



УДК 578.832'412.6.083.3

© 1990 г.

СИНТЕЗ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДНОГО
ФРАГМЕНТА preS-ОБЛАСТИ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ВИРУСА
ГЕПАТИТА В

*Евстигнеева Р. П., Желтухина Г. А., Прокуронова Е. П.,
Смирнов В. Д.*, Семилетов Ю. А.*, Калинин Т. И.*,
Худяков Ю. Е.*, Хромов Н. С.*, Фаворов М. О.,
Яшина Т. Л.**

*Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова;
*Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Синтезирован пептид, соответствующий участку 24—41 preS1-области белка оболочки вируса гепатита В (субтип ауw). Твердофазный синтез проведен методом ступенчатого наращивания пептидной цепи с С-конца на тefлоне с радиационно привитым полистиролом с применением пентафторфениловых и *n*-нитрофениловых эфиров Вос-аминокислот. Пептид отщеплен от носителя действием бромистого водорода в трифторуксусной кислоте и очищен гель-хроматографией. Получены конъюгаты пептида с бычьим сывороточным альбумином (БСА), которыми иммунизированы мыши. Показано, что образующиеся антипептидные антитела взаимодействуют с пептидом. В ходе клинических исследований выявлено, что сыворотки крови больных острым гепатитом В взаимодействуют с конъюгатом пептида с БСА в реакции твердофазного иммуноферментного анализа.

Оболочка вируса гепатита В состоит из главного белкового компонента S (HBsAg) и двух минорных полипептидов, содержащих в дополнение к последовательности S область preS [1]. Известно, что в этой области располагается несколько вируснейтрализующих эпитопов. Выяснилось [2], что область preS является высокоиммуногенным антигеном, превосходящим по эффективности иммунного ответа HBsAg. В связи с этим в последнее время получило широкое распространение представление о том, что антигенные детерминанты preS должны быть использованы в качестве необходимой составной части вакцины нового поколения против вируса гепатита В [3].

Интерес к изучению области preS еще более увеличился после того, как было продемонстрировано, что антитела к ней являются одними из наиболее ранних маркеров инфекции и потому могут быть использованы для ранней диагностики гепатита В.

Функциональная организация области preS достаточно сложна. Исследования, проведенные с использованием синтетических пептидов, позволили установить, что некоторые эпитопы локализованы в N-концевой части участков preS1 и preS2. Неожиданно было обнаружено, что эти же участки, по-видимому, содержат сайт для взаимодействия вируса с рецепторами клеток [4].

С целью более детального изучения свойств отдельных участков preS нами осуществлен синтез пептидного фрагмента 24—41 из N-концевой части

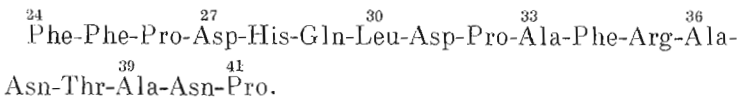
Сокращения: DCC — N,N'-дихлорогексилкарбодимид, -OPf₅ — пентафторфенилокси-, ONp — *n*-нитрофенилокси, DMF — диметилформамид, TFA — трифторуксусная кислота, БСА — бычий сывороточный альбумин, НОВt — 1-гидроксибензотриазол.

Расчет вторичной структуры пептида 24—41 области pgs1 белка оболочки вируса гепатита В [5] *

Тип структуры		24 Phe	25 Phe	26 Pro	27 Asp	28 His	29 Gln	30 Leu	31 Asp	32 Pro	33 Ala	34 Phe	35 Arg	36 Ala	37 Asn	38 Thr	39 Ala	40 Asn	41 Pro
α-Спираль	в белке							21	22	28	29	29	20	17					
	в растворе							12	12	16	17	17	13	10					
β-Структура	в белке	23	20	8															
	в растворе	7	6	3															
β-Изгибы	в белке		8	9	7	7				17	16	8				12	13		15
	в растворе	20	10							20	20	10				12	13		14

* Приведена вероятность (%) участия отдельных аминокислот последовательности в структуре определенного типа.

