



СИНТЕЗ, ИММУНОГЕННЫЕ И АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ФРАГМЕНТОВ ГЛИКОПРОТЕИНА Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

© 2001 г. Т. Д. Волкова[#], О. М. Вольпина, М. Н. Жмак,
В. Т. Иванов, М. Ф. Ворович*, А. В. Тимофеев*

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

*Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва

Поступила в редакцию 06.12.2000 г. Принята к печати 16.01.2001 г.

Синтезированы пептидные фрагменты оболочечного белка Е вируса клещевого энцефалита, включающие потенциальные Т-хелперные эпитопы, и изучена их способность в свободном виде, без конъюгации с высокомолекулярным носителем, стимулировать индукцию антител у мышей трех линий. Из шести синтезированных пептидов пять обладали иммуногенными свойствами, различающимися в зависимости от гаплотипа иммунизированных мышей. Изучена активность синтезированных пептидов при связывании с противовирусными антителами и выявлены два пептида, проявившие высокую способность узнавать антитела к вирусу в сыворотках лошади и человека, что делает их перспективными при создании пептидных диагностикумов для вируса клещевого энцефалита.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; синтетические пептиды; иммуногенность, антигенность; Т-хелперные эпитопы; В-эпитопы.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус клещевого энцефалита относится к семейству оболочечных вирусов Flaviviridae. Его вирион представляет собой икосаэдрический нуклеокапсид, окруженный бислойной липидной оболочкой. Показано, что гликопротеин Е – экспонированный на поверхности вириона белок оболочки, играет центральную роль в формировании иммунного ответа и проникновении вируса в клетку [1]. Данная работа – продолжение исследований, направленных на выявление с помощью синтетических пептидов иммуноактивных участков поверхностного белка Е вируса клещевого энцефалита, необходимых для индукции противовирусного иммунитета.

Ранее нами был описан ряд синтетических пептидов, моделирующих фрагменты последовательности белка Е, один из которых (фрагмент

35–51) входит в состав В-эпипотопа гликопротеина, а два других (98–113 и 394–403) вызывают при иммунизации в виде KLH-конъюгатов образование вируснейтрализующих антител [2]. Установлено, что фрагмент 98–113 является участком слияния вируса клещевого энцефалита с эндосомальной мембраной клетки-хозяина [3].

Все описанные ранее пептиды способны стимулировать образование антител у животных только в конъюгированном с KLH виде. Подобные конструкции с высокомолекулярными белками-носителями традиционно используют для индукции антител к синтетическим пептидам, они действительно способны вызывать образование антител и создавать иммунитет против вирусного антигена. Однако при этом генерируется нежелательный ответ против В-эпипотопов чужеродного белка, а Т-клеточная память формируется лишь на Т-хелперные эпитопы белка-носителя. При повторной иммунизации такими белково-пептидными конъюгатами может происходить супрессия иммунного ответа на антиген [4]. Новый и перспективный подход к индукции противовирусного иммунитета заключается в отказе от конъюгирования с белком и использовании для стимуляции образования антител собственных Т-эпипотопов вирусных белков. Поэтому в настоящей работе мы поставили задачу выявления Т-хелперных эпитопов в последовательности белка Е.

Сокращения: Bom – бензилоксиметил; BSA – бычий сывороточный альбумин; cHx – циклогексил; DIPC – N,N'-диизопропилкарбодиимид; DIEA – N-диизопропилэтамин; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DMS – диметилсульфид; Form – формил; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; HOBT – 1-гидроксибензотриазол; KLH – гемоцианин улитки; PAM – фенилацетамидометил; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофuran-5-сульфонил; PBS – 0.1 M NaCl в 0.01 M Na-фосфатном буфере (рН 7.4); TBTU – 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилмочевины тетрафторборат; ГКГ – главный комплекс гистосовместимости.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 336-57-77; e-mail: tdvolkova@mail.ibch.ru).

Нами проведено теоретическое исследование гликопротеина Е методами, позволяющими предсказать потенциальные Т-эпитопы, синтезированы пептиды, соответствующие данным участкам белка, и изучены их иммуногенные и антигенные свойства.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью программы, разработанной на основе сравнения последовательностей известных из литературы участков белков, связывающихся с главным комплексом гистосовместимости (ГКГ), была проанализирована последовательность белка Е вириуса клещевого энцефалита и рассчитаны мотивы связывания с мышьяными антигенами ГКГ II класса локусов I-E^k, I-E^b, I-E^d [5].

