



УДК 578.832.1А.083.3 : 578.74

© 1990 г.

В. А. Шибнев, А. Н. Шарейский*,³ Р. В. Валиев**,
И. Х. Халиков**

НЕКОТОРЫЕ ПОДХОДЫ В КОНСТРУИРОВАНИИ
ФУНКЦИОНАЛЬНО-АКТИВНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ НА ПРИМЕРЕ
ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А(Н₃Н₂)

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва;

* Институт общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина АМН СССР,
Москва;

**Таджикский государственный университет им. В. И. Ленина, Душанбе

Сконструирована антигенная детерминанта, представляющая собой гексапептид Lys-Gly-Pro-Asp-Ser-Gly и являющаяся аналогом иммунодоминантного участка эпитопа А гемагглютинина вируса гриппа А(Н₃Н₂) с последовательностью 141—146. В составе конъюгата с тиреоглобулином или гемоцианином гексапептид индуцировал у мышей СВА специфические антитела, взаимодействующие не только с гомологичным антигеном, но также с гемагглютинином и вирусом гриппа А(Н₃Н₂). Обсуждаются принципы, с помощью которых была выбрана аминокислотная последовательность гексапептида.

Известно, что получение живых и убитых вакцин сопряжено с рядом сложных проблем. Но после того, как было показано, что синтетические пептиды способны функционировать в качестве антигенных детерминант вирусных и бактериальных белков, появилась возможность создания синтетических вакцин [1]. Эта идея была реализована на примере вакцин против дифтерийного [2] и холерного [3] токсинов, вируса ящура [4], гепатита В [5], гриппа [6] и др. Однако эти успехи обозначили и те большие трудности, которые возникли на пути создания синтетических вакцин [7]. Одна из них состоит в разработке биологически приемлемых и высокоэффективных носителей для синтетических антигенных детерминант. Другая касается самих детерминант. Они должны быть как можно короче и при этом обладать выраженными иммуногенными свойствами, т. е. быть способными сами по себе или в составе соответствующих носителей индуцировать образование специфических антител в достаточно высоком титре. В противном случае практическая ценность идеи синтетических вакцин делается весьма проблематичной.

Поскольку специфические свойства антигенных детерминант зависят от их структуры [8], то для сохранения в них необходимой конформации приходится синтезировать достаточно длинные полипептидные фрагменты. Однако и в этом случае нет полной гарантии возникновения в них нужной структурной формы. Это было четко показано в очень обстоятельной работе Лернера и сотр. [9], в которой было синтезировано 20 различных полипептидов, сумма которых составляла почти 75% всей длины молекулы гемагглютинина вируса гриппа А. Оказалось, что антисыворотка против конъюгатов достаточно длинных полипептидов взаимодействовала лишь с самими пептидами, но ни с гемагглютинином, ни с вирусом гриппа не взаимодействовала, хотя указанные полипептиды и включали в себя наиболее экспрессированную антигенную детерминанту, именуемую эпитопом А и представляющую собой типичную петлю с последовательностью аминокислотных остатков 137—147. Можно согласиться с автора-