области pgs1 белка оболочки вируса гепатита В субтипа ауw:



Пептид был выбран на основе расчета его вторичной структуры по известной программе [5] и относительной гидрофильности его аминокислотной последовательности. Расчет был произведен как для всей pgs-области, так и отдельно для пептида 24—41. Показана высокая гидрофильность пептида и наличие трех симметрично расположенных β-изгибов пептидной цепи, предсказанных с достаточно высокой вероятностью (табл. 1). Пептид как в составе белка, так и в свободном состоянии в растворе содержит участки с α-спиралью и β-складчатой структурой, причем в растворе их расчетная вероятность уменьшается.

Синтез пептида 24—41 осуществляли твердофазным методом с использованием в качестве полимерного носителя тефлона с радиационно привитым полистиролом (16%). Этот полимер ранее успешно использовался в лаборатории для синтеза крупных пептидов [6]. С-Концевая аминокислота присоединялась к хлорметилированному носителю с использованием соответствующей цезиевой соли [7]. Пептидную цепь наращивали ступенчато с С-конца с применением в основном пентафторфениловых эфиров Вос-аминокислот. Остатки Asn⁴⁰, Asn³⁷, Phe²⁵, Phe²⁴ вводились в пептидполимеры в виде *n*-нитрофениловых эфиров в присутствии 1-гидроксибензотриазола. Деблокирование α-аминогрупп осуществляли 50% раствором TFA в хлористом метиле и 4 н. раствором хлористого водорода в диоксане [8].

Для предотвращения побочных реакций, характерных для дипептидполимеров с С-концевым пролином [9], дипептидполимер после удаления Вос-группы и соответствующих промывок вводили в реакцию с 3 экв. Вос-Ala-OPfp в присутствии 1 экв. триэтиламина. Содержание полученного трипептида в трипептидполимере составило 0,15 ммоль/г по сравнению с содержанием исходного пролина 0,2 ммоль/г носителя, что может свидетельствовать о частичном отщеплении пептида от полимера, вероятно, в виде дикетопиперазина. Для блокирования ОН-групп, которые при этом могли образоваться на носителе, пептидполимер был ацетилирован искусственным ангидридом в стандартных условиях [10].

Известно, что введение остатка аргинина в пептидполимер может проходить с низким выходом, сопровождаться модификацией гуанидинового звена и рацемизацией аминокислоты. Обычно применяемые для защиты боковой функции аргинина тозилная и нитрогруппа отщепляются в достаточно жестких условиях и не всегда успешно, поэтому остаток аргинина был введен в пептидполимер с высоким выходом и без побочных реакций с помощью Вос-Arg·HCl·H₂O.

Как известно, кислотное отщепление от носителя (HBr/TFA, HF) пеп-

Условия и результаты синтеза пептидного фрагмента 24—41 preS1-области белка оболочки вируса гепатита В (субтип ауw)

Реагенты, использованные для проведения конденсаций	Избыток ацилирующих агентов, моль/моль аминокисл.-полимера	Выход реакции, % *
Вос-Asn-ONp/HOBt	3/3	95
Вос-Ala-OPfp	3	96
Вос-Thr (Bzl)-OPfp	3	96
»	1	100
Вос-Asn-ONp/HOBt	3/3	99,5
»	1/1	100
Вос-Ala-OPfp	3	100
Вос-Arg·HCl·H ₂ O	3	94
»	1	100
Вос-Phe-OPfp	3	96
»	1	97
»	1	97
Вос-Ala-OPfp	3	100
Вос-Pro-OPfp	3	100
Вос-Asp (OBzl)-OPfp	3	100
Вос-Leu-OPfp	3	100
Вос-Gln-OPfp	3	100
Вос-His-OH	4	94
»	2	100
Вос-Asp (Bu ^t)-OPfp	3	100
Вос-Pro-OPfp	3	80
»	1,5	100
Вос-Phe-ONp/HOBt	3/3	94
»	1,5/1,5	96
»	1/5/1,5	100
Вос-Phe-ONp/HOBt	3/3	94
»	1,5/1,5	99,5

* Время реакции 20—24 ч.

