



УДК 578.825.083.3

© 1992 г. В. С. Иванов, Л. Д. Чикин,  
З. К. Суворова\*, А. Т. Кожич, В. Т. Иванов

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ ВИРУСОВ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва;  
\* Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва

С целью подбора синтетических пептидных антигенов для диагностики ВИЧ с помощью различных алгоритмов был проведен поиск вероятных антигенных детерминант белков, кодируемых генами *gag*, *pol*, *env*, *nef* ВИЧ-1 и ВИЧ-2, в твердофазным методом синтезировано свыше 40 пептидов, соответствующих предсказанным участкам. Антигенные свойства пептидов исследованы в ИФА на панелях сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2. Исследована возможность использования пептидов для ранней диагностики заболевания ВИЧ.

Синтетические пептиды являются мощным инструментом в иммунохимических исследованиях, особенно в качестве иммуногенов и антигенов для эпитопного картирования вирусных белков. Эти подходы интенсивно используются при изучении вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ) — этиологических агентов СПИД. В ряде работ [1–4] было предложено использовать синтетические пептиды в качестве антигенов в иммуноферментном анализе для обнаружения антител к ВИЧ в сыворотке крови. Использование в качестве антигенов синтетических пептидов вместо разрушенного вируса или рекомбинантных вирусных белков имеет несомненные преимущества. Пептиды легко синтезировать и получить в виде химически чистых веществ, что обуславливает высокую степень воспроизводимости результатов анализа. С помощью пептидов можно наиболее точно определить антигенные детерминанты белков, что заметно увеличивает специфичность анализа. Благодаря большой антигенной плотности иммобилизованных пептидов увеличивается чувствительность тест-систем. И, что немаловажно, при использовании пептидных антигенов отсутствует опасность заражения антигеном.

Цель нашей работы — поиск антигенных детерминант (В-эпитопов) ВИЧ-1 и ВИЧ-2 с помощью синтетических пептидов. Большая часть иммунного ответа при инфицировании ВИЧ направлена против структурных и регуляторных белков, кодируемых генами *env*, *gag*, *pol* и *nef* [5], поэтому поиск В-эпитопов мы осуществляли в этих белках. Нами были использованы традиционные методы предсказания антигенных участков — были рассчитаны профили гидрофильности [6], антигенности [7], подвижности основной цепи [8], вероятная вторичная структура [9] данных белков. После сопоставления всех расчетных данных были выбраны наиболее перспективные в антигенном отношении пептиды, причем предпочтение отдавалось пептидам из консервативных участков белков [10].

Так, из белков сердцевины вириона было выбрано для синтеза 8 фрагментов в основном из белка р24 (рисунок, а, табл. 1), антитела к которому

Принятые сокращения: X — норлейцин, В —  $\alpha$ -аминомасляная кислота, Z — D-аланин, TFA — трифторуксусная кислота, ТФИФА — твердофазный иммуноферментный анализ.

Реактивность синтетических пептидов в ТФИФА на панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-1

