



УДК 578.891 : 578.112.6.083.3

© 1991 г.

*Л. Д. Чижик, А. Т. Кожич, В. С. Иванов,
В. Т. Иванов, Т. А. Насташенко*, Ю. Ю. Кусов*,
М. С. Балаян**

СИНТЕЗ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОЛИГОПЕПТИДОВ— ФРАГМЕНТОВ КАПСИДНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА А

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;
Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР, Москва

С целью изучения антигенной структуры вируса гепатита А проведен компьютерный поиск ряда предполагаемых В-эпитопов из капсидных белков этого вируса. Выбранные пептиды синтезированы твердофазным методом. Изучены различные варианты проведения твердофазного синтеза с целью выбора оптимальной методики. Синтезированы пептиды 1—11, 1—17, 2—33, 11—25, 72—81, 75—85, 97—108, 97—111, 101—106, 101—107, 107—126, 112—122, 117—139, 276—298 из VP-1, 42—62 из VP-2, 76—85 из VP-3, 1—23 из VP-4. Свободные пептиды и их конъюгаты с белками-носителями использовали для иммунизации и исследования антигенности. Полученные пептиды оказались неспособными эффективно взаимодействовать с антителами к вирусу гепатита А, а их конъюгаты не индуцировали образование анти-VHA-антител.

В последние годы заметно интенсифицированы исследования, направленные на создание искусственных и синтетических пептидных вакцин. Описано успешное получение пептидной вакцины против гриппа [1], ящура [2], гепатита В [3] и других вирусных инфекций. Пептидные вакцины обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными живыми или инактивированными вакцинами, а именно: содержат только те последовательности, которые необходимы для создания протективного эффекта, не вызывают побочных реакций, а главное, безопасны в инфекционном отношении.

Первый шаг в создании пептидной вакцины состоит в выяснении антигенной структуры иммунодоминантных участков вирусных белков. Известно, что успешная локализация иммунодоминантных участков может быть проведена только при условии комплексного использования химических и биохимических методов [4].

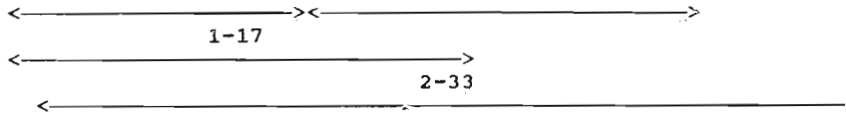
В качестве объекта исследования нами был выбран вирус гепатита А, поскольку заболевание гепатитом А довольно широко распространено в СССР и представляет серьезную проблему для здравоохранения. Из-за отсутствия эффективных вакцин профилактика гепатита А базируется в основном на мероприятиях санитарно-гигиенического характера, а также на использовании γ -глобулинов. Наряду с созданием традиционной вакцины на основе ослабленного или инактивированного вируса [5] перспективно и целесообразно изучение альтернативного подхода, состоящего в разработке синтетической пептидной вакцины.

Вирус гепатита А (VHA) относится к группе энтеровирусов семейства *Picornaviridae* [6]. Вирион представляет собой безоболочечный икосаэдр,

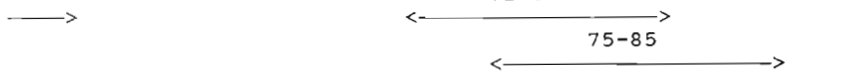
Принятые сокращения: DIEA — дивизпропилэтиламин, НОВТ — 1-гидроксибензотриазол, ОБТ — бензотриазолокси, ТФА — трифторуксусная кислота, As_2O — уксусный ангидрид, Аос — *трет*-амилоксикарбонил, сHex — циклогексил, Bом — бензилоксиметил, Dпр — 2,4-дивитрофенил, Bzl(Cl₂) — 2,6-дихлорбензил, Z(Br) — 2-бромбензилоксикарбонил, Z(Cl) — 2-хлорбензилоксикарбонил, Фог — формил, BSA — бычий сывороточный альбумин, VHA — вирус гепатита А, Pам — гидроксиметилфенилацетамидометил, KLN — гемоцианин улитки.