тидов, содержащих последовательности Asp-Gly, Asp-His с этерифицированной β-карбоксильной группой Asp, сопровождается побочной реакцией транспептидации [11], тогда как в случае незащищенной β-карбоксильной группы остатка Asp этой реакции не наблюдается [12]. Поэтому β-карбоксильная группа Asp²⁷ временно блокировалась *трет*-бутильной защитой [6], которая отщеплялась в следующем цикле деблокирования пептидил-полимера TFA.

Синтез проводили на 2,2 г носителя с исходным содержанием пролина 0,2 ммоль/г. Для введения аминокислотных остатков применяли трехкратные избытки реагентов. Полноту прохождения реакций контролировали с помощью нингидринового теста [13]. При неполном прохождении реакций конденсации их повторяли с 1 экв. активированной Вос-аминокислоты. Условия и результаты проведенных реакций представлены в табл. 2.

Пептид 24—41 был отщеплен от носителя действием бромистого водорода в трифторуксусной кислоте. Отщепленный пептид, по данным ТСХ, содержал небольшую примесь, мало отличающуюся по хроматографической подвижности от целевого вещества. После гель-фильтрации на Тоуо-PEARL HW40 был получен пептид с выходом 12,6% (в расчете на исходное содержание пролина на полимере). Пептид охарактеризован количественным аминокислотным анализом, определением N-концевой аминокислоты, ВЭЖХ (рисунок).

Синтезированный пептид конъюгировали с БСА двумя различными методами: в одном случае использовали бифункциональный сшивающий агент — глутаровый альдегид [14], при этом степень конъюгации составляла 5—7 моль пептида на 1 моль белка; в другом случае применяли активированный N-оксисукцинимидный эфир сукцинированного БСА [15], степень конъюгации достигала 7—9 моль пептида на 1 моль белка. Степень конъюгации определялась по данным аминокислотного анализа.

Полученные конъюгаты пептида 24 — 41 с БСА использовались для иммунизации лабораторных животных. Иммунизация белых мышей указанными конъюгатами приводила к индукции специфических антипептидных антител, что было определено методом иммуноферментного анализа, причем антипептидные антитела, полученные на конъюгат, синтезированный с помощью глутарового альдегида, имели более высокий титр. Эти данные объясняются, по-видимому, тем, что при иммунизации животных пептидом, связанным с сукцинилизированным БСА, антитела вырабатываются в первую очередь не на пептид и немодифицированные фрагменты белка, которые сохранили природное строение, а на ацилированные яктарным ангидридом участки БСА, несущие сильный отрицательный заряд и имеющие в своем составе модифицированные аминокислоты, что может способствовать усилению иммуногенности таких участков.

Были проведены также две серии опытов, в которых методом твердофазного иммуноферментного анализа [16] изучалась возможность использования конъюгатов пептида 24—41 с БСА для выявления антител в сыворотках крови больных гепатитом В. В первой серии использовали сорбированный на твердой фазе конъюгат, в котором пептид соединен с сукцинилизированным БСА. Анализировалось взаимодействие конъюгата с 34 образцами сывороток крови, полученными от 11 здоровых лиц, 15 больных гепатитом В в первую неделю от начала желтушного периода и 8 носителей HBsAg. Уровень цветной реакции, расценивавшийся как положительный (p/n 4,4 — 6,9) *, обнаружен только при исследовании сывороток крови больных гепатитом В (3 из 15), в других группах такого результата не наблюдали. При сорбции на твердой фазе БСА, обработанного яктарным ангидридом, и проведении реакций с тем же набором сывороток положительных результатов не было.

