



УДК 577.412.083.3 : 615.371

© 1990 г.

Д. Е. Цветков, А. Б. Ильина\*, С. М. Андреев,  
А. А. Соколенко\*\*, С. П. Павликов, П. Пужпен,  
М. А. Новиков

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

### 1. СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ ПРЕ-S БЕЛКОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ИММУНОГЕННОСТИ

*Институт иммунологии МЗ СССР, Москва;*

*\* Институт элементоорганических соединений АН СССР, Москва;*

*\*\* Институт эпидемиологии и микробиологии МЗ СССР, Москва*

Синтезированы фрагменты пре-S-области 13–26, 16–26, 22–32, 25–41, 134–144, 137–144, 132–149, 142–149, 144–153, 132–138 поверхностного антигена вируса гепатита В, иммобилизованные на носителях со слабой собственной иммуногенностью. Стимуляция образования антипептидных аггител наибольшая при иммунизации конъюгатами, содержащими микросферические носители или желатин, модифицированный Gly-Туг. Наибольшей иммуногенностью из использованных для иммунизации пептидов 16–26, 137–144, 142–149, 144–153, 132–138 обладает фрагмент пре-S- (134–144), конъюгированный с микросферическим носителем.

Вирусный гепатит В по распространенности и социальной опасности в настоящее время — одна из наиболее острых проблем. Заболевание может протекать в различных формах: острой, хронической активной или персистирующей, также возможно хроническое носительство, в 1–2% случаев приводящее к первичному раку печени и циррозу. В мире число носителей составляет около 300 млн., в Африке и Юго-Восточной Азии маркеры вируса в некоторых регионах обнаруживаются у 50–100% населения [1], причем наблюдается тенденция к распространению заболевания [2].

Из-за отсутствия эффективных модельных систем репликации вируса гепатита В основным источником вирусных белков пока остается кровь доноров.

Область генома, несущая информацию о поверхностных белках, содержит три иницирующих кодона, которые определяют синтез пре-S1-, пре-S2-, S-белков. Основное количество HBsAg составляет малый р25-белок, состоящий из 226 а.о. и кодируемый S-областью генома. Более крупные белки (р33 и р39) имеют дополнительно 55 и 163 (174) аминокислот на N-конце белка, кодируются областями пре-S2+S и пре-S(1+2)+S генома и являются минорными компонентами циркулирующего HBsAg [3, 4]. Однако установлено, что крупные белки обладают высокой иммуногенностью, индуцируют антитела, нейтрализующие вирус, и могут играть существенную роль в процессе проникновения вируса в гепатоциты [4–6].

Сокращения: HBsAg — поверхностный антиген вируса гепатита В, пре-S — фрагмент HBsAg, кодируемый пре-S-областью генома, VMA — сополимер винилпирролидона и малеинового ангидрида, TfaOSu — трифторацетоксисукцинимид, DMF-диметилформамид, MMM — N-метилморфолин, BSA — бычий сывороточный альбумин, RA — рекомбинантный белок фага  $\lambda$ , содержащий пре-S-область, ms — микросферический носитель, Gel — сукцинилжелатин, -OSup — остаток полимерного N-оксисукцинимидного эфира, Piv — пентафторфениловый эфир, Piv — пивалоил, ONo — орто-нитрофениловый эфир, DPPA — дифенилфосфорилазид, Od — октадецил.

Рис. 1. Данные компьютерного анализа пре-S-области серотипа ауш HBsAg: профили относительной гидрофильности [15] (а), относительной подвижности Са-атомов [16] (б), статистической антигенности (antigenicity value) [17] (в). Отмечены перпендикулярные для синтеза фрагменты

Рис. 2. Данные сканирования пре-S-области HBsAg (встречаемость 5-членных фрагментов) по банку аминокислотных последовательностей «PIR»