Для синтеза были выбраны фрагменты белка Е, содержащие расчетные Т-хелперные эпитопы последовательности 48–58, 60–70, 64–74, 90–100, 209–219, 392–402 и 399–409, а также упомянутые выше функционально значимые участки, установленные в ходе предыдущих исследований. Было синтезировано шесть 17–28-членных пептидов, аминокислотная последовательность которых представлена ниже. Пептид (I) содержит три расчетных эпитопа: 48–58, 60–70 и 64–74. Пептид (II) представляет собой укороченный с N-конца аналог пептида (I), содержащий один эпитоп 64–74. Данный фрагмент был синтезирован нами ранее [2] и показано, что он не иммуногенен в свободном виде на крысах, однако содержит мотив для связывания с мышьяными антигенами ГКГ; поэтому было решено использовать его в данном исследовании. Пептид (III) включает мотив 90–100 и последовательность 98–113 участка слияния вириуса с клеткой. Фрагмент (IV) содержит мотив 209–219 и, кроме того, по данным рентгеноструктурного анализа белка Е, представляет собой α -спиральный участок его последовательности [6], причем данная α -спираль по теоретическим расчетам является амфипатической, что, согласно еще одному методу предсказания Т-хелперных эпитопов [7], повышает вероятность проявления этим пептидом иммуногенной активности. Пептиды (V) и (VI) содержат мотив 392–402, а пептид (VI) также – мотив 399–409. Кроме того, оба фрагмента содержат участок 394–403, антитела к которому, как и антитела к фрагменту 98–113, способны нейтрализовать вирус [2].

Пептиды синтезировали твердофазным методом в ручном варианте путем последовательного наращивания цепи с C-конца. Синтез фрагмента (II) описан в работе [2]. Пептид (IV) получали аналогично на РАМ-полимере с использованием Вос-группы для временной защиты α -аминофункции. Боковые защитные группы были выбраны с расчетом на конечное удаление жидким HF: для Ser и Thr – Bzl-, для Arg – Tos-, для Lys – Z(Cl)-, для

48	74	
IYQENPAKTRYCLHAKLSDTKVAARC	(I)	
64	80	
KLSDTKVAARCPTMGPA	(II)	
90	113	
TVCKRDQSDRGWGNHCGLFGKGSI	(III)	
204	224	
KTSEHLPTAWQVHRDWFNDLA	(IV)	
377	403	
LPPGDNITYVGELSHQWFQKGSSIGRVE	(V)	
392	409	
WFQKGSSIGRVFQTRKG	(VI)	

Trp – Form-, для His – Bom-, для Asp и Glu – сНx-группы.

Для наращивания пептидной цепи использовали стандартный протокол, включающий двукратную реакцию конденсации – сначала методом симметричных ангидридов, затем методом DCC/HOBt. При введении остатков Gln и Asn использовали n-нитрофениловые эфиры. В случаях, когда в роли аминокомпонентов выступали пептидилполимеры с N-концевыми остатками Gln и Glu, реакции проводили методом симметричных ангидридов. Полноту протекания реакции контролировали с помощью никидринового либо пикринового тестов. Как правило, двукратной конденсации было достаточно для присоединения остатка более чем на 99%, однако в некоторых случаях требовались дополнительные повторы. Каждый цикл синтеза заканчивали ацилированием непрореагировавших аминогрупп для уменьшения количества близкородственных примесей в конечном продукте. Отщепление от полимера с одновременным удалением защитных групп проводили жидким HF с использованием двухэтапного метода "low-high".

Пептиды (I), (III), (V) и (VI) получены на n-аллоксибензильном полимере. Защитные группы боковых функций аминокислотных остатков выбраны с расчетом на конечное деблокирование трифтормукусной кислотой. Для защиты боковых функций Thr, Tyr, Ser использовали Bu¹-, для Asp, Glu – OBu¹-, для Lys – Boc-, для Arg – Pbf-, для His и Cys – Trt-группы. В качестве временной N^α-защиты служила Fmoc-группировка.