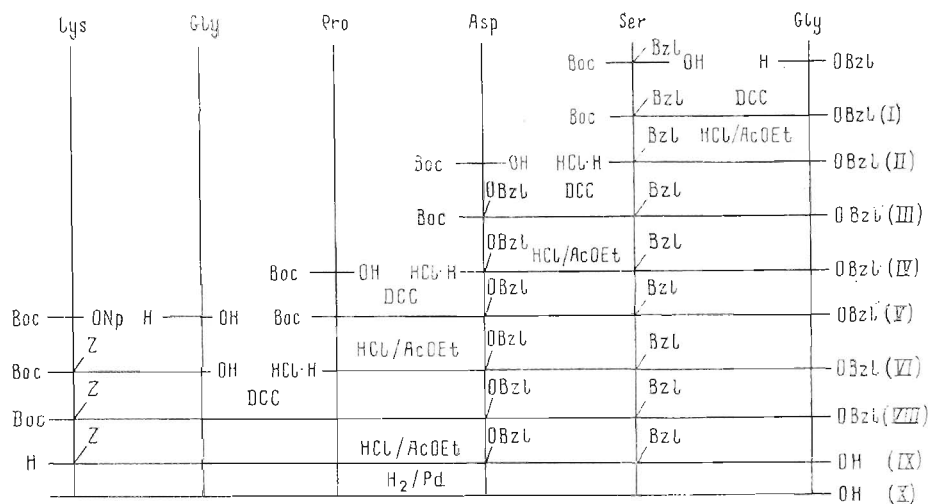
ми данной работы, что отсутствие антителообразования к белку стало следствием того, что пептиды утратили необходимую петлеобразную структуру, характерную для антигенной детерминанты, присутствующей в гемагглютинине. Следовательно, если в синтетическом пептиде, даже очень коротком, воссоздать некую стабильно существующую конформацию типа петли, близкую к той, которая существует в белке, то можно ожидать индукцию антител, специфических не только к пептиду, но и к молекуле белка.

Это предположение было удобно проверить на примере гемагглютинина, используя пептидный фрагмент того же эпитопа А, представляющий собой последовательность $^{-Lys-Arg-Gly-Pro-Asp-Ser-Gly-Phe-}$ [10]. Ясно, что реализация в таком коротком пептидном фрагменте петлеобразной конформации возможна лишь при формировании в определенных условиях некой циклической или даже квазициклической структуры в самом пептиде или же при конъюгации его с соответствующим носителем. Так, в случае использования в качестве носителя белка можно предположить, что боковые группы таких его аминокислот, как лизин, глутаминовая кислота, и др., способны принять участие в образовании конъюгированным пептидом соответствующих петлеобразных структур.

Все это возможно достичь лишь при условии реконструкции первичной структуры эпитопа А. При этом пептидный фрагмент должен обладать достаточной конформационной подвижностью и в то же время иметь особенности, стимулирующие циклообразование. К последним можно отнести наличие остатков пролина и глицина, а также отсутствие сильно заряженных кластеров типа $-Arg-Lys-$, $-Glu-Asp-$ и др. На наш взгляд, важным моментом является использование гексапептидного фрагмента как наиболее подходящего для циклизации. Исходя из этих предпосылок,

мы и остановили свой выбор на гексапептиде $Lys-Gly-Pro-Asp-Ser-Gly$, являющемся аналогом эпитопа А, в котором сохранен предполагаемый рецепторсвязывающий участок $-Pro-Asp-Ser-$ [9]. Замена остатка аргинина на лизиновый остаток позволила использовать ϵ -аминогруппу для конъюгации с белком, а остающиеся свободными N- и C-концевые группы способны взаимодействовать не только между собой, но и, как сказано выше, с соответствующими группами белка, образуя петлеобразные структуры.

При конъюгации этого пептида с тиреоглобулином или гемоцианином с помощью водорастворимого карбодиимида нами были получены соответствующие конъюгаты. К сожалению, мы не располагали возможностью идентификации в конъюгатах петлеобразных структур, сформированных за счет гексапептида. Поэтому единственным критерием родства хотя бы некоторых из них по вторичной структуре с природной антигенной детер-



Титр взаимодействия иммунных сывороток различного происхождения с соответствующими антигенами в реакции ELISA (\log_2)

Препарат для получения анти-сывороток	Антигены, иммобилизованные на полистироловых платах			
	Гексапептид	Гемагглютинин вируса гриппа А (H_3N_2)	Вирус гриппа А (H_3N_2)	Вирус гриппа свиньи H_1
Гексапептид-тиреоглобулин	11,10	10,30	8,70	0
Гексапептид-гемоцианин	10,50-11,20	9,5-10,50	8,6-9,50	0
Вирус гриппа А (H_3N_2)	4,0 3,80-4,2	6,40 6,20-6,5	7,30 7,0-7,50	0
Бычий сывороточный альбумин	0	8,50 8,0-9,0	8,50 8,0-9,0	Не определено
	0	0	0	0

