



УДК 547.964

© 1992 г.

Ю. А. Семилетов, В. А. Карпова, Ю. Е. Худяков,
Р. П. Павлюченкова, С. О. Вязов, В. Д. Смирнов,
Е. И. Прокуронова*, Г. А. Желтухина*, Р. П. Евстигнеева*

СИНТЕЗ И АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ БЕЛКА НУКЛЕОКАПСИДА ВИРУСА ГЕПАТИТА ДЕЛЬТА

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН, Москва;

*Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

На основании теоретического анализа вторичной структуры, гидрофильности и акрофильности выявлен ряд областей антигена вируса гепатита дельта (HDAg), предположительно содержащих иммунодоминантные В-эпитопы. Методом твердофазного синтеза получена серия пептидов, соответствующих этим областям. Все синтезированные пептиды взаимодействовали с соответствующими антипептидными сыворотками кроликов. Пептиды и их конъюгаты с белками исследованы в реакции ИФА с индивидуальными препаратами и пулами анти-HD-позитивных сывороток крови пациентов с хроническим гепатитом дельта. Высокая антигенная активность пептида 65–80 позволяет утверждать, что его можно использовать для выявления антител в сыворотках крови больных и что один из антигенно-активных районов дельта антигена располагается между 65-м и 80-м аминокислотными остатками.

Вирус гепатита дельта — дефектный инфекционный агент, являющийся причиной тяжелых, часто летальных форм остро и хронического гепатитов и цирроза печени [1, 2]. Вирион HDV содержит одноцепочечную циркулярную РНК 1,75 кб [3] и высокоосновный фосфорилированный по остаткам серина белок — антиген вируса гепатита дельта [4], упакованные в оболочку поверхностного антигена вируса гепатита В [5].

Инфекционность дельта-агента связана с присутствием в организме HBV и реализуется в виде супер- или коинфекции с последним.

В геномной и антигеномной цепях РНК идентифицировано пять открытых рамок считывания, способных кодировать белки, состоящие из 100 и более аминокислот [3]. Наибольшая из этих рамок, расположенная в антигеномной цепи, кодирует единственный вирусспецифический антиген — HDAg, который присутствует в крови и ткани печени инфицированных и представлен двумя полипептидами: P27, содержащим 214 аминокислотных остатков, и его укороченной формой P24, имеющей 195 аминокислот [4, 5]. Полные геномные последовательности определены для двух различных штаммов HDV. Один получен после пассажа через шимпанзе [3], другой — непосредственно из человеческой сыворотки [6]. Полипептиды P27 и P24, возможно, находятся в форме димера [7], связаны с РНК и входят в состав вирусного нуклеокапсида. Структура и функции HDAg изучены недостаточно.

Использованные сокращения: HDV — вирус гепатита дельта; HDAg — антиген вируса гепатита дельта; HBV — вирус гепатита В; HBsAg — поверхностный антиген вируса гепатита В; Вос — *трет*-бутилоксикарбонил; DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид; BSA — бычий сывороточный альбумин; KLN — гемодинанн виноградной улитки; Асм — ацетамидометил; НОВ1 — 1-оксибензотриазол; ОРфр — пентафторфенил; ONp — *п*-нитрофенил; Вzl — бензил; TFA — трифторуксусная кислота; TFMSA — трифторметансульфокислота; EDIPA — этилдиизопропиламин; MBS — N-оксисукцинимидный эфир 3-малеинимидобензойной кислоты.

В связи с отсутствием надежных и доступных серодиагностических средств выявления этой инфекции клинико-эпидемиологические исследования в нашей стране проводятся в ограниченном объеме. В состав существующих диагностикумов как важнейшие компоненты входят, во-первых, препарат вирусного антигена, выделяемый из пораженных клеток печени, и, во-вторых, антитела к дельта-антигену из сыворотки крови пациентов с дельта-инфекцией. Одним из путей создания эффективных и безопасных диагностических средств является использование синтетических пептидов или генно-инженерных препаратов, содержащих в своем составе иммунодоминантные эпитопы HDAg.