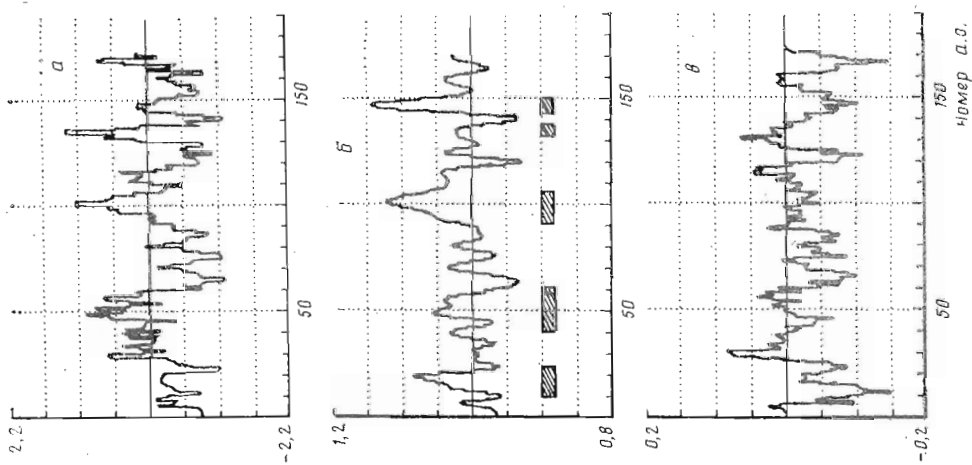


Рис. 1

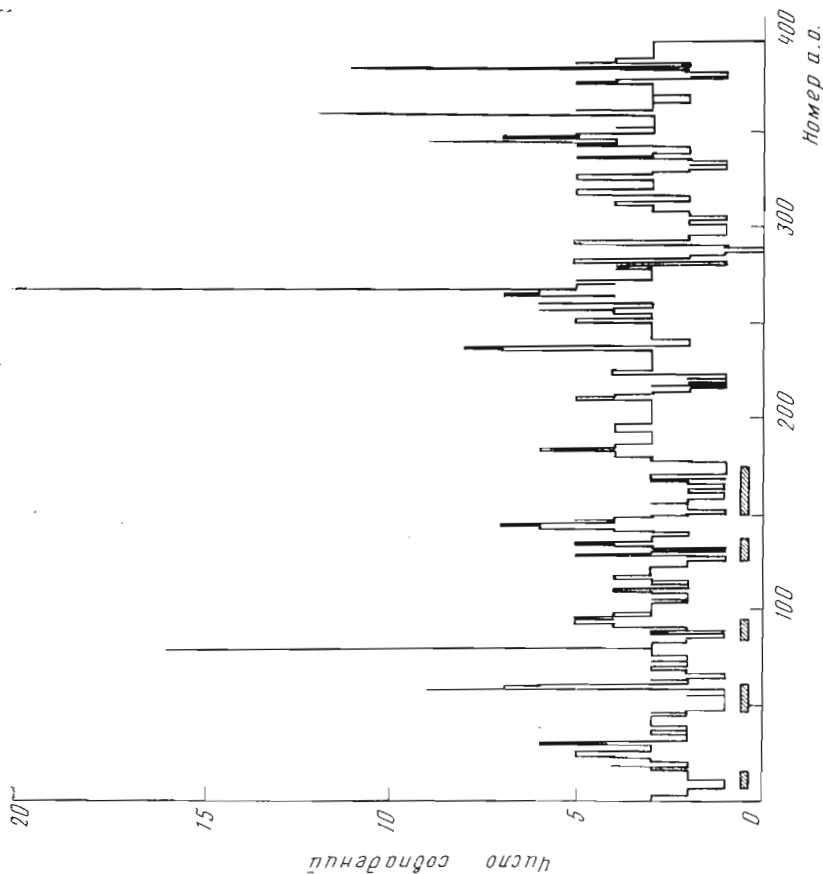


Рис. 2

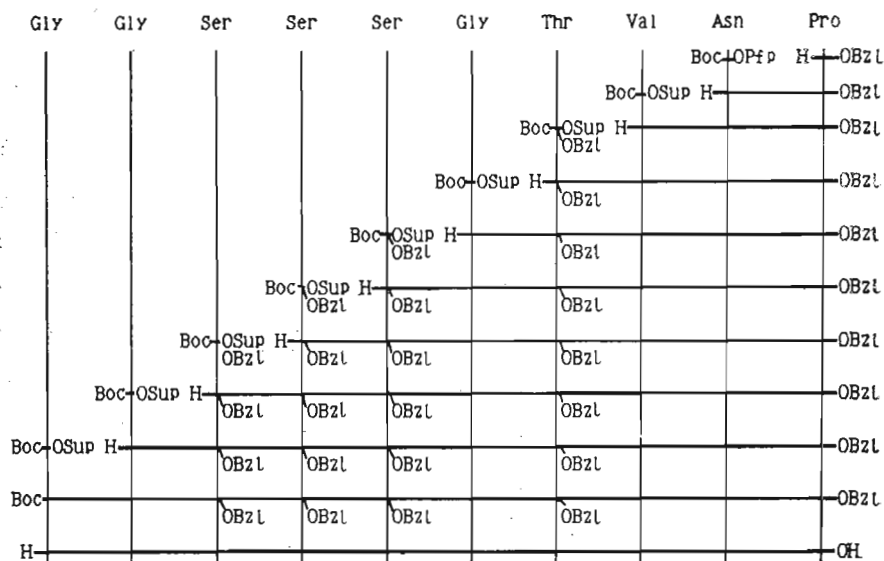
10	20
-----Met <u>GlyGlnAsnLeuSerThrSerAsn</u>	
30	40
<u>ProLeuGlyPhePheProAspHisGlnLeuAspProAlaPheArgAlaAsnThrAlaAsn</u>	
50	60
<u>ProAspTrpAspPheAsnProAsnLysAspThrTrpProAspAlaAsnLysValGlyAla</u>	
70	80
GlyAlaPheGlyLeuGlyPheThrProProHisGlyGlyLeuLeuGlyTrpSerProGln	
90	100
AlaGlnGlyIleLeuGlnThrLeuProAlaAsnProProProAlaSerThrAsnArgGln	
110	120
SerGlyArgGlnProThrProLeuSerProProLeuArgAsnThrHisProGlnAlaMet	
130	140
GlnTrpAsnSerThrThrPheHisGlnThrLeuGlnAspPro <u>ArgValArgGlyLeuTyr</u>	
150	160
<u>PheProAlaGlyGlySerSerSerGlyThrValAsnProValLeuThrThrAlaSerPro</u>	
170	180
LeuSerSerIlePheSerAlaArgThrGlyAspProAlaLeuAsnMetGluAsnIleThr	

Рис. 3. Аминокислотная последовательность фрагмента HBsAg, кодируемая пре-S-областью гепатома [21]. (Ссылка приведена по банку «PIR», запись →SAVLAN.) Последовательность серотипа ауВ [21] не имеет первых 11 аминокислот. Подчеркнуты синтезированные фрагменты

К настоящему времени известны работы по оценке антигенных и иммуногенных свойств некоторых фрагментов пре-S-белков [7]. Показана важная роль пре-S-домена в регуляции иммунного ответа на S-белок — базовый компонент современных вакцин [8]. Имеется также сообщение об успешном использовании синтетического пептида из пре-S2-области, конъюгированного с гемоцианином, в вакцинировании обезьян [9].

Применение синтетических пептидов, имитирующих антигенные детерминанты белков поверхности и кора вириона, — одно из перспективных направлений создания диагностических и протективных препаратов. Такие препараты легко стандартизируются, устойчивы, экономичны и безопасны. Несмотря на привлекательность этого подхода, проблемой является выбор приемлемого носителя, поскольку именно им в значительной мере определяется иммуногенность конъюгата. Известно, что включение антигена в корпускулярные носители (липосомы, микрокристаллическая целлюлоза, бактериальные или вирусные частицы) приводит, как правило, к резкому усилению выработки антител [10—12]. Можно полагать, что иммуногенны на основе микросфер регулируемого размера, на поверхности которых закреплены молекулы антигена, должны имитировать природные корпускулярные антигены (вирусы или бактерии) при условии полноценности набора Т- и В-клеточных детерминант. Для получения микросфер предпочтительно использовать биodeградируемые поли-