VP-1

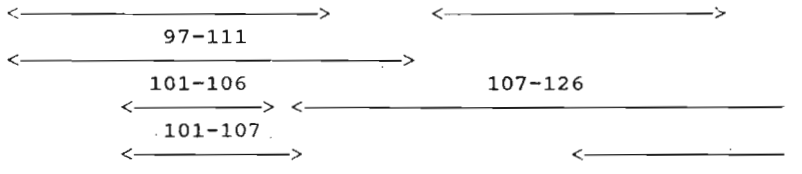
1 10 20 30
V G D D S G G F S T T V S T E Q N V P D P Q V G I T T M R D
1-11 11-25



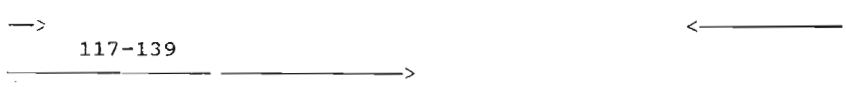
40 70 80
L K G K A N R G K M ... E L K P G E S R H T S D H M S I Y ...
72-81



100 110 120
... T F T F N S N N K E Y T F P I T L S S T S N P P H G L P
97-108 112-122



130 140 270 280
S T L R W F F N L F Q L Y R G P ... L S T E S M M S R I A A



290 300
G D L E S S V D D P R S E E D R R F E ...
276-298



VP-2

40 50 60
... I E P L K T S V D K P G S K K T Q G E K F F L I ...
42-62



VP-3

70 80 90
... D S V G Q Q I K V I P V D P Y F F Q M T N ...
76-85

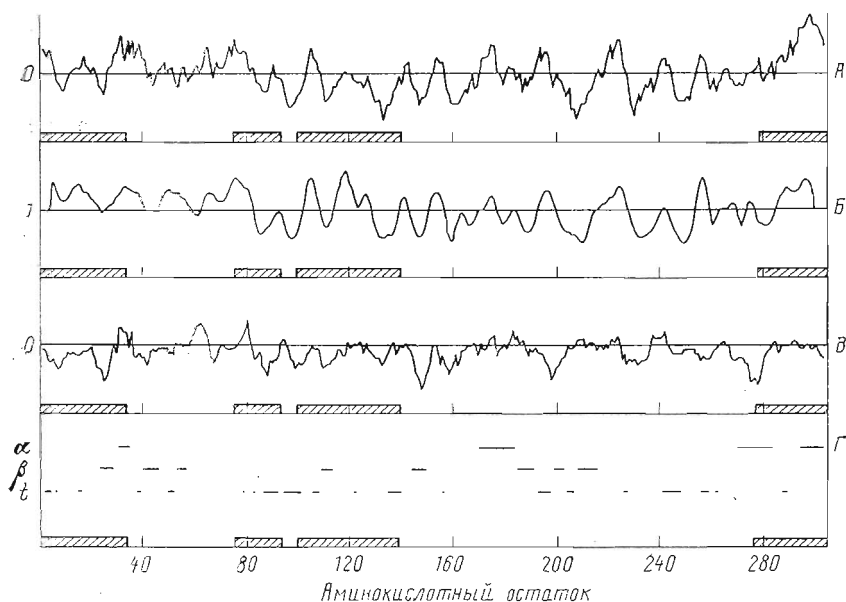


VP-4

1 10 20
M N M S K Q G I F Q T V G S G L D H I L S L A
1-23



Синтезированные пептиды



Выбор вероятных антигенных участков белка VP-1 с использованием компьютерного анализа: отмеченные участки перекрываются синтетическими пептидами. Приведены расчетные профили: гидрофильности (А), подвижности основной цепи, оцененной по температурным факторам S_{α} -атомов (Б), антигенности (В), вероятной вторичной структуры (Г), где α — α -спиральные участки, β — β -складчатые структуры, t — β -изгибы

состоящий из 60 копий капсидных белков VP-1, VP-2, VP-3 и, возможно, VP-4, внутри которого находится одна копия вирусной РНК [7]. Первичная структура вирусных белков была определена методами генной инженерии [8—10]. Все известные штаммы VHA обладают близкой антигенной специфичностью.

