



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.083.3:615.371

МОДЕЛИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ
ПРОТЕКТИВНЫХ ЭПИТОПОВ БЕЛКА VP₁ ВИРУСА ЯЩУРА
СЕРОТИПОВ О И А

*Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т.,
Ченуркин А. В.*, Иващенко В. Н.*, Бурдов А. Н.,
Дрягалов Н. Н.**

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемлягина Академии наук СССР,
Москва;*

**Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт, Владимир*

Существующие в настоящее время противовирусные вакцины имеют ряд серьезных недостатков, что заставляет искать новые биотехнологические приемы в решении задач специфической профилактики различных заболеваний человека и животных. Возможно, что одним из решений этой проблемы будет направленный синтез антигенных районов поверхностных вирусных белков. Вирус ящура является прекрасной моделью для апробирования указанного подхода. Ящур — тяжелое вирусное заболевание парнокопытных животных, наносящее большой экономический ущерб животноводству. Его возбудитель — РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству пикорнавирусов, по своим антигенным свойствам подразделяется на семь серотипов. Целью настоящей работы является синтез пептидов, моделирующих основные антигенные районы вируса ящура серотипов О и А, встречающихся на территории СССР.

Показано, что главные эпитопы этого вируса, вызывающие выработку вируснейтрализующих антител, так называемые протективные эпитопы, расположены на поверхности одного из капсидобразующих белков — VP₁ [1]. Известно, что протективную и вируснейтрализующую активность проявляют синтетические пептиды, отвечающие последовательности 141—160, 200—213 [2] и 144—159 [3] белка VP₁ штамма O₁K, конъюгированные с гемоглобином улитки (KLH), а также свободные пептиды (141—158)-Pro-Cys-Gly, (200—213)-Pro-Pro-Ser-(141—158)-Pro-Cys-Gly и Cys-Cys-(200—213)-Pro-Pro-Ser-(141—158)-Pro-Cys-Gly [4].

Ниже представлены фрагменты белка VP₁ штамма O₁K [5], выбранные нами для синтеза.

Пептид 136—152 ранее не описан и включает гипервариабельную область белка, начиная с остатка Tug¹³⁶, экспонированного на поверхности вируса [6]. Для локализации эпитопов в этом районе белка получен ряд перекрывающихся укороченных фрагментов этого пептида: 136—148, 141—148, 141—152. Пептид 145—159 соответствует ранее описанному синтетическому иммуногенному пептиду [3].

Синтез осуществлен классическим методом в растворе с использованием блочной конденсации фрагментов. Защитные группы удалены гидролизом. Гомогенность защищенных и свободных пептидов доказана методами высокоэффективной эксклюзионной, обращенно-фазовой и ионообменной хроматографии.

Для повышения иммуногенности коротких пептидов обычно используют их конъюгаты с белком-носителем. С этой целью первоначальный скрининг вируснейтрализующей и протективной активности всех синтезированных пептидов был проведен на их конъюгатах с KLH, полученных при помощи глутаральдегида [3]. Кроме того, в случае пептида 145—159

