



УДК 578.833.27'112.083.3

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

© 1998 г. Т. Д. Волкова<sup>#</sup>, О. М. Вольпина, В. Т. Иванов,  
С. Г. Рубин<sup>\*</sup>, И. В. Семашко<sup>\*</sup>, А. С. Караванов<sup>\*</sup>

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;*

*\*Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва*

*Поступила в редакцию 30.04.97 г. Принята к печати 25.09.97 г.*

Синтезирован ряд фрагментов оболочечного белка Е вируса клещевого энцефалита штамма Софьин. Все пептиды изучены в связывании с поликлональной сывороткой к белку Е. Проведена иммунизация крыс свободными пептидами и их КЛН-конъюгатами. Полученные сыворотки проверены на способность связываться с белком Е, а также нейтрализовать вирус в культуре клеток. Показано, что только пептид последовательности 35–51 связывается в ИФА с антисывороткой к белку Е. Двукратная иммунизация КЛН-конъюгатами пептидов последовательностей 98–113, 130–143 и 394–403 приводит к индукции у животных противопептидных антител, связывающихся с нативным белком Е, а антитела к КЛН-конъюгатам пептидов 98–113 и 394–403 способны нейтрализовать вирус.

*Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, гликопротеин Е, синтетические пептиды, антигенные детерминанты, ИФА, КЛН-конъюгаты.*

Вирус клещевого энцефалита, относящийся к семейству *Flaviviridae*, является одним из наиболее патогенных агентов, вызывающих поражение центральной нервной системы. Поэтому интерес к изучению антигенной структуры и механизмов функционирования вируса носит как теоретический, так и практический характер. Кроме того, успехи в разработке пептидной вакцины на примере вируса ящура [1] демонстрируют принципиальную возможность использовать подобный подход для создания других противовирусных вакцин. Вирион клещевого энцефалита, как типичного представителя флавивирусов, имеет икосаэдрический нуклеокапсид, построенный из множества копий единственного капсидного белка С, с заключенной внутри РНК. Капсид окружен бислойной липидной оболочкой, которая включает гликозилированный белок Е и небольшой белок М [2]. Показано, что капсидный белок С очень консервативен и несет на себе только группоспецифические антигенные детерминанты

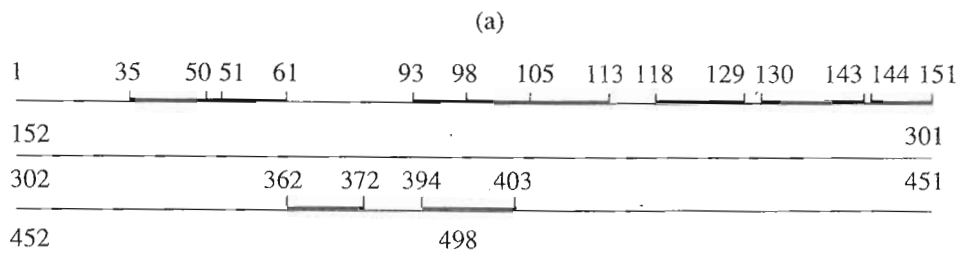
[3]. Функциональная роль белка М практически не выявлена, но, поскольку он полностью погружен внутрь липидного бислоя, представляется маловероятным, что данный белок может служить потенциальным антигеном. Гликопротеин Е – единственный белок, экспонированный на поверхности вириона, причем предполагают, что его N-концевая часть выступает над мембраной, а С-конец служит трансмембранным якорем [4]. Показано, что гликопротеин Е – главный компонент, проявляющий вируснейтрализующую и протективную активность, т.е. он несет на своей поверхности основные антигенные детерминанты. Кроме того, показано, что только белковая часть гликопротеина существенна для проявления антигенных и иммуногенных свойств [5, 6].

В представленной работе мы попытались с помощью синтетических пептидов выявить возможные антигенные детерминанты в структуре белка Е, основного носителя антигенных и иммуногенных свойств вируса. В качестве объекта исследования выбран вирус штамма Софьин, встречающийся на территории России. Исследуемый белок содержит 498 аминокислотных остатков [7].

Выбор фрагментов для синтеза (рисунок) проводился на основе данных теоретических методов анализа последовательности белка, позволяющих предсказать экспонированные и потенциально антигенные участки, а также литературных данных о локализации возможных эпитопов.

Сокращения: Acst- – ацетамидометил, Bcm- – бензилоксиметил-, DCU – дициклогексилмочевина, DIEA – диизопропилэтиламин, Fm- – флуоренилметил-, НОВТ – 1-гидроксибензотриазол, сНх – циклогексил, КЛН – гемоцианин улитки, Np- – нитрофенил-, OVA – овальбумин, PAM- – фенилацетамидометил-, Pfp- – пентафторфенил-, PBS – 0.01 M Na-фосфатный буфер, pH 7.4.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: 336-57-77).



- (б)
- 35 43  
Ala Glu Gly Lys Pro Ser Met Asp Val (I)
- 35 51  
Ala Glu Gly Lys Pro Ser Met Asp Val Trp Leu Asp Ser Ile Tyr Gln Glu (II)
- 50 58  
Gln Glu Asn Pro Ala Lys Thr Arg Glu (III)
- 50 61  
Gln Glu Asn Pro Ala Lys Thr Arg Glu Tyr Cys Leu (IV)
- 64 80  
Lys Leu Ser Asp Thr Lys Val Ala Ala Arg Cys Pro Thr Met Gly Pro Ala (V)
- 93 105  
Lys Arg Asp Gln Ser Asp Arg Gly Trp Gly Asn His Ala (VI)
- 98 113  
Asp Arg Gly Trp Gly Asn His Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile (VII)
- 105 113  
Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile (VIII)
- 118 129  
Lys Ala Ser Cys Glu Ala Lys Lys Lys Ala Thr Gly (IX)
- 130 143  
His Val Tyr Asp Ala Asn Lys Ile Val Tyr Thr Val Lys Val (X)
- 144 151  
Glu Pro His Thr Gly Asp Tyr Val (XI)
- 362 372  
Asn Pro Thr Ile Glu Asn Asn Gly Gly Gly Phe (XII)
- 394 403  
Gln Lys Gly Ser Ser Ile Gly Arg Val Phe (XIII)

Синтетические фрагменты гликопротеина E (a) и их структура (б)

Считается, что основным условием для расположения участка на поверхности белка в его нативной конформации является гидрофильность данного фрагмента [8]. Поэтому нами был проведен

теоретический расчет гидрофильности для белка E. С этим методом сходен другой использованный нами метод – определения акрофильных участков [9], основанный на данных рентгенострук-

турного анализа различных белков, исходя из которых рассчитан индекс вероятности расположения различных аминокислотных остатков в выступающих на поверхность участках. Мы использовали также метод расчета антигенности фрагментов [10], который учитывает статистические данные о частоте встречаемости определенных аминокислотных остатков в известных антигенных детерминантах различных белков. Кроме того, мы искали структурированные участки в молекуле белка Е, поэтому воспользовались теоретическими методами определения вторичной структуры – возможных  $\alpha$ -спиральных [11],  $\beta$ -складчатых участков [12],  $\beta$ -изгибов [11].