Таблица 2

Конкурентное ингибирование (в %) взаимодействия мышинных антител против конъюгата гексапептид-тиреоглобулин различными антигенами в реакции ELISA (\log_2)

Антигены, иммобилизованные на полистироловых платах	Антигены, используемые для ингибирования, 250 мкг/мл					
	гексапептид	гемагглютинин	вирус гриппа А (H_3N_2)	тиреоглобулин	гемоцианин	столбнячный анатоксин
Гексапептид	95	95	95	15	10	10
Гемагглютинин	0	95	95	Не определено		
Вирус гриппа А (H_3N_2)	0	95	95	»		

минантой гемагглютинина следовало бы считать образование антител, способных взаимодействовать не только с самим гексапептидом, но и с молекулой гемагглютинина и с интактной частью вируса гриппа.

Синтез гексапептида осуществляли по схеме, используя максимальную защиту функциональных групп. Защитные группы подбирались с учетом возможного селективного удаления на промежуточных стадиях синтеза. Так, для защиты α -аминогруппы аминокислот использовали *tert*-бутилоксикарбонильную группу (Boc-). α - и β -Карбоксильные группы, а также OH-группу серина защищали бензильной группой (Bzl-). В качестве конденсирующего агента для образования пептидной связи использовался N,N'-дихлорогексилкарбодимид (DDC). Дипептид Boc-Lys(Z)-Gly-OH синтезировали с использованием *n*-нитрофениловых эфиров. Вос-группу снимали действием 3 н. HCl в абсолютном этилацетате. Защищенный гексапептид очищали хроматографией на силикагеле. Z- и Bzl-группы удаляли гидролизом над палладиевой чернью. Синтезированный гексапептид конъюгировали с гемоцианином улитки и бычьим тиреоглобулином с помощью 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида. Полученные конъюгаты очищали диализом против воды. Эпитопную плотность гексапептида определяли по методу Лоури, приведенному в работе [11]. Она составляла соответственно 17 и 15 молекул пептида на молекулу белка.

Как оказалось, эти конъюгаты после трехкратного введения мышам индуцировали образование специфических антител в достаточно высоком титре, которые взаимодействовали не только с самим гексапептидом, но и с гемагглютинином и вирусом гриппа А (H_3N_2). Эти антитела, по видимому, обладали выраженной типовой специфичностью, так как не взаимодействовали перекрестно с вирусом гриппа свиньи H_1 (табл. 1). Анализ тонкой специфичности антигексапептидных антител выявил их гетероклитичные свойства. Об этом свидетельствуют данные, представленные

ные в табл. 2. В реакции конкурентного ингибирования гексапептид практически полностью (на $\sim 95\%$) подавлял взаимодействие антител с идентичным антигеном, но не с гемагглютинином и вирусом гриппа. В то же время молекула гемагглютинаина и вирусные частицы полностью ингибировали взаимодействие антител с собственными антигенами и гексапептидом. Вероятно, антигексапептидные антитела действительно гетероклиничны, т. е. обладают более высокой авидностью к участку молекулы гемагглютинаина, включающему, возможно, последовательность, аналогичную гексапептиду, чем к антигенной детерминанте, индуцировавшей их образование. Следует отметить, что характер иммунного ответа зависит от белка-носителя. Если им был тиреоглобулин, то у подопытных животных определялся высокий уровень антител к гексапептиду, которые перекрестно взаимодействовали с гемагглютинином и вирусом. Когда же в качестве носителя применяли гемоцианин, уровень антител к гексапептиду был низок, хотя и эта сыворотка в довольно высоком титре реагировала и с гемагглютинином, и с вирусом гриппа (табл. 1).

