



УДК 577.112.6.083.3:615.371

ПРЕДСКАЗАНИЕ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДОВ, СПОСОБНЫХ ИНДУЦИРОВАТЬ ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ У МЫШЕЙ

© 2002 г. О. М. Вольпина[#], М. А. Титова, М. Н. Жмак,
Д. О. Короев, М. Б. Обозная, Т. Д. Волкова, В. Т. Иванов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 15.02.2002 г. Принята к печати 14.03.2002 г.

На основании данных литературы о структуре Т-хелперных эпитопов, проявляющих активность в опытах *in vitro*, предложен простой метод предсказания последовательности пептидов, способных к стимуляции в свободном виде, без конъюгации с белком-носителем, образования антител у мышей в опытах *in vivo*. Согласно предложенному подходу, потенциально активный пептид должен содержать девятичленный участок, в первом положении которого находится гидрофобный аминокислотный остаток, а в девятом – положительно заряженный остаток. Эффективность подхода была подтверждена корреляцией между наличием такого девятичленного участка и проявляемой активностью в ряду ранее изученных синтетических пептидов, использованием разработанного подхода для выбора в последовательности различных белков иммуногенных фрагментов, проявивших впоследствии специфическую активность, и для конструирования иммуногенных пептидов на основе неактивных природных последовательностей.

Ключевые слова: образование антител; Т-хелперные эпитопы; пептиды иммуногенные, предсказание, синтез.

ВВЕДЕНИЕ

Проявление пептидными фрагментами белков способности стимулировать образование антител – ключевой момент в создании пептидных противовирусных и антибактериальных вакцин, при разработке диагностических тест-систем, а также при получении противобелковых антител для научных исследований. Часто используемый для индукции противопептидных антител метод конъюгации с высокомолекулярным белковым носителем сопровождается рядом нежелательных процессов, таких, как образование высокого уровня антител и долговременной Т-клеточной памяти на чужеродный белок-носитель [1]. В связи с этим особый интерес вызывают пептидные последовательности, способные без конъюгации с белковым носителем вызывать *in vivo* образование антител. В соответствии с представлениями современной иммунологии, необходимым условием образования противопептидных антител является наличие в пептидной последовательности Т-хелперного эпитопа. Т-хелперный эпитоп участ-

вует в образовании тройного комплекса между молекулой главного комплекса гистосовместимости II типа (МНС II), собственно Т-хелперным эпитопом и Т-клеточным рецептором, что приводит к активации Т-хелперных клеток и стимулирует антителообразование В-клетками [2, 3]. В последние годы в результате интенсивных научных исследований стала доступной информация о структуре большого числа Т-хелперных эпитопов, а именно участков белков, ответственных за связывание с молекулами МНС II и Т-клеточными рецепторами [4–6]. На основании этой информации предложены многочисленные и эффективные программы предсказания Т-хелперных эпитопов, активируемых молекулами МНС человека и мышей [7–10].

Мы обобщили имеющиеся данные литературы по структуре Т-хелперных эпитопов мышей и на их основе предложили простой метод предсказания структуры пептидов, способных стимулировать без конъюгации с белковым носителем образование антител у мышей *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У мышей известны два типа молекул МНС II, ответственных за связывание с Т-хелперными эпитопами, – это молекулы Н-2А и Н-2Е различных гаплотипов. При анализе структуры Т-хел-

Сокращения: DIPC – N,N'-диизопропилкарбодимид; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DMS – диметилсульфид; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; HOBT – 1-гидроксисбензотриазол; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-57-77; эл. почта: volpina@ibch.ru).

перных эпитопов, связывающихся с молекулами H-2A, не было выявлено закономерностей в их аминокислотных последовательностях [6]. В то же время в структурах T-эпитопов для молекул H-2E-типа наблюдаются выраженные закономерности. Авторы работ [5, 6] отмечают, что за связывание с молекулой H-2E отвечает T-эпитоп длиной в 9 а.о. В первом положении такого участка связывания с МНС II гаплотипа H-2E^k наиболее часто расположены остатки Ile, Leu, Val, а при связывании с МНС II H-2E^d- или H-2E^b-гаплотипа характерны ароматические остатки Phe, Tyr, Trp. В девятом положении участка связывания для всех трех гаплотипов наиболее часто встречаются положительно заряженные остатки Arg и Lys. Авторы отмечают, что кроме аминокислотных остатков в 1-м и 9-м положениях за связывание с молекулой МНС II гаплотипов H-2E^k, H-2E^d, H-2E^b ответственны также остатки аминокислот в 4-м и 6-м положениях нонафрагмента, но закономерности в их структуре менее выражены [6]. Кроме того, на основании данных рентгеноструктурного анализа было установлено, что аминокислотные остатки во 2-м, 3-м, 5-м, 7-м и 8-м положениях ответственны за взаимодействие с T-клеточным рецептором [5]. Необходимо отметить, что все полученные данные основаны на изучении активности в тестах *in vitro*. На основании выявленных закономерностей была предложена программа предсказания T-хелперных эпитопов мышей в последовательности белков [10]. Вероятность нахождения T-хелперного эпитопа в данном фрагменте рассчитывалась как сумма коэффициентов аминокислотных остатков, пропорциональных частоте их встречаемости в каждом положении участков, связывающихся с молекулой МНС II. К сожалению, метод доступен только в программном варианте и индивидуальные коэффициенты аминокислот авторами не раскрыты.