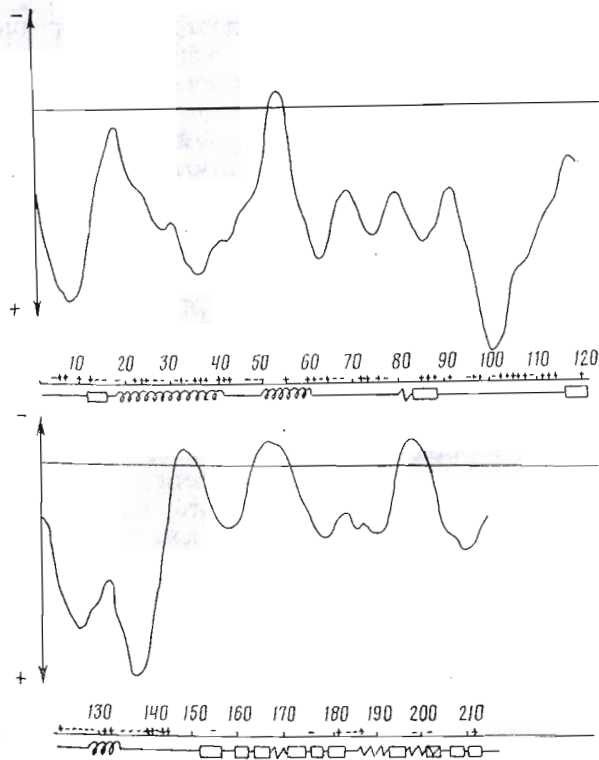
К настоящему времени появились две публикации о применении синтетических пептидов из последовательности HDAg и антител к ним для эпитопного картирования белка и выявления в нем иммунодоминантных участков. Данные, приведенные в статье Вэнга и соавт. [8], указывают на высокую антигенность участков 156—184 и 197—211, аминокислотная последовательность которых соответствует геномной последовательности, установленной Макино и др. [6]. В то же время в статье Бергман и соавт. [9] в качестве наиболее антигенно-активного рассматривается участок между 52-м и 93-м аминокислотными остатками HDAg, состав которого соответствует аминокислотной последовательности, определенной в работе [3]. Причины таких различий не могут быть объяснены незначительными различиями в аминокислотной последовательности, поэтому целесообразно более детальное исследование каждой из выявленных иммунодоминантных областей с использованием широкого спектра синтетических пептидов различной длины. При этом уместно отметить, что для сохранения антигенно-активной конформации во многих случаях необходим достаточно протяженный участок пептидной цепи, поэтому в настоящем исследовании при поиске антигенно-активных участков мы использовали пептиды с длиной цепи от 10 до 16 аминокислотных остатков.

В представленной работе описано выявление с помощью синтетических пептидов антигенно-активного участка белка нуклеокапсида HDV, хорошо узнаваемого антителами из сывороток крови больных.

Исследование включало три основных этапа: 1) теоретический анализ расположения иммунодоминантных участков в составе HDAg; 2) синтез выбранных пептидных фрагментов; 3) изучение антигенных свойств синтезированных пептидов.

Расчет вероятной вторичной структуры HDAg и акрофильности отдельных участков белка проводился с использованием соответствующих программ [10, 11]. Учитывались также результаты анализа структуры по программам гидрофильности [12], В-антигенности [13], подвижности [14]. Гидропатический профиль HDAg и сведения о вероятных элементах его вторичной структуры приведены на рисунке. Анализ структуры показывает, что белок высокогидрофилен и большинство участков, соответствующих β -поворотам, обычно сопряженных с расположением В-эпитопов, расположено в С-концевой части. Необходимо, однако, принимать во внимание, что в нуклеокапсидном белке ряд участков вовлечен во взаимодействие с геномной РНК, что может существенно ограничивать применимость используемых расчетов для определения его реальной конформации.

Считая наличие симметрично расположенных зон β -поворотов существенным параметром вторичной структуры В-эпитопа [10, 13], при выборе участков мы ориентировались на зоны с повышенной акрофильностью [11], содержащие β -повороты, наличие которых предсказывалось не только для целого белка, но и для отдельных пептидных фрагментов. Так, фрагмент 169—179, соответствующий участку белка с предсказанной высокой акрофильностью, содержит два β -поворота в районах 169—172 и 175—177.



Гидропатический профиль HDag [12]. Приведены сведения о распределении заряженных аминокислот и вероятных элементах вторичной структуры белка [10]

Кроме концевых участков белка, которые часто располагаются на поверхности глобулы, наше внимание привлечен неструктурированный район 60–90, обладающий повышенной гидрофильностью, содержащий значительное количество равноименно заряженных ионогенных групп (которые могут способствовать закреплению определенных конформаций) и имеющий β -поворот в районе Pro⁸⁵.

С учетом вышеизложенного для синтеза были выбраны следующие пептиды:

Cys(Acm)-SES RKNR GGREE	4–15
GGREE I LEQWVAG -Cys(Acm)	11–23
KIKKLEEDNP -Cys(Acm)	40–49
KDKDGE GAPPA-Cys(Acm)	61–71
GEGAPPAKRARTDQME -Cys(Acm)	65–80
DAGPRKRPLGGF -Cys(Acm)	82–94
Cys(Acm)-N PLEGG SRGAPGGGF	153–167
PSMQGV PESRF-Cys(Acm)	169–179
TGEGLDIR GSQGF-Cys(Acm)	182–195
PADPPF SQS-Cys(Acm)	201–211

Пептиды соответствуют участкам последовательности HDag: пептиды 40–49, 61–71, 82–94, 153–167, 169–179, 182–195 и 201–211 по данным работы [6], пептиды 4–15, 11–23 и 65–80 – по данным работы [3].

