



УДК 578.832'112.6.083.3

© 1991 г.

*Е. И. Прокуронова, И. И. Хлебникова, Г. А. Желтухина,
Р. П. Евстигнеева, Ю. А. Семилетов*, В. А. Карпова*,
Т. И. Калинин*, Ю. Е. Худяков*, Р. П. Павлюченкова*,
В. Д. Смирнов**

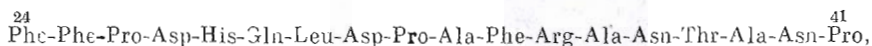
СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ preS1-ОБЛАСТИ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕННОЙ ДЕТЕРМИНАНТЫ

*Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова;
Институт вирусологии им. Д. И. Иванковского АМН СССР, Москва

Синтезированы пептиды, соответствующие участкам 24—41, 30—36, 31—36, 24—30 preS1-области белка оболочки вируса гепатита В (субтип ауw). Твердофазный синтез проведен на тefлоне с радиационно привитым полистиролом методом ступенчатого наращивания пептидной цепи с С-конца с применением активированных эфиров и симметричных ангидридов Вос-производных аминокислот. Пептиды отщеплены от носителя действием бромистого водорода в трифторуксусной кислоте или трифторметансульфоновой кислотой в трифторуксусной кислоте и очищены гель-хроматографией. Получены конъюгаты пептидов с белковыми носителями, которыми иммунизированы лабораторные животные. Показано, что образующиеся антипептидные антитела взаимодействуют с пептидами. В ходе клинических исследований выявлено, что сыворотки крови больных острым гепатитом В взаимодействуют с конъюгатами пептидов 24—41, 30—36, 31—36 в реакции твердофазного иммуноферментного анализа. Показано также, что пептиды 24—41, 30—36, 31—36 и их конъюгаты взаимодействуют с моноклональными антителами к preS1-области. Полученные данные дополнительно подтверждены результатами эпитоного картирования участка 24—41 preS1-области

Одним из подходов к разработке диагностических и вакцинных препаратов против гепатита В является химический синтез антигенных детерминант вирусных белков. Особый интерес в этом отношении вызывает preS-область белка оболочки, так как она высокоиммуногенна и содержит несколько вируснейтрализующих эпитопов [1]. Кроме того, антитела к preS-области являются одними из наиболее ранних маркеров развития вирусной инфекции [1].

Для локализации эпитопа внутри preS-области были использованы теоретические методы компьютерного анализа аминокислотной последовательности этого белка. PreS-область (субтип ауw) была исследована по программе гидрофильности Хоппа и Вудса [2] и Кайта и Дулитла [3], В-антигенности Веллинга [4] и подвижности Карплуса и Шульца [5] (рис. 1), а также с помощью вероятностного расчета вторичной структуры по программе О. В. Птицына и А. В. Финкельштейна [6]. На основании полученных результатов был выбран фрагмент 24—41 [7]



обладающий гидрофильным характером и содержащий участок с α -спиралью и несколько симметрично расположенных β -поворотов [7].

Использованные сокращения: Вос — трет-бутилоксикарбонил, Fmoc — 9-флуоренилметилоксикарбонил, DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, BSA — бычий сывороточный альбумин, KLN — гемоцианин виноградной улитки, AcM — ацетамидометил, НОВТ — 1-гидроксибензотриазол, Pfp — пентафторфенил, Np — n-нитрофенил, TFA — трифторуксусная кислота, TFMSA — трифторметансульфоуксусной кислоты, EDIPA — этилдиизопрпиламин, MBS — N-оксисукцинимидный эфир 3-маленилмидо-бензойной кислоты, SPDP — N-оксисукцинимидный эфир 3-(2-пиридилдигидро)пропионовой кислоты, Mtg — 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил, АВТС — азио-бис(3-этилбензтриазолин)сульфонат.

