



УДК 578.891.083.3:577:112.6

© 1994 Ю. А. Семилетов, В. А. Карпова,  
Т. И. Калинина, Ю. Е. Худяков

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ ИММУНОДОМИНАНТНОГО САЙТА В СОСТАВЕ КОРОВОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

*НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва*

Ключевые слова: пептиды, синтетические; антигенные детерминанты, вирус гепатита В.

На основании теоретического анализа вторичной структуры и гидропатического профиля корового антигена вируса гепатита В (НВсAg) выявлен участок 73—89, предположительно содержащий антигенную детерминанту. Проведено эпитопное картирование последовательности 73—89 НВсAg с использованием перекрывающихся гексапептидов, полученных пин-технологией, и пептидов, синтезированных твердофазным способом. Пептиды синтезированы в двух вариантах, различающихся аминокислотными остатками в положении 80 (Ala, Ile). Пептиды и их конъюгаты с BSA тестировались на антигенность методом твердофазного ИФА. Показано, что фрагмент 78—83 — наименьший участок корового антигена, способный связывать антитела из сывороток крови больных гепатитом В.

Вирус гепатита В (HBV), прототипный член семейства гепатотропных ДНК-содержащих вирусов животных (обзор [1]), — этиологический агент тяжелого и распространенного заболевания. Для успешной борьбы с вирусным гепатитом В необходимо широкое внедрение иммунодиагностических тестов для выявления антигенов HBV и соответствующих антител. В клинических и эпидемиологических исследованиях заболевания весьма ценными маркерами служат антитела классов IgG и IgM против корового антигена вируса, причем анти-НВс-антитела класса IgM представляют собой самый ранний и надежный маркер острой инфекции HBV [2].

Свойства НВсAg проявляет внутренний нуклеокапсид HBV (кор), несущий в своем составе геномную ДНК и эндогенную ДНК-полимеразу, в то время как

---

Использованные сокращения: HBV — вирус гепатита В; НВсAg — коровый антиген вируса гепатита В; НВеAg — е-антиген вируса гепатита В; АВТС — азинобис(3-этилбензтиазолин)сульфонат; Асп — ацетамидометил; BSA — бычий сывороточный альбумин; EDIPA — этилдиизопропиламин; НОВТ — 1-гидроксibenзотриазол; МВНА — 4-метилбензгидриламин; Мг — 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил; МБС — N-оксисукцинимидный эфир 3-малеинимидобензойной кислоты; Pfr — пентафторфенил; ТFMCA — трифторметансульфокислота; ТФС — твердофазный синтез.

Адрес для переписки: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16. НИИ вирусологии.

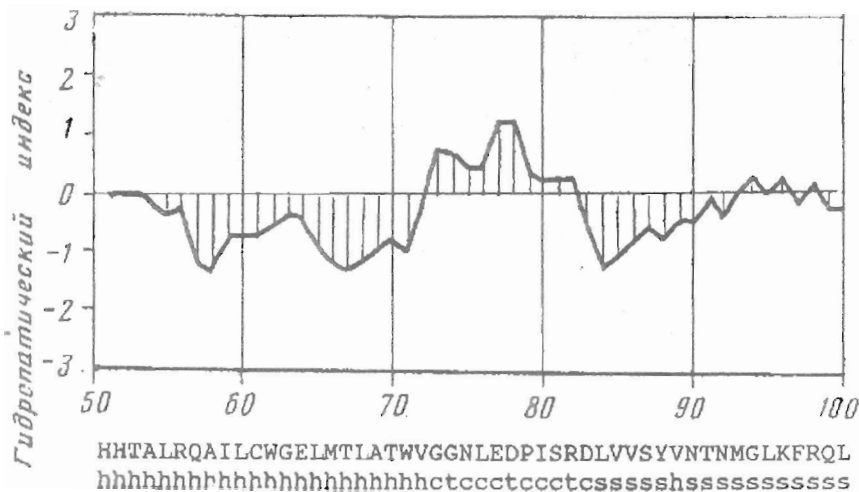


Рис. 1. Гидропатический профиль фрагмента 51—100 НВсАг [9]. Приведены аминокислотная последовательность и сведения о вероятных элементах вторичной структуры фрагмента [10, 11]. h —  $\alpha$ -спираль, s —  $\beta$ -складчатая структура, t —  $\beta$ -поворот, — — неупорядоченный клубок

наружная оболочка вирусной частицы содержит детерминанты поверхностного антигена НВсАг, определяющего принадлежность НВУ к тому или иному субтипу adw, ауw (наиболее распространенный субтип на территории бывшего СССР), adg, ауg. Структурной основой кора является белок, содержащий в зависимости от субтипа от 183 до 185 аминокислотных остатков [3]. Под действием протеолитических ферментов, 2-меркаптоэтанола или додецилсульфата натрия молекула НВсАг изменяется таким образом, что начинает проявлять свойства, присущие е-антигену (НВеАг) — третьей известной антигенной системе НВУ [4].