Для синтеза выбирали потенциально гидрофильные фрагменты, являющиеся возможными В-эпитопами также и согласно другим критериям.

Проведенный анализ показал, что N-концевой участок белка (1–121) теоретически наиболее гидрофилен. Кроме того, известна работа, проведенная с помощью моноклональных антител на вирусе штамма Найдорф, распространенного в Западной Европе. Результаты этого исследования [13] говорят о том, что основная часть антигенных детерминант сосредоточена в N-концевой области белка. Однако этот район содержит четыре дисульфидных мостика [4], которые фиксируют конформацию данной части белка, создавая предпосылки для сближения аминокислотных остатков из различных экспонированных участков. Другими словами, весьма вероятно, что имеющиеся здесь В-эпитоны конформационно зависимы. Для проверки этой возможности были синтезированы пептиды (I)–(IX).

Выбор фрагмента 35–43 (I) основан на теоретических прогнозах его высокой гидрофильности и наличия  $\beta$ -изгибов во вторичной структуре. Затем фрагмент (I) был удлинен до остатка 51 (пептид II), поскольку нами была выявлена тенденция к образованию  $\alpha$ -спирали участком 41–51. Пептид 50–58 (III) соответствует расчетному гидрофильному участку белка с  $\beta$ -изгибом в середине, его удлиненный вариант 50–61 (IV) добавляет  $\beta$ -складчатую структуру на C-конце. Пептиды 93–105 (VI) и 118–129 (IX) в соответствии с проведенными расчетами выделяются наиболее высокими показателями гидрофильности, а участок 118–129 белка также имеет вероятную  $\beta$ -складчатую структуру. Кроме того, участок 118–129 превосходит другие участки по значениям антигенности.

Среди пептидов, относящихся к N-концевому домену белка Е, выделяется пептид 98–113 (VII). Данный участок интересен тем, что его последовательность имеет чрезвычайно высокую степень гомологии с аналогичными участками белков Е всего семейства флавивирусов. Мы предположили, что он может играть важную роль в функционировании вируса.

В последовательности белка Е имеются два гидрофильных участка, не включенных в N-концевой домен, образованный благодаря наличию в данном районе четырех дисульфидных мостиков. К первому из них относятся фрагменты 130–143 (X) и 144–151 (XI). Мы предположили, что эти участки могут быть экспонированы на поверхности белка, поскольку они расположены вблизи центра гликозилирования в положении 154. Кроме того, известна работа по изучению иммуногенности протеолитических фрагментов аналогичного белка Е другого представителя флавивирусов – вируса Западного Нила [14]. В ней было показано, что протеолиз белка Е идет по двум участкам, один из которых совпадает с фрагментом 130–143, что подтверждает вероятность расположения его на поверхности вириона. Другой участок, подвергающийся расщеплению ферментами, относится к гидрофильному району, удаленному от N-конца. Из этого района нами были синтезированы пептиды 362–372 (XII) и 394–403 (XIII).

Пептиды (VI), (IX), (X) и (XI) получены классическим методом в растворе по схемам 1–4 с использованием блочной конденсации фрагментов. Защитные группы трифункциональных аминокислот были выбраны с расчетом на конечное деблокирование пептидов (VI) и (IX) жидким фтористым водородом, а пептидов (X) и (XI) – гидрированием. В качестве временной N $^{\alpha}$ -защитной группы служила Вос-группа, а для защиты карбоксильной группы C-концевой аминокислоты использовали бензиловые, метиловые либо флуоренилметиловые эфиры.

Для последовательного наращивания пептидной цепи применяли, как правило, метод смешанных ангидридов, в случае остатков Asn и Gln – метод нитрофениловых эфиров, а для остатка His – метод DCC/НОВТ. Остаток Thr при синтезе пептидов (IX) и (X) присоединяли методом пентафторфениловых эфиров, что давало более высокие выходы, чем при использовании метода смешанных ангидридов. Для введения остатка Trp с незащищенной боковой группой в последовательность пептида (VI) получали его сукцинимидный эфир. Через сукцинимидный эфир присоединяли также в ходе синтеза пептида (XI) остаток Pro к трипептиду (LXb). Конденсацию фрагментов проводили методом пентафторфениловых эфиров без выделения промежуточного продукта либо DCC/НОВТ-методом.

Защищенные пептиды очищали экстракцией и кристаллизацией, а в случае пептида (XIX) – адсорбционной хроматографией на силикагеле. Степень чистоты и протекание реакции контролировали с помощью ТСХ. Очистку деблокированных пептидов проводили гель-фильтрацией и ионообменной хроматографией.