Схема 2



Синтез пре-S2-(144–153)-фрагмента

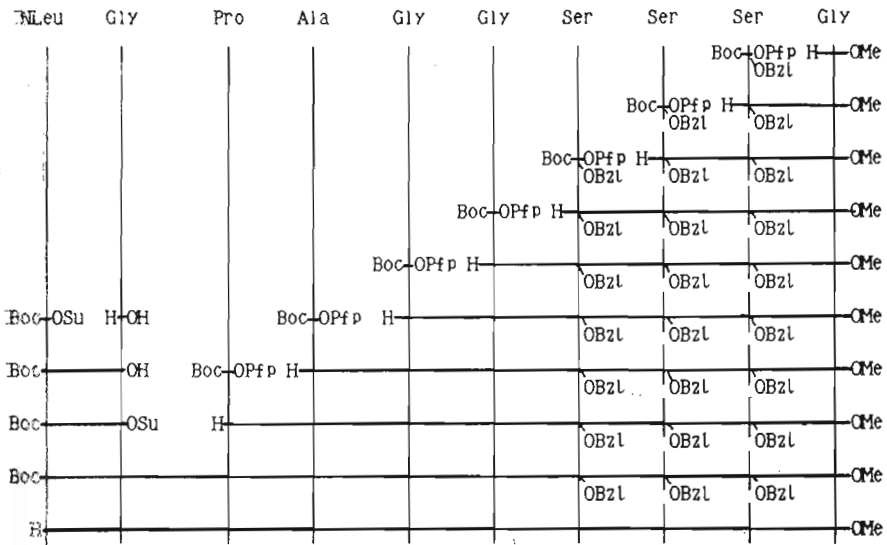
Компьютерный анализ аминокислотной последовательности пре-S-участков с помощью методов, оценивающих среднюю гидрофильность [15], относительную подвижность C<sup>α</sup>-атомов полипептидной цепи [16] и статистическую антигенность [17], позволяет выбрать потенциальные антигенные детерминанты: 10–25, 40–60, 90–105, 132–138, 142–150 (рис. 1). Из названных участков можно особо отметить пре-S-(132–138) и пре-S-(142–150), кодируемые консервативными участками генома. Оценивая количество фрагментов из аминокислотных последовательностей банка PIR, гомологичных 5-членным фрагментам пре-S-областей, можно выделить наиболее редкие последовательности – 5–15, 45–60, 85–95, 125–135, 150–175 PIR (рис. 2).

С учетом этих данных нами был синтезирован ряд фрагментов пре-S-областей. Классическими методами с применением активированных пентафторфениловых [18, 19] и полимерных N-оксисукцинимидных [20] эфиров были получены пре-S-пептиды: 13–26, 16–26, 22–32, 134–144, 137–144, 142–149, 144–153, 121–127, 132–138 (рис. 3, схемы 1–5). Фрагменты 25–41, 132–144, 132–149 синтезированы твердофазным методом с использованием хлорметилированного сополимера стирола с 1% дивинилбензола. Для создания пептидной связи применяли симметричные ангидриды Вос-аминокислот или соответствующие 2-нитрофениловые и пентафторфениловые эфиры; отщепление конечного пептида и его деблокирование осуществлялось действием HF в присутствии анизол или *m*-крезола. Очистку полученных пептидов проводили гель-фильтрацией и адсорбционной хроматографией. Их индивидуальность подтверждали тонкослойной хроматографией, ВЭЖХ и аминокислотным анализом (табл. 1).

Полученные фрагменты были конъюгированы с высокомолекулярными носителями: сополимером винилпирролидона и малеинового ангидрида (VMA), сукцинированными желатином и BSA, микросферами на основе желатина и модифицированного VMA. Активацию осуществляли методом переэтерификации с TfaOSu [22]. Для предполагаемого адъювантного эффекта сукцинилжелатин модифицировали пептидами: Gly-Tyr, Gly-Tyr-Tyr и тафтенном.

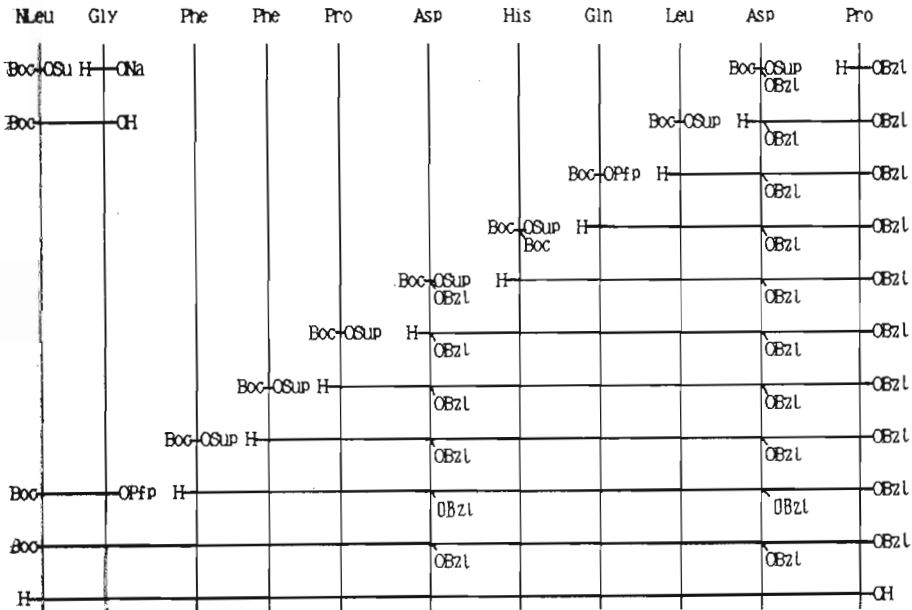
Конъюгацию пептидов проводили в DMF в присутствии третичного амина (до 5-кратного мольного избытка), а непрореагировавшие активированные группы удаляли аммиаком (50-кратный избыток) или эквивалентным количеством имидазола в присутствии 0,1 М бикарбонатного