Мы принимали в расчет и то, что при использовании полного адьюванта Фрейнда и белков-носителей в иммунной сыворотке наряду с антителами против гексапептида могли содержаться антитела и против эпитопов носителя и компонентов полного адьюванта Фрейнда. Поэтому, чтобы исключить возможность перекрестного взаимодействия последних с гексапептидом или молекулой гемагглютинаина, были проведены соответствующие контрольные эксперименты. Так, было обнаружено, что введение одного полного адьюванта Фрейнда контрольным мышам практически не вызывало образования антител, перекрестно реагирующих с гексапептидом. Антитела, индуцированные с помощью тиреоглобулина или гемоцианина, взаимодействовали с этими антигенами в высоком титре ($9-10$, \log_2), но очень слабо реагировали с гексапептидом, гемагглютинином и вирусом гриппа ($1-1,5$, \log_2). Аналогичные результаты в отношении этих носителей были получены и в работе [9]. С другой стороны, антитела против гексапептида очень слабо взаимодействовали с тиреоглобулином и гемоцианином ($1,5-2,0$, \log_2). Отсутствие выраженной перекрестной реактивности было четко показано в эксперименте с конкурентным ингибированием. Для этого в тест-систему, состоящую из антигена (гексапептида, иммобилизованного на полистироле) и антител (иммунная сыворотка, содержащая антитела против гексапептида), вводили препараты тиреоглобулина и гемоцианина, а в качестве контроля — столбнячный апатоксин. Как следует из табл. 2, ингибирование взаимодействия антигексапептидных антител с гексапептидом при этом не превышало $10-15\%$. В том случае, когда в систему вводили адекватное количество гексапептида, происходило практически полное ингибирование реакции антител — антиген. Следовательно, антитела против гексапептида были индуцированы гексапептидной детерминантой, а не носителем. Таким образом, полученные нами результаты могут указывать на то, что подобное конструирование функционально-активных детерминант на базе очень коротких пептидных фрагментов может быть достаточно перспективным.

Экспериментальная часть

В работе использованы аминокислотные производные (Reanal, ВНР), тиреоглобулин (Calbiochem, США), гемоцианин улитки, бычий сывороточный альбумин, пероксидаза хрена (Sigma, США), столбнячный апатоксин, адьювант Фрейнда (Difco, США), вирус гриппа $A(H_3N_2)$ (Ленинград), вирус гриппа свиней H_1 (Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского, АМН СССР), кроличьи антитела против вируса гриппа $A(H_3N_2)$ (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР), мышисамцы линии СВА массой $20-25$ г (питомник «Столбовая», АМН СССР).

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Silufol с закрепленным силикагельным слоем $100-200$ мкм (Chemapol, ЧССР) в системах: *n*-бутанол — вода — CH_3COOH , $4 : 1 : 1$ (А), *n*-бутанол — вода — пиридин — CH_3COOH , $3 : 2,4 : 2 : 0,6$ (Б), $CHCl_3 - CH_3OH$, $60 : 13$ (В),

втор-бутанол — 3% NH_4OH , 100 : 4 (Г). Вещества на хроматограммах обнаруживали нингидрином, параами иода и прокаливанием на открытом пламени. Температуру плавления (не исправлена) определяли на приборе Boetius (ГДР) при скорости плавления вещества $4^\circ \text{C}/\text{мин}$. Удельное вращение измеряли на автоматическом поляриметре А-1-ЕПЛ (СССР). Гидролиз пептидов для аминокислотного анализа проводили в стандартных условиях 6 н. HCl (105°C , 24 ч). Аминокислотный анализ осуществляли на аминокислотном анализаторе LC 2000 (ФРГ), фотометрирование — на приборе ELISA Reader Multiskop (США).

Вос-Ser(Bzl)-Gly-OBzl (I). К раствору 2,0 г (4,5 ммоль) *Вос-Ser(Bzl)-OH* в 15 мл этилацетата при охлаждении до -15°C и перемешивании добавляли 0,93 г (4,5 ммоль) DCC и через 10 мин охлажденный раствор 0,90 г (5,6 ммоль) $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{N-Gly-OBzl}$ и 0,62 мл (4,5 ммоль) триэтиламина в 10 мл этилацетата. Смесь перемешивали 2 ч при $-10 \div -15^\circ \text{C}$ и 4 ч при 20°C , затем выдерживали в холодильнике, выпавшую дициклогексимочевину отфильтровывали, упаривали частично растворитель и вновь освобождались от дициклогексимочевины. Фильтрат последовательно промывали водой, 10% лимонной кислотой (3×10 мл), 0,5 н. NaHCO_3 (3×10 мл) и водой, сушили над Na_2SO_4 . Получили 2,2 г (91%) маслообразного продукта с $[\alpha]_D^{25} +14^\circ$ (*c* 1; AcOEt). R_f 0,80 (Б); 0,80 (В); 0,76 (Г).