Полагают, что НВсАг имеет один основной конформационный иммунодоминантный эпитоп [5], чувствительный к действию денатурирующих агентов [4]. И хотя с помощью моноклональных антител в районе 80-го аминокислотного остатка НВсАг выявлена линейная антигенная детерминанта [6], она, по-видимому, лишь часть основного конформационного эпитопа [7]. Аминокислотная последовательность НВсАг вариабельна и может содержать в позиции 80 субтипа ауw остаток Ala [6] или Ile [8].

В настоящее время неизвестна точная локализация линейного фрагмента, участвующего во взаимодействии с анти-кор-антителами. Целью данного исследования являлась идентификация и анализ структурной организации минимального антигенно-активного фрагмента белка нуклеокапсида НВУ, способного хорошо связывать антитела из сывороток крови больных гепатитом В.

Исследование включало три основных этапа: 1) теоретический анализ расположения антигенно-активных участков НВсАг; 2) синтез пептидов из состава выбранного фрагмента; 3) изучение антигенных свойств синтезированных пептидов.

Из анализа гидропатического профиля аминокислотной последовательности НВсАг и данных расчета его вторичной структуры, полученных с использованием компьютерных программ [9—11], ясно, что участок между 73-м и 84-м аминокислотными остатками обладает характерными признаками потенциальной антигенной детерминанты (рис. 1). Этот участок с повышенной гидрофильностью неструктурирован, расположен между двумя протяженными структурированными участками, содержит с большой степенью вероятности  $\beta$ -изгибы, несет в своем составе остатки положительно и отрицательно заряженных аминокислот. Параллельно, в подтверждение наших расчетов, Салфелдом и соавт. [6] было показано, что синтезированный в *E. coli* гибридный белок, содержащий фрагмент 74—89 НВсАг, взаимодействует с одним из клонов моноклональных анти-НВс-антител.

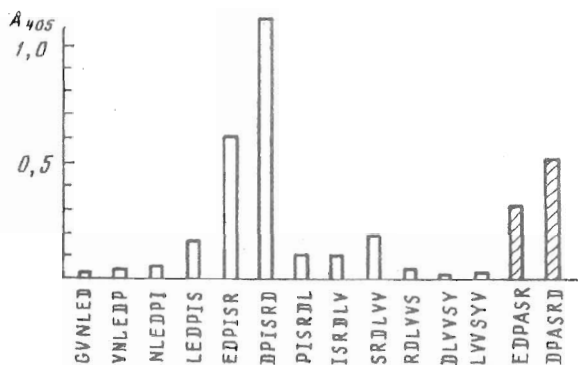


Рис. 2. Результаты ИФА взаимодействия пептидов, полученных методом эпипептного картирования участка 73—89 НВсАg, с кроличьими анти-кор-антителами. Светлые столбики соответствуют гексапептидам из аминокислотной последовательности 73—89 НВсАg [8], заштрихованные — гексапептидам, в которых остаток Ile заменен на Ala

Для более точной локализации антигенной детерминанты на участке 73—89 НВсАg был применен метод эпипептного картирования с использованием пин-технологии [12, 13], позволяющий проводить одновременно синтез десятков и даже сотен различных коротких пептидов для ИФА. Наиболее привлекательный вариант метода — получение набора гекса- и октапептидов со сдвигом на один аминокислотный остаток, позволяющий «сканировать» белковые последовательности в поисках последовательных эпитопов.

Методическую основу способа составляет проведение ТФС на индивидуальных инертных носителях (пинах), содержащих на поверхности радиационно привитые функционально активные аминоацильные группы, и последующее тестирование пептидов на антигенность с различными антисыворотками. Началу синтеза предшествует компьютерный расчет последовательности пептидов и схемы синтеза. Завершает работу компьютерный анализ полученных данных и результатов исследования в числовой и графической форме, что обеспечивается с помощью специально разработанных прикладных программ. В ходе синтеза пины, закрепленные на специальном держателе, вводятся в лунки планшета, которые содержат в соответствии с программой синтеза растворы активированных по карбонилу N-защищенных аминокислот. Планшеты, изготовленные из инертного материала (полипропилен), по размерам соответствуют стандартным 96-луночным планшетам для ИФА. Процесс ведется без применения специальных средств защиты от воздействия факторов окружающей среды, тем не менее эффективность конденсации вполне достаточна для получения гекса- и октапептидов, способных специфически связываться с антителами против секвенционных антигенных детерминант белка. В отличие от традиционных вариантов ТФС в конце опыта после удаления всех защитных групп пептиды остаются закрепленными на пинах и многократно используются в ИФА без очистки.

