии, активированных эфиров и симметричных ангидридов Boc-аминокислот [5]. 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).

Свободные пептиды сорбировались на 96-луночные планшеты в концентрации 5 мкг на лунку. Сыворотки исследовались в разведении 1 : 50 в условиях [3]. Отрицательным контролем служили сыворотки больных гепатитом А, гепатитом В

Таблица 2. Взаимодействие синтезированных пептидов с сыворотками крови больных острым гепатитом Е*

Антигены	Число сывороток		
	общее	из них положительных	
		абсолютное количество	%
92 - 103	21	4	19.0
99 - 116	21	19	90.0
99 - 119	21	20	95.0
102 - 116	21	17	81.0
102 - 119	21	19	90.0
111 - 123	21	5	24.0
Положительный контроль**	21	21	100.0

* Три образца сывороток здоровых доноров и по три образца сывороток больных гепатитом А или гепатитом В с исследованными пептидами не взаимодействовали.

** Диагностическая тест-система, предоставленная "Centers for Disease Control" (США).

и здоровых доноров. Положительными считались пробы, в которых значения относительного связывания P/N были равны или более 3 (P – значение поглощения (λ 492 нм) в лунках с исследуемой сывороткой, N – значения поглощения отрицательных контролей) (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что пептид 99 - 119 прореагировал со всеми сыворотками крови пациентов с диагнозом острый гепатит Е, кроме одной, ко-

торая не взаимодействовала ни с одним из исследуемых пептидов – вероятно, по причине отсутствия у данного пациента антител к С-концевой части ORF3-белка, что согласуется с результатами, полученными Ю.Е. Худяковым и соавт. [3]. Несмотря на одинаковый процент положительных реакций, антигенные активности пептидов 99 - 116 и 102 - 116 несколько различались. Эти пептиды показали противоположные по значению результаты в реакциях с двумя анти-HEV-положительными сыворотками: если один из указанных пептидов проявлял активность в отношении сыворотки, другой пептид с этой сывороткой не взаимодействовал. При уменьшении длины синтезированных пептидов снижался процент связывания с анти-HEV-антителами, причем "периферийные" пептиды 92 - 103 и 111 - 123 обладают наименьшей антигенной активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reyes G.R., Purdy M.A., Kim J.P., Luk K., Young L.M., Fry H.E., Bradley D.W. // *Science*. 1990. V. 247. P. 1335 - 1339.
2. Bradley D.W. // *Prog. Med. Virol.* 1990. V. 37. P. 101 - 135.
3. Khudyakov Y.E., Khudyakova N.S., Fields H.A., Jue D., Starling C., Favorov M.O., Kravczynski K., Polish L., Mast E., Margolis H. // *Virology*. 1993. V. 194. P. 89 - 96.
4. Ptitsyn O.B., Finkelstein A.V. // *Biopolymers*. 1983. V. 22. P. 15 - 25.
5. Семилетов Ю.А., Карпова В.А., Смирнов В.Д., Вязов С.О. // *Биоорганическая химия*. 1993. Т. 19. № 3. С. 277 - 285.

Synthesis and Antigenic Activity of Peptides from the ORF3 Protein Sequence of Hepatitis E Virus

Yu. A. Semiletov, E. V. Dement'eva, T. L. Yashina,
M. O. Favorov, and V. A. Shibnev

Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Gamalei 16, Moscow, 123098 Russia

Abstract – The hepatitis E virus (HEV) is an infection agent (detected recently) responsible for an enterically transmitted non-A, non-B hepatitis [1, 2]. Hepatitis E is a big problem in many developing countries, including the Central Asian areas of the former Soviet Union [2]. By cloning followed by sequence analysis of the HEV genome, three open reading frames (ORF) have been identified, among them ORF3 encoding a protein containing 123 amino acid residues, the function of this protein being unknown. Recently [3], one of the immunodominant regions of ORF3 protein was revealed between the 91st and 123rd amino acid residue. The purpose of the present study was a more precise localization of epitopes in the C-terminal portion of HEV ORF3 protein by using synthetic peptides.

Key words: synthetic peptides; antigenic determinants; hepatitis E virus.