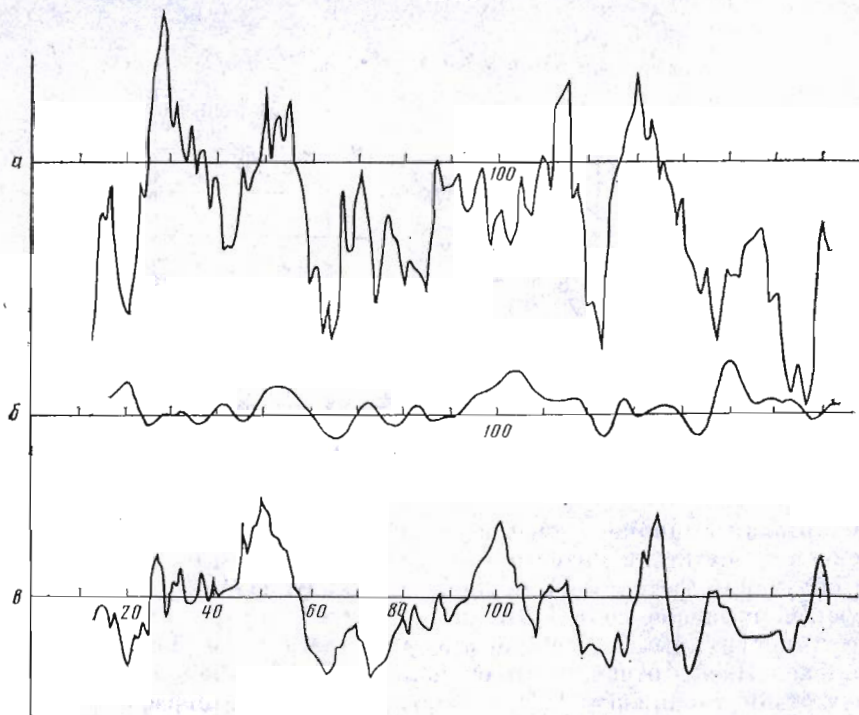
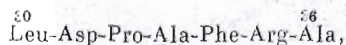


Рис. 1. Профили В-антигенности [4] (а), гибкости [5] (б), относительной гидрофильности [2] (в) preS-области белка оболочки вируса гепатита В (субтип ауw)

Конъюгат пептида с бычьим сывороточным альбумином, полученный с помощью глутарового альдегида [8], использовали для иммунизации лабораторных мышей. Иммунизация приводила к индукции специфических антипептидных антител, что было определено методом твердофазного иммуноферментного анализа [9]. Была показана также возможность использования конъюгата пептида 24—41 для выявления антител в сыворотках крови больных гепатитом В в остром периоде заболевания. Синтез и иммунохимические свойства пептида 24—41 подробно описаны в предыдущем сообщении [7]. Пептид 24—41 и его конъюгат с BSA взаимодействовали с моноклональными антителами к preS1-области [10]*. На основании этих результатов был сделан вывод о том, что фрагмент preS1-(24—41) содержит аминокислотную последовательность, участвующую в организации антигенной детерминанты preS1-области.

Пептид 24—41 не обладает повышенной подвижностью (рис. 1) и имеет сравнительно упорядоченную пространственную структуру. Наиболее интересным ее элементом нам представляется фрагмент 30—36, образующий α -спираль с наклоняющимся на нее β -поворотом

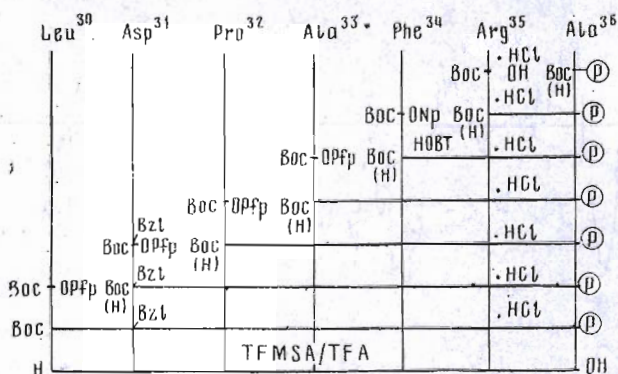


Такое наложение структур, исходя из литературных данных [11], характерно для потенциальной антигенной детерминанты. Наличие на N- и C-конце этого участка аминокислот, имеющих противоположно заряженные ионогенные боковые функции (Asp-31 и Arg-35), может способствовать стабилизации β -изгиба.