Пептид	Белок	Участок последовательности *	Ген, кодирующий белок	Результат	ТФИФА **
СП-65	p17	19-35	<i>gag</i>	11/82	(13,4%)
СП-69	p17	51-67	<i>gag</i>	7/82	(8,5%)
СП-71	p17	109-123	<i>gag</i>	6/76	(7,9%)
СП-38	p24	224-242	<i>gag</i>	4/123	(3,3%)
СП-37	p24	284-299	<i>gag</i>	10/123	(8,1%)
И-1	p24	351-363	<i>gag</i>	5/169	(3,0%)
СП-40	p24	356-373	<i>gag</i>	24/185	(13,0%)
И-2	p15	486-500	<i>gag</i>	5/130	(3,8%)
СП-45	p66/51	110-123	<i>pol</i>	17/149	(11,4%)
СП-50	p66/51	226-239	<i>pol</i>	25/125	(16,6%)
СП-48	p66/51	322-340	<i>pol</i>	18/150	(12,0%)
СП-42	p66/51	380-394	<i>pol</i>	3/124	(2,4%)
СП-46	p66/51	572-588	<i>pol</i>	46/150	(30,7%)
СП-61	p66/51	580-596	<i>pol</i>	5/144	(3,5%)
СП-67	p66/51	673-690	<i>pol</i>	3/82	(3,7%)
СП-26	gp120	492-517	<i>env</i>	172/250	(68,8%)
СП-18	gp120	500-517	<i>env</i>	100/216	(46,5%)
СП-32	gp120	502-516	<i>env</i>	62/156	(39,7%)
И-3	gp120	505-516	<i>env</i>	13/71	(18,3%)
СП-29	gp41	593-604	<i>env</i>	17/55	(30,8%)
W	gp41	584-604	<i>env</i>	144/202	(71,3%)
Z-3	gp41	598-609	<i>env</i>	71/75	(94,7%)
СП-5	gp41	598-609	<i>env</i>	179/223	(80,3%)
СП-7	gp41	600-618	<i>env</i>	293/313	(93,3%)
СП-6	gp41	600-618	<i>env</i>	110/217	(50,7%)
СП-15	gp41	601-616	<i>env</i>	249/263	(94,7%)
СП-23	gp41	600-618	<i>env</i>	190/216	(88,0%)
СП-25	gp41	600-618	<i>env</i>	120/187	(64,2%)
СП-63	p27	13-28	<i>nef</i>	14/143	(9,8%)
СП-73	p27	54-69	<i>nef</i>	8/86	(9,3%)
СП-58	p27	72-83	<i>nef</i>	7/146	(4,8%)
СП-54	p27	143-159	<i>nef</i>	25/148	(16,9%)
СП-52	p27	187-203	<i>nef</i>	22/150	(14,7%)

\* Нумерация аминокислот соответствует штамму BRU [18], за исключением пептидов Z-3 (Z-3 [20]) и СП-29 (EGL [21]).

\*\* В числителе — число положительных результатов, в знаменателе — общее число сывороток.

являются важными прогностическими маркерами [11]. Семь пептидов было выбрано из белков р66, р51 и р31 (рисунок, б) — продуктов гена *pol*, антитела к которым обнаруживаются в 75–80% случаев в сыворотке инфицированных ВИЧ [12]. Из оболочечных гликопротеинов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 (гены *env*) было выбрано 13 и 8 пептидов соответственно (рисунок, в, д), причем большая часть из них приходится на трансмембранные белки gp41 и gp40, где, согласно литературным данным, находятся высокоиммунодоминантные районы [2, 13, 14].

Ряд авторов утверждают, что антитела к белку, кодируемому геном *nef*, появляются до сероконверсии антител к основным структурным белкам и, таким образом, обнаружение в крови антител к этому белку позволяет проводить раннюю диагностику при заражении ВИЧ [15, 16]. Напротив, в некоторых работах указанное утверждение ставится под сомнение [17, 18]. Для выяснения этого вопроса мы синтезировали 5 пептидов из этого белка (рисунок, г).

В представленный набор входят 8 пептидов (СП-71 [23], СП-32 [24], СП-29 [25], W[1], Z-3 [25], СП-5 [25], СП-7 [26], СП-30 [25]), уже