Важно отметить, что, согласно последним результатам Салданы и соавт. [15], первичные структуры HDag из вируса, пассированного на шимпанзе, и вируса, выделенного из сыворотки крови человека, на участке 65–80 тождественны, хотя и отличаются от структуры, опубликован-

ной Макино [6]. Таким образом, речь идет о вариабельности белковой последовательности вирусов, выделенных от разных пациентов, что подтверждает представление о высокой изменчивости HDV.

Дополнительную концевую аминокислоту Cys(Asm) вводили в пептиды для их конъюгирования с белками через сульфгидрильную группу, в случае пептида 201—211 остаток Cys²¹¹ входит в состав природной последовательности. Пептиды 4—15 и 153—167 были синтезированы в двух вариантах: с N-концевым остатком Cys(Asm) и без него.

Синтез всех пептидов был выполнен твердофазным методом [16] на хлорметилированной матрице (тефлон с радиационно привитым полистиролом) с использованием Вос-производных L-аминокислот [17]. Стартовые аминокислоты присоединяли к хлорметилированному носителю в присутствии триэтиламина и иодида натрия как катализатора [18]. Нагрузка на носитель составляла 0,3—0,6 ммоль/г. Пептидная цепь наращивалась ступенчато с C-конца с применением в основном метода симметричных ангидридов. Остатки Вос-Asn и Вос-Gln вводились в пептидполимер методом активированных эфиров [19].

Деблокирование α -аминогрупп пептидполимеров проводили 50% раствором TFA в хлористом метиле с последующей нейтрализацией 10% раствором EDIPA в хлористом метиле.

Синтез триптофан- и метионинсодержащих пептидов проводили в условиях, обеспечивающих предотвращение побочных реакций, возможных для этих аминокислотных остатков. Все стадии синтеза после введения Met или Trp в пептидполимер осуществляли в атмосфере инертного газа для предотвращения окислительной деструкции остатка Trp и предотвращения незащищенного остатка Met от окисления кислородом воздуха в сульфоксид. Деблокирование аминогрупп таких пептидполимеров проводили 35% раствором TFA в хлористом метиле с добавлением 2% меркаптоэтанола при наличии остатка Trp [20] или 10% анизол — в случае остатка Met [21].

Отщепление всех синтезированных пептидов от полимера проводили действием 1 М раствора TFMSA и TFA в присутствии тиоанизола [22] с последующей очисткой геле-хроматографией на сефадексе G-10 в 10% водной уксусной кислоте. Выходы очищенных пептидов составляли 18—40%, за исключением триптофансодержащего пептида 11—23-Cys(Asm), выход которого составил 7%.

На табл. 1 и 2 в качестве примеров приведены синтезы пептидов 65—80-Cys(Asm) и 169—179 HDAg.

Для характеристики полученных пептидов были использованы ТСХ и ВЭЖХ, количественный аминокислотный анализ, определение удельных углов оптического вращения и N-концевых аминокислот (данные приведены в табл. 3).

Для проведения иммунологических исследований применялись как свободные пептиды, так и их конъюгаты с белками-носителями BSA и KLH. Конъюгаты пептидов с KLH получали с помощью MBS по реакции между SH-группой пептида и белком [23]. Для анализа антипептидных сывороток были получены конъюгаты пептидов с BSA, полученные с применением глутарового альдегида [24].

Степень конъюгации, определенная количественным аминокислотным анализом, составляла 10—17 молекул пептида на молекулу BSA или на каждую тысячу аминокислот KLH.

Все исследованные сыворотки реагировали с соответствующими «гомологичными» пептидами и не взаимодействовали с контрольными, «гетерологичными». На следующем этапе все синтезированные пептиды — в свободном виде и в форме конъюгатов с BSA — были исследованы в прямом и непрямом вариантах иммуноферментного анализа как с индивидуальны-