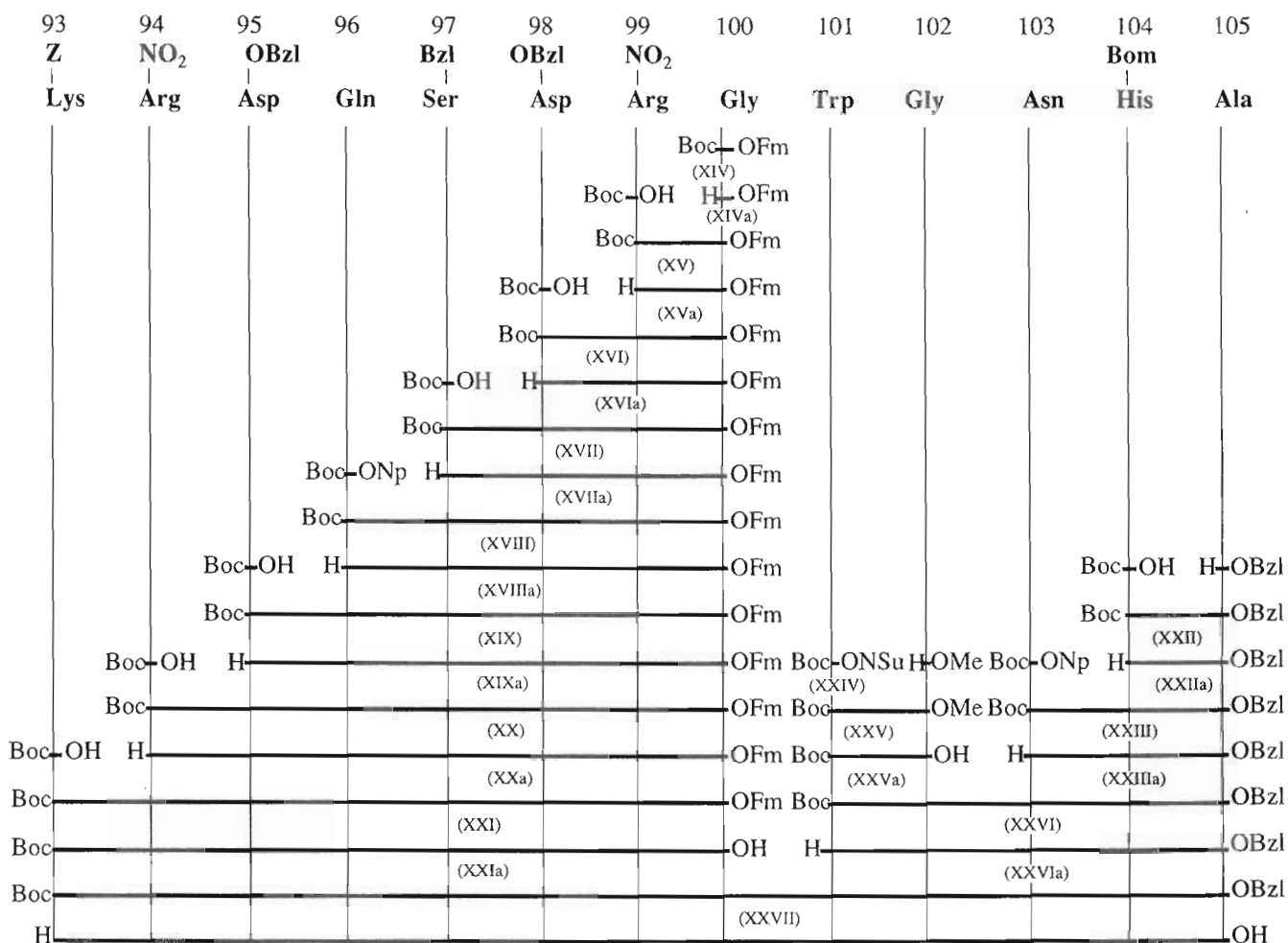


Схема 1. Синтез пептида 93-105 (VI)

Пептиды (I)–(V), (VII), (VIII), (XII) и (XIII) были синтезированы твердофазным методом путем последовательного наращивания цепи с С-конца, пептид (VII) – на синтезаторе Applied Biosystems 430A, остальные – в ручном варианте. Пептиды (I) – (III), (V), (VII) и (VIII) синтезированы на РАМ-полимере, а пептиды (IV), (VI), (VIII) и (XII) – на хлорметилированном сополимере стирола с дивинилбензолом. Для временной защиты аминофункции применяли Boc-группу. Защитные группы боковых функций аминокислот, кроме остатка Cys(Asm), были выбраны с расчетом на конечное деблокирование жидким фтористым водородом.

Реакцию конденсации проводили двукратно, первоначально методом симметричных ангидридов, затем DCC/НОВТ-методом с предварительной активацией аминокислоты. При неудовлетворительном результате двукратной конденсации реакцию повторяли DCC/НОВТ-методом до полноты протекания реакции более 99%. Остатки Boc-Asn и Boc-Gln вводили в реакцию методом

*n*-нитрофениловых эфиров. Присоединение к остаткам Gln и Glu проводили только с помощью симметричных ангидридов в DMF во избежание побочной реакции образования пироглутаминовой кислоты. Каждый цикл синтеза заканчивали ацилированием непрореагировавших аминогрупп уксусным ангидридом. После введения в пептидную цепь остатка Met Boc-группу во избежание окисления и алкилирования атома серы удаляли в присутствии меркаптоэтанола. Однако в случае пептида (V) в ходе синтеза произошло полное окисление остатка Met, что было установлено с помощью масс-спектрального анализа и ЯМР-исследования. Окисленный пептид после деблокирования восстанавливали дитиотреитом. После отделения от полимерного носителя и деблокирования с помощью жидкого фтористого водорода пептиды очищали гель-фильтрацией и ионообменной хроматографией.

Выход пептидов (IV), (VI), (VIII) и (XII), синтезированных на хлорметилированном полимере, составил 12–15% в расчете на первую аминокис-