Описанные в литературе данные о структуре T-хелперных эпитопов, основанные на результатах опытов *in vitro*, мы обобщили и применили для предсказания аминокислотной последовательности пептидов, способных *in vivo* индуцировать образование антител у мышей. Мы предположили, что для образования антител у мышей, независимо от их гаплотипа, пептид должен содержать ключевые аминокислотные остатки в первом и девятом положениях (условие 1 ∨ 9). В первом положении должен содержаться гидрофобный аминокислотный остаток Leu, Val, Ile, Trp, Phe или Tyr, а в девятом – остатки Arg или Lys. В соответствии с этой гипотезой, пептиды, содержащие в своей последовательности девятичленный фрагмент, у которого в 1-м положении находится гидрофобный аминокислотный остаток, а в 9-м – положительно заряженный остаток, с высокой степенью вероятности будут стимули-

ровать у мышей различных линий образование антител. Мы предположили, что остатки в 4-м и 6-м положениях, ответственные за связывание с молекулой H-2E, и остатки во 2-м, 3-м, 5-м, 7-м и 8-м положениях, ответственные за связывание с T-клеточным рецептором, определяют более тонкую специфичность взаимодействия и менее важны, чем остатки в 1-м и 9-м положениях.

Для подтверждения этой гипотезы был проведен анализ опубликованной базы данных о структуре участков, связывающихся с МНС, и их способности активировать T-хелперные клетки [11]. Из опубликованных 696 пептидных последовательностей, связывающихся с молекулами МНС II гаплотипов H-2E^k, H-2E^d, H-2E^b, проведен анализ 293 пептидов с изученной активностью, содержащих удовлетворяющий условию 1 ∨ 9 участок. Анализ базы данных показывает, что из 293 пептидов 197 (67%) одновременно обладают удовлетворительным или высоким сродством к молекулам МНС II и способностью активировать T-хелперные клетки.

На следующем этапе исследований была изучена корреляция между ранее полученными в нашей лаборатории данными о способности синтетических пептидов стимулировать образование антител у мышей различных линий [12–14] и наличием или отсутствием в последовательности пептидов фрагмента, удовлетворяющего условию 1 ∨ 9. В табл. 1 приведены аминокислотные последовательности синтетических фрагментов белка PorA внешней мембраны менингококка (*Neisseria meningitidis* серогруппы B), белка VP₁ вируса ящура (штамм A₂₂), белка E вируса клещевого энцефалита (штамм Sofjin), в которых подчеркнуты последовательности, удовлетворяющие условию 1 ∨ 9, и титры антител, индуцируемые этими фрагментами у мышей линий BALB/c (H-2^d-гаплотип), C57/BL (H-2^b-гаплотип) и SWA/J (H-2^k-гаплотип).

Как видно из результатов, приведенных в табл. 1, из 35 ранее изученных пептидных фрагментов только девять пептидов (№ 3, 5, 10–13, 19, 20, 27) удовлетворяли условию 1 ∨ 9. Из этих девяти пептидов семь проявили иммуногенные свойства на двух или трех линиях мышей, один пептид был иммуногенен только на одной линии и еще один пептид не проявил иммуногенной активности. Оставшиеся 26 пептидных фрагментов не соответствовали условию 1 ∨ 9. Из них 20 не стимулировали выработку противопептидных антител ни на одной линии мышей, два пептида были иммуногенны на одной линии, а четыре вызывали иммунный ответ у мышей двух или трех линий.

Таким образом, анализ ранее полученных данных показывает высокую вероятность способности пептидов, удовлетворяющих условию 1 ∨ 9,

Таблица 1. Способность синтетических пептидных фрагментов белков PоgA менингококка, VP₁ вируса ящура, E вируса клещевого энцефалита индуцировать выработку противопептидных антител [12–14]