Условия и результаты синтеза пептидного фрагмента 65—80-Cys(Acm) HDAg

Реагенты, использованные для конденсации	Избытки ацилирующих агентов, моль/моль аминокислотного полимера	Время реакции, ч	Растворитель	Нингидриновый тест
ВосGlu(Bzl)ONp/HOBT	2/2	20	DMF	+
»	1/1	2	DMF	—
ВосMetOH/DCC	2/1	2	DMF	+
»	2/1	2	CH ₂ Cl ₂	—
ВосGlnONp/HOBT	2/2	20	DMF	+
»	2/2	3	DMF	—
ВосAsp(Bzl)OH/DCC	2/1	2	DMF	+
»	1/0,5	1	CH ₂ Cl ₂	—
ВосThr(Bzl)OH/DCC	2/1	2	DMF	+
»	1/0,5	2	CH ₂ Cl ₂	—
ВосArg(NO ₂)/NCC	2/1	3	DMF	+
» /HOBT/DCC	1/1/1	2	DMF	—
ВосAlaOH/DCC	2/1	2	DMF	—
ВосArg(NO ₂)/HOBT/DCC	2/2/2	20	DMF	—
ВосLys(Z)OH/DCC	2/1	2	DMF	+
»	1/0,5	2	CH ₂ Cl ₂	—
ВосAlaOH/DCC	2/1	2	DMF	+
»	1/0,5	1	CH ₂ Cl ₂	—
ВосProOH/DCC	2/1	2	DMF	—
ВосProOH/DCC	2/1	2	DMF	—
ВосAlaOH/DCC	2/1	3	DMF	—
ВосGlyOH/DCC	2/1	2	DMF	+
»	1/0,5	2	CH ₂ Cl ₂	—
ВосGlu(Bzl)ONp/HOBT	2/2	20	DMF	+
»	1/1	2	DMF	—
ВосGlyOH/DCC	2/1	3	DMF	+
»	1/0,5	1	CH ₂ Cl ₂	—

ми препаратами сывороток крови пациентов, содержащих анти-НД-антигена (титры по ELISA не ниже 10^{-5}), так и с различными пулами, состоящими из 8—10 анти-НД-положительных сывороток крови пациентов с хроническим гепатитом дельта (табл. 4).

Как следует из данных, приведенных в табл. 4, выраженная положительная реакция ($S/N > 5,0$) была отмечена только в опытах с пептидом 65—80 и его конъюгатом с BSA, положительная реакция (S/N в пределах 3,5—5,0) — для пептида 169—179, слабоположительная (S/N в пределах 2,1—3,5) — для конъюгатов пептидов 169—179, 201—211, 153—167, 40—49. При этом с отдельными индивидуальными сыворотками пептид 169—179 взаимодействовал более эффективно ($S/N > 5$), что коррелирует с результатами Вэнга [8] и может служить косвенным подтверждением гетерогенности вирусной популяции, циркулирующей на территории СССР.

Включенный в каждый опыт положительный контроль, в котором использовался HDAg из ткани печени хронических больных, демонстрировал выраженную положительную реакцию в каждом опыте.

Локализация секвенционных антигенных детерминант вирусных белков с помощью исследования антигенных свойств синтетических пептидов — широко распространенный в современной вирусологии прием. Сле-

Условия и результаты синтеза пептидного фрагмента 169—179-Cys(Asm) HDAg

Реагенты, использованные для конденсации	Избытки ацилирующих агентов, моль/моль аминоацилполимера	Время реакции, ч	Растворитель	Нингидриновый тест
ВосPheONp/HOBT	3/3	24	DMF	+
ВосPheOH/DCC	4/2	2	CH ₂ Cl ₂	—
ВосProOH/DCC	4/2	1,5	CH ₂ Cl ₂	+
»	4/2	1,5	DMF	—
ВосSer(Bzl)OH/DCC	4/2	70	CH ₂ Cl ₂	—
ВосGlu(Bzl)ONp/HOBT	3/3	24	DMF	—
ВосProOH/DCC	4/2	1,5	CH ₂ Cl ₂	+
»	4/2	2	DMF	—
ВосValOH/DCC	4/2	2	CH ₂ Cl ₂	+
»	4/2	24	CH ₂ Cl ₂	+
»	4/2	2	DMF	—
ВосGlyOPfp	3	24	DMF	—
ВосGlnONp/HOBT	3/3	70	DMF	—
ВосMetOH/DCC	4/2	2	CH ₂ Cl ₂	+
»	4/2	24	DMF	—
ВосSer(Bzl)OH/DCC	4/2	24	CH ₂ Cl ₂	—
ВосProOH/DCC	4/2	2	CH ₂ Cl ₂	+
»	4/2	24	CH ₂ Cl ₂	—

дует, однако, учитывать как сложности, связанные с предсказанием пространственной структуры исследуемого белка, в особенности внутри-капсидного, находящегося во взаимодействии с РНК, так и то обстоятельство, что конформация пептидов в растворе или в составе конъюгата не всегда тождественна конформации соответствующего участка в составе белка. Дополнительные трудности вызываются гетерогенностью популяции самого HDV и гетерогенностью набора антител в сыворотках отдельных пациентов. Эти обстоятельства объясняют заметные расхождения в результатах исследования антигенной активности синтетических пептидов, получаемых в разных лабораториях. Возможно, что обнаруженная нами невысокая антигенная активность участков 40—49, 153—167 и 201—211 может рассматриваться как свидетельство участия этих зон в формировании иммунного ответа на HDAg, однако структура этих эпитопов нуждается в дальнейшем исследовании.