Нами одновременно были синтезированы 12 перекрывающихся гексапептидов, охватывающих 17-членную аминокислотную последовательность 73—89 (GGNLEDPISRDLVVS YV) НВсАg (рис. 2, светлые столбики). В этом же опыте были получены два гексапептида (рис. 2, заштрихованные столбики), в которых остаток Ile был заменен на остаток Ala, также встречающийся в геномных последовательностях природного НВсАg. Синтезированные на пинах пептиды тестировались на антигенность методом твердофазного ИФА с кроличьей антисывороткой, полученной ранее на генно-инженерный белок кора [14], содержащий в положении 80 остаток Ile. Из полученных результатов ИФА (рис. 2) видно, что участок, узнаваемый кроличьими анти-НВс-антителами, включает аминокислотные остатки с 77-го по 83-й. Максимальное взаимодействие наблюдалось для гексапептида DPISRD. Гексапептид DPASRD взаимодействовал слабее.

Далее мы решили подтвердить полученные результаты о локализации иммунодоминантного сайта в составе НВсAg с помощью пептидов, полученных традиционными методами ТФС, а также проверить, насколько усиливается взаимодействие пептидов с антителами в зависимости от увеличения длины пептидной цепи. Для этого был осуществлен синтез серии пептидов, заключающих в своей последовательности антигенно-активный фрагмент 78—83. Полученные пептиды (73—84)-Cys(Acm), (74—89)-Cys(Acm), (78—83)-Cys(Acm), (78—83)\*-Cys(Acm), (77—83)-NH<sub>2</sub>, (77—83)\*-NH<sub>2</sub>, (78—83)-NH<sub>2</sub> и (78—83)\*-NH<sub>2</sub> содержали в положении 80 остаток Ala или Ile (отмечены звездочкой). Дополнительную С-концевую аминокислоту Cys(Acm) вводили в пептиды для их конъюгации с белком-носителем (BSA) через сульфгидрильную группу Cys. Часть пептидов синтезировали в виде амидов для применения в ИФА в свободном состоянии. Амиды пептидов лучше имитируют соответствующие участки белковой последовательности, а отсутствие отрицательного заряда на С-конце молекулы усиливает их сорбционную способность, что особенно важно при использовании в твердофазном ИФА в качестве антигенов коротких пептидов. Пептиды, содержащие остаток Cys(Acm), были синтезированы на твердой фазе вручную с использованием Вос/Vzl-стратегии в соответствии с методикой, предложенной в работе [15]. Пептидную цепь наращивали ступенчато с С-конца с применением в основном метода симметричных ангидридов. Остаток Вос—Asn вводили в конденсацию методом активированных эфиров. Полноту прохождения реакций конденсации контролировали с помощью нингидринового теста. Отщепление всех синтезированных пептидов от полимера проводили действием 1 М раствора TFMSA в TFA в присутствии тиоанизола с последующей очисткой гель-хроматографией. Образцы пептидов, предназначенные для анализа и исследований, дополнительно очищали полупрепаративной ВЭЖХ.

Амиды пептидов синтезировали с использованием Fmoc/*трет*-бутил-стратегии [16] вручную. Для конечного деблокирования пептидов использовали TFA с добавлением тиоанизола, этандиола и анизола в соотношении 90 : 5 : 3 : 2 [17]. Очистку пептидов проводили полупрепаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте водного ацетонитрила. Выход пептидов по Fmoc-схеме в расчете на первую аминокислоту составил 65—70%, тогда как при использовании Вос-схемы синтеза выход пептидов колебался от 18 до 30%. Низкие выходы в последнем случае можно частично объяснить неполным восстановлением нитрогруппы, использованной нами для защиты гуанидиновой группы Arg, под действием TFMSA, которая, хотя и является хорошим реагентом для конечного расщепления бензильных производных [18], не всегда полностью может заменить жидкий фтористый водород. После выделения и очистки все пептиды были охарактеризованы с использованием ТСХ, ВЭЖХ, количественного аминокислотного анализа и определения удельных углов оптического вращения (табл. 1).

Для проведения иммунологических исследований применялись как свободные пептиды, так и их конъюгаты с BSA (в случае пептидов, содержащих остаток Cys). Конъюгаты получали с помощью MBS по реакции между SH-группой пептида и NH<sub>2</sub>-группами белка [19]. Степень конъюгации, определенная количественным аминокислотным анализом, составляла 10—15 молекул пептида на молекулу BSA.

Методом твердофазного ИФА было показано, что все синтезированные пептиды, в том числе амиды гексапептидов DPISRД и DPASRD, а также конъюгаты пептидов с BSA взаимодействовали с кроличьей антисывороткой, полученной против генно-инженерного корового белка [14], и не взаимодействуют с нормальной кроличьей сывороткой. В качестве положительного контроля использовали рекомбинантный коровый антиген, отрицательным контролем служил BSA. Эти результаты хорошо согласуются и подтверждают данные эпитопного картирования, показывающие, что гексапептид 78—83 является наименьшим участком корового антигена, способным связывать кроличьи анти-жор-антитела.