Схема 3



Синтез пре-S2-(142-149)-фрагмента

Схема 4

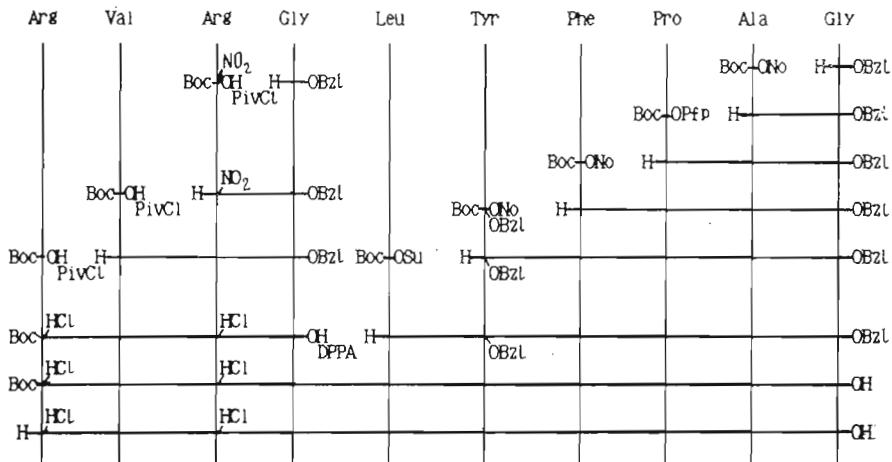


Синтез пре-S1-(22-32)-фрагмента последовательным наращиванием цепи в растворе методом пентафторфениловых и полимерных оксисукцинимидных эфиров

буфера либо добавлением тафтсина, Gly-Тур, Gly-Тур-Тур (до 20-кратных мольных избытков).

Некоторые пептиды были ацилированы по N-концу пальмитиновой или стеариновой кислотами и затем связаны с носителями, модифицированными октадециламином (NH<sub>2</sub>Od), за счет гидрофобного взаимодействия. Для оценки энергии связи использовался дансильированный пептид. Исходя из поляризации флуоресценции дансильной метки найдено, что энергия этого взаимодействия в водной среде составляет 7-9 ккал/моль (данные получены И. С. Литвиновым и М. В. Сидоровой - Институт иммунологии Минздрава СССР).

Микросферические носители получали путем сшивания VMA или активированного (OSu-эфир) сукцинилжелатина ферментативно-лабиль-



Синтез пре-S2-(134-144)-фрагмента в растворе последовательным наращиванием цепи методом активированных эфиров и избытков смешанных ангидридов триметилуксусной кислоты

ными кросс-агентами: сахарозой в присутствии  $\text{Et}_3\text{N}$  или олигопептидом  $\text{H-Gly-Phe-Gly-NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH-Gly}\leftarrow\text{Phe}\leftarrow\text{Gly-H(OP)}$  в двухфазной системе в условиях, при которых происходило формирование микросфер диаметром  $\sim 0,5-1$  мкм, после чего модифицировали их поверхность  $\epsilon$ -аминокапроновой кислотой или октадециламином.

Растворимые конъюгаты очищали диафильтрацией и хроматографировали на TSK-геле HW-55, микросфериты очищали промывкой и центрифугированием.

Из синтезированного набора пептидов для иммунизации нами были использованы сравнительно короткие фрагменты: 16-26, 132-139, 132-144, 134-144, 136-144, 142-149, 144-153, из них 16-26, возможно, содержат Т-клеточный сайт [4].

Полученными конъюгатами иммунизировали морских свинок с интервалом в 2 недели по схеме: каждой морской свинке вводили 40 мкг в две точки (первичная - внутрибрюшинно и в область лимфоузла, вторичная - внутрибрюшинно и в область позвоночника, третья проводилась аналогично вторичной).

Сыворотки тестировали методом иммуноферментного анализа (ИФА) на взаимодействие с различными антигенами (свободный пептид, конъюгат пептида с BSA, рекомбинантный белок фага fr(RA), сукцинированный желатин).

Результаты тестирования сывороток методом ИФА показывают, что иммунизация животных пептидными конъюгатами вызывает индукцию адекватного антипептидного ответа. Титры сывороток, определенные при сенсibilизации планшетов гомологичными свободными пептидами, ниже, чем при сенсibilизации конъюгатами пептидов с BSA (табл. 2, колонки 5, 6, 8), что, возможно, объясняется невысокой сорбцией свободных пептидов на полистироле по сравнению с BSA-конъюгатами. Лишь при использовании пептидов с гидрофобными аминокислотами из района 132-144 пре-S2-титры имеют сравнимые значения. Анализ сывороток, полученных после иммунизации препаратами, содержащими пре-S-(16-26)-фрагмент, показал (табл. 2, опыты 1, 2), что если на планшете был сорбирован гомологичный пептид или его конъюгат с BSA, то титры были крайне низкие, а при сенсibilизации RA их значения были вполне ощутимы. Такая разница может объясняться плохой сорбцией свободного пептида, а в случае конъюгата - низкой галтенной плотностью (2-3 моль/моль белка). Поэтому при сопоставлении иммуногенности препаратов, по-видимому, целесообразнее сравнивать титры, полученные при сенсibilизации планшетов RA (колонка 10). Уровень антителообразо-

Данные ИФА иммунного ответа морских свинок на пептиды с последовательностью пре-S-областей