№	Белок	Фрагмент	Аминокислотная последовательность*	Титр противопептидных антител (-lg)		
				BALB/c	C57/BL	CBA/J
1	РогА менингококка	(12–31)	VEGRNYQLQLTEAQAANGGA	<1.0	<1.0	<1.0
2	»	(22–41)	TEAQAANGGASGQVKVTKVT	<1.0	<1.0	4.1
3	»	(32–51)	SGQVKVTK VTKAKSRIRTKI	4.1	1.3	4.1
4	»	(77–96)	EQDVSVAGGGATQWGNRESF	<1.0	<1.0	<1.0
5	»	(118–143)	ASQAIDPWDSNND VASQLGIFKRDD	3.5	3.1	3.2
6	»	(166–187)	PIQNSKSAYTPAYYTKDTNNNL	3.2	4.1	<1.0
7	»	(178–187)	YYTKDTNNNL	<1.0	<1.0	<1.0
8	»	(178–199)	YYTKDTNNNLTLVPAVVGKPGS	<1.0	<1.0	<1.0
9	»	(223–242)	RHANVGRNAFELFLIGSGSD	<1.0	<1.0	2.2
10	»	(233–252)	ELFLIGSGSD QAK GTDPLKN	3.8	2.8	<1.0
11	»	(273–292)	AQLDLENGDKTKN STTEIA	<1.0	<1.0	<1.0
12	»	(306–321)	ISYAHG FDLIERGKKG	3.8	2.8	3.8
13	»	(311–328)	GFDFIERGKKG ENTSVDQ	4.5	2.5	3.8
14	»	(346–363)	SGAWLKRNTGIGNYTQIN	3.5	<1.0	3.2
15	VP ₁ вируса ящура	(10–24)	PVTTTVENYGGGETQV	<1.0	<1.0	<1.0
16	»	(39–61)	FVKIQNLNPIHVIDLMQTHQHGL	5.5	<1.0	3.1
17	»	(50–69)	VIDLMQTHQHGLVGALLRAA	<1.0	<1.0	<1.0
18	»	(90–98)	PNGAPEAAL	<1.0	<1.0	<1.0
19	»	(135–159)	KYSAGGMGRR GDLEPLAARVAAQLP	3.4	4.8	<1.0
20	»	(170–189)	TT HELLVRMK RAELYCPRP	5.8	5.5	5.8
21	»	(175–189)	LLVRMKRAELYCPRP	2.6	2.8	3.2
22	»	(197–213)	SQDRHKQKIIAPAKQLL	<1.0	<1.0	<1.0
23	E вируса энцефалита	(35–43)	AEGKPSMDV	<1.0	<1.0	<1.0
24	»	(35–51)	AEGKPSMDVWLD ^{SIYQE}	<1.0	<1.0	<1.0
25	»	(50–58)	QENPAKTRE	<1.0	<1.0	<1.0
26	»	(50–61)	QENPAKTREYCL	<1.0	<1.0	<1.0
27	»	(64–80)	KLSDTKVAAR CPTMGPA	<1.0	2.8	<1.0
28	»	(93–105)	KRDQSDRGWGNHA	<1.0	<1.0	<1.0
29	»	(98–113)	DRGWGNHCGLFGK ^{SGI}	<1.0	<1.0	<1.0
30	»	(105–113)	CGLFGK ^{SGI}	<1.0	<1.0	<1.0
31	»	(118–129)	KASCEAKKKATG	<1.0	<1.0	<1.0
32	»	(130–143)	HVYDANKIVYTVKV	<1.0	<1.0	<1.0
33	»	(144–151)	EPHTGDYV	<1.0	<1.0	<1.0
34	»	(362–372)	NPTIENGGGP	<1.0	<1.0	<1.0
35	»	(394–403)	QKGSSIGRVF	<1.0	<1.0	<1.0

* Выделены жирным шрифтом и подчеркнуты участки, отвечающие условию 1 ∨ 9.

стимулировать при иммунизации мышей образование антител.

На следующем этапе исследований предложенный подход был применен для выбора в по-

следовательности белков потенциально иммуно-активных фрагментов, то есть способных стимулировать выработку противопептидных антител без конъюгации с белком-носителем. На основании выполнения требования 1 ∨ 9 были выбраны

Таблица 2. Способность синтетических пептидных фрагментов белков ОраВ и NspA менингококка, Е вируса клещевого энцефалита, содержащих расчетные Т-хелперные эпитопы, индуцировать выработку противопептидных антител [15–17]

№	Белок	Фрагмент	Аминокислотная последовательность*	Титр противопептидных антител (–lg)			Балл**	
				BALB/c	C57/BL	CBA/J	H-2E ^k	H-2A ^k
1	ОраВ	(30–51)	ATGANNST VSDYFRNIR THSI	3.2	4.1	<1.0	18	12
2	»	(41–63)	DYFRNY RTHSIHPR VSVGYDPGD	4.2	3.8	4.8	14	14
3	»	(55–73)	V SVGYDPGDWRIA ADYASY	4.2	1.0	3.5	6	18
4	»	(64–83)	W RIAADYASYRK WNDNKYSV	2.5	3.8	4.8	12	10
5	»	(109–130)	TFHAVSSLGLSAI YDFKLN DKF	4.8	4.8	4.5	16	10
6	»	(120–139)	A IYDFKLN DKFKFKPYIGV	3.1	2.2	1.9	18	16
7	»	(131–150)	DKFDKFKPYIG V RVAYGHV K HQV	4.1	4.1	4.2	22	14
8	NspA	(6–21)	FYVQADA AHAK ASSL	<1.0	3.5	3.2	4	8
9	»	(40–62)	L RFAVDYTRYK NYKAP STDFKLY	4.8	2.5	4.1	10	14
10	»	(79–95)	KPYL G ARLSLNRASVDL	<1.0	2.0	2.2	18	14
11	»	(128–144)	YRY NYIGK VNTVKNVRS	3.2	2.5	3.5	18	8
12	Е вируса	(48–74)	IYQENPAKTREYCLHAKLS DTKVAARC	4.8	3.9	<1.0	18	14
13	»	(90–113)	TVCKRDQSDR GWGNHCGLFGK G SI	<1.0	<1.0	4.2	10	12
14	»	(204–224)	KTSEHL P TAWQVHRDWFNDLA	4.5	4.2	<1.0	22	10
15	»	(377–403)	LPPGDNIYVGELSHQ WFQK SSIGRVF	3.5	5.6	5.6	20	16
16	»	(392–409)	WFQK SSIGRVFQTRKG	<1.0	<1.0	<1.0	10	8

* Выделены жирным шрифтом и подчеркнуты участки, отвечающие условию 1 ∨ 9.