Иммунизация белых нелинейных мышей конъюгатом пептида 73—84 с BSA приводила к индукции специфических антипептидных антител с титром



Характеристика синтезированных пептидов

Пептид	$[\alpha]_D^{20}$ , град	Концентрация, растворитель	$R_f$ (ТСХ)	$t$ , мин (условия ВЭЖХ *)	Аминокислотный анализ**	Выход, % ***
(73—84)-Cys(Acm)	-61,5	0,3; 10% AcOH	0,65	15,2 (a)	D 2,95(3) S 0,97(1) E 1,10(1) P 0,99(1) G 0,96(1) A 1,00(1) V 0,89(1) L 2,10(2) R 0,90(1)	31
(74—89)-Cys(Acm)	-75,0	0,5; 10% AcOH	0,62	9,6 (б)	D 3,01(3) S 2,05(2) E 1,03(1) P 1,00(1) G 0,95(1) A 1,02(1) V 3,97(4) R 0,99(1) Y 1,05(1)	18
(78—83)-Cys(Acm)	-95,0	0,5; 10% AcOH	0,56	11,2 (a)	D 2,09(2) S 0,97(1) P 0,91(1) A 1,00(1) R 0,92(1)	25
(78—83*)-Cys(Acm)	-72,0	0,5; 10% AcOH	0,72	12,6 (a)	D 2,05(2) S 0,96(1) P 1,04(1) I 1,06(1) R 0,97(1)	27
(77—83)-NH <sub>2</sub>	-63,0	1,0; H <sub>2</sub> O	0,27	7,2 (б)	D 2,10(2) S 0,95(1) E 1,03(1) P 0,97(1) A 1,00(1) R 0,94(1)	65
(77—83*)-NH <sub>2</sub>	-56,7	1,0; H <sub>2</sub> O	0,39	7,5 (б)	D 2,08(2) S 0,97(1) E 1,04(1) P 1,02(1) I 1,00(1) R 0,92(1)	71
(78—83)-NH <sub>2</sub>	-73,2	1,0; H <sub>2</sub> O	0,33	5,4 (б)	—	64
(78—83*)-NH <sub>2</sub>	-67,5	1,0; H <sub>2</sub> O	0,54	5,6 (б)	—	68

\* См. «Экспер. часть».

\*\* Содержание остатков Cys количественно не определяли.

\*\*\* Выход приведен для пептидов, очищенных ВЭЖХ, в расчете на стартовую аминокислоту.

Взаимодействие пептидов из состава НВсAg с антителами из сывороток крови больных гепатитом В в непрямом твердофазном ИФА\*

Антиген	Сыворотка больного с анти-кор-АТ**, 1 : 100	Сыворотка больного с анти-е-АТ, 1 : 100
(73—84)-Cys(Acm)	++	++
(73—84)-BSA	+++	+++
(74—89)-Cys(Acm)	++	++
(77—83)*-NH <sub>2</sub>	++	—
(77—83)-NH <sub>2</sub>	++	—
(78—83)*-NH <sub>2</sub>	+++	—
(78—83)-NH <sub>2</sub>	++	—
(78—83)*-BSA	++	—
(78—83)-BSA	++	+
BSA	—	—
core-Ag	+++	+++

\* Приведена оценка результатов по показаниям A<sub>492</sub> в ИФА +++ , A<sub>492</sub> > 1,5; ++, A<sub>492</sub> = 0,5 — 1,5; +, A<sub>492</sub> = 0,11 — 0,49; —, A<sub>492</sub> < 0,1.

\*\* Сыворотки больных с анти-кор- и анти-е-АТ отобраны с помощью коммерческих тест-систем фирмы Abbott (США).

$2 \cdot 10^3$  —  $5 \cdot 10^3$ , что было определено методом ИФА. Полученные на пептид 73—84 антитела взаимодействовали также с рекомбинантным коровым антигеном и пептидами 77—83 и 78—83 независимо от того, содержали они в положении 80 остаток Ala или Ile. Таким образом, на мышах было показано, что пептиду 73—84 присущи свойства как антигена, так и иммуногена, что может быть использовано при создании искусственной вакцины против НВВ.

ИФА сывороток крови больных гепатитом В позволил выявить три анти-кор-позитивные сыворотки, которые взаимодействовали со всеми описываемыми пептидами, причем одна из них не содержала анти-е-антител. Исследовалась также анти-е-позитивная сыворотка, в которой отсутствовали анти-кор-антитела. Сыворотки больных с анти-кор- и (или) анти-е-антителами были отобраны с помощью коммерческих тест-систем фирмы Abbott (США).

В табл. 2 представлены результаты взаимодействия пептидов из состава НВсAg с антителами из сыворотки крови больных с диагнозом гепатит В в непрямом варианте твердофазного ИФА. Исследовались взятые в разведении 1 : 100 сыворотки, содержащие либо анти-кор-антитела, либо антитела против НВсAg (анти-е-антитела).

В качестве позитивного контроля применяли генно-инженерный препарат кор-антигена [14], негативным контролем служили BSA и сыворотки крови здоровых доноров. Взаимодействие каждой сыворотки с каждым пептидом проводилось трехкратно.