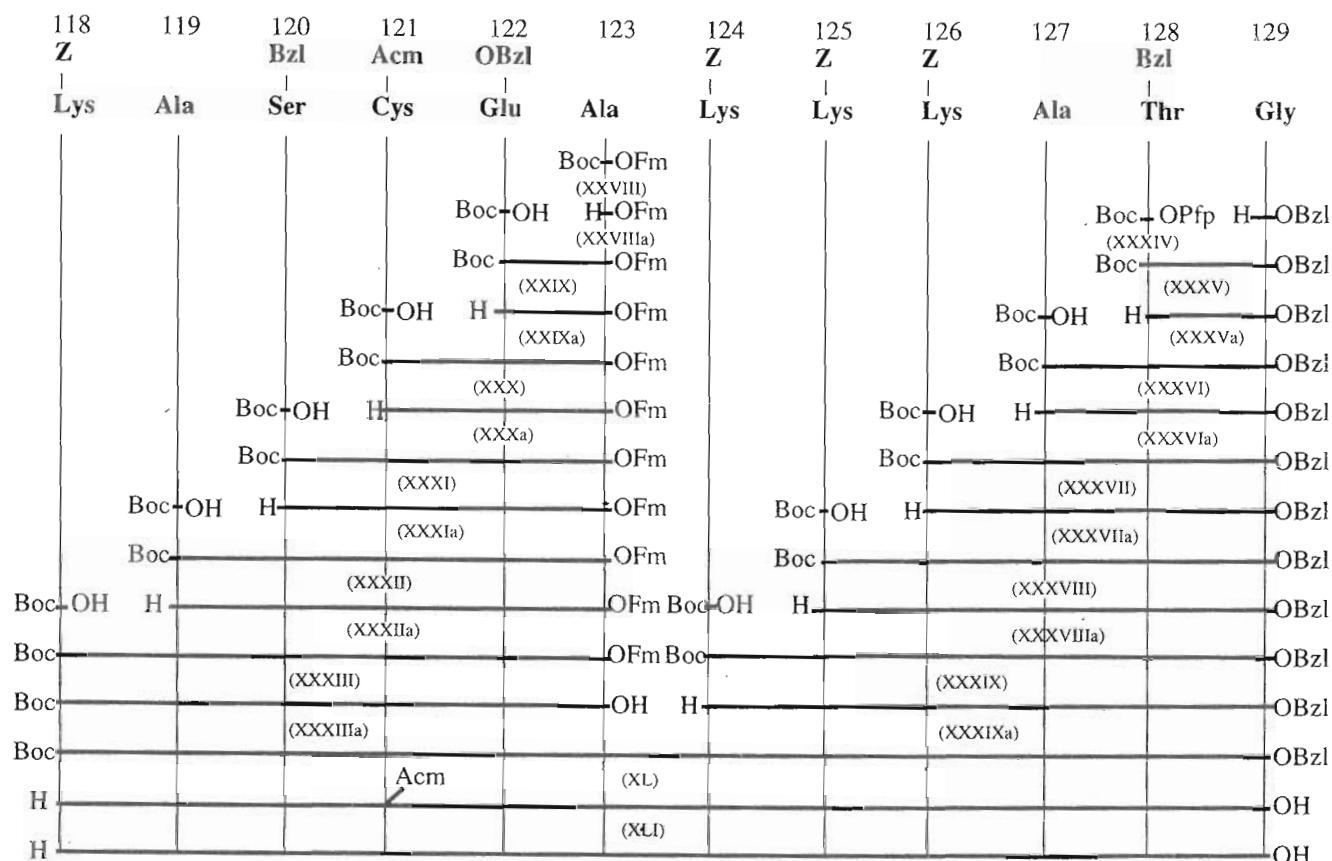


Схема 2. Синтез пептида 118-129 (IX)

лоту. Выход пептидов (I)–(III), (V), (VII) и (XIII) был существенно выше: 60–80%. Низкий выход пептидов первой группы, вероятно, объясняется известной побочной реакцией отщепления растущей пептидной цепи от хлорметирированного полимера. С другой стороны, выходы были ниже там, где использовали бензиловые эфиры для защиты боковых функций остатков Asp и Glu. При использовании производных Boc-Asp(OcHx) и Boc-Glu(OcHx) выходы были выше.

Индивидуальность полученных соединений подтверждена данными аминокислотного анализа после кислотного гидролиза, а свободных пептидов, полученных в растворе, – также данными аминокислотного анализа после ферментативного гидролиза. Кроме того, для всех свободных пептидов получены данные N-концевого анализа, масс-спектрометрии и обращенно-фазовой ВЭЖХ. В пептидах, имеющих в последовательности остатки Cys, определяли содержание SH-групп с помощью реактива Элмана. В случае пептида (VI), в ходе синтеза которого использовали незащищенный Trp, наличие в его последовательности неокисленного остатка Trp определяли с помощью УФ-спектроскопии.

Иммуногенность синтезированных пептидов была изучена на крысах (табл. 1). Крысы были иммунизированы двукратно как свободными пептидами, так и их конъюгатами с KLH. Полученные сыворотки исследовались в ИФА на присутствие противопептидных антител и на их способность связываться с нативным белком E, а также на способность нейтрализовать вирус в культуре клеток. Показано, что в свободном виде данные пептиды неиммуногенны. Титр противопептидных антител был незначителен (< 1, табл. 1). Сыворотки, полученные от иммунизации KLH-конъюгатами пептидов, имели высокие титры противопептидных антител, однако только для KLH-конъюгатов пептидов 98–113, 130–143 и 394–403 были получены антитела, способные связываться с белком E с достаточно высокими титрами (3.1, 2.2 и 2.2 соответственно). Все сыворотки были исследованы в реакции нейтрализации вируса по методу редукции числа бляшек на культурах перевиваемых клеток почки эмбриона свиньи [6]. Показано, что антитела к конъюгатам пептидов 98–113 и 394–403 способны нейтрализовать вирус с индексом 3.0 и 2.6 соответственно, в то время как индекс нейтрализации гликопротеина E составляет 4.4.



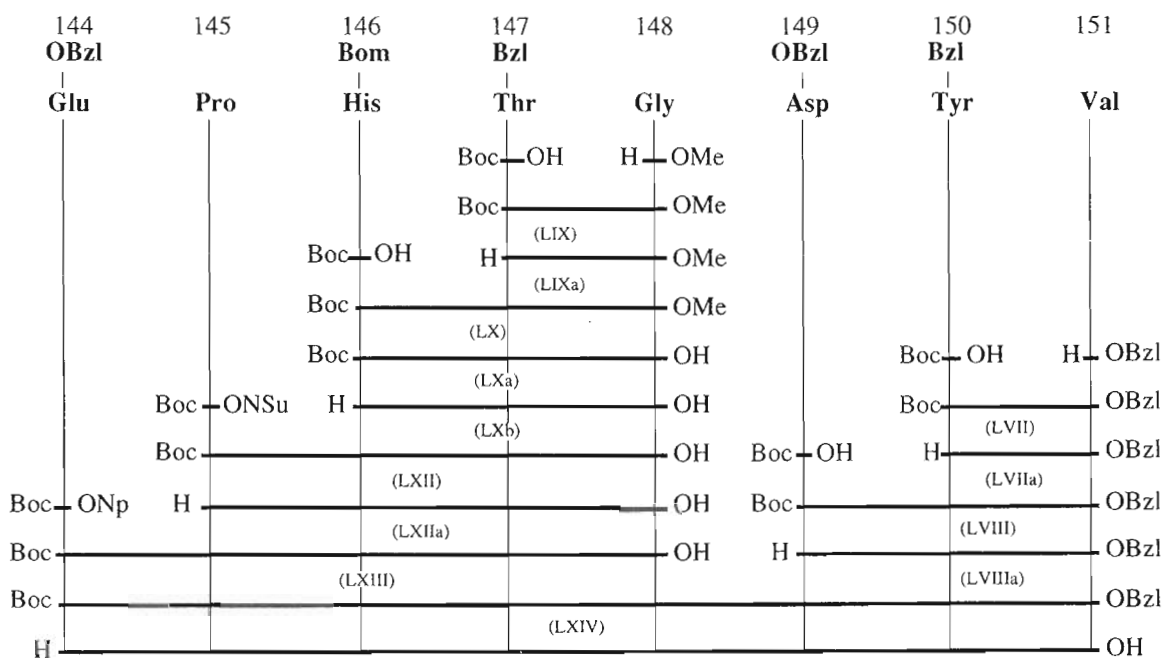


Схема 4. Синтез пептида 144-151 (XI)

течение 24 ч при 115°C. Растворители очищали согласно известным методикам [15]. Масс-спектр снимали на приборе Kratos MS 50 TC методом FAB.

Условия получения и очистки соединений (XIV)–(LXa), синтезированных в растворе, приведены в табл. 4.