В то же время высокая антигенная активность пептида 65—80 в реакции с различными пулами сывороток позволяет утверждать, что его можно использовать для выявления антител в сыворотках крови и что один из антигенно-активных районов дельта-антигена располагается между 65-м и 80-м аминокислотными остатками.

Экспериментальная часть

В синтезе пептидов использованы Вос-аминокислоты *L*-ряда и их производные: *O*-Bzl-Tyr, -Ser, -Thr, β - и γ -бензиловые эфиры соответственно Asp и Glu, N^{α} -Z-Lys, N^{α} -NO₂-Arg, *n*-нитрофениловые эфиры Asp и Glu фирмы Reanal (Венгрия), а также Вос-Cys(Asm) фирмы Serwa (Швейцария).

В качестве полимерной матрицы использован тефлон с радиационно привитым полистиролом (10%).

Характеристики синтетических пептидов

Пептид	Выход, %	R _f (система)	ВЭЖХ, t, мин	[α] _D ²⁰ , град	N-Концевая аминокислота	Аминокислотный анализ *
4—15	22,5	0,26(7)	18,5 (б)	—46,7 (с 0,3, 10% AcOH)	Ser	D 1,00(1) S 4,81(2) G 2,11(2) K 0,93(1) R 3,14(3) E 3,21(3)
4—15-Cys(Acm)	19,0	0,34(7)	20,6 (б)	—126,7 (с 0,3, 10% AcOH)	»	»
11—23-Cys(Acm)	7,4	0,32(3) 0,23(1)	21,0 (а)	—50,0 (с 0,43, 50% AcOH)	Gly	G 3,13(3) R 0,86(1) E 4,50(4) I 0,93(1) L 1,00(1) V 1,00(1) A 1,24(1)
40—49-Cys(Acm)	21,0	0,77(3)	4,7 (а)	—329,0 (с 0,5, 10% AcOH)	Lys	D 1,77(2) E 2,21(2) I 0,76(1) L 1,00(1) K 2,86(3) P 0,75(1)
61—71-Cys(Acm)	38,0	0,37(7)	20,6 (б)	—126,7 (с 0,3, 10% AcOH)	Lys	K 1,91(2) D 2,10(2) G 1,96(2) A 2,00(2) P 1,94(2) E 1,05(1)
65—80-Cys(Acm)	18,5	0,39(7)	15,5 (б)	—90,5 (с 1,0, 10% AcOH)	Gly	D 1,02(1) T 1,00(1) E 3,20(3) P 1,80(2) G 1,78(2) A 2,77(3) M 0,78(1) K 0,94(1) R 1,71(2)
82—94	19,5	0,23(2)	22,7 (а)	—141,0 (с 0,5, 10% AcOH)	Asp	P 1,90(2) G 3,20(3) A 0,89(1) L 1,05(1) F 1,00(1) K 0,90(1) R 2,50(3)
106—123-Cys(Acm)	19,7	0,71(5)	12,5 (а)	—69,7 (с 0,17, 10% AcOH)	Lys	D 0,81(1) S 4,12(4) E 2,05(2) G 2,50(2) A 1,00(1) L 3,36(3) K 3,83(4) R 0,85(1)
115—123-Cys(Acm)	22,3	0,75(6)	12,15 (а)	—52,3 (с 0,25, 10% AcOH)	Leu	K 1,00(1) L 1,85(2) G 1,74(2) S 4,80(5)

Таблица 3 (продолжение)