HCl-H-Ser(Bzl)-Gly-OBzl (II). К раствору 2,1 г (4,8 ммоль) дипептида (I) в 50 мл абс. этилацетата прибавляли 10 мл 3 н. HCl в этилацетате. Смесь выдерживали 50 мин при 20°C , избыток HCl отгоняли в вакууме при 20°C и продукт осаждали абсолютным эфиром, затем переосаждали из метанола эфиром и сушили в вакууме. Получили 1,6 г (88,8%) твердого аморфного продукта с R_f 0,40 (В), 0,60 (Г).

Вос-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Gly-OBzl (III) получали аналогично пептиду (I), исходя из 1,52 г (4,7 ммоль) *Вос-Asp(OBzl)-OH* в 15 мл этилацетата, 0,97 г (4,7 ммоль) DCC и 1,75 г (4,7 ммоль) хлоргидрата дипептида (II), 0,66 мл (4,7 ммоль) триэтиламина в 10 мл этилацетата. Полученный маслообразный продукт закристаллизовывался из этилацетата при добавлении гексана. Выход 2,5 г (81,6%), т. пл. $77-79^\circ \text{C}$, $[\alpha]_D^{25} +13^\circ$ (*c* 0,5; AcOEt), R_f 0,74 (В), 0,85 (Г).

HCl-H-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Gly-OBzl (IV) получали аналогично хлоргидрату дипептида (II), исходя из 0,5 г трипептида (III), 2,7 мл 3 н. HCl в этилацетате. Смесь выдерживали 1 ч при 20°C . Выход твердого аморфного продукта 0,3 г (68%). R_f 0,64 (А), 0,87 (Б), 0,43 (В).

Вос-Pro-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Gly-OBzl (V) получали аналогично пептиду (I), исходя из 0,54 г (2 ммоль) *Вос-Pro-OH* в 20 мл CH_2Cl_2 , 0,51 г (2,5 ммоль) DCC и 1,46 г (2,5 ммоль) пептида (IV), 0,34 мл (2,0 ммоль) триэтиламина в 15 мл CH_2Cl_2 . Аморфный продукт закристаллизовывался при переосаждении из этилацетата абсолютным эфиром. Получили 0,8 г (62,5%) тетрапептида (V), т. пл. $84-85^\circ \text{C}$, $[\alpha]_D^{25} -13^\circ$ (*c* 0,3, этилацетат). R_f 0,76 (А), 0,80 (Б), 0,60 (В), 0,80 (Г).

HCl-H-Pro-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Gly-OBzl (VI) получали аналогично хлоргидрату (II), исходя из 0,8 г (1 ммоль) тетрапептида (V), 5,1 мл 3 н. HCl в этилацетате. Смесь выдерживали 45 мин при 20°C . Очищали переосаждением из метанола эфиром. Выход 0,59 г (82%). R_f 0,54 (А), 0,40 (В), 0,60 (Г).

Вос-Lys(Z)-Gly-OH (VII). К раствору 0,9 г (1,7 ммоль) *Вос-Lys(Z)-ONr* в 6 мл диметилформаида добавляли 0,13 г (1,7 ммоль) глицина, растворенного в 1,7 мл 1 н. NaOH . Смесь перемешивали 15 ч при 20°C и диметилформаид упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 15 мл воды и промывали эфиром (3×5 мл). Водный слой подкисляли лимонной кислотой до pH 3—4, экстрагировали этилацетатом (3×10 мл) и органическую вытяжку промывали водой и сушили над Na_2SO_4 . Выход дипептида (VII) 0,6 г (82%), $[\alpha]_D^{25} -10,5^\circ$ (*c* 0,38, EtOH). R_f 0,84 (А), 0,75 (Б).