Для наращивания полипептидной цепи на полимере применяли TBTU-метод. Реакцию конденсации проводили дважды. Как и в случае синтеза на РАМ-полимере, после второй конденсации осуществляли контроль непрореагировавших аминогрупп и при неудовлетворительном результате конденсацию повторяли до полноты протекания реакции более 99%. Каждый цикл синтеза закан-

Таблица 1. Времена удерживания пептидов в условиях аналитической ВЭЖХ, молекулярные массы пептидов и данные масс-спектроскопии

Пептид	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	
		эксперим. (M^+)	теор.
(I)	21.6	3108	3107.6
(III)	22.5	2620	2619.9
(IV)	13.8	2553	2553.2
(V)	21.8	3034	3033.8
(VI)	15.8	2096	2095.6

Таблица 2. Иммуногенные свойства синтетических пептидов на мышах различных линий

Иммуноген	Титр противопептидных антител ($-Ig$) для мышей линий		
	Balb/c	C57/B1	CBA/J
48–74 (I)	4.8	3.9	<1.0
64–80 (II)	<1.0	2.8	<1.0
90–113 (III)	<1.0	<1.0	4.2
204–224 (IV)	4.5	4.2	<1.0
377–403 (V)	3.5	5.6	5.6
392–409 (VI)	<1.0	<1.0	<1.0

Таблица 3. Связывание синтетических пептидов с антителами лошади и человека к вирусу клещевого энцефалита

Пептид	Титр противовирусных антител, $-Ig$	
	лошади	человека
48–74 (I)	2.9	<1.0
64–80 (II)	<1.0	<1.0
90–113 (III)	<1.0	<1.0
204–224 (IV)	2.6	5.6
377–403 (V)	3.5	5.9
392–409 (VI)	<1.0	<1.0

чивали ацилированием оставшихся непрореагировавших аминогрупп с помощью уксусного ангидрида. Отщепление пептидов от полимера с одновременным деблокированием осуществляли смесью трифтормукосной кислоты с добавками, предотвращающими протекание побочных реакций.

После деблокирования все пептиды обессоливали и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выход пептидов составил 35–80% в расчете на первую аминокислоту. Индивидуальность полученных соединений подтверждена данными аминокислотного анализа, масс-спектроскопии и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Времена удержива-

ния пептидов при аналитической ВЭЖХ и найденные молекулярные массы представлены в табл. 1. Все пептиды имели корректный аминокислотный состав.

Способность синтезированных пептидов стимулировать образование антител была изучена в экспериментах на мышах трех линий, различающихся по гаплотипу: Balb/c (d-гаплотип), C57/B1 (b-гаплотип) и CBA/J (k-гаплотип). Мышей дважды иммунизировали свободными пептидами без конъюгации с белком-носителем. Полученные сыворотки исследовали методом ИФА на связывание с пептидами (табл. 2).

Результаты испытаний показали, что из шести синтезированных пептидов пять индуцировали гуморальный ответ хотя бы на одной линии мышей. Лишь пептид 392–409 (VI) не обнаружил способности вызывать образование антител у животных. Титры антител к остальным пептидам различались в зависимости от гаплотипа. Наиболее высокую иммуногенную активность проявил пептид 377–403 (V). Высокий уровень антител к этому пептиду вырабатывался у мышей всех трех линий. Высокую активность проявили также фрагменты 204–224 (IV) и 48–74 (I). Они интенсивно стимулировали образование антител на мышах двух линий (Balb/c и C57/B1). Однако пептид 64–80 (II), перекрывающийся с фрагментом 48–74 (I), оказался очень слабо иммуногенен. Интересно, что и пептид 392–409 (VI), не проявивший никакой способности стимулировать выработку антител, перекрывает довольно большим участком с фрагментом 377–403 (V), обладающим самой высокой иммуногенностью. Причем N-концевая часть фрагмента 377–403, не вошедшая в пептид 392–409, не содержит потенциальных Т-эпитопов.

Для изучения антигенных свойств пептидов (I)–(VI) была проверена их способность связываться с поликлональными антителами к вирусу клещевого энцефалита (табл. 3). В данном исследовании использовали противовирусные сыворотки лошади и человека.

Из данных, приведенных в табл. 3, видно, что фрагмент 48–74 (I) проявил способность связываться с противовирусными антителами лошади, а фрагменты 204–224 (IV) и 377–403 (V) – с противовирусными антителами как лошади, так и человека. Полученные результаты дают основание полагать, что эти пептиды входят в состав В-эпитопов вируса клещевого энцефалита.