** Рассчитан по программе [10], отражает вероятность проявления пептидами Т-хелперной активности.

пептидные фрагменты в последовательности белков ОраВ [15] и NspA [16] из менингококка (*N. meningitidis* серогруппы В), белка Е вируса клещевого энцефалита (штамм Sofjin) [17], осуществлен синтез пептидов с соответствующей последовательностью и изучена иммуногенная активность на мышах линий BALB/c, C57/BL и CBA/J гаплотипов H-2^b, H-2^d, H-2^k соответственно. Как видно из результатов, приведенных в табл. 2, все 16 синтетических пептидов содержали один или несколько участков, соответствующих условию 1 ∨ 9. Из них 14 пептидов (№ 1–12, 14, 15) вызывали выработку противопептидных антител у двух или трех линий мышей, один пептид (№ 13) был иммуногенен только на одной линии мышей и один пептид (№ 16) не проявил иммуногенных свойств.

Таким образом, в табл. 1 и 2 приведены результаты изучения иммуногенной активности 25 пептидов, удовлетворяющих требованию 1 ∨ 9. Из них 23 пептида (92%) стимулировали образование антител хотя бы у одной линии мышей, а 21 пептид (84%) был способен индуцировать образование антител у мышей двух или трех линий. И лишь два пептида (8%) из 25 не были активны.

Для приведенных в табл. 2 пептидов был проведен расчет вероятности проявления ими Т-хел-

перной активности с использованием описанной в литературе программы [10]. В табл. 2 в столбце “балл” приведена расчетная величина, отражающая вероятность проявления пептидом Т-хелперной активности у животных, несущих молекулы H-2E^k и H-2A^k. Сопоставление рассчитанных баллов с экспериментально полученными титрами антител у мышей CBA/J (H-2^k-гаплотип) показывают их невысокую корреляцию. Из 12 пептидов, индуцирующих образование антител у CBA/J мышей (№ 2–11, 13, 15), только пять (№ 3, 6, 7, 14, 15) имели высокие расчетные баллы для молекул H-2E^k (≥20) и/или H-2A^k (≥16).

К сожалению, расчет вероятности содержания Т-хелперных эпитопов в пептидах для проявления активности у животных с гаплотипами H-2^b и H-2^d в программе [10] пока недоступен, поэтому оценка эффективности данного подхода для мышей BALB/c (H-2^d-гаплотип) и C57/BL (H-2^b-гаплотип) невозможна.

Следующий этап проверки предложенной гипотезы заключался в конструировании пептидов, способных стимулировать образование антител, на основе неиммуногенных пептидных последовательностей. В табл. 1 были приведены данные изучения иммуногенной активности фрагмента 197–213 белка VP₁ вируса ящура штамма A₂₂

Таблица 3. Способность аналогов пептидных фрагментов белка VP₁ вируса ящура и белка PorA менингококка индуцировать выработку противопептидных антител

Фрагмент	Аминокислотная последовательность*	Титры противопептидных антител (-lg)		
		BALB/c	C57/BL	CBA/J
VP ₁ -(197–213)	SQDRHKQKIIAPAKQLL	<1.0	<1.0	<1.0
VP ₁ -[des-E ¹⁹⁴ , V ¹⁹⁵ , S ¹⁹⁶]- (192–213)	<u>AVSVSQDRHKQKIIAPAKQLL</u>	3.1	<1.0	<1.0
VP ₁ -[des-P ¹⁸⁹ , des-E ¹⁹⁴ , V ¹⁹⁵ , S ¹⁹⁶]- (188–213)	<u>RLLAVSVSQDRHKQKIIAPAKQLL</u> ^{2*}	3.5	<1.0	3.8
		2.9 ^{3*}	<1.0 ^{3*}	2.8 ^{3*}
PorA-(223–242)	RHANVGRNAFELFLIGSGSD	<1.0	<1.0	<1.0
PorA-(219–242)	<u>FKYARHANVGRNAFELFLIGSGSD</u>	4.1	4.1	4.1
		3.8 ^{4*}	3.8 ^{4*}	3.2 ^{4*}
PorA-(118–143)	ASQAIDPWDSNND <u>VASQLGIFKRHDD</u>	3.5	3.1	3.2
PorA-(130–143)	<u>DVASQLGIFKRHDD</u>	3.1	1.6	<1.0
PorA-(273–293)	<u>AQLDLENGDKTKNSTTEAIA</u>	<1.0	<1.0	<1.0
PorA-(276–293)	<u>DLENGDKTKNSTTEAIA</u>	3.8	<1.0	3.2
PorA-[A ²⁷⁷]- (276–293)	DASENGDKTKNSTTEAIA	<1.0	<1.0	2.3

* Выделены жирным шрифтом и подчеркнуты участки, отвечающие условию 1 ∨ 9.

^{2*} Природный фрагмент 188–213 имеет аминокислотную последовательность RPLLAVEVSSQDRHKQKIIAPAKQLL.

^{3*} В качестве антигена на плату наносили исходный пептид 197–213.

^{4*} В качестве антигена на плату наносили исходный пептид 223–242.