Все исследованные пептиды и их конъюгаты с BSA взаимодействовали с сывороткой крови больного, содержащей анти-кор-антитела, тогда как с анти-е-антителами достоверную положительную реакцию демонстрировали пептиды 73—84, 74—89 и конъюгат пептида 73—84 с BSA (табл. 2). Таким образом, анти-е-антитела узнают на этом участке НВсAg более протяженную аминокислотную последовательность по сравнению с анти-кор-антителами, которым для взаимодействия достаточно наличия фрагмента 78—83, содержащего 6 аминокислотных остатков. Минимальная положительная реакция в ИФА между анти-е-антителами и конъюгатом пептида DPASRD, по мнению авторов, — следствие неспецифического взаимодействия и, вероятно, происходит за счет близлежащих

аминокислотных остатков BSA, которые имитируют в данном случае необходимое для взаимодействия удлинение пептидной цепи антигена.

Приведенные результаты хорошо согласуются с данными, полученными недавно Салбергом и соавт. [7], которые методом эпитопного картирования показали, что моноклональные антитела mAb 35/312, полученные к HВсAg, лучше всего узнают пептид 76—85, и локализовали место связывания mAb 35/312 с HВсAg между 77-м и 82-м аминокислотными остатками. Но если шведские исследователи в своей работе подчеркивают роль 77-го аминокислотного остатка для связывания с мышинными анти-кор-антителами, то нами не отмечалось существенного различия во взаимодействии пептидов 77—83 и 78—83 с человеческими анти-кор-антителами; более того, максимальная положительная реакция была зафиксирована для гексапептида DPISRД. Таким образом, можно заключить, что фрагмент 78—83 — наименьший участок кор-антигена, способный связывать антитела из сывороток крови больных гепатитом В.

Оба варианта пептидов 73—83 и 77—83 специфически взаимодействовали с одними и теми же антисыворотками против HВсAg. Взаимозамена остатков Ala и Ile существенно не отразилась на антигенных свойствах детерминанты, несмотря на значительное различие в пространственных параметрах боковых цепей этих аминокислот. Отсюда следует, что боковые радикалы Ala и Ile в последовательности пептидов 78—83 и 77—83 не вовлекаются в прямое связывание или «контакт» с соответствующими антителами, и можно предположить, что антигенная детерминанта на участке 78—83 HВсAg является дискретной (лишенной непрерывности) линейно антигенной детерминантой.

### Экспериментальная часть

Все использованные аминокислоты — L-ряда. В синтезе пептидов применяли Вос-аминокислоты и следующие их производные: Ser(Bzl), Tyr(Bzl),  $\omega$ -бензиловые эфиры Asp и Glu, Arg(NO<sub>2</sub>), Asn—ONp фирмы Reanal (Венгрия). Вос-Cys(Acm), DCC, пиперидин, твин 20, ABTS — препараты фирмы Serva (Германия). Fmoc-аминокислоты и их производные: Ser(Bu),  $\omega$ -трет-бутиловые эфиры Asp и Glu, Arg(Mtr); препараты BSA, овальбумин, тиоанизол, TFMSA, EDIPA фирмы Fluka (Швейцария).

В качестве полимерного носителя применяли тефлон с радиационно привитым полистиролом (10%) [20] или PAL-полимер фирмы MilliGen/Biosearch (США), представляющий собой норлейцил-МВНА-полистирольную матрицу, содержащую в качестве якорной группы N-Fmoc-2,5-диметокси-4-(4'-карбокситибутилокси)бензиламин.

Эпитопное картирование проводили с помощью коммерческого набора производства фирмы Cambridge Research Biochemicals (Англия), включающего, во-первых, пакет прикладных компьютерных программ; во-вторых, пины, закрепленные на специальном держателе, и полипропиленовые 96-луночные планшеты; в-третьих, реактивы для пептидного синтеза (пентафторфениловые эфиры Fmoc-аминокислот и HOBt).

ВЭЖХ пептидов проводили на приборе фирмы Du Pont (США) в следующих условиях: аналитическая ВЭЖХ на колонке Silasorb C18, 6 мкм (4,6×250 мм; «Хроматосервис», Россия), скорость потока 1 мл/мин; полупрепаративная ВЭЖХ на колонке Nucleosil C18, 7 мкм (10×250 мм, Macherey-Nagel, Германия), скорость потока 4 мл/мин; элюция 0,1% TFA в воде — 0,1% TFA в 60% MeCN (а) или 0,1% TFA в 30% MeCN — 0,1% TFA в 60% MeCN (б) в течение 20 мин; детекция при 220 нм.

ТСХ пептидов осуществляли на пластинах Cellulose F (Merck, Германия) в системе: пропанол — вода — 25% аммиак, 6:1:3. Хроматограммы проявляли нингидрином.

Аминокислотный состав пептидов определяли на анализаторе Hitachi (Япония). Кислотный гидролиз проводили 6 н. HCl при 110° С в течение 24 ч.

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

Для ИФА использовали 96-луночные планшеты фирмы Linbro (Англия). Степень поглощения регистрировали на автоматическом спектрофотометре Titertek Multiskan (США).