**Синтез** проводили по следующим методикам:

**А. Удаление Boc-группы.** Пептид растворяли в смеси  $\text{CF}_3\text{COOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 : 1) либо в 70% водной  $\text{CF}_3\text{COOH}$ . Через 30–40 мин раствор упаривали, к остатку добавляли толуол и раствор снова упаривали, операцию повторяли 2–3 раза.

**Б. Метод смешанных ангидридов.** К охлажденному до  $-15^\circ\text{C}$  раствору 1.5 экв. карбоксильного компонента и 1.5 экв. *N*-метилморфолина в минимальном объеме DMF добавляли 1.4 экв. изобутилхлорформиата, смесь перемешивали 1–2 мин при  $-15^\circ\text{C}$ , затем добавляли по каплям раствор 1 экв. трифторацетата аминок компонента и 1 экв. *N*-метилморфолина в DMF. Реакционную массу перемешивали 30 мин при  $-15^\circ\text{C}$ .

**В. Метод *l*-нитрофениловых эфиров.** Раствор 1 экв. *l*-нитрофенилового эфира карбоксильного компонента, 1 экв. трифторацетата аминок компонента, 1 экв. *N*-метилморфолина и 2 экв. НОВТ в минимальном объеме DMF перемешивали 3–15 ч при  $20^\circ\text{C}$ .

**Г. Получение пентафторфениловых эфиров.** Раствор 1 экв. аминокислоты или пептида и 1.5 экв. пентафторфенола в тетрагидрофуране

охлаждали до  $-5^\circ\text{C}$ , а затем добавляли 1.2 экв. DCC. Реакционную массу перемешивали 1 ч при  $0^\circ\text{C}$  и 2 ч при  $20^\circ\text{C}$ , DCU отфильтровывали, а полученный эфир либо сразу вводили в реакцию (Г1), либо выделяли (Г2).

**Д. Метод пентафторфениловых эфиров.** К раствору 1 экв. пентафторфенилового эфира карбоксильного компонента в DMF добавляли 1 экв. трифторацетата аминок компонента, предварительно нейтрализованного 1 экв. *N*-метилморфолина, и реакционную массу перемешивали 2 ч при  $0^\circ\text{C}$  и 1–10 ч при  $20^\circ\text{C}$ .

**Е. Получение флуоренилметилового эфира.** Раствор 1 экв. аминокислоты, 1 экв. флуоренилметанола и 0.1 экв. диметиламинопиридина в этилацетате охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ , затем добавляли 1,2 экв. DCC и перемешивали 30 мин при  $0^\circ\text{C}$  и 4 ч при  $20^\circ\text{C}$ , после чего DCU отфильтровывали.

**Ж. Удаление флуоренилметилового эфира.** Эфир пептида растворяли в 20% растворе пиперидина в DMF и выдерживали 40–60 мин при  $20^\circ\text{C}$ . Раствор разбавляли этилацетатом, подкисляли 1 н. HCl до pH водной фазы 2.5, органическую фазу промывали водой.

**З. DCC/НОВТ-метод.** К раствору 1 экв. карбоксильного компонента в диоксане прибавляли 1.2 экв. DCC и 2 экв. НОВТ при  $4^\circ\text{C}$ . Через 30 мин добавляли 1 экв. трифторацетата аминок компонента, нейтрализованного *N*-метилморфолином. Реакционную массу перемешивали 30 мин при  $4^\circ\text{C}$  и 2–15 ч при  $20^\circ\text{C}$ . Затем DCU отфильтровывали.

**И. Получение N-оксисукцинимидных эфиров.**

Раствор 1 экв. аминокислоты и 1 экв. N-оксисукцинимиды в THF охлаждали до -5°C, затем добавляли 1 экв. DCC. Реакционную массу перемешивали 1 ч при 0°C и 2 ч при 20°C, DCU отфильтровывали.

**К. Метод N-оксисукцинимидных эфиров.**

1. К раствору 1 экв. сукцинимидного эфира аминокислоты в DMF добавляли 1 экв. трифторацетата аминок компонента, предварительно нейтрализованного 1 экв. N-метилморфолина, и реакционную массу перемешивали 20 ч при 20°C.

2. К охлажденной до 0°C суспензии 1 экв. гидрохлорида аминок компонента и 2 экв. NaHCO<sub>3</sub> в 50% водном диоксане добавляли 0.5 экв. N-оксисукцинимидного эфира карбоксильного компонента и перемешивали 1 ч при 0°C и 20 ч при 20°C. Затем смесь подкисляли 1 н. HCl до pH 2.5 и экстрагировали пептид этилацетатом.

**Л. Омыление метилового эфира пептида.** Пептид растворяли в 0.1 н. NaOH в CH<sub>3</sub>OH, через 40 мин раствор подкисляли CH<sub>3</sub>COOH до pH 5, упаривали и очищали экстракцией.

**М. Удаление Асм-группы.** К раствору 1 экв. Асм-защищенного пептида в воде добавляли 10 экв. ацетата ртути. Через 4 ч при комнатной температуре к раствору добавляли 500 экв. меркаптоэтанола. При этом выпадал осадок сульфида ртути. Через 2 ч осадок отфильтровывали, а пептид выделяли хроматографически.

**Н. Удаление защитных групп гидрированием.** Пептид растворяли в смеси CH<sub>3</sub>OH-HCOOH (7 : 3), добавляли Pd-чернь и пропускали водород в течение 10-20 ч при 20°C. Катализатор отфильтровывали и фильтрат упаривали.

**О. Удаление защитных групп жидким фтористым водородом.**

1. Защищенный пептид или пептидилполимер обрабатывали смесью HF-n-крезол (90 : 10) в течение 1 ч при 0°C. После удаления фтористого водорода остаток промывали эфиром (5 × 30 мл), сушили и экстрагировали пептид 10% раствором уксусной кислоты. Раствор лиофилизовали.

2. Защищенный пептид или пептидилполимер обрабатывали 2 ч при 0°C смесью 65% диметилсульфида, 10% n-крезола и 25% жидкого HF. Фтористый водород и диметилсульфид отгоняли в вакууме, твердый остаток промывали эфиром (3 × 30 мл) и сушили. На втором этапе повторяли операции, описанные в методике О1.