Пептид 30—36 и пептиды, описанные далее в этой статье, были синтезированы на твердой фазе в соответствии с методологией, предложенной в работе [7] (схема 1).

* Моноклональные антитела 18/7 к preS1-области любезно предоставлены доктором В. Г. Герлихом (ФРГ, Геттингенский университет).

Схема 1



Синтез пептида preS1-(30—36)

Здесь и в схемах 2 и 3 Р — тефлон с радиационно привитым полистиролом

Стартовая аминокислота присоединялась к хлорметилированному носителю в присутствии иодистого натрия как катализатора и триэтиламина при облучении фотолампой мощностью 500 Вт [12] или в виде соответствующей цезиевой соли [13].

α -Аминогруппы деблокировали 50% раствором TFA в хлористом метиле. После отщепления от полимера действием TFMSA в TFA в присутствии тиоанизола [14] и очистки гель-хроматографией выход пептида preS1-(30—36) в расчете на исходное содержание аланина в полимере составил 28% (таблица).

Характеристики синтезированных пептидов

Пептид preS1	Выход, %	Аминокислотный анализ	ВЭЖХ t, мин (условия)	ТСХ R _f (система)	$[\alpha]_D^{20}$, град (с, H ₂ O)	N-конц. амино- кислота	Содержание пептида в конъюгате, моль/моль BSA (методика конъюгации)
30—36	28	Asp (1) 0,9 Ala (2) 1,96 Leu (1) 1,3 Phe (1) 1,0 Arg (1) 0,84 Pro (1) 0,95	22,3(1)	0,17 (А) 0,47 (Б) 0,7 (В)	-62,0 (с 0,5)	Leu	(I) 7
30—36-Cys(Acm)	15	Asp (1) 0,99 Pro (1) 1,01 Ala (2) 1,96 Leu (1) 1,0 Phe (1) 0,87 Arg (1) 0,88	26,8(2)	0,35 (Д)	-48,5 (с 0,2)	Leu	(II) 29
31—36-Cys(Acm)	28	Asp (1) 0,89 Ala (2) 2,29 Phe (1) 0,9 Arg (1) 1,0 Pro (1) 0,97	27,6(2)	0,59 (Г) 0,22 (Д)	-109,09 (с 0,33)	Asp	(III) * 27
24—30-Cys(Acm)	15	Asp (1) 0,91 Glu (1) 1,19 Leu (1) 1,0 Phe (2) 1,6 His (1) 0,97 Pro (1) 0,87	30,8(2)	0,77 (Г)	-48,6 (с 0,2)		(III) 20

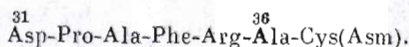
* В качестве белка-носителя использован КЛН.

Конъюгат пептида 30—36 с BSA был получен с применением глутарового альдегида [8]. При исследовании его иммунохимических свойств методом твердофазного иммуноферментного анализа было показано, что он взаимодействует с теми же сыворотками больных острым гепатитом В, с которыми реагирует конъюгат пептида 24—41 [7]. Для контрольных опытов использовали сыворотки здоровых лиц и сыворотки больных гепатитом А, которые не взаимодействовали с конъюгатами указанных пептидов. Кроме того, пептид 30—36 и его конъюгат реагировали с моноклональными антителами 18/7 к preS1-области.

Для повышения селективности процесса связывания пептида с белковым носителем был синтезирован пептид 30—36 с С-концевым остатком цистеина, защищенного по сульфгидрильной функции ацетамидометильной группой, которая сохраняется в условиях синтеза и отщепления пептида от полимера, а отщепляется солями двухвалентной ртути [15].