### *Синтез пептидов с использованием Вос-схемы*

*Присоединение стартовой Вос-аминокислоты к хлорметилированному носителю.* К 1 г хлорметилированного полимера (0,6 мг·экв. Cl) [21], суспендированного в 5 мл DMF, прибавляли 1 ммоль Вос-Cys(Asm), 0,14 мл (1 ммоль) триэтиламина и 75 мг (0,5 ммоль) иодистого натрия. Смесь перемешивали 4 ч при 40—50° С. Температуру регулировали освещением реакционной смеси фототампой мощностью 500 Вт. Полимер отфильтровывали, промывали DMF (3×10 мл), этанолом (3×10 мл), трижды эфиром и гексаном, высушивали в вакууме. Нагрузка стартовой аминокислоты, определенная по данным количественного аминокислотного анализа, составила 0,4 ммоль/г.

*Синтез пептидов (73—84)-Cys(Asm), (74—89)-Cys(Asm), (78—83)-Cys(Asm) и (78—83)\*-Cys(Asm)* проводили, исходя из 0,5 г Вос-Cys(Asm)-полимера (0,4 ммоль/г) в соответствии с методикой, предложенной в работе [15]. Стандартный цикл пептидной конденсации на полимере методом симметричных ангидридов включал следующие стадии: 1) промывка хлористым метиленом (3×1 мин), 2) обработка 50% раствором TFA в хлористом метилене (5 + 25 мин), 3) промывка хлористым метиленом (3×1 мин), 4) обработка 10% раствором EDIPA в хлористом метилене (5 + 5 мин), 5) промывка хлористым метиленом (3×1 мин), 6) промывка DMF (3×1 мин), 7) конденсация с 2,5-кратным избытком симметричного ангидрида Вос-аминокислоты в DMF в течение 1—3 ч, 8) промывка DMF (3×1 мин). Объем однократной промывки 1 г пептидилполимера 5 мл. Симметричные ангидриды получали в хлористом метилене, используя на 1 ммоль Вос-аминокислоты 0,5 ммоль DCC. После выдерживания при 0° С в течение 0,5 ч реакционную смесь фильтровали. Фильтрат сразу вводили в реакцию пептидообразования или сначала упаривали в вакууме, остаток растворяли в DMF и реакцию с пептидилполимером проводили в DMF. Вос-Asp вводили в конденсацию в виде *n*-нитрофенилового эфира, взятого в четырехкратном избытке, с добавлением эквимольных количеств НОВt в DMF.

*Отщепление пептидов от полимерного носителя.* К 0,5 г пептидилполимера последовательно прибавляли 6 мл TFA, 0,7 мл тиоанизола и 0,55 мл TFMSA. Смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 2 ч при 20° С. Полимер отделяли фильтрованием и промывали TFA (3×1 мл). Фильтрат и промывные жидкости объединяли, охлаждали до 0° С и при перемешивании добавляли диэтиловый эфир. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, промывали диэтиловым эфиром и высушивали в вакууме.

*Очистку пептидов* проводили гель-хроматографией на колонке (2,5×50 см) с сефадексом G-10 в 10% водной уксусной кислоте. Собирали и лиофилизовали фракции, выходящие с колонки со свободным объемом. Для очистки пептида (74-89)-Cys(Asm) использовали сефадекс G-15 в 5 мМ водном растворе гидрокарбоната аммония (рН 9,3). Образцы пептидов, предназначенные для анализа и исследований, дополнительно очищали полупрепаративной ВЭЖХ.

### *Конъюгирование пептидов с BSA*

1. Для удаления Asm-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). 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.

2. Для активирования белка-носителя 15 мг BSA растворяли в 1 мл 10 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,2), добавляли 50 мкл раствора MBS в DMF (24,8 мг/мл) и перемешивали 30 мин при 20° С. Непрореагировавший MBS немедленно удаляли хроматографированием смеси на колонке с сефадексом G-25 в 50 мМ Na-фосфатном буфере.

3. Немедленно проводили реакцию между активированным BSA и 10 мг пептида со свободной SH-группой в Na-фосфатном буфере при pH 7,5 под азотом 3 ч. Затем раствор диализовали против 0,03% водного аммиака и лиофильно высушивали.

#### *Синтез пептидов с использованием Fmoc-схемы*

Синтез пептидов с концевым амидом EDPASRD-NH<sub>2</sub> и EDPISRD-NH<sub>2</sub> начинали исходя из 0,74 г (0,27 мг·экв/г) PAL-полимера. Стандартный цикл пептидной конденсации на PAL-полимере методом симметричных ангидридов включал следующие стадии: 1) промывка DMF (2×1 мин), 2) обработка 20% раствором пиперидина в DMF (3+7 мин), 3) промывка DMF (6×1 мин), 4) конденсация с 2,5-кратным избытком симметричного ангидрида Fmoc-аминокислот в DMF в течение 1,5—2 ч, 5) промывка DMF (2×1 мин), 6) отбор 5 мг пептидилполимера и проведение нингидринового теста Кайзера. По окончании каждого цикла повторяли стадии 1—6. Симметричные ангидриды получали в хлористом метиле (при необходимости добавляли для полной растворимости несколько капель DMF), используя на 1 ммоль Fmoc-аминокислоты 0,5 ммоль DCC. После перемешивания при 18° С в течение 10 мин реакционную смесь фильтровали. Фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в DMF и вводили в реакцию. После трех первых циклов пептидной конденсации пептидилполимер разделили на две равные порции и продолжали синтез параллельно в двух реакторах. После 6 циклов пептидной конденсации и последующего отщепления Fmoc-групп (стадии 1—3) пептидилполимеры промыли этанолом, эфиром и высушили в вакууме. Из каждого реактора отобрали половинные количества пептидилполимера для получения гексапептид-амидов DPASRD-NH<sub>2</sub> и DPISRD-NH<sub>2</sub>, после чего провели седьмой, завершающий цикл пептидной конденсации.