Значительная потеря специфических антигенных свойств при денатурации вируса свидетельствует в пользу того, что соответствующие антигенные детерминанты являются конформационными. Ковалентная пришивка моноклональных антител к интактному VHA показала, что один антигенный участок находится в составе VP-1 [11], поэтому в нашей работе основное внимание было уделено этому белку.

Цель настоящей работы — поиск последовательных антигенных детерминант VHA с помощью синтетических пептидов. Для выявления вероятных антигенных детерминант были использованы методы компьютерного анализа первичной последовательности белков: были рассчитаны профили гидрофильности [12], антигенности [13], подвижности основной цепи аминокислотных остатков [14], вероятная вторичная структура [15]. Сопоставление всех полученных данных позволило выявить наиболее перспективные в антигенном отношении участки белков VHA (рисунок).

Пептиды, перекрывающие выбранные участки, были синтезированы твердофазным методом на модернизированном нами синтезаторе «Beckman 990» (США). В качестве носителя использовали аминотетраметил-полистирол и 1% дивинилбензола с *n*-гидроксиметил-фенилацетамидометильной (Pam) якорной группировкой. Концентрация аминокислот составляла 0,25—0,7 ммоль/г смолы. Якорные группировки вводили при помощи предварительно синтезированного Pam-производного защищенной C-концевой аминокислоты [16].

Синтез осуществлялся методом последовательного наращивания пептидной цепи [17]. Для временной защиты α -аминогруппы аминокислот использовали Boc-группу (в некоторых случаях для защиты аргинина использовалась Aoc-группа ввиду лучшей растворимости Aoc-производного в хлороформе). Боковые функциональные группы аминокислот защищали: Asp, Glu — OBzl, OcHex; Arg — Tos; His — Bom, Dnp; Ser, Thr — Bzl; Tyr — Bzl(Cl₂), Z(Br); Lys — Z(Cl); Trp — For.

Аминокислоты конденсировали с помощью предварительно приготовленных симметричных ангидридов (кроме Arg, Gln, Asn, Trp) и оксизензотриазоловых эфиров. В отдельных случаях конденсация Arg и Gly проводилась с использованием DCC без преактивации, но при этом не было выявлено сколько-нибудь заметного повышения чистоты конечного продукта.

Проведенная нами модернизация синтезатора позволила проводить преактивацию аминокислот в полностью автоматическом режиме с частичным обменом растворителей непосредственно перед введением в конденсацию.

Полнота протекания реакции контролировалась с помощью качественного и количественного индикринового теста [18]. При необходимости непрореагировавшие аминогруппы ацилировались уксусным ангидридом в присутствии диизопропилэтиламина. Вос-группу в процессе синтеза удаляли обработкой смесью TFA—CHCl₃ (1 : 1) за 20 мин с последующей нейтрализацией 7% раствором диизопропилэтиламина в DMF.

В работе нами были использованы три варианта (А, В, С) синтеза с целью выбора наиболее подходящего для достаточно быстрого получения 200—400 мг очищенного пептида размером от 10 до 30 аминокислот при минимальном расходе реагентов и растворителей.

А. Синтез пептидов белка VP-1 последовательности 97—111, 112—122, 97—108, 72—81, 107—126, 1—17, 101—106, 101—107, 75—85, 276—298; белка VP-2 последовательности 42—62 и белка VP-4 последовательности 1—23 проводился с использованием двойной конденсации для каждой аминокислоты. Первая конденсация для всех аминокислот, кроме Arg, Gln, Asn, Trp, осуществлялась методом симметричных ангидридов с преактивацией в CHCl₃ и конденсацией в DMF. Первую конденсацию Arg, Gln, Asn, а также Trp (из-за плохой растворимости в CHCl₃) проводили с помощью ОВТ-эфиров в DMF. Вторую конденсацию проводили после промывок и обработки 7% раствором DIEA. Все аминокислоты конденсировали с использованием ОВТ-эфиров. Исключения делались в случае посадки на Gln и Asn, когда для повторной конденсации применялись симметричные ангидриды в DMF, чтобы избежать циклизации. Однако, как показала практика, при посадке на Asn и даже на Gln с использованием ОВТ-эфиров потеря аминогрупп незначительна.