Номер опыта	Пептид	Носитель	Содержание пептида, мкг	Данные иммуноферментного анализа: титры антителитидных сывороток к различным антигенам					Белок фага гг
				пре-S- (134-144)	пре-S- (132-144)	Gel	BSA-пре-S- (132-144)	BSA-пре-S- (144-153)	
1	пре-S-(16-26)	Gel	73	<1/10	<1/10	<1/10	<1/10	-	1/500
2	пре-S-(16-26) *	-		<1/10	<1/10	<1/10	<1/10	-	1/500
3	пре-S-(144-153)	Gel	260	<1/10	<1/10	<1/10	<1/10	<1/10	
4	пре-S-(144-153) *	ms-VPМ-NHod	61	<1/10	<1/10	<1/10	<1/10	1/900	1/1000
5	пре-S-(144-153) *	-		<1/10	<1/10	<1/10	<1/10	<1/10	1/300
6	пре-S-(142-149)	Gel	92	<1/10	<1/10	<1/10	1/100	<1/10	1/100
	пре-S-(134-144)	-	106						
7	пре-S-(132-144) **	VPМ-NHod	190	<1/10	<1/10	<1/10	<1/10	1/100	<1/10
8	пре-S-(132-144) **	-		<1/10	<1/10	<1/10	<1/10	-	1/300
9	пре-S-(132-144)	Gel	200	<1/10	<1/10	<1/10	1/100	-	1/300
10	пре-S-(136-144)	Gel	220	1/150	1/100	1/900	1/900	-	1/500
11	пре-S-(132-139)	Gel	450	1/100	1/100	1/100	1/100	-	1/900
12	пре-S-(134-144)	Gel-рафтосин	88+150(T)	<1/10	<1/10	1/400	1/100	-	1/1500
13	пре-S-(134-144)	ms-Gel	80	1/300	1/300	1/400	1/900	-	1/1500
14	пре-S-(134-144)	Gel-Gly-Тур	106	1/400	1/400	<1/10	1/400	-	1/3000
15	пре-S-(134-144)	Gel-Cly-Тур-Тур	85	<1/10	<1/10	1/300	1/300	-	1/100
16	пре-S-(134-144)	Gel-Cly-Тур+ms (pStур) d<0,1 мкм	11	<1/10	<1/10	<1/10	1/100	-	1/500

\* Пептиды ацелированы гальмитомильными остатками.

\*\* Пептид ацелирован стериоильным остатком.

вания, как видно из табл. 2, для одного и того же пептида зависит от структуры носителя. Максимальные значения титров антител получены при использовании микросферитов (опыты 4, 13) и желатина, модифицированного дипептидом Gly-Tyr (опыт 14). Ацилирование пептидов жирными кислотами (опыты 1, 5, 8), а также комплексообразование стеарилопептида с растворимым гидрофобным полимером (опыт 7) не приводило к заметной стимуляции антителопродукции. Покрытие полистирольного латекса (pStyr) пептидным конъюгатом также не давало эффекта (опыт 16). Конъюгация с немодифицированным желатином индуцирует незначительные титры антител (опыты 3, 6, 9—11).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о перспективности применения биodeградируемых микросфер и желатина, модифицированного Gly-Tyr, в качестве носителей синтетических гаптен-ов.

Согласно литературным данным [23], тафтсин, тетрапептидный фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина, имеющий сродство к Fc-рецепторам, обладает иммуностимулирующими свойствами. Однако результаты данной работы показывают, что ковалентное присоединение его по  $\alpha$ -аминогруппе к конъюгату (табл. 2, опыт 12) не приводит к стимуляции иммунного ответа. Повышение уровня продукции антиальбуминовых антител не наблюдалось и при иммунизации конъюгатом овалбумина модифицированным тафтсином. При совместном введении тафтсина с эритроцитами барана титры антител к эритроцитам не увеличивались.

Для подтверждения специфичности полученных антител к пре-S-доменам был проведен анализ антипептидных сывороток методом иммуноблоттинга, где в качестве антигена использовали RA [24]. Денситограммы стрипов при 620 нм приведены на рис. 4, 5. В качестве стандарта использовали моноклональные антитела MA 18/7 [25], специфичные к пре-S-фрагменту, любезно предоставленные В. Герлихом (Геттингенский университет, ФРГ); для окрашивания стрипы инкубировали с вторичными антителами, мечеными пероксидазой, с последующей обработкой *o*-дианизидином. Данные иммуноблоттинга (рис. 4, 5) показывают, что все антипептидные сыворотки специфичны в отношении пре-S-области. Профили денситограмм стрипов, обработанных антипептидными, анти-HBsAg-сыворотками и моноклональными антителами, полностью совпадают в главных максимумах. Наличие минорных полос, по-видимому, связано с примесями фрагментов в исходном антигене. Путем сравнения высоты максимумов можно дать приблизительную оценку иммуногенности использованных в этом эксперименте препаратов. Очевидно, что идет ее снижение в ряду опытов: 4=14, 3, 6, при этом наблюдается соответствие данным ИФА. Низкая концентрация пре-S-антител в анти-HBsAg-сыворотке может свидетельствовать о незначительном содержании пре-S-домена в используемом антигене.

В данной работе мы приводим результаты исследования по синтетическим фрагментам из довольно ограниченного района пре-S<sub>2</sub>- (132—153). Очевидно, эта область иммунодоминантна, что согласуется с полученными ранее данными [4]. Результаты, касающиеся остальных синтезированных нами фрагментов пре-S, будут приведены в последующих публикациях.

### Экспериментальная часть

В работе использовали N-гидроксисукцинимид (Fluka, Швейцария), производные аминокислот (Reanal, ВНР; Fluka, Швейцария), желатин (Fluka, Швейцария), сополимер N-винилпирролидона и малеинового ангидрида получали согласно работе [22].

Растворители очищали по методикам [26]. Величины оптического поглощения определяли с помощью спектрофотометра Ultrospec IIe (LKB, Швеция) и многоканального спектрофотометра Multiskan MCC (Flowlab, Англия). Аминокислотный анализ выполнен на анализаторе Biotronic LC-2000 (ФРГ). Диафильтрацию проводили на мембранах Amicon (США). Для ИФА применяли планшеты Nunc (Дания). Расчеты выполнены с помощью персональных компьютеров Apple IIe (Apple



