



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.6.083.3

© 1991 г.

*А. Б. Мошникова, А. Т. Кожич, А. Г. Красько\*,  
Л. Д. Чижин, Н. Д. Баркар\*, В. Т. Иванов*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОТЕКТИВНОГО ЭПИТОПА — ФРАГМЕНТА  
НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА ЛАССА

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;  
\*Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ БССР, Минск*

Вирус Ласса, принадлежащий к семейству ареновирусов, является этиологическим агентом геморрагической лихорадки с высоким уровнем летальности [1]. В настоящее время интенсивно ведется разработка средств, обеспечивающих предотвращение этого заболевания. Ввиду сложностей с получением вакцины традиционного типа большое внимание уделяется созданию генно-инженерных и синтетических вакцин [2—4]. Согласно современным представлениям, синтетическая вакцина должна содержать В- и Т-эпитопы, обеспечивающие гуморальный и клеточный ответ соответственно. В ходе исследований, направленных на создание синтетической вакцины против лихорадки Ласса, нами был предпринят поиск Т-эпитопов структурных вирусных белков.

Используя пакет программ «Сектор Т», созданный в нашей лаборатории для предсказания Т-эпитопов [5], мы провели анализ аминокислотных последовательностей структурных белков вируса и выбрали в качестве возможных Т-эпитопов следующие фрагменты нуклеопротеина (NP) и гликопротеина (GP): NP-69—86, NP-138—167, NP-277—303, NP-445—456, GP-3—21, GP-60—72, GP-311—327.

Пептиды были синтезированы твердофазным методом на синтезаторе «Векман 990» (США). Кроме названных пептидов были получены более мелкие фрагменты этих пептидов: NP-147—167, NP-159—167, NP-287—303. В качестве носителя использовали аминотиметилированный сополимер стирола и 1% дивинилбензола с *n*-гидрокси-метилфенилацетамидометильной (ПАМ) якорной группировкой. Синтез осуществляли методом последовательного наращивания пептидной цепи [6]. В качестве временной защиты  $\alpha$ -аминогрупп использовали Вос-группу. Снятие пептидов со смолы и деблокирование боковых групп осуществляли действием HF в присутствии *n*-крезола и *n*-тиокрезола. Пептиды очищали гель-фильтрацией и препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ. Полученные пептиды охарактеризованы аналитической ВЭЖХ, аминокислотным и масс-спектрометрическим анализами.

Полученные пептиды, в дополнение к исследованию их Т-клеточной активности *in vitro*, результаты которого будут опубликованы позднее, были проверены на протективную активность в опытах *in vivo*. Проводили иммунизацию мышей линии СВА дважды по 50 мкг на мышью внутрибрюшинно с интервалом в 7 сут. Через 10 сут после второй иммунизации мышью заражали интрацеребрально летальной дозой вируса Ласса (1000 бляшкообразующих единиц на мышью). Наблюдали 21 сут (три инкубационных периода). Иммунизация пептидами NP-277—303 и NP-287—303 защищает животных от летальной дозы вируса с 60 и 75% степенью защиты соответственно по сравнению с контрольной группой животных (табл. 1).

Нами предпринята попытка более точной локализации протективного эпитопа. Были синтезированы укороченные фрагменты участка нуклеопротеина 287—303: NP-287—296, NP-289—300 и NP-291—300.

Таблица 1

## Протективные свойства фрагментов структурных белков вируса Ласса \*

Вирусный белок	Аминокислотная последовательность	Защита, %	Вирусный белок	Аминокислотная последовательность	Защита, %
NP	69-86	30	NP	277-303	75
NP	159-167	0	NP	445-456	0
NP	147-167	0	GP1	3-21	0
NP	138-167	0	GP1	60-72	0
NP	287-303	60	GP2	311-327	0

\* Иммунизовали группы животных по 5-6 особей весом 16-20 г. Контрольная группа - 8 животных; учитывалась летальность.

Таблица 2

## Протективные свойства синтетических фрагментов из области нуклеопротеина 277-303

Пептид	Аминокислотная последовательность	Защита, %
277-303	GILKSILKVKKSLGMFVSDTPGERNPY	75
287-303	KSLGMFVSDTPGERNPY	60
287-296	KSLGMFVSDT	62
289-300	LGMFVSDTPGER	52
291-300	MFVSDTPGER	73

Все эти пептиды демонстрировали достаточно высокий процент защиты экспериментальных животных от вируса Ласса (табл. 2). Проведенная на 21-е сут наблюдения проверка сыворотки на антитела к вирусу Ласса показала их отсутствие, что предполагает клеточный механизм защиты.

Таким образом, в настоящей работе был найден участок нуклеопротеина вируса Ласса, обладающий протективными свойствами. В настоящее время ведется работа по выяснению минимальной структуры из этого участка, обладающей протективной активностью, а также по повышению защитного действия синтетических конструкций на их основе.

Авторы выражают свою признательность А. Э. Габриэляну за помощь в проведении расчетов вероятных Т-эпитопов в аминокислотной последовательности нуклеопротеина вируса Ласса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McCormick J. B. // *Curr. Topics Microbiol. and Immunol.* 1987. V. 134. P. 69-78.
2. Auferin D., Esposito J. J., Lange J. V., Bauer S. P., Knight J., Sasso D. R., McCormick J. B. // *Virus Res.* 1988. V. 9. № 2/3. P. 223-248.
3. Fisher-Hoch S. P., McCormick J. B., Auferin D., Brown B. G., Castor M., Perez G., Ruo S., Conaty A., Brammer L., Bauer S. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 1. P. 317-321.
4. Мошнікова А. Б., Чикин Л. Д., Кожич А. Т., Краско А. Г. // Всесоюзный симпозиум по химии пептидов. Рига, 1990. С. 37.
5. Kozhich A. T., Gabrielian A. E., Ivanov V. S., Tchikin L. D., Kulik L. N., Ivanov V. T. // *J. Cell. Biochem.* 1989. Suppl. 13A. P. 272.
6. Barany G., Merrifield R. B. // *The Peptides / Eds Gross E., Meienhofer J.* London, New York: Acad. Press, 1980. P. 3-254.

Поступило в редакцию 22.XI.1990

A. B. MOSHNIKOVA, A. T. KOZHICH, A. G. KRASKO\*, L. D. TCHIKIN,  
N. D. BARKAR\*, V. T. IVANOV

## IDENTIFICATION OF A SMALL PROTECTIVE EPITOPE IN THE LASSA VIRUS NUCLEOPROTEIN

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

\* Belarusian Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Minsk

Several peptides from Lassa virus glyco- and nucleoproteins were predicted as probable T-cell epitopes. Their synthesis was performed by solid phase method. The study of possible protective effect *in vivo* with Lassa-sensitive CBA mice revealed protective epitope within the 277-303 nucleoprotein region. Further studies reduced the protective epitope structure to the 287-300 nucleoprotein fragment.