При использовании этого варианта загрузка смолы (в пересчете на аминогруппы) составляла 1,5—2 ммоль, использовался 3—4-кратный общий избыток аминокислоты на каждой стадии (по отношению к первоначальному количеству аминогрупп на смоле, в дальнейшем называемому первоначальной загрузкой). Выход продукта после деблокирования составлял 40—70% по отношению к первоначальной загрузке. Общее время одной двойной конденсации 210—250 мин.

В. Этот вариант был применен для синтеза пептидов белка VP-1 последовательности 2—33, 11—25, 117—139. Они были синтезированы с использованием однократной конденсации методом симметричных ангидридов для всех аминокислот, кроме Arg, Gln, Asn, Trp. Для конденсации этих аминокислот применялся метод ОВТ-эфиров.

Первоначальная загрузка составляла 1—1,4 ммоль, использовался 3—4-кратный избыток аминокислот, выход продукта после деблокирования составлял 50—70% по отношению к первоначальной загрузке. Общее время одной конденсации 130—150 мин.

Однако было замечено, что при использовании симметричных ангидридов, несмотря на их высокую реакционную способность, нередко случался, когда реакция не проходит до конца, даже при выборочном применении повторной конденсации. Особенно это заметно в случае «тяжелых» аминокислот (Lys, Tyr, Arg, His). По-видимому, это объясняется затрудненностью диффузии симметричных ангидридов и стерической труднодоступностью части аминогрупп.

С. Этот вариант применялся для синтеза пептидов VP-1-(1—11) и VP-3-(76—85). При этом использовалась однократная конденсация методом ОВТ-эфиров для всех аминокислот. Первоначальная загрузка со-

Взаимодействие пептидов с анти-VHA-антителами *

Пептид	Сыворотка реконвалесцента гепатита А	Гипериммунная анти-VHA-сыворотка морской свинки	Сыворотка морской свинки к субъединицам VHA	Сыворотка морской свинки до иммунизации
VP1				
11—25	0,300	0,143	0,300	0,121
75—85	0,090	0,175	0,306	0,140
97—111	0,170	0,142	0,229	0,119
101—106	0,169	0,157	0,157	0,132
112—122	0,211	0,185	0,225	0,127
276—298	0,164	0,142	0,163	0,121
290—299	0,194	0,171	0,226	0,137
VP2				
46—62	0,161	0,124	0,162	0,103
VP3				
76—85	—	0,218	0,218	0,100
VP4				
1—23	0,156	0,159	0,158	0,125
Контрольные пептиды:				
HTLV-1 **	0,187	0,125	0,191	0,107
АТР-аза *** (С-конец)	0,194	0,182	0,172	0,169

* Приведено поглощение при 492 нм (среднее арифметическое из трех определений) в непрямом методе ИФА.

** SLLFDGKKEADDN.

*** KLIIRRRPG.

ставляла 1 ммоль, использовался 3-кратный избыток аминокислот, выход продукта после деблокирования составлял около 80—90% по отношению к первоначальной загрузке. Общее время одной конденсации 130—150 мин.

Таким образом, первый из трех разработанных вариантов позволяет использовать большие по сравнению с другими вариантами загрузки смолы и, следовательно, получать большие количества пептидов, а при использовании небольших загрузок добиваться более полного протекания реакции. Но, с другой стороны, этот метод требует значительно большего расхода реактивов и растворителей, а также более значительных временных затрат. Поэтому в дальнейшем этот вариант применяли только для наработки больших количеств пептидов. Он может быть также использован для синтеза пептидов размером более 30 аминокислотных остатков, когда необходимо возможно более полное протекание реакции.

Второй из использованных вариантов должен быть признан не совсем удачным, так как, несмотря на больший по сравнению с третьим вариантом расход защищенных аминокислот, часто возникали трудности с окончательной очисткой полученного пептида.