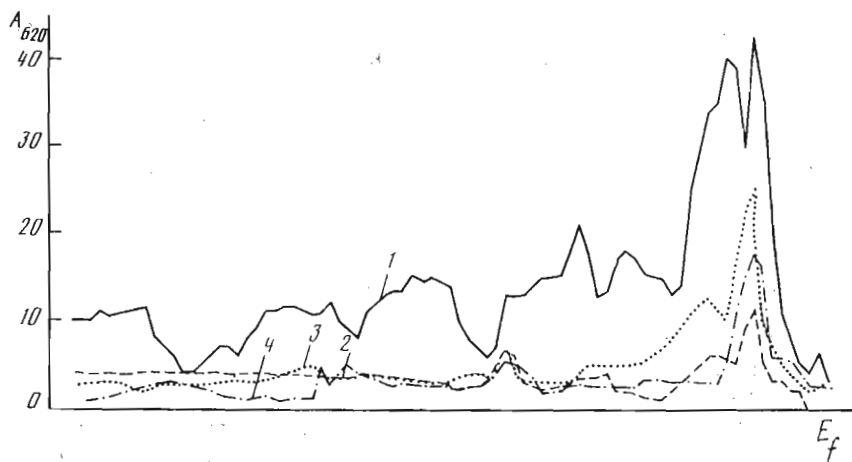


Рис. 4. Денситограммы стрипов иммуноблоттинга рекомбинантного белка фага fr, содержащего последовательность пре-S HBsAg. Стрипы проявляли: 1 — моноклональными антителами MA18/7; 2 — антисывороткой к пре-S-(144-153), иммобилизованному на микросферите (см. табл. 2, опыт 4); 3 — антисывороткой к пре-S-(134-144), иммобилизованному на модифицированном Gly-Tyr желатине (см. табл. 2, опыт 14); 4 — антисывороткой к пре-S-(134-144) и пре-S-(142-149), иммобилизованном на желатине (см. табл. 2, опыт 6)

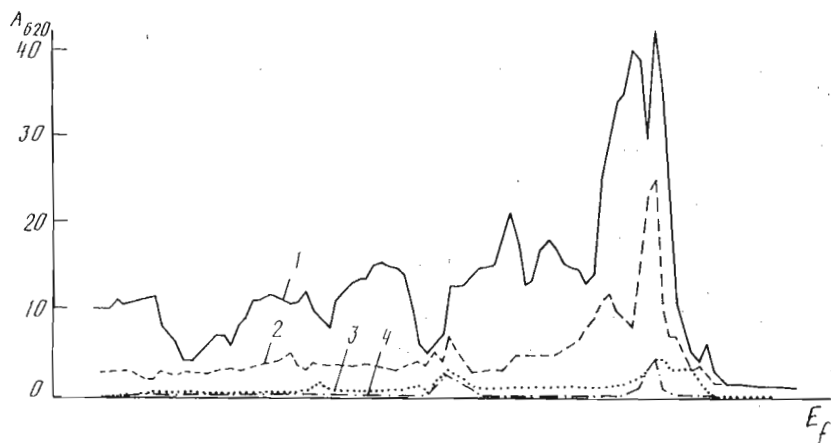


Рис. 5. Денситограммы стрипов иммуноблоттинга рекомбинантного белка фага fr, содержащего последовательность пре-S HBsAg. Стрипы проявляли: 1 — моноклональными антителами MA18/7; 2 — антисывороткой к пре-S-(144-153), иммобилизованному на микросферите (см. табл. 2, опыт 4); 3 — антисывороткой к пре-S-(144-153), иммобилизованному на сукцинилжелатине (см. табл. 2, опыт 3); 4 — антисывороткой к нативному HBsAg

Computers, США) и PC XT286 (IBM Corp., США), использовали банк аминокислотных последовательностей «PIR» Release 11,0 Dec. 1986 (Georgetown University Medical Center, США). Денситометрию проводили с помощью сканирующей приставки к спектрофотометру Hitachi-557 методом отражения в двухволновом режиме:  $\lambda$  570 и 620 нм. Для гель-фильтрации использовали носитель Fractogel TSK HW-55 (Toyo Soda MFG, Япония), ВЭЖХ выполнена на колонке (4×250 мм) Partisil ODS-3 (Whatman Inc., США).

Хроматографическую подвижность определяли в системах: *n*-BuOH — AcOH — H<sub>2</sub>O, 4:1:1 (А), CHCl<sub>3</sub> — MeOH — 32% AcOH, 60:45:20 (Б), *i*-PrOH — 25% NH<sub>3</sub>, 75:25 (В), *n*-BuOH — AcOH — H<sub>2</sub>O, 3:1:1 (Г) на стеклянных пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ), вещества обнаруживали хлоро-толидиновой реакцией.

**Сукцинирование желатина.** К раствору 5 г желатина в минимальном количестве воды прибавляли порциями 5 г янтарного ангидрида, подерживая pH 8-9 добавлением Et<sub>3</sub>N. Через 30 мин довели pH раствора

до 5,5. Осадили полученный продукт в 10-кратный объем изопропилового спирта. Осадок промыли эфиром и высушили в вакууме. Получено 4,9 г сукцинилжелатина (Gel).

*Активация сукцинированного желатина.* К суспензии 1 г Gel в безводном DMF прибавляли раствор TfaOSu в DMF, полученный из 1 г (8,6 ммоль) HOsu и 2,4 мл (17,2 ммоль) (Tfa)<sub>2</sub>O по методу [17], и 0,8 мл (10 ммоль) пиридина. Через 1 ч после полного осветления раствора продукт осаждали 10-кратным объемом изопропилового спирта, промывали спиртом и эфиром, высушивали в вакууме. Получили 1,1 г Gel-OSu с концентрацией активных групп 0,6 ммоль/г (определено спектрофотометрически в 0,1 н. растворе аммиака  $\epsilon_{260}=9800$ ).

*Типовая методика иммобилизации пептидов.* К раствору 100 мг Gel-OSu (или ms-Gel-OSu\*) в 1 мл DMF прибавляли 20–50 мкмоль пептида и 50–100 мкмоль NMM, через 1 сут к полученному вязкому раствору для удаления избытка активированных групп прибавляли эквивалентные количества имидазола в присутствии 0,1 М бикарбонатного буфера или 50-кратные избытки аммиака или для модификации прибавляли тафтсин, Gly-Тур, Gly-Тур-Тур (20-кратные мольные избытки). Через 1 ч разбавляли 50 мл воды, диафильтровали на мембране PM10 против воды не менее 3 раз. Содержание пептида и модификаторов определяли с помощью аминокислотного анализа. Получали 70–100 мг конъюгата со средней плотностью по пептиду 100–260 мкг/мг.