**Методы очистки продукта реакции**

**П.** Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в этилацетате, в случае низкой растворимости отдельных пептидов использовали n-бутанол. Полученный раствор промывали 5%

**Таблица 1.** Иммуногенность пептидов на крысах

Иммуноген	Титр антител, lg		Индекс нейтрализации
	противопептидных	противобелковых	
35-51	<1.0	<1.0	<1.0
35-51-KLH	2.4	<1.0	<1.0
50-61	<1.0	<1.0	<1.0
50-61-KLH	2.1	<1.0	<1.0
93-105-KLH	2.1	<1.0	<1.0
98-113	1.0	<1.0	<1.0
98-113-KLH	3.8	3.1	3.0
118-129-KLH	2.4	<1.0	<1.0
130-143	1.0	<1.0	<1.0
130-143-KLH	2.4	2.2	<1.0
362-372-KLH	2.1	<1.0	<1.0
394-403	<1.0	<1.0	<1.0
394-403-KLH	3.4	2.2	2.6
Гликопротеин E		>5.5	4.4

**Таблица 2.** Связывание синтетических пептидов с антителами к белку E

Пептид	Титр антител, lg
35-51	3.7
50-61	<1.0
50-58	<1.0
98-113	<1.0
105-113	<1.0
118-129	<1.0
130-143	<1.0
362-372	<1.0
394-403	<1.0
Гликопротеин E	>5.0

**Таблица 3.** Условия хроматографии в тонком слое

Растворитель	Объемные соотношения компонентов в системах											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Гексан	3						3					
Эфир	1						1					
Хлороформ		10	9	6	3	1		3				
Этилацетат	1	10	3	3	1	1	1	1	10	4		
Метанол		1	1	1	1	1	0.1	1				
n-Бутанол											4	42
Пиридин												24
Уксусная кислота								0.1	1	1	1	4
Вода										1	1	30



Таблица 4. Условия получения и очистки соединений, синтезированных в растворе

Соединение	Метод синтеза*	Метод очистки*	Выход, %	$R_f$ (система**)
(XIV)	Е	П	72	0.51 (1)
(XIVa)	А	Т (эфир)	99	0.26 (9); 0.52 (5)
(XV)	Б	П	80	0.41 (3)
(XVa)	А	Т (эфир)	98	0.55 (10)
(XVI)	Б	П	97	0.74 (5); 0.42 (3)
(XVIa)	А	Т (эфир)	98	0.62 (10); 0.27 (9)
(XVII)	Б	П, С (этилацетат-эфир)	78	0.75 (5); 0.42 (3)
(XVIIa)	А	Т (эфир)	99	0.60 (10)
(XVIII)	В	П, С (этилацетат-эфир)	70	0.75 (5); 0.48 (9)
(XVIIIa)	А	Т (эфир)	99	0.46 (10)
(XIX)	Б	П, У (силикагель, система №5)	56	0.71 (5); 0.5 (3)
(XIXa)	А	Т (эфир)	98	0.42 (10)
(XX)	Б	Р	78	0.56 (5); 0.27 (3)
(XXa)	А	Т (эфир)	98	0.38 (10)
(XXI)	Г1, Д	Р	90	0.68 (9); 0.91 (10)
(XXIa)	Ж		70	0.58 (10)
(XXII)	З	П	98	0.62 (4); 0.82 (5)
(XXIIa)	А	Т (эфир)	99	0.39 (9); 0.72 (10)
(XXIII)	В	П, С (эфир-пентан)	69	0.51 (5); 0.26 (3)
(XXIIIa)	А	Т (эфир)	98	0.28 (10)
(XXIV)	И	П, С (эфир-пентан)	87	0.70 (3)
(XXV)	К1	П, С (эфир-пентан)	90	0.80 (5); 0.71 (3)
(XXVa)	Л	П	91	0.82 (10); 0.67 (9)
(XXVI)	Г1, Д	П, С (этилацетат-эфир)	82	0.61 (10); 0.17 (9); 0.29 (5)
(XXVIa)	А (1% МЭ***)	Т (эфир)	97	0.30 (10)
(XXVII)	Г1, Д	Т (этилацетат-эфир)	85	0.56 (10)
(XXVIII)	Е	П	78	0.55 (1)
(XXVIIIa)	А	Т (эфир)	98	0.62 (4)
(XXX)	Б	П, С (этилацетат-пентан)	76	0.80 (5); 0.62 (3)
(XXXa)	А	Т (эфир)	97	0.70 (6)
(XXXI)	Б	П, С (этилацетат-пентан)	81	0.75 (5); 0.60 (3)
(XXXIa)	А	Т (эфир)	98	0.8 (6)
(XXXII)	Б	П, С (этилацетат-эфир)	74	0.65 (5); 0.28 (3)
(XXXIIa)	А	Т (эфир)	98	0.57 (10)
(XXXIII)	Б	Р	79	0.48 (5); 0.56 (9)
(XXXIIIa)	Ж		69	0.62 (10)
(XXXIV)	Г2	С (гексан, -60° С)	80	0.48 (1)
(XXXV)	Д	П, С (эфир-гексан, -60° С)	98	0.75 (2); 0.21 (1)
(XXXVa)	А	Т (эфир)	99	0.53 (5)
(XXXVI)	Б	П, С (этилацетат)	68	0.45 (3); 0.70 (4)
(XXXVIa)	А	Т (эфир)	95	0.61 (9)
(XXXVII)	Б	П, С (этилацетат-эфир)	88	0.61 (3); 0.8 (4)
(XXXVIIa)	А	Т (эфир)	97	0.7 (9)
(XXXVIII)	Б	Р	93	0.42 (3); 0.84 (5); 0.73 (4)
(XXXVIIIa)	А	Т (эфир)	97	0.33 (10)
(XXXIX)	Б	Р	91	0.85 (5); 0.67 (4); 0.35 (10)
(XL)	Г1, Д	Р	82	0.68 (10); 0.22 (9)

Таблица 4. (Окончание)