Наконец, третий вариант в условиях поставленной задачи представляется наиболее выгодным из трех разработанных.

Снятие со смолы и деблокирование пептидов проводили жидким фтористым водородом с различными добавками. Деблокированные пептиды очищали с помощью гель-фильтрации и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Пептиды характеризовали аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ, аминокислотным анализом (на смоле и после очистки), FAB-масс-спектрометрией и ¹H-ЯМР-спектроскопией.

Для иммунизации животных получали конъюгаты пептидов с КЛП, сукцинилированным BSA и активированным сукцинилированным желатином.

Как видно из приведенных в таблице данных, ни один из пептидов не проявлял антигенную активность, иными словами, все пептиды оказались неспособными эффективно связываться не только с анти-VHA-антителами, содержащимися в сыворотке реконвалесцента гепатита А и в гипериммунной анти-VHA-сыворотке морской свинки, но и с антителами к субъединицам VHA, т. е. к денатурированным кипячением в додецил-

сульфате натрия белкам ВНА. Характерные для пептидов значения оптического поглощения при 492 нм практически не отличались от значений контрольных образцов (соотношение P/N (см. «Экспер. часть») не превышало 2,1). Приведенные результаты относительно пептида VP-1-(11—25) согласуются с данными работы Гаусс-Миуллера с соавт. [19], но отличаются от данных одной из ранних работ Эмини с соавт. [20]. Следует отметить, что неспособность изученных пептидов, в том числе VP-1-(11—25), проявлять антигенные свойства, а также индуцировать у животных антивирусный ответ свидетельствует о конформационном, а не линейном характере антигенных детерминант нативного ВНА.

Известно, что помимо гуморального иммунного ответа, за который ответственны В-эпитопы, важную роль в защите от инфекции играет клеточный иммунитет. В связи с этим в дальнейшей работе планируется изучение важных для клеточного иммунитета антигенных фрагментов ВНА, содержащих В- и Т-эпитопы.

Экспериментальная часть

В работе применяли реактивы и производные аминокислот фирм Reanal (ВНР), PRF (Япония), Fluka (Швейцария). В качестве носителя использовали смолу (Bio-Rad, США), аминотетраацетатную по стандартной методике [16]. Отщепление со смолы и деблокирование пептидов проводили в аппарате фирмы PRF (Япония), для гель-фильтрации применяли сефадекс фирмы Pharmacia (Швеция). ВЭЖХ осуществляли на приборе фирмы Gilson (Франция). Для получения конъюгатов использовали белки (Sigma, Calbiochem, США), а также глутаровый альдегид (Serva, США).

Гидролиз пептидов проводили в течение 24 ч в смеси концентрированной соляной и пропионовой кислот (1 : 1) с добавлением 0,5% фенола при 110° С. Растворители абсолютировали обычным образом [21].

Протоколы синтеза пептидов. Объемы растворителей приведены в расчете на 2 г исходной смолы.

Протокол А (основной вариант): 1) CHCl_3 , 30 мл, 1 × 1 мин; 2) CHCl_3 , 30 мл, 1 × 3 мин; 3) 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 1 × 1 мин; 4) 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 1 × 20 мин; 5) CHCl_3 , 30 мл, 5 × 1 мин; 6) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1 × 1 мин; 7) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1 × 10 мин; 8) DMF, 30 мл, 3 × 1 мин; 9) DMF, 30 мл, 1 × 15 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 9а) защищенная аминокислота, 4 ммоль/5 мл CHCl_3 , 1 × 3 мин, 0° С; 9б) DCC, 2 ммоль/5 мл CHCl_3 , 1 × 10 мин, 0° С; 10) реакционная смесь «9б» добавляется к смоле; 11) DMF, 10 мл, промывка преактивационного сосуда; 12) перемешивание 40 мин, 20° С; 13) DMF, 30 мл, 3 × 1 мин; 14) отбор образца для нингидринового теста; 15) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1 × 3 мин; 16) DMF, 30 мл, 3 × 1 мин; 17) DMF, 30 мл, 1 × 20 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 17а) НОВТ, 2 ммоль/5 мл DMF, 1 × 3 мин, 0° С; 17б) DCC, 2 ммоль/5 мл CHCl_3 , 1 × 3 мин, 0° С; 17в) защищенная аминокислота, 2 ммоль/5 мл DMF, 1 × 10 мин, 0° С; 18) реакционная смесь «17в» добавляется к смоле; 19) DMF, 5 мл, промывка преактивационного сосуда; 20) перемешивание 80 мин, 20° С; 21) DMF, 30 мл, 5 × 1 мин; 22) отбор образца для нингидринового теста.