(пептид № 22). Данный фрагмент не способен вызывать выработку противопептидных антител в свободном состоянии ни на одной линии мышей. Ранее было показано, что этот фрагмент содержит минорный В-эпитоп вируса ящура [18], на который вырабатываются вируснейтрализующие антитела только в случае конъюгации пептида с гемоцианином улитки [19]. В связи с этим представляло интерес стимулировать образование антител на участок 197–213 без конъюгации пептида с белком-носителем. Однако ближайший к этому участку фрагмент, удовлетворяющий условию 1 ∨ 9, содержится в далеко отстоящей последовательности 172–181 белка. Поэтому в аминокислотную последовательность фрагмента ¹⁸⁸RPLLAVEVSSQDRHKQKIIAPAKQLL²¹³ были введены изменения, приводящие к формированию участка 1 ∨ 9. За счет пропуска остатка E¹⁹⁴ и замены остатка V¹⁹⁵ на S, а S¹⁹⁶ на V в последовательности фрагмента 188–213 было образовано три участка, удовлетворяющих условию 1 ∨ 9. Кроме того, во вновь сформированной последовательности был пропущен остаток P¹⁸⁹ для избежания стерических затруднений во взаимодействии остатка L¹⁹⁰ с молекулой МНС II. В соответствии с вышеописанными заменами было синтезировано два аналога этого фрагмента белка. Аналог фрагмента 192–213 [des-E¹⁹⁴, V¹⁹⁵, S¹⁹⁶] содержал в последовательности два участка 1 ∨ 9, а аналог фрагмента 188–213 [des-P¹⁸⁹, des-E¹⁹⁴, V¹⁹⁵, S¹⁹⁶] содержал три участка 1 ∨ 9.

В табл. 3 приведены аминокислотные последовательности синтетических аналогов и результаты изучения их способности стимулировать образование антител у мышей различных линий. Появление двух участков 1 ∨ 9 в последовательности VP₁-(192–213)-аналога приводит к стимуляции антител у мышей линии BALB/c, а наличие трех участков 1 ∨ 9 в последовательности VP₁-(188–213)-аналога приводит к образованию антител уже у мышей двух линий – BALB/c и CBA/J. Интересно, что стимулируемые неприродной последовательностью VP₁-(188-213)-аналога антитела способны связываться с природной последовательностью 197–213. Кроме того, было показано, что стимулируемые на мышях Balb/c VP₁-(188–213)-аналогом антитела способны нейтрализовать вирус ящура и имеют титр вируснейтрализующих антител, выраженный в –log₂ разведения сыворотки, равный 4.5. Корректность проведенного эксперимента, так же как и в случае остальных примеров, приведенных в табл. 3, была подтверждена контрольными иммунизациями неактивным прототипом пептида (в данном случае фрагмента 197–213).

Аналогичный подход был применен для получения антител на неактивный фрагмент 223–242 белка PorA менингококка (см. табл. 1, № 9). В отличие от последовательности 188–213 белка VP₁ вируса ящура, природная последовательность 221–229 белка PorA менингококка удовлетворяет

условию 1 ∨ 9, поэтому для получения антител на фрагмент 223–242 был синтезирован участок 219–242 белка PоgA, содержащий участок 1 ∨ 9. Как видно из результатов, приведенных в табл. 3, синтетический пептид последовательности 219–242 способен индуцировать образование противопептидных антител на мышцах всех трех линий. Полученные противопептидные антитела были направлены как к исходному пептиду последовательности 219–242, так и к неиммуногенному фрагменту 223–242.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что введение в последовательность неиммуногенного пептидного фрагмента участка, удовлетворяющего условию 1 ∨ 9, вызывает развитие иммунного ответа на первоначально неактивный пептид. Два вышеприведенных примера стимуляции образования антител на фрагменты белков вируса ящура и менингококка удлиненными пептидными последовательностями с введенными в них фрагментами 1 ∨ 9 оставляют возможность того, что индукция такими пептидами антител является следствием увеличения молекулярной массы иммуногена. Для подтверждения гипотезы участия фрагментов, удовлетворяющих условию 1 ∨ 9, в индукции образования антител был проведен эксперимент по изучению активности укороченного фрагмента последовательности 118–143 белка PоgA менингококка (PоgA-(130-143)-фрагмент, табл. 3). Пептид 118–143 содержит участок 1 ∨ 9 в последовательности 131–139 и способен индуцировать образование антител у мышей трех линий (см. табл. 1, № 5). Был синтезирован укороченный фрагмент белка PоgA последовательности 130–143, также содержащий участок 1 ∨ 9, но имеющий почти в два раза меньшую молекулярную массу. Укороченный фрагмент, содержащий участок 1 ∨ 9, был способен вызывать образование антител у мышей линий BALB/c и C57/BL и лишь на мышцах линии CBA/J пептид был неактивен. Таким образом, была продемонстрирована ключевая роль участка, удовлетворяющего условию 1 ∨ 9, в индукции образования противопептидных антител.

Фрагмент 273–292 белка PоgA менингококка, несмотря на наличие в последовательности двух участков 1 ∨ 9, не проявлял иммуногенной активности ни на одной линии мышей (см. табл. 1, № 11). Для выяснения причин отсутствия активности у этого пептида были синтезированы два укороченных пептида – фрагмент 276–292, содержащий один участок 1 ∨ 9, и аналог фрагмента 276–292 с заменой L²⁷⁷ на А, не содержащий участка 1 ∨ 9. Укороченный пептид 276–292, содержащий один участок 1 ∨ 9, в отличие от более длинного пептида 273–292, проявлял способность индуцировать образование антител у мышей линий BALB/c и CBA/J (табл. 3). Повышение Т-клеточной активности при уменьшении длины пеп-

тида неоднократно было описано в литературе [20–22] и в данном случае может объясняться двумя причинами. Во-первых, устранением второго, перекрывающегося с первым Т-эпитопа, поскольку два эпитопа в случае более длинного пептида 273–292 могут конкурировать между собой и в результате не стимулируют образование антител. Во-вторых, как в описанном случае с фрагментом лизоцима [20], выступающие за пределы МНС-связываемой области аминокислотные остатки могут затруднять образование тройного комплекса МНС–Т-эпитоп–Т-клеточный рецептор. L²⁷⁷А-аналог фрагмента 276–292 не содержал участка 1 ∨ 9, при этом в опытах на мышцах BALB/c активность пептида пропадала, а для мышей CBA/J титр падал с 3.2 у пептида 276–292 до 2.3 у L²⁷⁷А-аналога. Проведенные эксперименты подтверждают важность присутствия участка, удовлетворяющего условию 1 ∨ 9, в аминокислотной последовательности пептида, индуцирующего образование антител, и в то же время демонстрируют сложность процесса развития иммунного ответа *in vivo* при наличии в последовательности иммуногена перекрывающихся участков 1 ∨ 9.