a)		б)	
СП-65	IRLRPGGKKKYKLVHIV	СП-45*	WKPKXIGGIGGFIK
СП-69	LETSEGC (Acм) RQILGQLQPS	СП-50	PVFAIKKDKSTKWR
СП-71	NKSKKKAQQAADTGM	СП-48*	GSPAIFQSSXTKILEPFRK
СП-38*	APGQXREPRGSDIAGTTST	СП-42	GLTTPDKKHQKEPPF
СП-37	DIROGPKPEFRDYVDR	СП-46	YWQATWIPEWEFVNTTP
И-1*	BQGVGGPGHKARVL	СП-61	EWEFVNTPLVLKLYQL
СП-40*	PGHKARVLAEAXSQVTNS	СП-67	IQAOPDKSESELVNOIIE
И-2	LTSLSLFGNDPSSQ		
в)		г)	
СП-26*	XKVVKIEPLGVAPTAKRRRVQREKRA	СП-63*	WPTVREXRRAEPAAD
СП-18*	XGVAPTAKRRRVQREKRA	СП-73	AC (Acм) AWLEAQEEEEVGFP
СП-32*	CGCAPTKAKRRRVQREKR	СП-58*	PQVPLRPXTYKA
И-3	KAKLRRRVQREKR	СП-54	YKLVPEPDKVEEANKG
СП-29	LGIWGCSGKHIC	СП-52	SRLAFHHVARELHPEYCG
W	RILAVERYLKDQQLLGIWGCS		
Z-3	LGLWGCSGKLIC	д)	
СП-5	LGIWGCSGKLIC	СП-11	EVKETLAKHPRYRG
СП-6*	IWGSSGKLICTTAVPWNAS	СП-10	ELGDYKLVGITPIGFAPTKREK
СП-7	IWGCSGKLICTTAVPWNAS	СП-59*	LQDQA-LNSWGCAFRQVCHT
СП-15	WGCSGKLICTTAVPWN	СП-8	LNSWGCAFRQVCHT
СП-23*	FGCSGKLICTTAVPEN	СП-20*	LNSWGCAFRQVCHT-амид
СП-25*	FGCSZKLICTTAVPEN	СП-30	LNSWGCAFRQVC
		СП-9	SWGCAFRQVCHTTVPWVND
		СП-12*	SWGSAFRQVSHTTVPWVND

Синтетические пептиды из белков, кодируемых генами *gag* (а), *pol* (б), *env* (в), *nef* (г) ВИЧ-1 и *env* ВИЧ-2 (д). Звездочкой отмечены пептиды — аналоги природной структуры. Замененные или добавленные аминокислотные остатки подчеркнуты

опубликованных к началу нашей работы. Нас интересовали антигенные свойства перечисленных пептидов на использованных в работе панелях ВИЧ-1 и ВИЧ-2-положительных сывороток. Кроме того, в ходе работы появлялись публикации, в которых описывались пептиды, перекрывающиеся с выбранными нами (СП-65 [2], СП-38 [23], СП-15 [23], СП-54 [15], СП-63 [15], СП-73 [15], СП-58 [15], СП-54 [15], СП-52 [15], СП-59 [27]).

С целью упрощения синтеза в ряде пептидов (СП-38, СП-40, СП-45, СП-48, СП-63, СП-58) имеющиеся в белке остатки метионина были заменены изостерическими остатками норлейцина, при этом мы учитывали, что такая замена обычно не приводит к снижению биологической активности. По таким же соображениям была произведена замена N-концевого остатка цистеина на остаток  $\alpha$ -аминомасляной кислоты в пептиде И-1. Пептиды СП-26 и СП-18 были синтезированы длиннее природных фрагментов на один N-концевой остаток норлейцина, а пептид СП-32 был удлинен в N-концевой части на последовательность CGG. Эти изменения,

Реактивность синтетических пептидов в ТФИФА на панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-2

Пептид	Белок *	Участок последовательности **	Результат	ТФИФА ***
СП-11	gp120	352-365	14/24	(58,3%)
СП-10	gp120	480-501	8/20	(40,0%)
СП-59	gp40	587-605	12/12	(100%)
СП-30	gp40	592-603	7/7	(100%)
СП-8	gp40	592-605	24/35	(68,6%)
СП-20	gp40	592-605	26/35	(74,3%)
СП-9	gp40	594-612	13/20	(65,0%)
СП-12	gp40	594-612	32/35	(91,4%)

\* Белки гена *env*.

\*\* Нумерация аминокислот соответствует штамму ROD [22].

\*\*\* См. примечание к табл. 1.

практически не влияющие на антигенные свойства пептидов, были произведены для получения конъюгатов с белками (данные не приведены).

Пептиды были синтезированы твердофазным методом. Деблокирование и удаление пептидов со смолы проводили жидким фтористым водородом, очистку осуществляли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Синтезированные пептиды охарактеризованы аминокислотным анализом, ГАВ-масс-спектрометрией и аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для оценки реактивности пептидов — способности взаимодействовать с сыворотками, содержащими антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, и сыворотками здоровых доноров — использовали непрямой твердофазный иммуноферментный анализ с пептидами в качестве антигенов.