Во второй серии опытов использован конъюгат того же пептида с БСА, полученный с применением глутарового альдегида. Анализировали сыворотки крови 42 больных гепатитом В с HBs-антигенами на 3—14-й день желтушного периода болезни и 4 сыворотки здоровых лиц. В большинстве образцов сывороток больных (30 из 42) получен положительный результат, причем в некоторых случаях отношение p/n составляло более 30. Все 3 образца сывороток больных гепатитом В, выявленные с использованием первого конъюгата, реагировали и со вторым.

Таким образом, можно предположить, что синтезированный пептид 24—41 может использоваться для выявления антител в сыворотках крови больных и содержит последовательность, участвующую в организации антигенной детерминанты preS1-области.

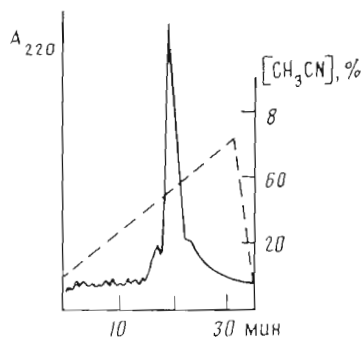
Обращает на себя внимание большая информативность исследования при использовании пептида 24—41, конъюгированного с БСА при помощи глутарового альдегида.

Экспериментальная часть

Для синтеза пептида использованы Вос-аминокислоты и их производные (Reanal, ВНР). Все аминокислоты имеют *L*-конфигурацию. В качестве полимерной матрицы использован тефлон с радиационно привитым полистиролом (16%).

Полноту прохождения реакций конденсации на полимере проверяли с помощью нингидринового теста [13].

* p/n — превышение положительного сигнала над отрицательным фоном.



Профиль элюции пептида 24—41 (ВЭЖХ на колонке $4,6 \times 250$ мм с носителем Ultrasphere-octyl (5 мкм); элюция 0,05 М $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4$ (pH 3) — ацетонитрил, скорость потока 1 мл/мин)

ВЭЖХ пептида проводили на приборе фирмы Du Pont (США) в следующих условиях: 1) колонка $3,2 \times 250$ мм, носитель — Silasorb C18 (10 мкм), элюция 0,1% TFA — 0,1% TFA в 80% ацетонитриле, скорость потока 1 мл/мин, детекция при 219 нм; 2) колонка $4,6 \times 250$ мм, носитель — Ultrasphere-ocetyl (5 мкм), элюция 0,05 М KH_2PO_4 (рН3) — ацетонитрил, скорость потока 1 мл/мин, детекция при 220 нм.

ТСХ пептида осуществляли на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧССР) в системе растворителей вода — пропанол — аммиак, 1 : 6 : 3. Хроматограммы проявляли нингидрином, хлор-толидиновым реагентом и в ультрафиолетовом свете.

Аминокислотный состав пептида определяли на анализаторе (Bio-tronik, ФРГ). Кислотный гидролиз проводили при 140° С в течение 2 ч.

Удельное оптическое вращение пептида измеряли на поляриметре (Perkin — Elmer 241 mc, Швеция), длина оптического пути 2 см.

N-Концевую аминокислоту определяли дансильным методом [17]. Вос-Pro-P. К 2,44 г хлорметилированного тефлона (1,078 ммоль хлора) прибавляли раствор 0,59 г (1,725 ммоль) Вос-Pro-OCs [7] в 4 мл DMF. Перемешивали 1,5 ч при 40° С и оставляли на 60 ч при 20° С. Аминоацил-полимер отфильтровывали, промывали DMF (3 × 5 мл), смесью DMF — вода, 1 : 1 (2 × 5 мл), DMF (2 × 5 мл), хлороформом (2 × 5 мл), метанолом (1 × 5 мл), эфиром (1 × 5 мл). Нагрузка на носитель 0,2 ммоль/г (определено с пикриновой кислотой [18] и количественным аминокислотным анализом). Для замещения непрореагировавшего хлора к 2,4 г Вос-Pro-P (0,58 ммоль хлора) прибавляли раствор 0,56 г (2,9 ммоль) ацетата цезия [19] в 7 мл DMF. Перемешивали 1,5 ч при 40° С и оставляли на 15 ч при 20° С. Вос-Pro-P отфильтровывали и промывали, как указано выше. Найдено 0,39% хлора.