Для Arg, Asn, Gln, Trp вместо операций 9—12 использовали операции 17—20.

Протокол В (основной вариант): 1) CHCl_3 , 30 мл, 1 × 1 мин; 2) CHCl_3 , 30 мл, 1 × 3 мин; 3) 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 1 × 1 мин; 4) 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 1 × 20 мин; 5) CHCl_3 , 30 мл, 5 × 1 мин; 6) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1 × 1 мин; 7) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1 × 10 мин; 8) DMF, 30 мл, 3 × 1 мин; 9) DMF, 30 мл, 1 × 15 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 9а) защищенная аминокислота, 4 ммоль/5 мл CHCl_3 , 1 × 3 мин, 0° С; 9б) DCC, 2 ммоль/5 мл CHCl_3 , 1 × 10 мин, 0° С; 10) реакционная смесь «9б» добавляется к смоле; 11) DMF, 10 мл, промывка преактивационного сосуда; 12) перемешивание 40 мин, 20° С; 13) DMF, 30 мл, 5 × 1 мин; 14) отбор образца для нингидринового теста.

Для Arg, Asn, Gln, Trp операции 1—8 аналогичны основному варианту; 9) DMF, 30 мл, 1×20 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 9а) НОВТ, 2 ммоль/5 мл DMF, 1×3 мин, 0°C ; 9б) DCC, 2 ммоль/5 мл CHCl_3 , 1×3 мин, 0°C ; 9в) защищенная аминокислота, 2 ммоль/5 мл DMF, 1×10 мин, 0°C ; 10) реакционная смесь «9в» добавляется к смоле; 11) DMF, 5 мл, промывка преактивационного сосуда; 12) перемешивание 80 мин, 20°C ; операции 13—14 аналогичны основному варианту.

Протокол С: операции 1—8 аналогичны основному варианту протокола В; 9) DMF, 30 мл, 1×20 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 9а) НОВТ, 3 ммоль/5 мл DMF, 1×3 мин, 0°C ; 9б) DCC, 3 ммоль/5 мл CHCl_3 , 1×3 мин, 0°C ; 9в) защищенная аминокислота, 3 ммоль/5 мл DMF, 1×10 мин, 0°C ; 10) реакционная смесь «9в» добавляется к смоле; 11) DMF, 5 мл, промывка преактивационного сосуда; 12) перемешивание 40 мин, 20°C ; операции 13—14 аналогичны основному варианту протокола В. Для Lys, Tyr, Arg, His время конденсации (операция 12) было увеличено до 60 мин.

Вспомогательные протоколы

Протокол, используемый для посадки на смолу Ram-производного защищенной аминокислоты: 1) CHCl_3 , 30 мл, 2×1 мин; 2) 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 2×1 мин; 3) CHCl_3 , 30 мл, 5×1 мин; 4) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×1 мин; 5) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×10 мин; 6) DMF, 30 мл, 3×1 мин; 7) DMF, 30 мл, 1×5 мин; параллельно-ручная активация: 2 ммоль Ram-производного защищенной аминокислоты, 2 ммоль НОВТ, 2 ммоль DDC, DMF/ CHCl_3 (1 : 1) до 10 мл, 10 мин, 20°C ; 8) реакционная смесь вручную добавляется к смоле; 9) перемешивание 40—60 мин, 20°C ; 10) DMF, 30 мл, 5×1 мин; 11) отбор образца для нингидринового теста.