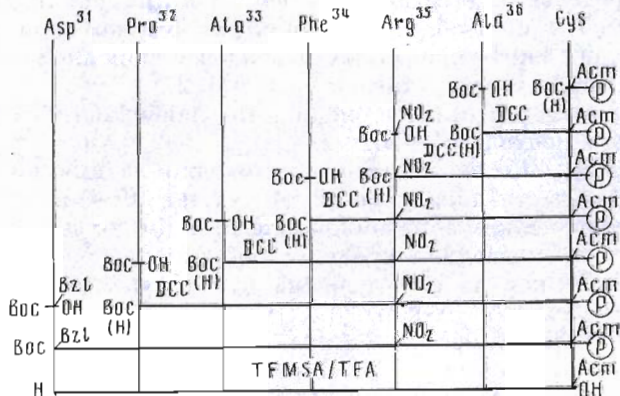
Выход пептида preS1-(30—36)-Cys(Asm) после отщепления от полимера и очистки составил 15% (таблица). Пептид и его конъюгат с BSA, полученный с помощью N-оксисукцинимидного эфира 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты (SPDP) [15], также взаимодействовали с моноклональными антителами к preS1-области. Методика конъюгации через S—S-мостик была использована и с другими пептидами.

Дополнительный расчет вторичной структуры по программе [6] пептида 30—36, вычлененного из состава фрагмента 24—41, подтвердил наличие устойчивого β-поворота в центре этого фрагмента. При этом предсказано, что остаток Leu-30 не участвует в организации β-поворота. Для подтверждения несущественности этого аминокислотного остатка в биологическом функционировании был синтезирован пептид, соответствующий аминокислотной последовательности 31—36 preS1-области с остатком Cys на С-конце (схема 2)



Выход пептида составил 28%.

Схема 2



Синтез пептида preS1-(31—36)-Cys(Asm)

Синтетический пептид и его конъюгат взаимодействовали с моноклональными антителами к preS1-области. По-видимому, остаток Leu-30 действительно не играет важной роли в организации структуры антигенной детерминанты preS1-области.

Фрагмент preS1-(24—30) интересен тем, что он соответствует максимальному значению В-антигенности, предсказанной программой [4]. Синтез этого пептида представлен на схеме 3. Выход пептида составил 15%.

При исследовании синтетического пептида preS1-(24—30)-Cys(Asm) и его конъюгата в реакции с моноклональными антителами и сыворотками крови больных гепатитом В в остром периоде заболевания не было получено положительных результатов.

	F F P D N Q L D P A F R A N T A N P	
25-30	F P D N Q L	0,005
26-31	P D N Q L D	0,031
27-32	D N Q L D P	0,008
28-33	H Q L D P A	0,022
29-34	Q L D P A F	0,041
30-35	L D P A F R	0,065
31-36	D P A F R A	0,166
32-37	P A F R A N	0,103
33-38	A F R A N T	0,041
34-39	F R A N T A	0,010
35-40	R A N T A N	0,000
36-41	A N T A N P	0,023

Рис. 2. Результаты иммуноферментного анализа взаимодействия пептидов, полученных методом картирования участка 25—41 preS1-области, с моноклональными антителами 18/7 к preS1-полипептиду

ВЭЖХ пептидов проводили на приборе фирмы Du Pont (США) на колонке $3,2 \times 250$ мм с носителем μ -Bondapak C18 10 мкм. Элюировали в условиях: 1) 0,1% TFA — 0,1% TFA в 80% ацетонитриле, 2) 0,1% TFA — 0,1% TFA в 80% метаноле, детекция при 220 нм, скорость потока 1 мл/мин.

ТСХ пептидов осуществляли на пластинках Silufol UV 254 (Чехо-Словакия) в системах растворителей: бутанол-1 — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5, верхняя фаза (А); бутанол-1 — пропанол-2 — 12% аммиак — этилацетат, 2 : 2 : 5 : 2 (Б); пропанол-2 — 25% аммиак — вода, 6 : 3 : 1 (В); пропанол-2 — 25% аммиак — вода, 14 : 5 : 1 (Г); бутанол-1 — пиридин — уксусная кислота — вода, 5 : 5 : 1 : 4 (Д).

Вещества на пластинках обнаруживали нингидрином, хлор-толидиновым реагентом и в ультрафиолетовом свете.