*Получение полимерного микросферического носителя.* Раствор 10 ммоль сополимера N-винилпирролидона и малеинового ангидрида, 1 ммоль сахарозы и 2 ммоль Et<sub>3</sub>N в 5 мл DMF эмульгировали при интенсивном перемешивании в 200 мл силиконового масла и обрабатывали ультразвуком (400 Вт) 5 мин. Нагревали до 100°С в течение 60 мин, охлаждали, разбавляли равным количеством эфира, центрифугировали при 5°С, промывали эфиром. Получали микросферит (ms) диаметром около 0,5–1 мкм с выходом 90% от исходного веса.

*Получение гидрофобизированного микросферита.* К суспензии 100 мг микросферита в 1 мл DMF прибавляли 5 мг октадециламина, через 20 ч добавляли 50 мкл воды и 20 мкл NMM, через 60 мин центрифугировали, осадок промывали эфиром, дихлорметаном и высушивали в вакууме над КОН. Получали 85 мг гидрофобизированного микросферита (ms-VRM-NH-Od).

*Иммобилизация на микросферическом носителе.* К суспензии 30 мг гидрофобизированного микросферита в 500 мкл 0,1 М карбонатного буфера прибавили 16 мг пептиджелатина, содержащего 260 мкг/мг пептида пре-S-(144–153). Встряхивали 2 ч, промывали водой. Полученную суспензию использовали для иммунизации. Аналитический образец микросферита содержит 61 мкг пептида пре-S-области на 1 мг конъюгата.

*Получение пептида OP.* К раствору 1,1 г (9,0 ммоль) гексаметилендиамина в дихлорметане прибавляли 10 г Boc-Gly-OSup (емкость по Gly 2,2 ммоль на 1 г полимера), через 30 мин прибавляли 2,4 мл (21,7 ммоль) NMM. Через 2 ч фильтровали, промывали полимер спиртом, объединенный фильтрат упаривали в вакууме и растворяли в этилацетате. Промывали дважды 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>, дважды 5% раствором KHSO<sub>4</sub> и водой. Органический слой высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Полученное бесцветное масло с R<sub>f</sub> 0,65 (Д), 0,87 (Е) обрабатывали трифторуксусной кислотой (TfaOH) 40 мин, упаривали в вакууме и осаждали эфиром. Осадок промывали эфиром и высушивали в вакууме над КОН. Получено 4,6 г (91% от теории) TfaOH<sub>2</sub>-H-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH ← Gly-H с R<sub>f</sub> 0,12 (Г).

К раствору 4,0 г (7,1 ммоль) полученного пептида в DMF прибавили 0,72 мл (7,8 ммоль) NMM и 10,4 г Boc-Phe-OSup (емкость по Phe 1,7 ммоль на 1 г полимера), через 2 ч фильтровали, промывали полимер спиртом, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в этилацетате и обрабатывали как указано выше. Органический слой упаривали, остаток растирали с эфиром. Получено 4,4 г (86% от теории) Boc-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH ←

\* Микросферический активированный желатин (см. ниже).

← Gly ← Phe-Вос с  $R_f$  0,68 (Д). К 4,0 г (5,5 ммоль) полученного пептида прибавили 5 мл TfaOH, через 40 мин упаривали в вакууме и осаждали эфиром. Осадок высушивали в вакууме над KOH. Получено 2,3 г (5,2 ммоль, 95% от теории) TfaOH<sub>2</sub>·H-Phe-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH ← Gly ← ← Phe-H с  $R_f$  0,33 (Г) и 0,10 (Д). Полученный трифторацетат пептида растворяли в DMF, прибавляли 0,63 мл (5,7 ммоль) NMM и 10 г Вос-Gly-OSup (емкость по Gly 2,2 ммоль на 1 г полимера) и оставляли на ночь. Реакционную смесь обрабатывали по указанной выше схеме. Полученное масло с  $R_f$  0,59 (Г) обрабатывали TfaOH в течение 40 мин, реакционную смесь упарили в вакууме, остаток растирали с эфиром. Получили 4,9 г (94% от теории) ОР с  $R_f$  0,50 (Б), 0,31 (Г) и т. пл. 133° С. Аминокислотный анализ: Gly 4,0, Phe 1,89.

*Получение желатинового микросферического носителя.* К раствору 100 мг Gel-OSu в 5 мл DMF прибавили 4,0 мг (6,0 мкмоль) ОР, эмульгировали при интенсивном перемешивании в 200 мл силиконового масла и обрабатывали 5 мин ультразвуком (400 Вт). Прибавляли при перемешивании 2 ммоль Et<sub>3</sub>N в 1 мл DMF и нагревали до 60° С в течение 60 мин, охлаждали, разбавляли равным количеством эфира, центрифугировали при 5° С, промывали эфиром. Получали микросферит диаметром около 0,5–1 мкм с выходом 90% от исходного веса.

*ИФА.* По 50 мкл растворов синтетических пептидов, конъюгатов пептидов с BSA и рекомбинантный белок фага fr, содержащий пре-S-последовательность, наносили в лунки в концентрациях 10, 100 и 20 мкг/мл соответственно в 0,01 М карбонатном буфере при pH 9,5. Сорбцию проводили в течение 20 ч при 4° С. Образцы сывороток (по 50 мкл) в необходимых серийных разведениях (0,01 М фосфатный буфер, содержащий 0,9% NaCl, 0,05% твин-20 и 0,2% BSA) вносили в лунки и инкубировали 1 ч при 37° С. После 5-кратной отмывки разводящим буфером инкубировали 30 мин с мечеными пероксидазой хрена козыми антителами к IgG морских свинок (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва), промыв, вносили 0,04% раствор *o*-фенилендиамина в 0,1 М цитрат-фосфатном буфере (pH 4,7), содержащем 0,005% перекиси водорода. Через 20 мин при 20° С проводили фиксацию, добавляя по 10 мкл 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и измеряли оптическое поглощение при длине волны 492 нм.