Стандартный цикл пептидной конденсации на полимере включает следующие стадии: 1) промывка диоксаном (2 × 3 мин); 2) обработка 4 н. HCl в диоксане (2 × 15 мин); 3) промывка диоксаном (2 × 3 мин); 4) промывка хлористым метиленом (2 × 3 мин); 5) обработка 50% TFA в хлористом метилене (2 × 15 мин); 6) промывка хлористым метиленом (2 × 3 мин); 7) промывка DMF (2 × 3 мин); 8) нейтрализация аминокомпонента 10% раствором триэтиламина в DMF (2 × 15 мин); 9) промывка DMF (3 × 3 мин); 10) конденсация с трехкратным избытком карбонильного компонента; 11) промывка DMF, хлороформом, метанолом, хлороформом, эфиром; 12) определение непрореагировавших аминогрупп нингидриновым тестом.

Объем однократной промывки пептидильного полимера 5 мл. Конденсации проводили в минимальном объеме DMF методом активированных эфиров. Ниже приведены типичные методики конденсации.

Вос-Asn-Pro-P. К 2,2 г Pro-P (0,44 ммоль Pro) прибавляли раствор 0,47 г (1,34 ммоль) Вос-Asn-ONp и 0,18 г (1,34 ммоль) 1-гидроксibenзо-триазола в 3,5 мл DMF. Перемешивали 1 ч и оставляли на 20 ч. Выход продукта 95%. Пептидильный полимер промывали DMF (3 × 3 мин). К суспензии Вос-Asn-Pro-P в DMF прибавляли 0,5 мл (5,35 ммоль) уксусного ангидрида и 0,75 мл (5,35 ммоль) триэтиламина. Через 1 ч пептидильный полимер промывали DMF, хлороформом, метанолом, хлороформом, эфиром.

Вос-Ala-Asn-Pro-P. К 2,23 г $\text{CF}_3\text{COOH} \cdot \text{Asn-Pro-P}$ (0,44 ммоль Pro) прибавляли раствор 0,47 г (1,34 ммоль) Вос-Ala-OPfp в 3,5 мл DMF и 0,063 мл (0,44 ммоль) триэтиламина. Оставляли на 20 ч. Выход продукта 96%. Пептидильный полимер промывали DMF (3 × 3 мин). К суспензии Вос-Ala-Asn-Pro-P в 3,5 мл DMF прибавляли 0,5 мл (5,37 ммоль) уксусного ангидрида и 0,75 мл (5,37 ммоль) триэтиламина. Через 1 ч смолу отфильтровывали, промывали DMF, хлороформом, метанолом, хлороформом, эфиром.

Вос-Ala-Asn-Thr(Bzl)-Ala-Asn-Pro-P. К 2,23 г пептидильного полимера Asn-Thr(Bzl)-Ala-Asn-Pro-P прибавляли раствор 0,49 г (1,34 ммоль) Вос-Ala-OPfp в 3 мл DMF. Через 20 ч гексапептидильный полимер отделяли и промывали, как указано выше. Выход продукта 100%.