Соединение	Метод синтеза*	Метод очистки*	Выход, %	R <sub>f</sub> (система**)
(XLI)	О2			
(XLII)	Б	П, С (этилацетат-эфир-гексан)	82	0.31 (1); 0.76 (2)
(XLIIa)	А	Т (эфир)	99	0.5 (5)
(XLIII)	Б	П, С (этилацетат-гексан)	85	0.48 (3); 0.65 (4)
(XLIIIa)	А	Т (эфир)	99	0.7 (9)
(XLIV)	Д	П, С (этилацетат-эфир)	78	0.42 (3); 0.79 (5)
(XLIVa)	А	Т (эфир)	98	0.39 (9)
(XLV)	Б	Р	69	0.65 (5); 0.42 (4)
(XLVa)	А	Т (эфир)	99	0.32 (10)
(XLVI)	Е	П	72	0.45 (1)
(XLVIa)	А	Т (эфир)	98	0.55 (5)
(XLVII)	Б	П, С (эфир-гексан, -60° С)	71	0.4 (1)
(XLVIIa)	А	Т (эфир)	98	0.42 (3)
(XLVIII)	Б	П, С (этилацетат-эфир)	75	0.22 (1); 0.7 (2)
(XLVIIIa)	А	Т (эфир)	97	0.66 (5)
(XLIX)	В	Ф	85	0.71 (5); 0.42 (4)
(XLIXa)	А	Т (эфир)	99	0.5 (6)
(L)	Б	Ф	91	0.48 (4); 0.35 (3)
(La)	Ж		87	0.62 (9)
(LI)	З	Р	90	0.35 (8); 0.70 (9)
(LIa)	А	Т (эфир)	98	0.33 (10)
(LII)	Е	П	86	0.63 (1)
(LIIa)	А	Т (эфир)	97	0.61 (9)
(LIII)	Б	П, С (этилацетат-эфир)	78	0.36 (7); 0.70 (2)
(LIIIa)	А	Т (эфир)	98	0.62 (3)
(LIV)	Б	П, С (этилацетат-эфир)	70	0.51 (2); 0.22 (7)
(LIVa)	А	Т (эфир)	99	0.65 (5)
(LV)	З	П, С (этилацетат-эфир)	65	0.33 (3); 0.77 (5)
(LVa)	Ж		82	0.5 (8)
(LVI)	З	Ф	72	0.48 (10)
(LVII)	Б	П, С (эфир-гексан)	71	0.5 (1)
(LVIIa)	А	Т (эфир)	99	0.46 (5)
(LVIII)	Б	П, С (эфир-пентан)	80	0.73 (3); 0.25 (2)
(LVIIIa)	А	Т (эфир)	98	0.51 (9)
(LIX)	Б	П, С (эфир-гексан)	75	0.42 (3); 0.66 (4)
(LIXa)	А		98	0.65 (10)
(LX)	З	П	62	0.64 (5); 0.25 (4)
(LXa)	Л	П		0.56 (10)
(LXb)	А		98	0.28 (11)
(LXI)	И	П	85	0.73 (3)
(LXII)	К	Ф	91	0.62 (10)
(LXIIa)	А		97	0.32 (11)
(LXIII)	К	Ф	90	0.53 (10)
(LXIV)	З	Р	77	0.29 (6); 0.22 (9); 0.61 (10)

\* Методы синтеза и очистки соединений описаны в "Экспериментальной части".

\*\* См. табл. 3.

\*\*\* 2-Меркаптоэтанол.

NaHCO<sub>3</sub>, водой, 10% лимонной кислотой, водой, высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали.

**Р.** В реакционную смесь наливали 5% раствор NaHCO<sub>3</sub>, выпавший осадок отфильтровывали, промывали в фильтре 5% NaHCO<sub>3</sub>, водой, 10% лимонной кислотой, водой, сушили, затем промывали этилацетатом и эфиром.

**С.** Кристаллизовали из растворителя, указанного в табл. 4 в скобках, и отфильтровывали.

**Т.** Раствор упаривали до минимального объема и продукт реакции осаждали растворителем, указанным в табл. 4 в скобках, и отфильтровывали.

**У.** Хроматографическая очистка. Условия хроматографии указаны в табл. 4 в скобках.

**Ф.** Пептид осаждали из реакционной смеси этилацетатом, фильтровали и промывали на фильтре этилацетатом, затем эфиром.

Для твердофазного синтеза пептидов (I)–(III), (V), (VII) и (XIII) использовали Вос-аминоацил-РАМ-полимеры фирмы PRF.

Вос-аминоацил-полимеры для синтеза пептидов (IV), (VI), (VIII) и (XII) получали реакцией цезиевой соли Вос-аминокислоты и хлорметилированного полимера по методике [16].

Использовали следующий протокол каждого синтетического цикла (10–15 мл растворителя на 1 г полимера):

- 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 1 мин),
- 2) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–TFA, 1 : 1 (1 мин),
- 3) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–TFA, 1 : 1 (30 мин),
- 4) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 1 мин),
- 5) DIEA–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 : 95 (2 × 2 мин),
- 6) DMF (3 × 1 мин),
- 7) 3 экв. симм. ангидрида Вос-аминокислоты в DMF (1 ч),
- 8) DMF (2 × 1 мин),
- 9) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 1 мин),
- 10) DIEA–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 : 95 (2 × 2 мин),
- 11) DMF (3 × 1 мин),
- 12) 3 экв. НОВТ-эфира Вос-аминокислоты в DMF (2 ч),
- 13) DMF (3 × 1 мин),
- 14) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 1 мин),
- 15) изопропанол (3 × 1 мин),
- 16) ацилирование смесью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–Ac<sub>2</sub>O–пиридин, 60 : 20 : 20 (1 ч),
- 17) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 1 мин),
- 18) изопропанол (3 × 1 мин).

Для получения симметричного ангидрида защищенной аминокислоты к 6 экв. Вос-аминокислоты в 10 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> приливали раствор 3 экв. DCC в DMF при 0°C. После перемешивания в течение 30 мин выпавшую DCU отфильтровывали, а раствор использовали для проведения реакции конденсации.

Гидроксibenзотриазоловые эфиры получали в результате реакции 3 экв. Вос-аминокислоты, 3 экв. НОВТ и 3 экв. DCC в смеси CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–DMF при 0°C в течение 10 мин. Образовавшуюся DCU от-

фильтровывали, раствор использовали для проведения реакции конденсации.

В ходе синтеза соединений (LXI), (LXII) и (LXV) после присоединения остатка Met на стадиях 2 и 3 протокола вместо смеси CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–TFA (1 : 1) использовали смесь CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–TFA–2-меркаптоэтанол (48 : 48 : 4).

Контроль протекания реакций конденсации осуществляли после стадии 14 с помощью нингидринового [17] и пикринового [18] тестов.

Синтез пептидполимера (LXVI) проводили с помощью синтезатора Applied Biosystems 430A с использованием той же схемы, что и в ручном варианте, но без стадии ацилирования непрореагировавших аминогрупп (пп. 16–18 протокола).

Деблокирование с одновременным отщеплением от смолы в синтезах пептидов (IV), (VIII), (XII) и (XIII) проводили методом O1, для пептидов (I)–(III), (V) и (VII) – методом O2. В случае пептидов (I) и (VII) на первом этапе использовали смесь Me<sub>2</sub>S–*n*-крезол–тиокрезол–HF (65 : 5 : 5 : 25), а в сосуд с HF добавляли 1 г триптофана.

**Восстановление пептида (V) с окисленным остатком Met.** 50 г пептида растворяли в 1.5 мл 0.1 н. AcOH, добавляли 25 мг дитиотреита и нагревали смесь до 50°C в течение 21 ч.

В пептидах (III), (V), (VII) и (VIII) после деблокирования удаляли AcM-защиту методом M.