Вос-Lys(Z)-Gly-Pro-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Gly-OBzl (VIII) получали ана-

логично пептиду (I), исходя из 0,33 г (0,80 ммоль) дипептида (VII) в 15 мл CH_2Cl_2 , 0,16 г (0,80 ммоль) DCC и 0,6 г (0,82 ммоль) хлоргидрата тетрапептида (VI) с 0,41 мл (0,82 ммоль) триэтиламина в 10 мл CH_2Cl_2 . Продукт очищали на колонке (3×50 см) с силикагелем L100/160. Элюирование проводили смесью $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{CH}_3\text{COOH}$ (20 : 1 : 0,5) со скоростью 15 мл/ч. Выход кристаллического продукта 0,55 г (61%), т. пл. $130-132^\circ \text{C}$, $[\alpha]_D^{24} -26^\circ$ (с 0,3, EtOH), R_f 0,8 (A), 0,80 (B), 0,85 (B).

H-Lys(Z)-Gly-Pro-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Gly-OBzl (IX) получали аналогично пептиду (II), исходя из 0,3 г (0,26 ммоль) гексапептида (VIII) и 4 мл 3,5 н. HCl в этилацетате. Через 45 мин продукт осаждали абсолютным эфиром и снимали на амберлите IRA-401 (ОН-форма). Выход аморфного продукта 0,22 г (77%). R_f 0,37 (B), 0,72 (B).

H-Lys-Gly-Pro-Asp-Ser-Gly-OH (X). 0,2 г (0,36 ммоль) гексапептида (IX) растворяли в 20 мл метанола, содержащего 0,5 мл CH_3COOH , и гидрировали над палладиевой чернью до полного отщепления бензильных групп. Растворитель упаривали, остаток очищали переосаждением из метанола эфиром. Выход кристаллического продукта 0,1 г (90%), т. пл. $180-182^\circ \text{C}$. Аминокислотный анализ: Lys 0,9 (1), Gly 1,96 (2), Pro 1 (1), Asp 0,9 (1), Ser 0,89 (1). R_f 0,24 (B), 0,10 (B) (в системе толуол — диоксан — гептан — этанол, 10 : 6 : 3 : 1).

Получение конъюгатов H-Lys-Gly-Pro-Asp-Ser-Gly-OH с тиреоглобулином и гемоцианином улитки. К раствору 0,08 г тиреоглобулина или гемоцианина в 5 мл воды прибавляли 0,1 г 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида и 0,03 г пептида (X). Смесью перемешивали 24 ч при 20°C , затем диализовали 20 ч против воды. Эпитопная плотность пептида на 1 моль белка-носителя определялась по методу Лоури. Было найдено, что 1 моль тиреоглобулина содержал 17 моль (X), а 1 моль гемоцианина улитки — 15 моль пептида (X).

Иммунизация мышей конъюгатами гексапептида с тиреоглобулином и гемоцианином. Полученные конъюгаты использовались для иммунизации мышей. Первые два введения конъюгатов производили в дозе 150 мкг на инъекцию под кожу холки и корень хвоста в полном адьюванте Фрейнда с 3-недельным интервалом. Разрешающую дозу вводили через 4 недели внутрибрюшинно без адьюванта в дозе 100 мкг/мышь вместе с клетками карциномы Эрлиха $2 \cdot 10^6$. На 5—6-е сут извлекали перитональный экссудат и центрифугировали клеточные элементы. Надосадочную жидкость использовали в качестве источника антител для исследования. Контрольным животным вводили полный адьювант Фрейнда без антигена или белков-носителей. Эти препараты вводили в той же дозе и по той же схеме, что и изучаемые конъюгаты.