Аминокислотный состав пептидов определяли на анализаторах Biotronic (ФРГ) и Hitachi (Япония). Кислотный гидролиз проводили 2 ч при 140° С или 24 ч при 110° С.

Удельное оптическое вращение пептидов измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 241 mc (Швеция).

N-Концевые аминокислоты в пептидах определяли дансильным методом [22].

Присоединение стартовой аминокислоты к хлорметилированному носителю

1. К 1 г хлорметилированного полимера (0,4 ммоль Cl) [23], суспендированного в 5 мл DMF, прибавляли 0,9 ммоль Вос-аминокислоты, 0,14 мл (0,9 ммоль) триэтиламина, 75 мг (0,5 ммоль) иодистого натрия [12]. Смесь выдерживали 4 ч при перемешивании и температуре 40—50° С, которую регулировали освещением реакционной смеси фотолампой мощностью 500 Вт. Полимер отфильтровывали, промывали DMF трижды, этанолом трижды, водой трижды, этанолом, эфиром трижды, гексаном, сушили в вакууме.

2. К 2,5 г хлорметилированного носителя (1 ммоль хлора) [23] прибавляли раствор 1,73 ммоль цезиевой соли Вос-аминокислоты в 4 мл DMF [13]. Перемешивали 1,5 ч при 40° С и оставляли на 60 ч при 20° С. Аминоацилполимер отфильтровывали, промывали DMF трижды, смесью DMF — вода (1 : 1) дважды, хлороформом дважды, метанолом, эфиром, сушили в вакууме.

Нагрузку стартовой аминокислоты на полимер определяли по данным количественного аминокислотного анализа.

Для замещения непрореагировавшего хлора к 2,5 г аминоацилполимера (0,58 ммоль Cl) прибавляли раствор 0,56 г (2,9 ммоль) ацетата цезия [24] в 7 мл DMF. Перемешивали 1,5 ч при 40° С и оставляли на 15 ч при 20° С. Полимер отфильтровывали и промывали, как указано выше. Найдено 0,39% Cl.

Стандартный цикл пептидной конденсации на полимере включает следующие стадии: 1) промывку хлористым метиленом (2 × 3 мин), 2) обработку 50% раствором TFA в хлористом метиле (5 + 25 мин), 3) промывку хлористым метиленом (3 × 3 мин), 4) обработку 10% раствором EDIPA в хлористом метиле (5 + 10 мин), 5) промывку хлористым метиленом (2 × 3 мин), 6) промывку DMF (2 × 3 мин), 7) конденсацию с трехкратным избытком карбоксильного компонента, 8) промывку DMF, хлороформом, метанолом, хлороформом, эфиром, 9) ацилирование непрореагировавших аминогрупп 20% раствором уксусного ангидрида в пиридине, раствором уксусного ангидрида и триэтиламина в DMF, раствором 5-кратного по отношению к остаточным аминогруппам избытка *n*-нитрофенилацетата в DMF в течение 1 ч или повторное проведение конденсации. Объем однократной промывки пептидилполимера 5 мл. Конденсации проводили в минимальном объеме DMF или хлористого метилена методом активированных эфиров или симметричных ангидридов.

Отщепление пептидов от полимерного носителя с использованием TFMSA [14]. Пептидилполимер (1 г) суспендировали в 9,5 мл TFA, прибавляли 1,2 мл тиаоанизола и 1,2 мл TFMSA и перемешивали 30 мин при 0° С и 1 ч при 20° С. Смолу отфильтровывали, промывали TFA (3 × 5 мл). К фильтрату прибавляли 50 мл сухого эфира, выдерживали 2 ч при -5° С. Осадок отделяли, промывали несколькими порциями эфира (всего 100 мл), сушили в вакууме.

Пептиды очищали гель-хроматографией на колонке (2,6 × 50 см) с сефадексом G-10 в 10% уксусной кислоте. Пептид 30—36-Cys(Acm) был дополнительно очищен полупрепаративной ВЭЖХ (Silasorb C18 10 × × 125,2 мм в условиях опыта 2, скорость потока 4 мл/мин).