Пептид	Выход, %	R_f (система)	ВЭЖХ, t , мин	$[\alpha]_{20}^D$, град	N-Концевая аминокислота	Аминокислотный анализ *
153—167	18,0	0,68(4)	23,3 (б)	—65,0 (с 0,192, H ₂ O)	Asp	D 0,70(1) S 0,99(1) E 1,18(1) P 2,40(2) G 6,80(6) A 1,20(1) L 1,00(1) F 1,30(1) R 1,18(1)
Cys(Асм)-153—167	18,6	0,71(4)	24,6 (б)	—56,6 (с 0,3, H ₂ O)	Cys	»
167—179-Cys(Асм)	10,4	0,20(1) 0,82(4)	24,3 (а)	—78,5 (с 0,5, H ₂ O)	Phe	S 1,77(2) E 2,42(2) P 3,15(3) G 1,25(1) V 1,88(2) M 1,06(1) F 1,96(2)
169—179-Cys(Асм)	25,1	0,68(4) 0,44(2)	24,3 (а)	—101,0 (с 0,5, H ₂ O)	Pro	S 1,80(2) E 2,09(2) P 2,70(3) V 0,94(1) G 1,00(1) F 0,97(1) M 0,43(1)
182—195-Cys(Асм)	21,0	0,66(1) 0,64(7)	21,0 (б)	—66,7 (с 0,3, 10% AcOH)	Thr	D 1,00(1) T 0,81(1) S 1,06(1) G 3,99(4) L 1,10(1) I 0,95(1) F 1,16(1) R 0,80(1) E 2,20(2) P 1,13(1)
201—211-Cys(Асм)	40,0	0,65(1) 0,44(7)	18,8 (а)	—10 (с 0,3, 10% AcOH)	Pro	D 1,00(1) S 1,79(2) E 1,13(1) P 4,19(4) A 1,08(1) F 1,06(1)

* Содержание остатков Cys и Thr количественно не определяли.

Индивидуальность полученных соединений подтверждалась хроматографически. Тонкослойная хроматография проводилась на пластинках Silufol UV 254 (Чехо-Словакия) в следующих системах: 1) бутанол-1 — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5, верхняя фаза; 2) бутанол-1 — уксусная кислота — пиридин — вода, 30 : 6 : 20 : 24; 3) бутанол-1 — пропанол-2 — 12% аммиак — этилацетат, 2 : 2 : 5 : 2; 4) пропанол-2 — вода — 25% аммиак, 6 : 1 : 3; 5) пропанол-1 — вода — 25% аммиак, 6 : 1 : 3; 6) пропанол-2 — вода — 25% аммиак, 14 : 1 : 5; 7) бутанол-1 — пиридин — уксусная кислота — вода, 5 : 5 : 1 : 4.

Высокоэффективная жидкостная хроматография пептидов осуществлена на приборе фирмы Du Pont (США) в следующих условиях: колонка 3,2×250 мм, носитель — μ -Bondapak C18-10 мкм, элюция 0,1% TFA —

Взаимодействие пептидов дельта-антигена с антипептидными сыворотками кролика и сыворотками человека в твердофазном ИФА

Антиген	S/N *				
	Антипептидные антитела	Анги-дельта-антитела			
		пул 1	пул 2	пул 3	пул 4
4—15	+++	—	—	—	—
(4—15)—BSA	+++	—	**	—	**
11—23	**	—	**	—	**
(11—23)—BSA	**	—	**	—	**
40—49	+++	—	—	—	—
(40—49)—BSA	+++	+	**	—	—
61—71	+++	—	—	—	—
(61—71)—BSA	+++	—	**	—	—
65—80	+++	+++	+++	+++	+++
(65—80)—BSA	**	+++	**	++	+++
82—94	++	**	—	—	—
(82—94)—BSA	**	—	**	—	**
153—167	+++	—	—	—	—
(153—167)—BSA	++	—	**	—	+
169—179	+++	++	+	—	—
(169—179)—BSA	+++	+	**	—	+
182—195	**	—	—	—	**
(182—195)—BSA	**	—	**	**	**
201—211	+++	—	—	—	—
(201—211)—BSA	+++	+	**	**	—
Позитивный контроль ***	—	+++	++	+++	+++

* S/N — превышение положительного сигнала над фоном — <2,1; +2,1—3,5; ++3,5—5,0; +++>5,0.

** Не исследовано.

*** Дельта-антиген из ткани печени инфицированного (взаимодействие антипептидных антител с дельта-антигеном здесь не рассматривается).

0,1% TFA/80% ацетонитрил (а), 0,1% TFA — 0,1% TFA/60% ацетонитрил (б), 0,1% TFA — 0,1% TFA/80% метанол (в), 0,1% TFA — 0,1% TFA/60% метанол (г); скорость потока 1 мл/мин, детекция при 220 нм.

Стандартный цикл пептидной конденсации на полимере методом симметричных ангидридов включает в себя следующие стадии: 1) промывка хлористым метиленом (3×1 мин), 2) обработка 50% раствором TFA в хлористом метиле (5+25 мин), 3) промывка хлористым метиленом (3×1 мин), 4) обработка 10% раствором EDIPA в хлористом метиле (5+5 мин), 5) промывка хлористым метиленом (3×1 мин), 6) промывка DMF (3×1 мин), 7) конденсация с 2-кратным избытком симметричного ангидрида Вос-аминокислоты в DMF в течение 1—3 ч, 8) промывка DMF (3×1 мин), 10) повторная конденсация с 2-кратным избытком симметричного ангидрида в хлористом метиле. Образование симметричных ангидридов проводили в хлористом метиле, используя на 1 ммоль Вос-аминокислоты 0,55 ммоль DCC. После выдерживания при 0° С в течение 0,5 ч реакционную смесь фильтруют. Фильтрат либо сразу вводят в реакцию пептидообразования, либо сначала упаривают в вакууме, остаток растворяют в DMF и реакцию с пептидполимером проводят в DMF. Вос-Gln и Вос-Asp вводили в конденсацию методом активированных *N*-нитрофениловых эфиров, взятых в 4-кратном избытке, с добавлением эквивалентных количеств НОВТ. Непрореагировавшие аминокислоты бло-