Протокол ацилирования: 1) приготовление вручную смеси 2 мл DIEA, 1 мл As_2O и до 5 мл CHCl_3 ; 2) добавление смеси вручную к смоле; 3) DMF, 5 мл, 1×20 мин; 4) DMF, 30 мл, 5×1 мин.

После завершения синтеза смолу промывали 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 2×1 мин; CHCl_3 , 30 мл, 3×1 мин; 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×10 мин; CHCl_3 , 30 мл, 3×1 мин; затем сушили 10—12 ч в вакууме при 20°C . Высушенную смолу хранили в темноте при -20°C . Деблокирование пептидов и снятие их со смолы осуществляли по стандартным методам [22].

Получение конъюгатов пептидов. Для получения конъюгата пептида с BSA или KLN к 4 мг пептида в 4 мл смеси DMF — 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, добавляли 10 мг белка в 4 мл того же буфера. К полученному раствору в течение 1 ч при 20°C добавляли 2 мл 0,25% водного раствора глутарового альдегида. Смесь оставляли на 16 ч, а затем диализовали против того же буфера.

Конъюгат пептида с сукцинированным желатином, карбоксильные группы которого активированы путем превращения в N-оксисукцинимидные эфиры [23], получали по следующей методике: 7 ммоль пептида растворяли в 1 мл DMF, добавляли 2 экв. N-метилморфолина и приливали к раствору 70 ммоль активированного желатина в 1 мл DMF. Перемешивали при 20°C до завершения реакции (контроль — ТСХ), после чего реакционную смесь разбавляли вдвое водой и добавляли одну-две капли 1 н. раствора аммиака в воде для блокирования непрореагировавших эфирных групп. Конъюгат выделяли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50f.

Непрямой метод иммуноферментного анализа. Раствор тестируемого пептида (100 мкл, 10 мкг/мл) в 0,01 М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6) вносили в лунки иммунопанели (Nunc, Дания) и инкубировали при 20°C . Через 14—16 ч раствор пептида удаляли и для предупреждения неспецифической сорбции лунки панели заполняли до краев 0,05% раствором желатины и оставляли на 2—3 ч при 20°C . После 3-кратного отмывания 0,01 М фосфатно-солевым буфером (pH 7,4), содержащим 0,05% Твин-20 (ФСБ-Твин), в лунки вносили по 50 мкл разведенных 1 : 10 сывороток и инкубировали 14—16 ч при 20°C . Далее панель трижды отмыва-