Определение титров антител против гексапептида, индуцированных его конъюгатами с тиреоглобулином и гемоцианином иммуноферментным методом. В стандартные плоскодонные 96-луночные полистирольные планшеты вносили по 100 мкл препаратов (10 мкг/мл): гексапептид, гематтенин вируса гриппа A(H_3N_2), вирус гриппа A(H_3N_2), вирус гриппа свиньи H_1 , тиреоглобулин быка, гемоцианин улитки или столбнячный анатоксин в забуференном фосфатами растворе с pH 7,5 (ЗФР). Инкубировали 1 сут при 4°C . Планшеты отмывали 3 раза водой с заключительным промыванием 0,05% водным раствором твина-20 в течение 3 мин. Не связавшиеся с антигеном участки полистирола блокировали 0,5% раствором бычьего сывороточного альбумина, приготовленного на ЗФР, в течение 40 мин при 37°C и отмывали по вышеуказанной схеме. Затем в лунки вносили по 100 мкл раствора ЗФР и проводили титрование путем последовательного 2-кратного разведения мышинных антисывороток. Планшеты выдерживали 45 мин при 37°C . После промывания в лунки вносили по 100 мкл кроличьей антисыворотки против IgG мыши, инкубировали 45 мин при 37°C и промывали. После этого прибавляли по 100 мкл ослиной иммунной сыворотки против IgG кролика, меченой пероксидазой хрена, выдерживали 45 мин при 37°C , собирали конъюгат и повторяли промывание. Готовили свежий раствор хромогена (5 мл фосфатно-цитратного буфера, pH 5, с 2 мг *o*-фенилендиамина и 20 мкл 3% H_2O_2) и добав-

ляли в полистирольные лунки. Спустя 30 мин экспозиции ферментативную реакцию оставляли 2 н. H_2SO_4 , после чего проводили фотометрическое измерение при 492 нм. За титр антител принимали последнее разведение сыворотки, при котором величина экстинкции отличалась в 2 раза от контроля. Результаты даны в \log_2 .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arnon R. // Ann. Rev. Microbiol. 1980. V. 34. P. 593—618.
2. Audibert F., Jolivet M., Chedid L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 16. P. 5042—5046.
3. Jacob C. O., Sela M., Arnon R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 24. P. 7611—7615.
4. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A. // Nature. 1982. V. 298. № 5869. P. 30—38.
5. Dreesman G. R., Sanchez Y., Ionescu — Matiu I., Sparrow J. T., Six H. R., Peterson D. L., Hollinger F. B., Melnick J. L. // Nature. 1982. V. 295. № 5845. P. 158—160.
6. Muller G. M., Shapira M., Arnon R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 2. P. 569—573.
7. Иванов В. Т., Вольпина О. М., Андропова Т. М. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1988. № 5. С. 43—50.
8. Atassi M. Z. // Immunochemistry. 1975. V. 12. № 5. P. 423—438.
9. Green N., Alexander H., Olson A., Alexander S., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A. // Cell. 1982. V. 28. № 3. P. 477—487.
10. Wiley D. C., Wilson J. A., Skehel J. J. // Nature. 1981. V. 289. № 5796. P. 373—378.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. Y., Faarr A. L. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.

Поступила в редакцию
14.VII.1989

После доработки
28.XI.1989

V. A. SHIBNEV, A. N. SHARETSKY *, R. V. VALIEV **, Sh. H. HALICOV **

SOME APPROACHES TO DESIGNING FUNCTIONALLY ACTIVE DETERMINANTS EXEMPLIFIED BY THE INFLUENZA VIRUS A(H_3N_2) HEMAGGLUTININ

V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow;

* A. N. Sysin Research Institute of General and Communal Hygiene,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;

** V. I. Lenin Tadjik State University, Dushanbe

Hexapeptide Lys-Gly-Pro-Asp-Ser-Gly analogous to the immunodominant fragment 141—146 of the epitop A of the influenza virus A(H_3N_2) hemagglutinin is synthesized. Conjugated with thyreoglobulin and hemocyanine, the hexapeptide induced formation of highly specific antibodies with heterolitic properties in CBA mice. Antihexapeptide antibodies interact not only with the homologous antigene but also with hemagglutinin and influenza virus. Choice of the hexapeptide sequence is discussed.