Для удаления Acm-защитной группы SH-функции цистеина 10 мкмоль пептида растворяли в 1 мл дегазированной 50% уксусной кислоты и добавляли 50 мкл свежеприготовленного водного 1 М раствора ацетата ртути(II) [15]. Выдерживали 2 ч при 20° С и смесь насыщали газообразным сероводородом. Осадок HgS отделяли центрифугированием, промывали 1 мл дегазированной воды. Раствор упаривали в вакууме, к остатку добавляли воду и упаривали до удаления следов сероводорода. Полученное вещество немедленно использовали для конъюгирования.

BSA, активированный SPDP (BSA-SPDP), получали следующим образом [15]: к раствору 50 мг BSA в 1,2 мл 0,1 М *N*-метилморфолинацетатного буфера (pH 7,3) при перемешивании добавляли порциями по 0,1 мл раствор 20 мг SPDP в 0,6 мл тетрагидрофурана. Выдерживали 2 ч при 18° С, удаляли тетрагидрофуран на ротонном испарителе и остаток диализовали против 0,03% водного аммиака и лиофилизовали.

Методы конъюгирования пептидов с белковыми носителями

I. К 5,5 мг BSA, растворенного в 0,6 мл буферного раствора (PBS), содержащего 8,1 mM Na₂HPO₄, 0,01 М азид натрия, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,138 М NaCl (pH 7,2), прибавляли 4,5 мг пептида. К раствору добавляли 200 мкл 20 mM водного раствора глутарового альдегида. Перемешивали 20 ч при 20° С. По окончании реакции смесь диализовали против воды, содержащей 0,03% аммиака, и лиофилизовали [8].

II. Через раствор 15 мг BSA-SPDP (7,5 мкмоль 2-пиридилтиогрупп), в 5 мл 7 М водного раствора мочевины, барботировали аргон, затем добавляли раствор 10 мкмоль пептида со свободной SH-группой в 0,5 мл 50% раствора уксусной кислоты [15]. Смесь перемешивали 16 ч при 18° С. За ходом реакции следили спектрофотометрически по накоплению в растворе

2-тиопиридона. По окончании реакции смесь диализовали против воды, содержащей 0,03% аммиака, и лиофилизовали.

III. К 4 мг BSA или KLH, растворенного в 0,25 мл 10 mM Na-фосфатного буфера (pH 7,2), прибавляли по каплям раствор 0,7 мг MBS, растворенного в минимальном объеме DMF, и перемешивали 30 мин при 20° С. Продукт реакции — белок, активированный MBS, — очищали от несвязавшегося MBS на сефадексе G-25, уравнивающим 50 mM Na-фосфатным буфером (pH 6,0). Активированный носитель затем вводили в реакцию с 5 мг пептида со свободной SH-группой, растворенного в 1 мл фосфатного буфера (pH 7,5). Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 20° С. Смесь диализовали против воды, содержащей 0,03% аммиака или триэтиламина, и лиофилизовали [25].

Эпитопное картирование

Для синтеза пептидов, используемых для эпитопного картирования участка 25—41, использовали коммерческий набор производства фирмы Cambridge Research Biochemicals (Англия), позволяющий одновременно вести синтез 96 пента-, гексапептидов на полипропиленовых шариках диаметром 3,7 мм с радиационно привитыми «якорными» группировками, содержащими свободный амин в концентрации 150—300 нмоль на шарик, в полипропиленовом 96-луночном планшете, используя для синтеза Fmoc-стратегию. Боковые функциональные группы защищали трет-бутильной защитой (Asp, Thr), Boc- (His), Mtr- (Arg) группами.