кировали 20% раствором уксусного ангидрида в пиридине в течение 1 ч, пептидилполимер предварительно промывали пиридином. Объем однократной промывки 1 г пептидилполимера 5 мл.

Отщепление пептидов от полимерного носителя проводилось с использованием TFMSA [22]. 2 г пептидилполимера суспендировали в 9,5 мл TFA, прибавляли 1,2 мл тиоанизола 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). Осадок отделяли, промывали несколькими порциями эфира (всего 100 мл), сушили в вакууме.

Конъюгирование пептидов с белковыми носителями. 1) К 5,5 мг белкового носителя, растворенного в 0,6 мл буферного раствора (PBS), содержащего 8,1 мМ Na₂HPO₄, 0,01 М азид натрия, 1,5 мМ KH₂PO₄, 0,138 М NaCl, 2,7 мМ KCl (рН 7,2), прибавляли 4,5 мг пептида. К раствору добавляли 200 мкл 20 мМ водного раствора глутарового альдегида. Перемешивали 20 ч при 20° С. По окончании реакции смесь диализовали против воды, содержащей 0,03% аммиака, и лиофилизовали. 2) К 10 мг KLH, растворенного в 0,6 мл PBS (рН 7,2), прибавляли раствор 1,5 мг MBS в 100 мкл DMF и перемешивали 30 мин при 20° С. Продукт реакции — белок, активированный MBS, — очищали на сефадексе G-25, уравновешенном 50 мМ Na-фосфатным буфером (рН 6,0), чтобы удалить несвязавшийся MBS. Активированный KLH затем реагировал с 8 мг пептида со свободной SH-группой, растворенного в 1 мл фосфатного буфера (рН 7,5). Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 20° С. Смесь диализовали против воды, содержащей 0,03% триэтиламина.

Иммуноферментный анализ на твердой фазе проводили по методике [25], используя полистирольные микротитровальные планшеты отечественного производства. ИФА осуществляли путем непосредственной адсорбции антигена в лунках планшет, куда вносили по 100 мкл раствора антигена в 0,01 М бикарбонат-карбонатном буферном растворе (рН 9,5) в концентрации 50 мкг/мл. После добавления специфических антител к фиксированному на твердой фазе антигену результирующие иммунные комплексы выявляли с помощью меченных пероксидазой хрена антивидовых антител против IgG кролика или человека.

В качестве контроля использовали реакции тех же антигенов с нормальными сыворотками. Учет результатов вели на автоматическом спектрофотометре Titertek Multiskan MMC/340 P (США). Реакцию считали положительной, если показания экстинкции превышали 0,2. Как положительные оценивались пробы, где значения величины относительного связывания S/N были более 2,1 (S и N — показания экстинкции в лунках с исследуемой сывороткой и в контроле).

Иммунизация лабораторных животных. Гетероиммунные сыворотки к синтетическим пептидам были получены на кроликах. Иммунизацию кроликов-самцов весом не менее 3 кг проводили трижды с интервалом 2 нед внутривенно вдоль позвоночника из расчета 1–2 мг/мл пептида конъюгированного с KLH или BSA и соединенного с полным адьювантом Фрейнда (1 : 1) при первой иммунизации и неполным адьювантом (1 : 1) при 2-й и 3-й иммунизации. Пептид без адьюванта (бустер) вводили внутривенно по 1 мл той же концентрации на 10-й день после 3-кратной иммунизации с адьювантом. Кровь брали на 11–12-й день после последней иммунизации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rizetto M. // *Hepatology*. 1983. № 3. P. 729–737.
2. Вязов С. О., Палади Н. Е., Мухарян А. Л. // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1989. № 10. С. 96–103.
3. Wang K. S., Choo Q. L., Wiener A. J., Ou H. J., Thayer R. M., Mullenbach T., Deniston K. J., Gerin J. L., Houghton M. // *Nature*. 1986. V. 323. N 6088. P. 508–513.