Таким образом, в результате проделанной работы предложен простой подход к выбору пептидов, способных стимулировать образование антител у мышей различных линий. Необходимо отметить, что предложенный подход позволяет выбирать пептиды, индуцирующие образование антител у мышей, несущих разные гаплотипы, что с высокой вероятностью означает проявление этими пептидами иммуногенной активности на нелинейных животных других видов, таких, как кролики и морские свинки.

Очевидно, что наличие в последовательности пептида участка 1 ∨ 9 не является единственным условием проявления им иммуногенной активности, так как у мышей развитие иммунного ответа обеспечивают молекулы МНС II двух типов, а именно Н-2Е и Н-2А. Предложенный алгоритм описывает закономерности только для молекул МНС II типа Н-2Е, поэтому пептиды, не удовлетворяющие условию 1 ∨ 9, могут проявлять иммуногенные свойства за счет их взаимодействия с молекулой МНС II типа Н-2А. Кроме того, в литературе описано, что аминокислотные остатки, выступающие за пределы связываемого МНС участка, могут влиять на взаимодействие пептида с молекулой МНС. При отсутствии специфических пептидаз выступающие аминокислотные остатки не отщепляются и могут стерически затруднять взаимодействие МНС–пептид, что приводит к исчезновению активности [20]. Важную роль в стимуляции выработки антител играют не только первый и девятый аминокислотные остатки, но и другие остатки, находящиеся внутри рамки 1 ∨ 9. Кроме того, не исключено взаимное влияние перекрывающихся фрагментов пептида,

удовлетворяющих условию $1 \vee 9$, которые могут конкурировать между собой за связывание с молекулой МНС II.

Несмотря на то что процесс стимуляции пептидами антител чрезвычайно сложен, не все его этапы хорошо изучены и, очевидно, что он не может быть обусловлен только наличием в пептиде участка $1 \vee 9$, предлагаемый подход позволяет с высокой эффективностью выбирать в последовательности белков потенциальные иммуногенные пептиды. С помощью описанного в настоящей работе подхода можно конструировать компоненты синтетических антибактериальных, противовирусных вакцин и пептиды для получения диагностических антител.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы для пептидного синтеза и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария), *n*-алкоксibenзильный полимер (Merck, ФРГ). Для обессоливания применяли сефадекс G-10 (Pharmacia, Швеция). Для ВЭЖХ использовали хроматограф System Gold (Beckman, США), колонки Phenomenex Jupiter 5 μ C18 300A (4.6 \times 250 мм) для аналитической хроматографии и Phenomenex Jupiter 10 μ C18 300A (10 \times 250 мм) для препаративной хроматографии. Гидролиз пептидов проводили смесью 6 н. HCl-TFA (2 : 1) в течение 45 мин при 170°C. Растворители очищали согласно известным методикам [23]. Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания). Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (ФРГ).

В иммунохимических исследованиях применяли полный и неполный адъюванты Фрейнда, антитела козы против иммуноглобулинов мышей, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), 96-луночные платы из полистирола (Nunc Maxisorb, Дания). Для иммунизации использовали самок мышей линий BALB/c, C57/BL, CBA/J весом 18–20 г (Опытно-племенной питомник лабораторных животных при НИИ биомоделей РАМН).

Твердофазный синтез пептидов: фрагментов VP₁-[des-E¹⁹⁴, V¹⁹⁵, S¹⁹⁶]- (192–213) и VP₁-[des-P¹⁸⁹, des-E¹⁹⁴, V¹⁹⁵, S¹⁹⁶]- (188–213), фрагментов PorA- (219–242), PorA- (130–143), PorA- (276–293), PorA-[A²⁷⁷]- (276–293).

Твердофазный синтез пептидов проводили на *n*-алкоксibenзильном полимере с содержанием гидроксильных групп 0.37 ммоль/г. Для защиты боковых функций Thr, Tyr, Ser использовали Bu^t-группу, для Asp, Glu – OBu^t-группу, для Lys – Boc, для Arg – Pbf, для His – Trt-группы. В качестве временной N^α-защитной группы служила Fmoc-группа.

Полимер промывали DMF, эфиром и высушивали. 200 мг полимера суспендировали в 10 мл DMF. В 5 мл DMF растворяли 10 экв. стартовой Fmoc-защитенной аминокислоты, 100 мг HOBT (10 экв.), к перемешиваемому раствору добавляли 115 мкл DIPC (10 экв.), раствор перемешивали 10 мин при 0°C. Полученный раствор вместе с 1 мг DMAP (0.1 экв.) добавляли к суспензии полимера и перемешивали в течение 4 ч. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали DMF, CH₂Cl₂ и ацилировали непрореагировавшие гидроксильные группы 5 мл смеси Ac₂O–пиридин–CH₂Cl₂ (20 : 20 : 60) 1 ч, после чего полимер промывали CH₂Cl₂, изопропанолом и снова CH₂Cl₂.