Стандартный цикл пептидной конденсации при эпитопном картировании включает следующие стадии [16, 17]: 1) обработку 20% раствором пиперидина в DMF (30 мин), 2) промывку DMF (1 × 5 мин), 3) промывку метанолом (4 × 2 мин), 4) высушивание на воздухе (10—15 мин), 5) промывку DMF (1 × 5 мин), 6) добавление растворов Pfr-эфиров Fmoc-аминокислот и НОВТ и реакции конденсации (18 ч), 7) промывку DMF (1 × 2 мин), 8) промывку метанолом (4 × 2 мин), 9) высушивание (10—20 мин), 10) ацетилирование смесью DMF — уксусный ангидрид — EDIPA, 50 : 5 : 1 (90 мин), 11) промывку DMF (1 × 2 мин), 12) промывку метанолом (4 × 2 мин), 13) высушивание (10—20 мин).

При реакциях конденсации применяют 30 mM растворы активированных эфиров Fmoc-аминокислот (120 мкл 30 mM раствора на лунку планшета).

Промывки пептидилполимеров проводили в бане из полипропилена, погружая стержни на глубину 1 см.

Для снятия защит боковых функциональных групп пептидилполимеры, укрепленные на блоке-держателе, одновременно обрабатывали 4 ч при 20° С, в бане из полипропилена смесью TFA — тиоанисол, 95 : 5, и затем последовательно промывали дихлорметаном (2 × 2 мин), 5% раствором EDIPA в дихлорметане (2 × 5 мин), дихлорметаном (1 × 5 мин), высушивали на воздухе (более 10 мин), промывали водой (1 × 2 мин), метанолом (1 × 18 ч). Сушили в вакууме над силикагелем.

Метод твердофазного иммуноферментного анализа для пептидного картирования [16, 17]. Полипропиленовые стержни-носители с присоединенными к ним пептидами помещали в лунки 96-луночного планшета (Linbro) с суперкоктейлем (фосфатно-солевой буфер, pH 7,2, содержащий 1% овальбумина, 1% BSA, 0,1% твин-20) (200 мкл на лунку) и инкубировали 1 ч при 20° С при встряхивании для блокирования центров неспецифического связывания. Затем пептидилполимеры в планшете инкубировали в течение ночи при -4° С с моноклональными антителами 18/7, взятыми в разведении 1/1000 в суперкоктейле, содержащем 0,05% азида натрия (175 мкл на лунку).

Пептидилполимеры отмывали (4 × 10 мин) в бане, содержащей 0,1% твин-20 в фосфатно-солевом буфере. Затем в лунки планшета наносили антитела, полученные против иммуноглобулинов мышей, меченные пероксидазой. Инкубировали 1 ч при 20° С, затем планшет отмывали. Для проявления ферментативной активности добавляли субстрат — ABTS в цитрат-