Итак, в результате направленного поиска выявлены фрагменты белка Е, способные в свободном виде, без конъюгации с белком-носителем, стимулировать образование антител при иммунизации животных, то есть проявляющие Т-хеллерную активность. Наиболее иммуногенны пептиды 377–403 (V), 204–224 (IV) и 48–74 (I). Эти пеп-

тиды перспективны в качестве носителей при создании конструкций, формирующих полноценный иммунитет к вирусу клещевого энцефалита. Параллельно с этим установлено, что пептиды 204–224 (**IV**) и 377–403 (**V**), способные связываться с противовирусными антителами, входят в состав В-эпитопов вируса клещевого энцефалита. Высокая способность данных участков распознавать антитела к вирусу клещевого энцефалита в сыворотке человека делает возможным применение пептидов 204–224 (**IV**) и 377–403 (**V**) в качестве основы для создания высокочувствительных пептидных диагностикумов заболевания вирусным энцефалитом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реагенты для пептидного синтеза и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария), BocAla-OCH₂-PAM-полимер (0.675 ммоль на 1 г смолы, Applied Biosystems, США), *n*-алкоксибензильный полимер с содержанием гидроксильных групп 0.37 ммоль на 1 г полимера (Merck, ФРГ). Обработку пептидил-полимера жидким фтористым водородом проводили в приборе Toho Kasei (Япония). Для обессоливания пептидов использовали сефадексы G-10 и G-25 (LKB, Швеция); поглощение элюата регистрировали при помощи детектора Uvicord SII (LKB, Швеция) при 226 нм. Для ВЭЖХ использовали приборы фирм Du Pont (США) и Beckman System Gold (США); колонки Ultrasphere ODS (4.6 × 150 мм, размер частиц 5 мкм) для аналитической и Altex Ultrasphere-Octyl (10 × 250 мм, размер частиц 5 мкм) для препаративной хроматографии. Гидролиз пептидов проводили смесью 6 н. HCl-TFA (2 : 1) в течение 45 мин при 170°C или в 6 н. HCl в течение 24 ч при 115°C. Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (ФРГ). Растворители очищали согласно известным методикам [8]. Масс-спектроскопию пептидов выполняли методом MALDI на приборе Vision 2000 (Bioanalysis, Великобритания). В иммунохимических исследованиях применяли полный и неполный адъюванты Фрейнда (Sigma, США), антитела козы против иммуноглобулинов мышьей, лошади и человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), 96-луночные платы из полистирола (Nunc Maxisorp, Дания). Для иммунизации использовали самок мышьей линий Balb/c, C57/B1 и СВА/І весом 14–16 г.

Синтез пептидов. Пептид (**IV**) синтезировали исходя из BocAla-OCH₂-PAM-полимера с использованием следующего протокола для каждого синтетического цикла (из расчета 8–10 мл растворителя на 500 мг исходного полимера), при проведении реакций конденсации (операции 7 и 12) использовали объем реакционной смеси 4–5 мл:

1) CH₂Cl₂ (2 × 1 мин);

2) BIOCORGИЧЕСКАЯ ХИМИЯ том 27 № 3 2001

2) CH₂Cl₂-TFA, 1 : 1 (1 мин);
 3) CH₂Cl₂-TFA, 1 : 1 (30 мин);
 4) CH₂Cl₂ (5 × 1 мин);
 5) DIEA-CH₂Cl₂, 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) CH₂Cl₂ (2 × 1 мин);
 10) DIEA-CH₂Cl₂, 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) CH₂Cl₂ (2 × 1 мин);
 15) изопропанол (3 × 1 мин);
 16) ацилирование смесью CH₂Cl₂-(CH₃CO)₂O-пиридин, 60 : 20 : 20 (1 ч);
 17) CH₂Cl₂ (3 × 1 мин);
 18) изопропанол (3 × 1 мин).

Для получения симметричного ангидрида защищенной аминокислоты к 6 экв. Вос-аминокислоты в 10 мл CH₂Cl₂ приливали раствор 3 экв. DCC в DMF при 0°C. После перемешивания в течение 30 мин выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали, а раствор использовали для реакции конденсации (стадия 7).

Оксибензотриазоловые эфиры получали реакцией 3 экв. Вос-аминокислоты, 3 экв. НОВТ и 3 экв. DCC в смеси CH₂Cl₂-DMF при 0°C в течение 10 мин. Образовавшуюся дициклогексилмочевину отфильтровывали, раствор использовали для реакции конденсации (стадия 12).

Контроль протекания реакций конденсации осуществляли после стадии 14 с помощью нингидринового [9] или, в случае N-концевого остатка Рто, – пикринового [10] тестов.