136 Tyr-Asn-Arg-Asn-Ala-Val-Pro-Asn-Leu-Arg-Gly-Asp-Leu-Gln-Val-Leu-Ala-Gln-Lys-Val-Ala-Arg-Thr-Leu 159
 136 152

141 148

141 152

145 159

136 148

131 149
 131 149
 131 149

131 139

140 149

**Иммунногенность синтетических пептидов последовательности белка VP₁
вируса ящура штаммов O₁K и A₂₂ ***

Штамм	Антиген	Носитель	А		Б	
			Титр вируснейтрализующих антител на		Титр вируснейтрализующих антител на 55-е сут	Протективный эффект
			30-е сут	55-е сут		
O ₁ K	Вирус **	Отсутствует	3,0-4,0	6,6-7,0	4,0-6,0	100
	145-159	KLH	<1,0	<1,0	<1,0	0
	145-159	ПАК	<1,0	<1,0	<1,0	0
	145-159	ГМДП	<1,0	<1,0	<1,0	0
	136-152	KLH	1,2-2,7	4,1-5,0	—	—
	136-152	Отсутствует	—	—	1,5	100
	136-148	KLH	1,0-2,2	2,1-4,7	<1,0	50
	136-148 ***	Отсутствует	1,0-3,0	3,7-5,1	—	—
	136-148	»	<1,0	1,7-3,7	<1,0	60
	141-148	KLH	—	—	<1,0	0
	141-148	Отсутствует	—	—	<1,0	0
	141-152	KLH	—	—	<1,0	0
	141-152	Отсутствует	—	—	<1,0	0
	A ₂₂	Вирус **	»	—	—	3,5
131-149		KLH	3,5-4,3	4,2-5,0	4,2	75
131-149 ***		Отсутствует	—	—	3,8	20
131-149		»	—	—	4,0	80
131-139		KLH	<1,0	<1,0	—	—
131-139		Отсутствует	—	—	<1,0	0
140-149		KLH	2,2-3,5	4,0-4,8	—	—
140-149		Отсутствует	—	—	3,0	50

* Кроликов массой 2-3 кг (А) и морских свинок массой 0,5 кг (Б) первично иммунизировали конъюгатами пептидов или свободными пептидами в дозе 200 мкг (в пересчете на пептид) с полным адъювантом Фрейнда в подушечки лап или внутримышечно, через 42 сут — повторно в той же дозе внутримышечно в сочетании с неполным адъювантом Фрейнда. Титр вируснейтрализующих антител в сыворотках крови кроликов определяли на 30-е и 55-е сут, а сыворотках морских свинок на 55-е сут после первой иммунизации в реакции нейтрализации вируса на культуре ткани свиной лочки против 32 ТЦД₅₀ вируса O₁K (ТЦД — тканевая цитопатическая доза вируса). Титр вируснейтрализующих антител выражали в логарифмах с основанием 2. Протективный эффект определяли по числу морских свинок, не заболевших генерализованной формой ящура после интраплатантарного заражения в дозе 200 ИД₅₀ (ИД₅₀ — инфекционная доза вируса, вызывающая генерализованную форму ящурной инфекции у 50% животных). Прочерк (—) означает отсутствие экспериментальных данных.

** Очищенный инактивированный вирус вводили в дозе 5 мкг на животное.

*** Пептид полимеризован.

были получены его конъюгаты с полиакриловой кислотой (ПАК)* и с изучаемым в нашей лаборатории гликопептидным адъювантом — N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамилдипептидом (ГМДП)*. Активность полученных препаратов была исследована в опытах по определению титра вируснейтрализующих антител в сыворотках крови кроликов и морских свинок *in vitro*, а также по определению протективного эффекта на морских свинках *in vivo* (таблица). Согласно полученным результатам, наибольшую активность проявляет пептид последовательности 136-152: высокий титр вируснейтрализующих антител и 100% защиту животных от заражения вирусом. Причем протективный эффект достигался иммунизацией свободным пептидом без белка-носителя.

Для локализации протективных эпитопов в этом районе изучены короткие перекрывающиеся фрагменты пептида 136-152. Иммунизация пептидом 136-148 обеспечивает защиту от заболевания 50-60% животных, причем свободный пептид, его конъюгат с KLH и полимеризованный пептид проявляют сходную активность. Пептиды 141-148 и 141-152 были полностью неактивны. Показать активность пептида 145-159 в нашем случае не удалось.

Аналогичная работа была проведена по вирусу штамма A₂₂. Аминокислотная последовательность белка VP₁ для этого штамма [7] значительно отличается от последовательности белка штамма O₁K, однако закономерности в распределении вариабельных и гидрофильных районов вдоль полипептидной цепи сохраняется, поэтому при выборе фрагментов

* Подробно синтез пептидов и получение конъюгатов будет опубликовано отдельно.