4. Chang M. F., Baker S. C., Soe L. H., Kamahara T., Keck J. G., Makino S., Govindarajan S., Lai M. M. C. // *J. Virol.* 1988. V. 62. P. 2403-2410.
5. Bonino F., Heermann K. H., Rizetto M., Gerlich W. H. // *J. Virol.* 1986. V. 58. P. 945-950.
6. Makino S. M. F., Chang C. K. S., Kamahara T., Vannier D. M., Govindarajan S., Lai M. M. C. // *Nature.* 1987. V. 329. № 6137. P. 343.
7. Вазыхова Ф. Г., Вязов С. О., Анианьев В. А. // *Вопр. вирусологии.* 1989. № 3. С. 299-302.
8. Wang J. G., Jansen R. W., Brown E. A., Lemon S. M. // *J. Virol.* 1990. V. 64. № 3. P. 1108-1116.
9. Bergmann K. F., Cote P. J., Moriarty A., Gerin J. L. // *J. Immunol.* 1989. V. 143. P. 3714-3721.
10. Piitsyn O. B., Finkelstein A. V. // *Biopolymers.* 1983. V. 22. P. 15-25.
11. Synthetic Peptides in Biology and Medicine. Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division)/Eds Alitalo K., Vaheri A. 1985. P. 3-9.
12. Kyte J., Doolittle R. F. // *J. Mol. Biol.* 1982. V. 157. P. 105-132.
13. Welling G. W., Weijer W. J., Van der Zee R., Welling-Wester S. // *FEBS Lett.* 1985. V. 188. № 2. P. 215-218.
14. Karplus P. A., Schulze G. F. // *Naturwiss.* 1985. B. 72. № 4. S. 212-213.
15. Saldanha J. A., Thomas H. C., Monjardino J. P. // *J. Gen. Virol.* 1990. V. 71. P. 1603-1606.
16. Merrifield R. B. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1963. V. 85. P. 2149-2154.
17. Евстигнеева Р. П., Желудкина Г. А., Прокуронова Е. И., Смирнов В. Д., Семилетов Ю. А., Худяков Ю. Е., Калинина Т. И., Хромов И. С., Фаворов М. О., Яшина Т. Л. // *Биоорг. химия.* 1990. Т. 16. № 1. С. 34-40.
18. Даванков В. А., Рогожин С. В., Коршак В. В., Цюрупа М. П. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1967. Т. 17. № 7. С. 1612.
19. Мишин Г. П., Коршунова Г. А., Швачкин Ю. П. // *Успехи химии.* 1974. Т. XLIII. Вып. 11. С. 2014-2044.
20. Smith J. A., Hurrell I. G. R., Leach S. J. // *Immunochemistry.* 1977. V. 14. P. 565-568.
21. Barany G., Merrifield R. B. // *The Peptides.* V. 2/Eds Gross E., Meienhofer J. Acad. Press, Inc. 1979. P. 3-284.
22. Toida I., Yamamoto S., Takuma S., Suzuki T., Hirata H. // *Infection and Immunity.* 1985. V. 50. № 3. P. 614-619.
23. Liu F.-T., Zinnecker M., Hamaoka T., Katz D. H. // *Biochemistry.* 1979. V. 18. P. 690-697.
24. Mariani M., Bracci L., Presentini R., Nucci P., Neri P., Antoni G. // *Mol. Immunol.* 1987. V. 24. № 3. P. 297-303.
25. Voller A., Ditwell D. E., Bartlett A. // *Bull. Wld. Helt. Org.* 1977. V. 53. № 1. P. 38-48.

Поступила в редакцию
4.VII.1991

Yu. A. SEMILETOV, V. A. KARPOVA, Yu. E. KHUDYAKOV, R. P. PAVLYUCHENKOVA,
S. O. VYAZOV, V. D. SMIRNOV, E. I. PROKURONOVA*, G. A. ZHELTUKHINA*,
R. P. EVSTIGNEEVA*

SYNTHESIS OF PEPTIDES FROM HEPATITIS DELTA NUCLEOCAPSIDE PROTEIN AND ANALYSIS OF THEIR ANTIGENIC ACTIVITY

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

* *M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

Hepatitis delta virus (HDV), a recently discovered infectious agent, participates in severe, often lethal forms of acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. Based on theoretical analysis of secondary structure, hydrophilicity and acrophilicity data, several regions of HDV antigen, presumably containing B-epitopes, have been revealed and the corresponding peptides have been synthesized by the solid phase method. All the peptides obtained reacted with the respective anti-peptide rabbit sera. The peptides and their conjugates with BSA or KLH were used for ELISA with individual and pooled anti-HD-positive sera from patients with chronic delta hepatitis.

The high antigenicity of the peptide 65-80 shows that one of the antigenically active regions of HDAg is situated between these amino acid residues and that the peptide may be used for detection of anti-HD antibodies in patients' blood sera.