ли раствором ФСБ-Твин, вносили в лунки по 50 мкл рабочего разведения белка А (*Streptococcus aureus*), меченного пероксидазой (НИИЭМ им. Пастера, Ленинград), инкубировали 2 ч при 37° С и отмывали, как описано выше. Реакцию проявляли субстрат-индикаторным раствором, содержащим орто-фенилендиамин и перекись водорода в цитратно-фосфатном буфере (рН 5,0). Результаты учитывали с помощью многоканального спектрофотометра Multiskan (Финляндия). Результаты считали положительными при $P/N \geq 2,1$, где P — поглощение (λ 492 нм) в лунках с анти-VНА-антителами, N — поглощение в лунках с сывороткой, не содержащей анти-VНА-антител.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shapira M., Arnon R.* // Options for the Control of Influenza / Eds Kendell A. P., Patriarca P. A. New York: Alan R. Liss., 1986. P. 391—406.
2. *Яров А. В., Гельфанов В. М., Гречанинова Л. А., Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Ченуркин А. В., Дрягалов Н. Н., Иващенко В. Н.* // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1313—1317.
3. *Itoh Y., Takai E., Ohnuma H., Kitajima K., Tsuda F., Machida A., Mishiho S., Nakamura T., Miyakawa Y., Mayumi M.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 23. P. 9174—9178.
4. *Atassi M. Z.* // Biochem. J. 1985. V. 226. № 2. P. 477—485.
5. *Балаян М. С.* // Вопр. вирусологии. 1988. Т. 4. № 1. С. 5—11.
6. *Gust I. D., Coulepis A. G., Feinstone S. M., Locarnini S. A., Moritsugu Y., Najera R., Siege G.* // Intervirology. 1983. V. 20. № 1. P. 1—17.
7. *Ticehurst J. R.* // Semin. Liver. Dis. 1986. V. 6. P. 46—55.
8. *Najarian R., Caput D., Gee W., Potter S. J., Renard A., Merryweather J., Van Nest G., Dina D.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 9. P. 2627—2631.
9. *Овчинников Ю. А., Свердлов Е. Д., Царев С. А., Арсений С. Г., Розлина Т. О., Чижиков В. Е., Петров Н. А., Приходько Г. Г., Блинов В. М., Василенко С. К., Сандавичев Л. С., Кусов Ю. Ю., Грабко В. И., Флерт Г. П., Балаян М. С., Дроздов С. Г.* // Докл. АН СССР. 1985. Т. 258. С. 1014—1018.
10. *Cohen J. I., Ticehurst J. R., Purcell R. H., Buckler-Whiht A., Baroudy B. M.* // J. Virol. 1987. V. 61. № 1. P. 50—59.
11. *Hughes J. V., Stanton L. W., Tomassini J. E., Long W. J., Scolnick E. M.* // J. Virol. 1984. V. 52. № 1. P. 465—473.
12. *Hopp T. H., Woods K. R.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824—3828.
13. *Welling G. W., Weijer W. J., Zee R., Welling-Wester S.* // FEBS Lett. 1985. V. 188. № 2. P. 215—218.
14. *Karplus P. A., Schulz G. E.* // Naturwissenschaften. 1985. V. 72. № 1. S. 212—216.
15. *Garnier J., Osguthope O. J., Robson B.* // J. Mol. Biol. 1978. V. 120. № 1. P. 97—99.
16. *Mitchell A. R., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B.* // J. Org. Chem. 1978. V. 43. № 13. P. 2845—2852.
17. *Merrifield R. B.* // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. № 7. P. 2149—2154.
18. *Sarin V. K., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B.* // Anal. Biochem. 1981. V. 117. № 1. P. 147—157.
19. *Gauss-Muller V., Deinhardt F.* // J. Med. Virol. 1988. V. 24. № 1. P. 219—228.
20. *Emini E. A., Hughes J. V., Perlow D. S., Boger J.* // J. Virol. 1985. V. 55. № 2. P. 836—839.
21. *Perrin D. D., Armarego W. L. F., Perrin D. R.* // Purification of Laboratory Chemicals. Pergamon Press. 1985. P. 167—168, 224, 445—446, 448.
22. *Stewart J. M., Yoing J. D.* // Solid Phase Peptide Synthesis. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Comp., 1984. P. 85—89.
23. *Андреев С. М., Сидорова В. М., Ракова О. А., Цветков Д. Е., Фомина Л. А.* // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 696—700.

Поступила в редакцию
2.X.1990

L. D. TCHIKIN, A. T. KOZHICH, V. S. IVANOV, V. T. IVANOV, T. A. NASTASHENKO*
Yu. Yu. KUSOV*, M. S. BALAYAN*

**SYNTHESIS OF PEPTIDES FROM THE HEPATITIS A VIRUS
CAPSID PROTEINS AND THEIR IMMUNOCHEMICAL STUDY**

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

**Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

The hepatitis A virus (HAV) capsid protein VP1, VP2 and VP3 are exposed at the virion surface and should therefore contain antigenic determinants. Algorithms for hydrophilicity, antigenicity and flexibility were used to predict probable antigenic sites. Synthesis of 7- to 23-membered overlapping peptides from seven sites, viz., 1-11, 1-17, 2-33, 11-25, 73-82, 76-86, 98-109, 98-112, 102-107, 102-108, 108-127, 113-123, 118-140, 276-298 from VP1, 42-62 from VP2, 76-85 from VP3, and 1-23 from VP4, was performed by various solid-phase methods.

Free peptides and their conjugates with different carriers were used for immunization and study of antigenicity. The peptides did not interact with antibodies to the hepatitis A virus, whereas their conjugates did not induce the formation of anti-HAV-antibodies.