Наращивание полипептидной цепи вели по следующему протоколу для каждого синтетического цикла (при расходе 5–7 мл растворителя на 200 мг исходного полимера): 1) CH₂Cl₂ (2 \times 2 мин); 2) DMF (2 \times 2 мин); 3) 20% пиперидин в DMF (20 мин); 4) DMF (2 \times 2 мин); 5) диоксан-вода, 2 : 1 (2 \times 5 мин); 6) DMF (3 \times 2 мин); 7) CH₂Cl₂ (3 \times 2 мин); 8) DMF (2 \times 2 мин); 9) 3 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (2 ч); 10) DMF (2 \times 2 мин); 11) 3 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (2 ч); 12) DMF (2 \times 2 мин); 13) CH₂Cl₂ (2 \times 2 мин); 14) ацилирование: Ac₂O–пиридин–CH₂Cl₂, 20 : 20 : 60 (30 мин); 15) изопропанол (3 \times 2 мин); 16) CH₂Cl₂ (3 \times 2 мин); 17) DMF (3 \times 2 мин).

Для преактивации аминокислот к раствору 3 экв. Fmoc-защитенной аминокислоты и 3 экв. HOBT в 5 мл DMF приливали 3 экв. DIPC, раствор перемешивали 10 мин при 0°C. Контроль за содержанием непрореагировавших аминокислот проводили с помощью нингидринового и пикринового тестов после операции 13 синтетического протокола [24, 25]. При положительном нингидриновом или, в случае *N*-концевого Pro, пикриновом теста цикл конденсации (операции 10–13) повторяли.

Отщепление пептида от полимера с одновременным деблокированием проводили на 200 мг пептидполимера в 3 мл смеси TFA–этандитиол–DMS–*m*-крезол в объемном соотношении 91 : 3 : 3 : 3 в течение 2 ч, раствор пептида в TFA отфильтровывали от полимера, затем TFA упаривали при пониженном давлении. Пептид осаждали 100 мл этилового эфира, продукт отщепления отфильтровывали и промывали эфиром (5 \times 20 мл). Осадок перемешивали в 5 мл 10% AcOH 20 мин, отфильтровывали и промывали 5 мл 10% AcOH. Полученный раствор пептида лиофилизировали и обессоливали на колонке 2.5 \times 60 см с сефадексом G-10 в 0.1 М AcOH. Пептиды очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA от 10 до 70% за 60 мин; при расходе элюента 3 мл/мин; поглощение элюата регистрировали при длине волны 226 нм.

Таблица 4. Времена удерживания пептидов в условиях аналитической ВЭЖХ, молекулярные массы пептидов и данные МС

Фрагмент белка	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	
		вычисленная	по данным МС
VP ₁ -[des-E ¹⁹⁴ , V ¹⁹⁵ , S ¹⁹⁶]- (192–213)	16.8	2332.12	2332.8
VP ₁ -[des-P ¹⁸⁹ , des-E ¹⁹⁴ , V ¹⁹⁵ , S ¹⁹⁶]- (188–213)	19.5	2714.63	2714.9
PorA-(219–242)	20.4	2670.0	2668.0
PorA-(130–143)	21.1	1600.1	1601.0
PorA-(276–293)	18.2	1780.8	1781.9
PorA-[A ²⁷⁷]- (276–293)	18.5	1882.9	1883.2

Синтезированные пептиды характеризовали данными аналитической ВЭЖХ, аминокислотного анализа и масс-спектрометрии. Аналитическую ВЭЖХ проводили в градиенте ацетонитрила (10 → 70%) в 0.1% TFA за 60 мин при расходе элюента 1 мл/мин, поглощение элюата регистрировали при длине волны 226 нм. Времена удерживания пептидов при аналитической ВЭЖХ и найденные молекулярные массы представлены в табл. 4. Все пептиды имели корректный аминокислотный состав.

Иммунизация. Для иммунизации животных готовили растворы свободных пептидов (2 мг/мл) в 0.01 М Na-фосфатном буфере (рН 7.4), затем смешивали с равным объемом адъюванта. Мышей (по 5 шт. в каждой группе) иммунизировали дважды в основание хвоста в дозе 100 мкг пептида в 100 мкл эмульсии. Первую иммунизацию проводили в полном адъюванте Фрейнда, вторую в неполном адъюванте Фрейнда на 44 день. Кровь отбирали на 55 день после первой иммунизации и определяли титры противопептидных антител.

Титр противопептидных антител. Противопептидные IgG антитела определяли методом непрямого твердофазного ИФА как описано в [26], нанося на плату пептид, который использовали для иммунизации. Исключение составляли специально оговоренные в табл. 3 случаи. Титры противопептидных антител рассчитывали как разведение сыворотки, выраженной в –lg, при котором развивается окрашивание не менее 0.1 ОЕ при длине волны 492 нм, превышающее фоновый уровень в два раза.

Титр вируснейтрализующих антител определяли как описано в работе [27].