**Получение препаратов для иммунизации.** Конъюгацию пептидов проводили согласно описанной методике [19]. 15 мг KLH и 2 мг пептида в 2 мл PBS перемешивали 30 мин, затем в течение 1 ч добавляли по каплям 0.5 мл 0.5% водного раствора глутарового альдегида. Реакционную массу перемешивали 15 ч, после чего диализовали против PBS с трехкратной сменой буфера.

**Иммунизация животных.** Крысы Вистар массой 170–190 г были первично иммунизированы KLH-конъюгированными или свободными пептидами в дозе 200 мкг (в пересчете на пептид) с полным адъювантом Фрейнда в подушечки лап или внутримышечно; через 30 сут повторно в той же дозе внутримышечно в неполном адъюванте Фрейнда. Кровь отбирали на 45-е сут после первой иммунизации.

Титр противопептидных и противобелковых антител определяли **твердофазным иммуноферментным анализом (“непрямой” метод)**, который проводили как описано в работе [20]. В первом случае в качестве антигена на плату наносили OVA-конъюгаты пептидов в концентрации 100 мкг/мл, во втором – белок E в концентрации 10 мкг/мл. Поглощение измеряли при 492 нм на приборе Titertek Multiskan Plus. За титр антител принимали соответствующее разведение антисыворотки, дающее окрашивание в 0.1 ОЕ и превышающее фоновый уровень в 4 раза.

**Приготовление ОВА-конъюгатов.** 10 мг пептида и 20 мг ОВА растворяли в 1 мл PBS и при перемешивании в течение 1 ч добавляли 0.1 мл 20% водного раствора солянокислого 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Полученный раствор перемешивали 15 ч, после чего диализовали как описано выше.

Молярное соотношение пептид-носитель определяли по результатам количественного аминокислотного анализа [21], оно составляло от 5 до 10 моль пептида на 1 моль носителя.

**Реакцию нейтрализации вируса клещевого энцефалита противопептидными сыворотками** проводили по методу редукции числа бляшек на культурах перевиваемых клеток СПЭВ (почки эмбриона свиньи) [6]. Равные объемы 10-кратных разведений вируса и противопептидных сывороток или контрольной нормальной сыворотки (в минимальном разведении) инкубировали 1 ч при 37°C, смеси засеивали по 0.2 мл во флаконы с 3-суточным, хорошо сформировавшимся монослоем клеток СПЭВ, культуры заливали расплавленным (остуженным до 50°C) 2.5% агаром и инкубировали их при 37°C в течение нескольких суток до окончания процесса бляшкообразования. Затем вычисляли индекс нейтрализации как отношение выявленных титров вируса с иммунной и нормальной сыворотками.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Volpina O.M., Yarov A.V., Zhmak M.N., Kuprianova M.A., Cherpurkin A.V., Toloknov A.S., Ivanov V.T. // *Vaccine*. 1996. V. 14. P. 1375–1380.
2. Heinz F.X., Kunz Ch. // *J. Gen. Virol.* 1981. V. 57. P. 263–274.
3. Trent D.W. // *J. Virol.* 1977. V. 22. P. 608–618.
4. Mandl C.W., Guirakhoo F., Holzmann H., Heinz F.X., Kunz Ch. // *J. Virol.* 1989. V. 63. P. 564–571.
5. Heinz F.X., Tuma W., Kunz Ch. // *Infect. Immun.* 1981. V. 33. P. 250–257.
6. Чумаков М.П., Рубин С.Г., Кусов Ю.Ю., Семашко И.В., Сальников Я.А., Прессман Е.К., Цехановская Н.А. // *Вопр. вирусологии*. 1984. Т. 29. С. 701–705.
7. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. // *FEBS Lett.* 1986. V. 200. P. 317–721.
8. Hopp Th.P., Woods K.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. P. 3824–3828.
9. Hopp Th.P. // *J. Immunol. Methods*. 1986. V. 88. P. 1–18.
10. Welling G.W., Weijer W.J., Zee R., Welling-Wester S. // *FEBS Lett.* 1985. V. 188. P. 215–218.
11. Chou P.Y., Fasman G.D. // *Biophys. J.* 1979. V. 26. P. 367–369.
12. Garnier J., Osguthorpe D.J., Robson B. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 120. P. 97–101.
13. Heinz F.X., Berger R., Tuma W., Kunz Ch. // *Virology*. 1983. V. 126. P. 525–537.
14. Wengler G., Wengler G., Nowak T., Wahn K. // *Virology*. 1987. V. 160. P. 210–219.
15. Perrin D.D. *Purification of Laboratory Chemicals*. N.Y.: Pergamon Press, 1980. P. 1–563.
16. Gisin B.F., Merrifield R.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1972. V. 94. P. 6165–6170.
17. Sarin V.K., Kent S.B.H., Tam J.P., Merrifield R.B. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 117. P. 147–157.
18. Gisin B.F. // *Anal. Chim. Acta*. 1972. V. 58. P. 248–249.
19. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H.O., Schulz G.E., Schaller H. // *EMBO J.* 1982. V. 1. P. 869–874.
20. Суровой А.Ю., Гельфанов В.М., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Черпуркин А.В., Иванющенко В.Н., Дрягалин Н.Н., Бурдов А.Н. // *Биоорг. химия*. 1989. Т. 15. С. 1185–1192.
21. Brand J.P., Muller S., Van Regenmortel M.H.V. // *J. Immunol. Methods*. 1985. V. 78. P. 59–69.

## The Study of Antigenic Structure of the Tick-borne Encephalitis Virus by Means of Synthetic Peptides

T. D. Volkova\*, O. M. Volpina\*, V. T. Ivanov\*, S. G. Rubin\*\*, I. V. Semashko\*\*, and A. S. Karavanov\*\*

\* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

\*\* Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 142782 Russia

A number of peptides, fragments of the envelope protein E of the tick-borne encephalitis virus (Sofjin strain), were synthesized. Their binding to the polyclonal antiserum to protein E was studied. Rats were immunized with both the free peptides and their KLH-conjugates, and the resulting antisera were tested for their reactivity toward protein E and for their neutralizing activity toward the virus in cell culture. The only peptide corresponding to the 98–113 sequence of protein E was shown to be bound by the protein E antiserum in EIA. Two-fold immunization of rats with KLH-conjugates of the peptides corresponding to the 98–113, 130–143, and 394–403 sequences of protein E resulted in antipeptide antibodies capable of binding the native protein E, and the antibodies to the 98–113 and 394–403 peptides were capable of neutralizing the virus.

*Key words:* tick-borne encephalitis virus, glycoprotein E, synthetic peptides, antigenic determinants, EIA, KLH-conjugates