для синтеза учитывались активности, проявленные пептидами вируса О₁К. Так, был осуществлен синтез пептида 131–149, а также его более коротких фрагментов: 131–139, 140–149.

Результаты испытаний приведены в таблице. Иммунизация пептидом 131–149 приводит к появлению высокого титра вируснейтрализующих антител и защите 80% животных от заболевания, при этом активность свободного пептида не отличается от активности конъюгата. Протективный эффект полимеризованного пептида 131–149 был значительно ниже. Изучение фрагментов показало, что N-концевой пептид 131–139 не проявляет иммуногенной активности, в то время как иммунизация C-концевым декапептидом 140–149 вызывает образование вируснейтрализующих антител и 50% защиту животных.

Таким образом, синтезированы иммуногенные, ответственные за проявление протективных свойств пептиды последовательности основного антигенного района белка VP₁ вируса ящура штаммов О₁К и А₂₂.

В отличие от иммуногенного пептида последовательности 144–159 [3] показано, что пептид 145–159 полностью неактивен, в то же время 100% протективную активность проявляет ранее не описанный пептид 136–152 штамма О₁К и 80% активность — пептид 131–149 штамма А₂₂. Важно, что эти пептиды проявляют иммуногенные свойства без конъюгации с какими-либо белками-носителями, что предполагает участие не только гуморального, но и Т-клеточного иммунного ответа на эти пептиды. В настоящее время проводятся работы по установлению минимальных линейных районов последовательности белка VP₁ штаммов О₁К и А₂₂, обладающих протективной активностью без белка-носителя, и синтезу соответствующих пептидов, а также исследование по локализации B- и T-эпитопов белка VP₁.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bachrach H. L., Moore D. M., McKercher P. D., Polatnick J. // J. Immunol. 1975. V. 115. № 6. P. 1636–1641.
2. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. // Nature. 1982. V. 298. № 5869. P. 30–33.
3. Pfall E., Mussgay M., Bohm H. O., Schulz G. E., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869–874.
4. DiMarchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., Mowat N. // Science. 1986. V. 232. № 4764. P. 639–641.
5. Kurz C., Forss S., Kupper H., Strochmaier K., Schaller H. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 8. P. 1919–1931.
6. Robertson B. H., Moore D. M., Grubman M. J., Kleid D. J. // J. Virol. 1983. V. 46. № 1. P. 311–316.
7. Опищенко А. М., Петров Н. А., Блинов В. М., Василенко С. К., Сандахчиев Л. С., Бурдов А. П., Иванющенко В. Н., Перевозчикова Н. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 416–419.

Поступило в редакцию
24.II.1987

MIMICKING PROTECTIVE EPITOPES OF VP₁ PROTEIN OF THE FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS TYPE O AND A WITH SYNTHETIC PEPTIDES

SUROVOY A. Yu., VOL'PINA O. M., IVANOV V. T., CHEPURKIN A. V.*,
IVANYUSHENKOV V. N.*, BURDOV A. N.*, DRYAGALIN N. N.*

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of
Sciences of the USSR, Moscow:

* All-Union Scientific Research Foot-and-Mouth Disease Institute, Vladimir

In a search of novel approaches to cattle protection from foot-and-mouth disease we have prepared a series of peptides from the major antigenic region 130–160 of the VP₁ protein. The 144–159 peptide as well as 141–152, 141–148, 148–159 segments (strain О₁К) were inactive in all in vitro and in vivo experiments on virus inhibiting. On the other hand, synthetic 136–152, 136–148 О₁К sequences as well as 131–149, 140–149 А₂₂ sequences afforded 50 to 100% protection, both in the free state and conjugated with keyhole limpet hemocyanin. Therefore the 136–145 region should be considered as an essential part of the major sequential epitope, necessary for full-scale antiviral immune response. We also believe that the 136–152 segment is so far the smallest peptide capable of eliciting virus neutralizing antibodies and antiviral protection without conjugation with a high-molecular carrier.