Авторы выражают благодарность С.Р. Кременчугской (Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных, г. Владимир) за определение титров вируснейтрализующих антител.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sood A., Venugopalan P., Mysore N., Vyas S.P. // *Indian J. Exp. Biol.* 1998. V. 35. P. 846–861.
2. Babbit B.P., Allen P.M., Matsueda G., Harber E., Unanue E.R. // *Nature.* 1985. V. 312. P. 359.
3. Rosental A.S. // *Immunol. Rev.* 1978. V. 40. P. 136.
4. Stern L.J., Wiley D.C. // *Structure.* 1994. V. 2. P. 245–251.
5. Fremont D.H., Hendrickson W.A., Marrack P., Kappler J. // *Science.* 1996. V. 272. P. 1001–1004.
6. Rammensee H.-G., Friede T., Stevanovic S. // *Immunogenetics.* 1995. V. 41. P. 178–228.
7. Parker K.C., Bednarek M.A., Coligan J.E. // *J. Immunol.* 1994. V. 152. P. 163–175.
8. Meister G.E., Roberts C.G.P., Berzofsky J.A., De Groot A.S. // *Vaccine.* 1995. V. 13. P. 581–591.
9. Roberts C.G.P., Meister G.E., Jesdale B.M., Lieberman J., Berzofsky J.A., De Groot A.S. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1996. V. 12. P. 593–610.
10. Rammensee H.-G., Bachmann J., Emmerich N.P.N. // *Immunogenetics.* 1999. V. 50. P. 213–219. <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>
11. Brusica V., Rudy G., Kune A.P., Harrison L.C. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 368–371.
12. Volpina O.M., Gelfanov V.M., Yarov A.V., Surovoy A.Yu., Chepurkin A.V., Ivanov V.T. // *FEBS Lett.* 1993. V. 333. P. 175–178.
13. Волкова Т.Д., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Рубин С.Г., Семашко И.В., Караванов А.С. // *Биоорган. химия.* 1998. Т. 24. С. 100–111.
14. Короев Д.О., Котельникова О.В., Вольпина О.М., Жмак М.Н., Куприянова М.А., Агафонова С.А., Аллилуев А.П., Литвинов И.С., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // *Биоорган. химия.* 2000. Т. 26. С. 323–329.
15. Короев Д.О., Вольпина О.М., Жмак М.Н., Куприянова М.А., Несмеянов В.А., Аллилуев А.П., Котельникова О.В., Иванов В.Т. // *Биоорган. химия.* 2001. Т. 27. С. 21–26.
16. Короев Д.О., Обозная М.Б., Жмак М.Н., Волкова Т.Д., Титова М.А., Котельникова О.В., Вольпина О.М., Несмеянов В.А., Аллилуев А.П., Иванов В.Т. // *Биоорган. химия.* 2002. Т. 28. С. 291–297.
17. Волкова Т.Д., Вольпина О.М., Жмак М.Н., Иванов В.Т., Ворович М.Ф., Тимофеев А.В. // *Биоорган. химия.* 2001. Т. 27. С. 174–179.

18. *Strohmaier K., Franze R., Adam K.H.* // *J. Gen. Virol.* 1982. V. 59. P. 295–306.
19. Яров А.В., Гельфанов В.М., Гречанинова Л.А., Суrowой А.Ю., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Чепуркин А.В., Луговской А.А., Дрягалин Н.Н., Иванющенко В.Н., Бурдов А.Н. // *Биоорг. химия.* 1989. Т. 15. С. 1193–1205.
20. *Moudgil K.D., Secarz E.E., Grewal I.S.* // *Immunol. Today.* 1998. V. 19. P. 217–220.
21. *Brett S.J., Cease K.B., Berzofsky J.A.* // *J. Exp. Med.* 1988. V. 168. P. 357–373.
22. *Vacchio M.C., Berzofsky J.A., Krzych U. et al.* // *J. Immunol.* 1989. V. 143. P. 2814–2819.
23. *Perrin D.D.* *Purification of Laboratory Chemicals.* N.Y.: Pergamon Press, 1980. P. 1–563.
24. *Sarin V.K., Kent S.B.H., Tam J.P., Merrifield R.B.* // *Anal. Biochem.* 1981. V. 117. P. 147–157.
25. *Gisin V.F.* // *Anal. Chim. Acta.* 1972. V. 58. P. 248–249.
26. Гельфанов В.М., Гречанинова Л.А., Кан Е.С., Яров А.В., Суrowой А.Ю., Вольпина О.М., Чепуркин А.В., Иванов В.Т. // *Биоорг. химия.* 1991. Т. 17. С. 596–605.
27. Спирин В.К., Глоденко Л.А., Кременчугская С.Р. и др. // *Методы диагностики болезни с везикулярным синдромом / Современные аспекты ветеринарной патологии животных.* Владимир, 1988. С. 71–81.

Structure Prediction for Peptides Capable of Inducing Antibody Formation in Mice

O. M. Vol'pina[#], M. A. Titova, M. N. Zhmak, D. O. Koroev,
M. B. Oboznaya, T. D. Volkova, and V. T. Ivanov

[#] Phone: +7 (095) 336-5777; e-mail: volpina@ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia*

A simple method for the sequence prediction of peptides capable of the *in vivo* stimulation of antibody production in mice without conjugation with protein carriers was proposed on the basis of literature data on the structure of T-helper epitopes active *in vivo*. According to this approach, a potentially active peptide should contain a nine-membered sequence with a hydrophobic amino acid residue in the first position and a positively charged residue in the ninth position. The efficiency of this approach was confirmed by the presence of such sequences in the previously described synthetic peptides with immune activities, by the application of this approach to the choice of immunogenic fragments within the sequences of various proteins that exhibited further the specific activity, and by the construction of immunogenic peptides on the basis of inactive natural sequences. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: antibody formation; immunogenic peptides, prediction, synthesis; T-helper epitopes