Для конечного деблокирования пептидов использовали реагент R (TFA — тиоанизол — этандитиол — анизол, 90:5:3:2) в расчете 10 мл реагента R на 0,1 ммоль отщепляемого пептида. Отщепление проводили в течение 18 ч при 18° С. Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе при 30° С, обрабатывали сухим эфиром с последующим упариванием трижды, снова обрабатывали сухим эфиром и фильтровали, тщательно промыв сухим эфиром, и сушили в вакууме над NaOH.

Очищали амиды пептидов полупрепаративной ВЭЖХ в условиях «б».

#### *Имуноферментный анализ на твердой фазе*

В 96-луночные планшеты были сорбированы пептиды в концентрации 100 мкг/мл и конъюгаты пептидов с BSA в концентрации 50 мкг/мл в 0,01 М бикарбонат-карбонатном буферном растворе (pH 9,5) в течение ночи при 20° С. Центры неспецифического связывания были дополнительно заблокированы 1% BSA в течение 2 ч при 37° С. Затем планшеты были пятикратно отмыты физиологическим раствором с 0,1% тритоном X-100. Для разведения антител использовали буфер, содержащий 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), 0,15 М NaCl, 0,1% тритон X-100, 10% фетальную бычью сыворотку.

В лунки с фиксированным антигеном добавляли соответствующие разведения специфических антител, инкубировали 2 ч при 37° С и отмывали, как указано

выше. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли с помощью меченных пероксидазой хрена антивидовых антител против IgG кролика, мыши или человека.

Для проявления ферментативной активности применяли субстрат — орто-фенилендиамин в цитратном буфере в концентрации 0,5 мг/мл. Реакцию останавливали добавлением 10%  $H_2SO_4$ . Степень поглощения регистрировали при длине волны 492 нм.

В качестве контроля использовали реакции тех же антигенов с нормальными сыворотками. Положительными считали пробы, в которых значения величины относительного связывания  $S/N$  были более 2,1 ( $S$  — значения поглощения в лунках с исследуемой сывороткой, но не менее 0,1;  $N$  — значения поглощения в лунке с нормальной сывороткой).

### *Метод эпитопного картирования*

*Стандартный цикл пептидной конденсации на пинах* включал следующие стадии: 1) обработка аминоксил(пептидил)-полимера 20% раствором пиперидина в DMF (30 мин), 2) промывка DMF (5×1 мин), 3) промывка метанолом (4×2 мин), 4) высушивание на воздухе (10—15 мин), 5) промывка DMF (5×1 мин), 6) добавление растворов пентафторфениловых эфиров Fmoc-аминокислот и HOBT и проведение реакции конденсации (18 ч), 7) промывка DMF (2×1 мин), 8) промывка метанолом (4×2 мин), 9) высушивание (10—20 мин), 10) ацетилирование смесью DMF — уксусный ангидрид — EDIPA, 50 : 5 : 1 (90 мин), 11) промывка DMF (2×1 мин), 12) промывка метанолом (4×2 мин), 13) высушивание (10—20 мин).

Все стадии, кроме шестой, предусматривали одинаковую обработку и промывку пептидполимеров; пины погружали в баню из полипропилена на глубину 1 см. Компоненты реакции конденсации вносили в каждую лунку индивидуально, используя 30 мМ растворы пентафторфениловых эфиров Fmoc-аминокислот (120 мкл 30 мМ раствора на 1 лунку планшета). Расчет реагентов осуществляли с применением специальной компьютерной программы.

Для деблокирования боковых функциональных групп пептидполимеры одновременно обрабатывали смесью TFA — тиоанизол (95 : 5) при 20° С в течение 4 ч в бане из полипропилена, помещенной в эксикатор, заполненный аргоном. Затем пины последовательно промывали дихлорметаном (2×2 мин), 5% раствором EDIPA в дихлорметане (2×5 мин), дихлорметаном (5×1 мин), высушивали на воздухе (более 10 мин), промывали водой (2×1 мин), метанолом (1×18 ч). Сушили в вакууме над силикагелем.