ном буфере в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали 30 мин в темноте при встряхивании. Реакцию останавливали удалением стержней-носителей из планшета, оптическое поглощение регистрировали на приборе Multiscan (Titertec) при длине волны 405 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neurath A. R., Kent S. B. H., Strick N. // J. gen. Virol. 1986. V. 67. № 2. P. 453—461.
2. Hopp T. P., Woods K. P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824—3828.
3. Kyte J., Doolittle R. F. // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. P. 105—132.
4. Welling G. W., Weijer W. J., Van der Zee R., Welling-Wester S. // FEBS Lett. 1985. V. 188. N 2. P. 215—218.
5. Karplus P. A., Schulze G. E. // Naturwiss. 1985. B. 72. № 4. S. 212—213.
6. Ptitsyn O. B., Finkelstein A. V. // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 15—25.
7. Евстигнеева Р. П., Желтухина Г. А., Прокуронова Е. И., Смирнов В. Д., Семилетов Ю. А., Калинина Т. И., Худяков Ю. Е., Хромов И. С., Фасоров М. О., Яшина Т. Л. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 1. С. 34—40.
8. Mariani M., Bracci L., Presentini R., Nucci P., Neri P., Antoni G. // Mol. Immunol. 1987. V. 8. P. 871—874.
9. Иммуноферментный анализ // Ред. Нго Т. Т., Ленхофф Г. М. М.: Мир, 1988. 444 с.
10. Pontisso P., Rivoletto M. G., Gerlich W. G., Heermann K.-H., Bardini R., Alberti A. // Virology. 1989. V. 173. P. 522—530.
11. Мертвцов Н. П., Беклемишев А. Б., Савич И. М. Современные подходы к конструированию молекулярных вакцин. Новосибирск: Наука, 1987. 208 с.
12. Даванков В. А., Рогожин С. В., Коршак В. В., Цюрюпа М. П. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1967. Т. 17. № 7. С. 1612.
13. Gisin V. F. // Helv. chim. acta. 1973. V. 56. № 5. P. 1476—1482.
14. Toida I., Yamamoto S., Takuma S., Suzuki T., Hirata H. // Infection and Immunity. 1985. № 12. P. 614—619.
15. Самуков В. В., Калашиников В. В., Офицеров В. И., Швалье А. Ф. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1037—1047.
16. Geysen H. M., Meloen R. H., Barteling S. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 3998.
17. Geysen H. M., Barteling S. J., Meloen R. H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 178.
18. Калинина Т. И., Худяков Ю. Е., Макеева И. В., Кадошников Ю. П., Смирнов В. Д. // Итоги науки и техники. Сер. вирусология. Т. 22. Вирусные гепатиты. Материалы международного симпозиума. Ростов. 3—8 сент. 1990. С. 51.
19. Khudyakov Y. E., Kalinina T. I., Makeeva I. V., Samoshin V. V., Semiletov Y. A. // VIIIth International Congress of Virology. Abstracts. Berlin. August 26—31. 1990. P. 349.
20. Сидорова М. В., Желтухина Г. А., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П. // Журн. орган. химии. 1986. Т. 56. Вып. 6. С. 1405—1412.
21. Kaiser E., Colescott R. L., Rossinger C. D., Cook P. J. // Anal. Biochem. 1970. V. 34. № 2. P. 595—598.
22. Дэвени Т., Гергей Я. // Аминокислоты. Пептиды. Белки / Ред. Незлин Р. С. М.: Мир, 1976. 364 с.
23. Янг Дж., Стюарт Дж. // Твердофазный синтез пептидов / Ред. Швачкин Ю. П. М.: Мир, 1971. 176 с.
24. Желтухина Г. А., Сидорова М. В., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П. // Журн. орган. химии. 1977. Т. 47. № 5. С. 1208.
25. Green N., Alexander H., Olson A., Alexander S., Shinnick T. M., Sutcliffe I. G., Lerner R. // Cell. 1982. V. 28. № 3. P. 477—487.

Поступила в редакцию
3.IV.1991

E. I. PROCURONOVA, I. N. KHLEBNIKOVA, G. A. ZHELTUKHINA, R. P. EVSTIGNEEVA,
Yu. A. SEMILETOV *, V. A. KARPOVA *, T. I. KALININA *, Yu. E. KHUDYAKOV *,
R. P. PAVLUCHENKOVA *, V. D. SMIRNOV *

**SYNTHESIS OF PEPTIDES AND LOCALIZATION OF THE ANTIGENIC
DETERMINANT OF THE HEPATITIS B ENVELOPE preS1-PROTEIN**

M. V. Lomonosov Institute of Chemical Technology, Moscow;

** D. I. Ivanovskii Institute of Virology, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow*

We synthesized the 24-41, 30-36, 31-36, 24-30 fragments of the preS1-region of the hepatitis B (subtype ayw) envelope. The peptides were prepared by the solid phase synthesis on perfluoropolyethylene polymer grafted with polystyrene. The peptide chains were elongated from C-terminus using activated esters and symmetrical anhydrides of Boc-amino acids, cleaved off the solid phase by HBr or TFMSA in TFA, purified by gel filtration, and, after conjugation with protein carriers, inoculated into test animals. The resultant antibodies were shown to react with peptides. The blood sera from patients with acute hepatitis B reacted with the conjugates of peptides 24-41, 30-36, 31-36 in the immunoenzymic solid phase assay. The monoclonal antibodies for the preS1-polypeptide were shown to react with peptides 24-41, 30-36, 31-36 and with their conjugates. The results obtained were proved by the data of the epitope-mapping with overlapping hexapeptides.