Как видно из табл. 1, пептиды из белков, кодируемых геном *gag*, не обладают сколько-нибудь заметной реактивностью. Наибольшей реактивностью обладали фрагмент N-концевой части p17 СП-65 и фрагмент C-концевой части p24 СП-40. Пептид СП-65, полностью перекрывающий описанный ранее пептид 22-29 [2], обладает почти в 2 раза большей реактивностью, но все-таки недостаточной для использования его в качестве антигена в ТФИФА. Пептид СП-38 (224-242), как и пептид 228-235 [2], который он в себя включает, не характеризуется высокой реактивностью. Наоборот, по данным авторов, использовавших для тестирования пептиды, связанные со смолой, пептид 226-237, входящий в состав СП-38, и пептид 109-123, аналогичный СП-71, выявляют соответственно 15 и 10 сывороток из 15 ВИЧ-положительных [23], что значительно выше результатов, полученных нами. Очевидно, предложенный авторами работы [23] метод позволяет добиться большей чувствительности анализа.

Фрагменты продуктов гена *pol* характеризуются большей реактивностью, причем более высокими антигенными свойствами обладают пептиды из обратной транскриптазы p66/p51, а основной эпитоп находится в ее C-концевой области (СП-46). Тот же вывод был сделан с помощью моноклональных антител [28]. Пептиды СП-48, СП-42 и СП-67, входящие в состав трех В-эпитопов обратной транскриптазы [29], определенных с помощью рекомбинантных полипептидов, по нашим данным, не обладают высокой реактивностью.

Как и следовало ожидать, пептиды из последовательностей белков, кодируемых геном *env*, выделяются среди всех остальных пептидов высокой реактивностью (табл. 1 и 2). Ранее мы уже сообщали об исследовании антигенной области C-концевой части оболочечного гликопротеина gp120 ВИЧ-1 [30]. Следует заметить, что у пептидов, представляющих данный

антигенный район (СП-26, СП-18, СП-32, И-3), реактивность увеличивается с удлинением пептида к N-концевой части гликопротеина (ср. И-3 и СП-26). Можно предположить, что самый длинный пептид СП-26 перекрывает по крайней мере два В-эпитопа. Наши данные о реактивности пептида СП-32 согласуются с литературными [24]. Реактивность пептида И-3 (505—516) оказалась в 2 раза ниже реактивности рекомбинантного химерного комплекса, состоящего из пептида 505—519 и  $\beta$ -галактозидазы [31]. Было показано [32], что пептид, идентичный И-3, реагирует с 19 из 20 ВИЧ-1-положительных сывороток. Пептид 495—516 [27], являющийся укороченным аналогом СП-26, реагирует с 48 из 50 ВИЧ-1-положительных сывороток. По нашим данным, полученным на значительно большей панели ВИЧ-1-положительных сывороток, реактивность пептидов И-3 и СП-26 существенно ниже. Можно сделать вывод, что для объективной, статистически достоверной оценки реактивности пептидов необходимо использовать достаточно большую панель сывороток.

Существенно выше реактивность пептидов из иммунодоминантного района трансмембранного белка gp41. Наибольшее число ВИЧ-1-положительных сывороток (94,7%) выявляет пептид СП-15 (601—616), хотя пептид 600—616 [26], который длиннее всего на один аминокислотный остаток, выявлял 7 из 10 (70%) ВИЧ-1-положительных сывороток. Пептид СП-7 (600—618), включающий в себя СП-15, не проявлял 100% реактивности в отличие от идентичного пептида 600—618 [26]. Синтезированные нами с целью оптимизации структуры аналоги пептида СП-15 (СП-6, СП-23, СП-25) не отличались высокой реактивностью [33]. Реактивность пептида W (584—604) не была столь высокой, как сообщалось ранее [1]. Результаты, полученные нами, скорее согласуются с результатами более поздних исследований [34]. Из пептидов Z-3, СП-5 и СП-29, представляющих один и тот же фрагмент белка gp41, но из разных штаммов ВИЧ-1 [25], только Z-3 обладал реактивностью, близкой к описанной, — результаты тестирования СП-5 и СП-29 были ниже. Но все же реактивность пептида СП-5 была почти в 2 раза выше, чем описано в литературе [26, 34]. Причиной этого разногласия, вероятно, может быть различная штамм-специфичность панелей ВИЧ-1-положительных сывороток.