Деблокирование с одновременным отщеплением от смолы проводили жидким фтористым водородом в два этапа. На первом этапе использовали смесь HF, диметилсульфида и *n*-крезола (25 : 65 : 10), а на втором этапе смесь 90% HF, 5% *n*-крезола и 5% тиокрезола (90 : 5 : 5) [11].

Пептиды (**I**), (**III**), (**V**) и (**VI**) синтезировали на *n*-алкоксибензильном полимере. Полимер промывали DMF, эфиром и высушивали. В 15 мл DMF² сусpendировали 300 мг *n*-алкоксибензильного полимера, добавляли 150 мг НОВТ (10 экв.), 24 мг DMAP (0.2 ммоль) и 10 экв. С-концевой Fmoc-защищенной аминокислоты. К суспензии приливали 172 мкл DIPC (10 экв.) и перемешивали в течение 4 ч при 0°C. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали DMF, CH₂Cl₂ и обрабатывали 5 мл смеси (CH₃CO)₂O-пиридин-CH₂Cl₂ (1 : 1 : 3) в течение 1 ч, после чего полимер

промывали CH_2Cl_2 , изопропанолом и снова CH_2Cl_2 . Наращивание пептидной цепи вели в проточном реакторе по следующему протоколу для каждого синтетического цикла (из расчета 8–10 мл растворителя на 300 мг исходного полимера; при проведении реакций конденсации (операции 9 и 11) использовали объем реакционной смеси 3–4 мл):

- 1) CH_2Cl_2 (2×2 мин);
- 2) DMF (2×2 мин);
- 3) 55% пиперидин в DMF (20 мин);
- 4) DMF (2×2 мин);
- 5) диоксан–вода, 2 : 1 (2×5 мин);
- 6) DMF (3×2 мин);
- 7) CH_2Cl_2 (3×2 мин);
- 8) DMF (2×2 мин);
- 9) первая конденсация: 2 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (1 ч);
- 10) DMF (2×2 мин);
- 11) повторная конденсация: 2 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (1 ч);
- 12) DMF (2×2 мин);
- 13) CH_2Cl_2 (2×2 мин);
- 14) ацилирование: $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ –пиридин– CH_2Cl_2 , 20 : 20 : 60 (30 мин);
- 15) изопропанол (3×2 мин);
- 16) CH_2Cl_2 (3×2 мин);
- 17) DMF (3×2 мин).

Для предактивации аминокислот к раствору 2 экв. N^{α} -Fmoc-производного аминокислоты и 2 экв. TBTU в 3–4 мл DMF добавляли 2 экв. DIEA, раствор перемешивали 10 мин. Контроль за содержанием непрореагировавших аминогрупп проводили также с помощью нингидринового или, в случае *N*-концевого пролина, – пикринового тестов после операции 13 синтетического протокола. При положительном teste цикл конденсации (операции 10–13) повторяли.

Пептиды от полимера отщепляли с одновременным деблокированием, используя аликвоту пептидилполимера 300 мг в 5 мл смеси TFA–этандитиол–DMS–*m*-крезол в объемном соотношении 91 : 3 : 3 : 3 в течение 2 ч. Смесь отфильтровывали от полимера. Раствор упаривали при пониженном давлении. Затем добавляли 100 мл этилового эфира, продукт отщепления отфильтровывали и промывали эфиром (5×20 мл). Осадок растворяли в 10 мл 10% CH_3COOH , полученный раствор пептида лиофилизовали.

Очистку пептидов проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила в 0.05% TFA (от 10 до 70%) за 60 мин при расходе элюента 3 мл/мин, поглощение элюата регистрировали при длине волны 226 нм.

Для аналитической хроматографии использовали градиент ацетонитрила в 0.05% TFA от 10 до

80% за 40 мин. Скорость потока 1 мл/мин, поглощение элюата регистрировали также при длине волны 226 нм.

Для иммунизации животных готовили растворы пептидов в 0.01 M PBS в концентрации 2 мг/мл. Раствор пептида смешивали с равным объемом полного (для первой иммунизации) или неполного (для второй иммунизации) адъюванта Фрейнда до получения эмульсии. Мышей трех линий (по 5 особей в каждой группе) иммунизировали дважды с интервалом в 41 сут. Вводили по 100 мкг пептида (0.1 мл эмульсии) подкожно в основание хвоста. Кровь забирали через 10 сут после реиммунизации тотально. Полученные сыворотки хранили при -20°C .