HBr·Phe-Phe-Pro-Asp-His-Gln-Leu-Asp-Pro-Ala-Phe-Arg-Ala-Asn-Thr-

Ala-Asn-Pro. 1,2 г пептидполимера Boc-Phe-Phe-Pro-Asp-His-Gln-Leu-Asp(OBzl)-Pro-Ala-Phe-Arg-Ala-Asn-Thr(Bzl)-Ala-Asn-Pro-P, содержащего 0,24 ммоль пептида, суспендировали в 3 мл TFA в присутствии 0,1 мл анизола и пропускали ток сухого бромистого водорода в течение 1 ч. Смолу отделяли и промывали TFA (2 × 3 мл), растворитель удаляли в вакууме, остаток растирали с сухим эфиром. Осадок отделяли. Получили 240,6 мг (62,2% в расчете на исходное содержание Pro на полимере) продукта. Продукт очищали гель-хроматографией на Тоуо-PEARL HW 40, колонка 2 × 36 см, элюция 0,2 н. AcOH со скоростью 0,35 мл/мин. Выход 44,5 мг (19%), R_f 0,69, $[\alpha]_D^{20} -57,5^\circ$ (с 0,4; 0,2 н. AcOH), N-концевая аминокислота Phe. Аминокислотный анализ: Asp 4,32 (4), Thr 0,77 (1), Glu 1,1 (1), Pro 3,54 (3), Ala 2,2 (3), Phe 2,6 (3), His 0,75 (1), Arg 1,0 (1). ВЭЖХ в условиях (1), время выхода 22 мин; в условиях (2) — 21 мин.

Конъюгирование пептида 24 — 41 с БСА. а) 5,5 мг БСА растворяли в 0,6 мл буферного раствора, содержащего 8,1 mM Na_2HPO_4 , 0,01 M азид натрия, 1,5 mM KH_2PO_4 , 0,138 M NaCl, 2,7 mM KCl (pH 7,2), и прибавляли к 4,5 мг пептида. К раствору добавляли 200 мкл 20 mM раствора глутарового альдегида в воде. Перемешивали 20 ч при 20° C. По окончании реакции смесь диализовали против воды, содержащей 0,03% аммиака, и лиофилизовали [14]. Степень конъюгации, определенная по данным аминокислотного анализа, составляла 5—7 моль пептида на 1 моль белка.

б) К раствору 12 мг пептида в 1 мл DMF прибавляли 5 мкл N-метилморфолина и 12 мг N-оксисукцинимидного эфира сукцинилированного БСА [15]. Перемешивали 20 ч при 20° C, затем диализовали против воды, содержащей 0,03% аммиака, и лиофилизовали. Степень конъюгации, определенная по данным аминокислотного анализа, составляла 7—9 моль пептида на 1 моль белка.

Иммунизация лабораторных животных. Для иммунизации были использованы самцы белых нелинейных мышей весом 12—14 г, по 6—10 животных в группе. Препарат с полным адьювантом Фрейнда вводили внутривентриально в дозе 50 мкг/мышь. Вторую и третью иммунизации проводили с интервалом 2 нед с неполным адьювантом Фрейнда, еще через 7 сут брали кровь для анализа на специфические антитела. Мышей забивали декапитацией.

Метод твердофазного иммуноферментного анализа [16]. В 96-луночные планшеты (Linbro) были сорбированы пептиды, конъюгированные с БСА, в концентрации 50 мкг/мл в физиологическом растворе (0,15 M хлорида натрия) в течение ночи при комнатной температуре. Центры неспецифического связывания были дополнительно заблокированы 0,5% человеческим альбумином в течение 2 ч при 37° C. Затем планшеты были пятикратно отмыты физиологическим раствором с 0,1% тритоном X-100. Сыворотки крови больных или иммунизированных мышей наносили в разведении 1 : 50 и 1 : 200. Для разведения использовали буфер, содержащий 0,01 M трис (pH 8,0), 0,15 M NaCl, 0,1% тритон, 10% fetalную бычью сыворотку и модифицированный БСА в концентрации 200 мкг/мл. Инкубировали 2 ч при 37° C. После стандартной отмывки на планшет наносили антивидовые антитела, меченные пероксидазой (антитела против иммуноглобулинов человека или мыши). Инкубировали 2 ч при 37° C, затем планшет отмывали. Для проявления ферментативной активности добавляли субстрат — орто-фенилендиамин в цитратном буфере в концентрации 0,5 мг/мл. Реакцию останавливали добавлением 10% H_2SO_4 . Степень поглощения регистрировали на приборе Multiscan (Titertec) при длине волны 492 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neurath A. R., Kent S. B. H., Strik N. // J. gen. Virol. 1986. V. 67. № 2. P. 453—461.
2. Neurath A. R., Kent S. B. H., Strik N., Taylor N. // Nature. 1985. V. 315. № 6014. P. 154—157.
3. Neurath A. R., Jameson B. B., Huima T. // Microbiol. Sci. 1987. V. 4. № 2. P. 45—51.