*Метод твердофазного иммуноферментного анализа для эпитопного картирования.* Полипропиленовые стержни-носители с присоединенными к ним пептидами были помещены в 96-луночном планшете в суперкоктейль (фосфатно-солевой буфер, pH 7,2, содержащий 1% овальбумина, 1% BSA, 0,1% твин 20; 200 мкл на лунку) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре для блокирования центров неспецифического связывания. Затем пептидполимеры инкубировали в течение ночи при 4° С со 175 мкл кроличьей антисыворотки на лунку, взятой в разведении 1/1000 в суперкоктейле, содержащем 0,05% азида натрия. Пептидполимеры были отмыты (4×10 мин) в бане, содержащей 0,1% раствор твин 20 в фосфатно-солевом буфере. Затем на планшет наносили антивидовые антитела, полученные против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой хрена. Инкубировали 2 ч при 37° С, затем планшет отмывали (4×10 мин) вышеуказанным раствором. Для проявления ферментативной активности добавляли субстрат (ABTS) в цитратном буфере, pH 4,0, в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в темноте при встряхивании в течение 30 мин. Реакцию останавливали удалением пинов из планшета, степень поглощения регистрировали при длине волны 405 нм.

Иммунизацию трёх групп белых нелинейных мышей-самцов весом 12—14 г (по 6—10 животных в группе) проводили трижды с интервалом 2 нед. Препарат конъюгата пептида 73—84 с BSA, растворенный в физиологическом растворе в концентрации 1 мг/мл, вводили с полным адъювантом Фрейнда внутривенно в дозе 50 мкг/мышь. Вторую и третью иммунизацию проводили с неполным адъювантом Фрейнда. Кровь брали через 7 сут после последней иммунизации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ganem D., Varmus H. E.//Ann. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 651—693.
2. Дейнхард Ф., Густ Н. Д.//Бюл. ВОЗ. 1982. Т. 60. № 5. С. 18—45.
3. Tiollais P., Charnay P., Vyas G. N.//Science. 1981. Т. 213. P. 406—411.
4. MacKay P., Lees J., Murray K.//J. Med. Virol. 1931. V. 8. P. 237—243.
5. Ferns R. B., Tedder P. S.//J. Med. Virol. 1986. V. 19. P. 193—203.
6. Salfeld J., Praff E., Noah M., Schaller H.//J. Virol. 1989. V. 63. № 2. P. 798—808.
7. Sallberg M. et al.//J. Med. Virol. 1991. V. 33. P. 248—252.
8. Борисова Г. П. и др.//Докл. АН СССР. 1984. Т. 279. № 5. С. 1245—1249.
9. Hopp T. D., Woods K. R.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 3824—3828.
10. Chou P. Y., Fasman G. D.//Ann. Rev. Biochem. 1978. V. 47. P. 251—276.
11. Rose G. D.//Nature. 1978. V. 272. P. 586—590.
12. Geysen H. M., Meloan R. H., Barteling S. J.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 3998—4002.
13. Geysen H. M. et al.//J. Immunol. Meth. 1987. V. 102. P. 259—274.
14. Khudyakov Yu. E. et al.//Biomed. Sci. 1991. V. 2. P. 257—265.
15. Семилетов Ю. А., Карпова В. А., Вязов С. О.//Биоорг. химия. 1993. Т. 19. № 3. С. 277—285.
16. Atherton T., Sheppard R. C.//Solid Phase Peptide Synthesis. IRL Press at Oxford University Press, 1989. 203 P.
17. Fields G. B., Noble R. L.//Int. J. Peptide and Protein Res. 1990. V. 35. P. 161—214.
18. Yajima H., Fujii N.//The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology/Eds E. Gross, J. Meienhofer. N. Y.: Acad. Press, 1983. V. 5. P. 65—109.
19. Liu F.-T., Zinnecker M., Hataoka T., Katz D. H.//Biochemistry. 1979. V. 18. P. 690—697.
20. Potapov V. K. et al.//Nucl. Acids Res. 1979. V. 6. P. 2041—2056.
21. Стюард Дж., Янг Дж.//Твердофазный синтез пептидов/Ред. Ю. П. Швачкин. М.: Мир, 1971.

Поступила в редакцию 5.XI.1993

После доработки 21.III.1994

Yu. A. Semiletov, V. A. Karpova, T. I. Kalinina, Yu. E. Khudyakov

LOCALIZATION OF THE IMMUNODOMINANT SITE IN THE  
HEPATITIS B VIRUS CORE-ANTIGEN WITH THE USE  
OF SYNTHETIC PEPTIDES

*D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences,  
Moscow*

Based on theoretical analysis of secondary structure and hydrophilicity data, the region (residues 73—89) of the HBV core-antigen presumably containing the antigenic determinant has been revealed. The epitope mapping of this region with the use of synthetic peptides, obtained by the pin technology and solid phase method, was carried out. Peptides were synthesized in two variants with different amino acids residues in the position 80 (Ala, Ile). Free peptides and their conjugates with bovine serum albumine were tested for antigenicity in ELISA. The results indicate that the fragment 78—83 is the shortest region of the core-antigen which reacts with antibodies from hepatitis B patients sera.