Ни один из синтезированных фрагментов белка p27, кодируемого геном *nef*, не обладал высокой реактивностью. Наши результаты свидетельствуют в пользу того, что В-эпитопы этого белка находятся ближе к его С-концевой части, что согласуется с данными работы [18]. Пептид СП-54 (143—159), имеющий наибольшую реактивность, перекрывается с иммунодоминантным пептидом 148—161 [15]. С другой стороны, имеются данные, что в этой области белка В-эпитопа нет [16]. Выбранные нами для синтеза пептиды из белка p27 частично перекрываются с ранее опубликованными пептидами [15]. Такое совпадение не является неожиданным, поскольку для предсказания В-эпитопов в обоих случаях использовались сходные методы. Хотя реактивность описанных в работе [15] пептидов и выше (30—60%), чем у пептидов, приведенных в табл. 1 (5—17%), данные эти были получены на существенно меньшей панели ВИЧ-1-положительных сывороток.

Как видно из табл. 2, основной иммунодоминантный район *env*-белков ВИЧ-2, расположен по аналогии с ВИЧ-1 в N-концевой части трансмембранного белка gp40. 100-процентный результат, полученный с пептидом СП-30, полностью совпадает с данными, приведенными для аналогичного пептида [25]. При тестировании на большей панели ВИЧ-2-положительных сывороток пептида СП-8, который длиннее СП-30 на два аминокислотных остатка, наблюдалось снижение реактивности. Замена в пептиде СП-8 С-концевого карбоксила на карбоамидную группу (СП-20) привела к некоторому увеличению реактивности. Пептид СП-59 (587—605) обла-

Таблица 3

## Результаты тестирования синтетических пептидов в ТИФА на панелях сероконверсии

Образцы сыворонок	Дата взятия крови	Синтетические пептиды								Тест-системы *																		
		СП-40	СП-50	СП-46	СП-36	СП-15	СП-54	СП-52	A	B	B	Г	Д	Е	Ж													
<b>Панель «А»</b>																												
ВВ1-01	04-05-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-02	08-07-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-03	29-07-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-04	19-08-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-05	02-09-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-06	09-09-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-07	16-09-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-08	23-09-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-09	14-10-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<b>Панель «Д»</b>																												
ВВ1-40	29-04-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-41	20-05-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-42	17-06-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-43	30-07-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ВВ1-44	06-08-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

\* Данные взяты из сертифицированной панели сероконверсии «А» в «Д»: А — Abbot Laboratories; В — Cellular Products; В — DuPont Company; Г — Electro-Nuclear Products; Д — Genetic Systems Corp.; Е — Ortho Diagnostic Systems Inc.; Ж — Organon Teknika Corp.



дал высокой реактивностью, как и перекрывающийся с ним ранее опубликованный пептид 581-603 [27]. По техническим причинам в процессе синтеза пептида СП-59 произошла делеция аргинина в положении 592, но, как видно из табл. 2, отсутствие остатка аргинина не повлияло на реактивность этого пептида. Интересно отметить, что пептид СП-12 является аналогом пептида СП-9, у которого два цистеиновых остатка заменены на сериновые, что исключает образование дисульфидной связи. Данная замена неожиданно привела к увеличению реактивности пептида СП-12, хотя в результате аналогичной замены (СП-6) в гомологичном пептиде СП-7 из того же белка ВИЧ-1 мы получили падение реактивности почти в 2 раза. Очевидно, в нативном белке между этими остатками цистеинов не образуется дисульфидная связь. Мы не синтезировали пептиды из других белков ВИЧ-2 из-за малой панели ВИЧ-2-положительных сывороток, которая не позволила бы получить статистически достоверные результаты.