4. *Neurath A. R., Kent S. B. II., Strik N., Parker K.* // *Cell*. 1986. № 3. V. 46. P. 429—435.
5. *Finkelstein A. V., Ptitsyn O. B.* // *Biopolymers*. 1983. V. 22. № 1. P. 15—25.
6. *Сидорова М. В., Желтухина Г. А., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П.* // *Журн. орган. химии*. 1986. Т. 56. Вып. 6. С. 1405—1412.
7. *Gisin V. F.* // *Helv. chim. acta*. 1973. V. 56. № 5. P. 1476—1482.
8. *Желтухина Г. А., Сидорова М. В., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П.* // *Журн. орган. химии*. 1977. Т. 47. № 5. С. 1208.
9. *Ainroug P. R., Wickstrom E.* // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1980. V. 15. № 3. P. 225—235.
10. *Янг Дж., Стюарт Дж.* // *Твердофазный синтез пептидов* / Ред. Швачкина Ю. П. М.: Мир, 1971. 176 с.
11. *Bohdanzky M., Kwei Y. Z.* // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1978. V. 12. № 1. P. 69—74.
12. *Wang S. S., Yang C. C., Kulesha Y. D., Sonnenberg M., Merrifield R. B.* // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1974. V. 6. № 2. P. 109—119.
13. *Kaiser E., Colescott R. L., Rossinger C. D., Cook P. Y.* // *Anal. Biochem.* 1970. V. 34. № 2. P. 595—598.
14. *Mariani M., Bracci L., Presentini R., Nucci D., Neri P., Antoni G.* // *Molecular Immunology*. 1987. V. 24. № 3. P. 297—303.
15. *Андреев С. М., Сидорова М. В., Ракова О. А., Цветков Д. Г., Фомина Л. А.* // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 5. С. 696—700.
16. *Иммуноферментный анализ* // Ред. Нго Т. Т., Ленхофф Г. М.: Мир, 1988. 444 с.
17. *Дэвени Т., Гергей Я.* // *Аминокислоты. Пептиды. Белки* / Ред. Незлина Р. С. М.: Мир, 1976. 364 с.
18. *Gisin V. F.* // *Anal. chim. acta*. 1975. V. 58. N 1. P. 248—249.
19. *Желтухина Г. А., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П.* Способ отщепления гаптоидов от аминокислотных полимеров. А. с. 777025 СССР / Б. И. 1980, № 41.

Поступила в редакцию
16.II.1988

После доработки
18.IV.1989

SYNTHESIS AND IMMUNOLOGIC PROPERTIES OF A PEPTIDE FRAGMENT OF THE HEPATITIS B ENVELOPE preS-PROTEIN

EVSTIGNEEVA R. P., ZHELTUKHINA G. A., PROKURONOVA E. I., SMIRNOV V. D.*,
SEMILETOV Yu. A.*, KALININA T. I.*, KHUDYAKOV Yu. E.*, KHROMOV I. S.*,
FAVOROV M. O.*, YASHINA T. L.*

M. V. Lomonosov Institute of Chemical Technology, Moscow;
**D. I. Ivanovskii Institute of Virology,*
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

We have synthesized the 24—41 fragment of the preS region of the hepatitis B (subtype ayw) envelope. The peptide was prepared by the solid phase synthesis on perfluoropolyethylene polymer grafted with polystyrene. The peptide chain was elongated from C-terminus using pentafluorophenyl- and *p*-nitrophenyl esters of Boc-amino acids. The peptide was cleaved off the solid phase by HBr in CF₃COOH, purified by gel filtration, and, after conjugation with serum albumin (BSA), inoculated into mice. The resultant antibodies were shown to react with the peptide. The blood sera from patients with acute hepatitis B reacted with the peptide-BSA conjugates in the immunoenzymic solid phase assay.