Твердофазный иммуноферментный анализ (непрямой метод). В лунки плашки вносили по 0.1 мл раствора пептида в 0.05 M Na-карбонатном буфере (pH 9.6) в концентрации 20 мкг/мл и инкубировали 16 ч при 4°C . Раствор пептида сливал, лунки четырежды отмывали PBS, содержащим 0.05% Твина-20 (PBST). Затем в лунки вносили по 0.1 мл образцов сывороток в двойных разведениях, начиная с разведения 1 : 10 или 1 : 100. После инкубации в течение 1 ч при 37°C растворы сывороток сливал, плашки четырежды отмывали PBST и вносили в лунки по 0.1 мл раствора конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антител против иммуноглобулинов мышей в концентрации 1 мг/мл. Плашку инкубировали 1 ч при 37°C , отмывали, как описано выше, и вносили в лунки по 0.1 мл субстрата (0.05% *o*-фенилендиамина, 0.05% перекиси водорода) в 0.05 M Na-цитратном буфере, pH 4.5. Развитие окраски останавливали добавлением 12.5% H_2SO_4 . Оптическое поглощение при длине волны 492 нм измеряли на приборе Multiscan Plus MK11 (Flow Laboratories, Великобритания). За титр противопептидных антител принимали значение соответствующего разведения сыворотки, дающее окрашивание более 0.1 ОЕ (λ 492 нм) и превышающее фоновый уровень в два раза.

Связывание противовирусных сывороток с пептидами исследовали непрямым ИФА. Использовали очищенные поликлональные антитела лошади к вирусу клещевого энцефалита, полученные в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, и человека (FSME-Bulin 16%, IMMUNO AG, Austria). На платы наносили свободные пептиды в концентрации 20 мкг/мл и инкубировали 16 ч при 4°C . Затем платы отмывали PBST, в лунки вносили по 0.1 мл 1% раствора BSA, инкубировали 1 ч при 37°C и снова отмывали PBST. Затем добавляли противовирусные антитела в последовательных разведениях и повторяли все операции как описано выше для непрямого ИФА.

Настоящая работа поддержана грантом РФФИ № 99-04-48717.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heinz F.X., Tuma W., Kunz Ch. // Infect. Immunol. 1981. V. 33. P. 250–257.
2. Волкова Т.Д., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Рубин С.Г., Семашко И.В., Караванов А.С. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 100–111.
3. Волкова Т.Д., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Варгин В.В., Ворович М.Ф., Тимофеев А.В., Семенов Б.Ф., Цехановская Н.А., Прессман Е.Г. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 676–681.
4. Schutze M.-P., Leclerc C., Jovilet M. // J. Immunol. 1985. V. 135. P. 2319–2324.
5. Rammensee H.-G., Friede T., Stevanovic S. // Immunogenetics. 1995. V. 41. P. 178–228.
6. Rey F., Heinz F.X., Mandl Ch., Kunz Ch., Harrison S. // Nature. 1995. V. 375. P. 291–298.
7. DeLisi Ch., Berzofsky J.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 7048–7052.
8. Perrin D.D. // Purification of Laboratory Chemicals. N.Y.: Pergamon Press, 1980. 563 p.
9. Sarin V.K., Kent S.B.H., Tam J.P., Merrifield R.B. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. P. 147–157.
10. Gisin B.F. // Anal. Chim. Acta. 1972. V. 58. P. 248–249.
11. Tam J.P., Heath W.F., Merrifield R.B.J. // Org. Chem. 1972. V. 105. P. 6442–6455.

Synthesis, Immunogenicity, and Antigenicity of the Glycoprotein E Fragments of the Tick-Borne Encephalitis Virus

**T. D. Volkova*, O. M. Vol'pina*, M. N. Zhmak*, V. T. Ivanov*,
M. F. Vorovich**, and A. V. Timofeev****

e-mail: tdvolkova@mail.ibch.ru.

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

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

Six peptide fragments of the envelope protein E of the tick-borne encephalitis virus involving the predicted T-helper epitopes were synthesized. Their ability to induce antibodies without conjugation with any high-molecular-mass carrier was studied in mice of three lines. Five of six synthesized peptides exhibited immunogenic properties, which differed in dependence on the haplotype of immunized mice. The peptide binding to the antiviral antibodies was studied, and two peptides were revealed that demonstrated a high ability to recognize the viral antibodies in the horse and human sera. These peptides are promising for the development of diagnostic agents for the tick-borne encephalitis virus. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: antigenicity, B-epitopes, immunogenicity, synthetic peptides, T-helper epitopes, tick-borne encephalitis virus