*Иммуноблоттинг.* 5 мг клеток-продуцентов гомогенизировали в 100 мкл 0,062 М трис-HCl-буфера, содержащего 2% додецилсульфата натрия (SDS) и 5% 2-меркаптоэтанола, при pH 6,8. Нагревали в течение 5 мин до 100° С. Диагностировали против того же буфера, содержащего 20% глицерина и 0,1% бромфенолового синего. Аликвоту, содержащую 50 мкг белка, наносили на концентрирующий 4% полиакриламидный гель (соотношение акриламид – N,N-метиленбисакриламид 35:1, в 0,375 М трис-HCl-буфере, pH 6,8, содержащем 0,1% SDS и 0,1 М глицин), разделение проводили на 12,2% геле (соотношение акриламид – N,N-метиленбисакриламид 35:1, в 0,125 М трис-HCl-буфере, pH 8,9, содержащем 0,1% SDS) при напряжении 200 В до прохождения зоны красителя к краю геля (около 3 ч).

Разделенные полипептиды переносили на нитроцеллюлозные фильтры (Schleicher und Schüll, Inc.) с помощью прибора Transblot (Bio-Rad, США) в течение 6 ч при постоянном токе 250 мА. Свободные центры сорбции нитроцеллюлозы насыщали обработкой в течение 1 ч при 20° С 2% раствором BSA в 0,05 М растворе трис-HCl, содержащем 150 мМ NaCl. Для идентификации специфических детерминант фильтры обрабатывали антипептидными сыворотками в разведении 1:20. Неспецифически связанные антитела удаляли промывкой в 0,1% растворе твина-20 (Sigma, США). Проявление и денситометрию проводили как указано выше. В качестве положительного контроля использовали антисыворотку к плазменному HBsAg (НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР, Горький), выделенному без ферментативной обработки, и моноклональные антитела MA 18/7 [25].

1. Brechot C. // Bull. Inst. Pasteur. 1987. V. 85. № 2. P. 125-149.
2. Rustgi V. K., Hoojnagle J. H. // Semin. Liver disease. 1987. V. 7. № 1. P. 40-46.
3. Gerlich W. H., Heerman K. H. // J. Cell. Biochem. Suppl. 11D. 1987. P. 4.
4. Milich D. R. // Immunology Today. 1988. V. 9. № 12. P. 380-386.
5. Heerman K. H., Kruse F., Seifer M., Gerlich W. H. // Intervirology. 1987. V. 28. № 1. P. 14-25.
6. Neurath A. R., Jameson B. A., Huima T. // Microbiol. Sci. 1987. V. 4. № 2. P. 45-51.
7. Kent S. B. H., Parker K. // J. Cell. Biochem. Suppl. 11D. 1987. P. 5.
8. Milich D. R., McLachan A., Chisari F. V., Kent S. B. H., Thornton G. B. // J. Immunology. 1986. V. 137. № 1. P. 315-322.
9. Itoh V., Takai E., Ohuma H., Kitajima K., Tsuda Y., Machida A., Mishuro S., Nakamura T., Nijkawa Y., Mayumi M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 23. P. 9174-9178.
10. Gregoriadis G., Davis D., Davis A. // Vaccine. 1987. V. 5. P. 145-151.
11. Корюкова А. А., Григорьева А. С., Гурвич А. Е. // Бюл. exper. биол. 1985. № 7. С. 49-53.
12. Тихоненко Т. И. // Молекулярн. биология. 1984. Т. 48. № 1. С. 176-185.
13. Herzogberg L. A., Tokuhisa T. // J. Exp. Med. 1982. V. 155. P. 1730-1737.
14. Warren H. S., Vogel F. R., Chedid L. A. // Ann. Rev. Immunol. 1986. V. 4. P. 369-388.
15. Hopp T. P., Woods K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 3824-3828.
16. Kurplus P. A., Schulz G. E. // Naturwissenschaften. 1985. B. 72. S. 212.
17. Welling G. W., Weijer W. J., van der Zee R., Welling-Wester S. // FEBS Lett. 1985. V. 188. № 2. P. 215.
18. Kisfaludy L., Roberts J. E., Johnson R. H., Mayer G. L., Kovacs L. // J. Org. Chem. 1970. V. 35. № 10. P. 3563-3565.
19. Ильина А. В., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1988. С. 2816-2818.
20. Андреев С. М., Юртанов А. И., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. // Докл. АН СССР. 1973. Т. 212. № 1. С. 108-111.
21. Galibert F., Mandart E., Fitoussi F., Tiollais F., Charnay P. // Nature. 1979. V. 281. P. 646-650.
22. Андреев С. М., Сидорова М. В., Ракова О. А., Цветков Д. Е., Фомина Л. А. // Биорган. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 696-700.
23. Fridkin M., Gottlieb P. // Mol. and Cell. Biochem. 1981. V. 41. № 1. P. 73-97.
24. Козловская Т. М., Сомицкая И. В., Сергеева С. М., Цибинович В. В., Пумпен П. П., Грен Э. Я. // Новое в гепатологии: методы, факты, концепции. Рига, РМИ, 1988. С. 40-49.
25. Heerman K. H., Kruse F., Seifer M., Gerlich W. H. // Intervirology. 1987. V. 23. № 1. P. 14-25.
26. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. С. 434.

Поступила в редакцию  
28.II.1989

D. E. TSVETKOV, A. V. ILJINA\*, S. M. ANDREEV, A. A. SOKOLENKO\*,  
S. P. PAVLIKOV, P. PUMPEN, M. A. NOVIKOV

STUDIES OF ANTIGENIC STRUCTURE OF THE HEPATITIS  
B VIRUS PROTEINS. I. SYNTHESIS OF PRE-S FRAGMENTS  
OF THE HEPATITIS B VIRUS ENVELOPE PROTEINS  
AND THEIR IMMUNOGENICITY

*Institute of Immunology, Health Ministry of the USSR, Moscow:*

*\*Institute of Organo Element Compounds, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow:*

*\*\*Institute of Epidemiology and Microbiology, Health Ministry  
of the USSR, Moscow*

Fragments of hepatitis B virus envelope proteins corresponding to the parts of the pre-S domain were synthesised and immobilised on the carriers with low own immunogenicity. The highest stimulation of the antibody production was observed for the antigens immobilised on microspherical carriers or gelatine modified by H-Gly-Tyr-OH. Among peptides used for immunization, pre-S fragment 134-144, conjugated with microspherical carrier, proved to be the most active.