Для оценки возможности ранней диагностики антител к ВИЧ с помощью синтетических пептидов мы протестировали в ТФИФА пептиды, обнаружившие лучшие антигенные свойства, на панели сероконверсии (табл. 3). Хорошие результаты показали только фрагменты оболочечных гликопротеинов СП-26 и СП-15. Что касается *nef*-пептидов, то эффективность их использования для ранней диагностики, по нашим данным, сомнительна.

Следует добавить, что все пептиды также тестировались на панели сывороток здоровых доноров, при этом не наблюдалось неспецифического связывания.

Исходя из полученных результатов нами была подобрана композиция из трех пептидов и на ее основе разработана диагностическая тест-система для обнаружения антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

### Экспериментальная часть

В работе использовали производные аминокислот и реактивы фирм Reanal (Венгрия), PRF (Япония), Fluka (Швейцария). В качестве носителя использовали смолу BIO-BEADS S-X1 (Bio-Rad, США). Отщепление со смолы и деблокирование пептидов проводили в аппарате фирмы PRF (Япония). В работе использованы образцы сывороток крови, содержащих антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, а также сыворотки здоровых доноров из коллекции СНИЛЭП СПИД ЦНИИ эпидемиологии МЗ СССР, панели сероконверсии Boston Biomedica (США).

ВЭЖХ пептидов осуществляли на хроматографе фирмы Gilson (Франция). Для препаративной ВЭЖХ использовали колонки Ultrasphere Octyl (10×250 мм, 5 мкм; Altex) и Vydac C<sub>18</sub> (10×250 мм, 10 мкм; Vydac), для аналитической ВЭЖХ — колонку Ultrasphere Octyl (4,6×250 мм, 5 мкм; Altex).

Растворители абсолютировали по методикам [35]. Аминокислотный анализ проводили после кислотного гидролиза (смесь концентрированная HCl — пропионовая кислота, 1 : 1, с добавлением 0,5% фенола, 24 ч в запаянных ампулах при 110°С) на анализаторе Durrum Marck (США).

Масс-спектры регистрировали на приборе MS 50 TC (Kratos, Англия) в режиме бомбардировки ускоренными атомами ксенона (FAB).

Для твердофазного синтеза пептидов использовали модернизированный нами синтезатор Beckman 990 (США) [36]. Смолу аминометилировали по методике [37]. Концентрация аминогрупп составляла 0,25—0,5 ммоль/г смолы. Якорные группировки вводили при помощи *n*-гидроксиметилфенилацетамидометильного производного защищенной С-концевой аминокислоты [37].

Для временной защиты  $\alpha$ -аминогрупп использовали Вос-группу. В качестве защит боковых функций аминокислот использовали: для Asp, Glu — бензиловый и циклогексиловый эфиры; для Arg — тозилную группу; для His — бензилоксиметильную и 2,4-динитрофенильную группы; для Ser, Thr — бензильную группу; для Tyr — 2,6-дихлорбензильную группу; для Lys — 2-хлорбензилоксикарбонильную группу; для Cys — ацетамидометильную и 4-метилбензильную группы. Аминокислоты конденсировали с помощью симметричных ангидридов и оксибензотриазоловых эфиров в DMF.

Полноту протекания реакции контролировали с помощью нингидринового теста [38]. Для удаления Вос-группы использовали смесь TFA —  $\text{CHCl}_3$  (1 : 1) с последующей нейтрализацией 7% раствором диэтилопропилэтиламина в DMF.

Подробная методика твердофазного синтеза пептидов представлена в работе [36]. Деблокирование пептидов и снятие их со смолы осуществляли по стандартным методикам [39].

*Твердофазный иммуноферментный анализ.* В лунки планшета для микротитрования Maxisorb (Nunc, Дания) вносили по 100 мкл раствора испытуемого пептида в концентрации 1 мкг/мл в 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$ . После инкубации в течение ночи при 4°С планшеты промывали 4 раза 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,0–7,2, содержащим 0,05% твин-20 и 4% NaCl. Все последующие промывки осуществляли этим же буфером. По 100 мкл сывороток крови, разведенных 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,0, содержащим 0,2% твин-20 и 4% NaCl, в соотношении 1 : 50, вносили в лунки планшетов и инкубировали 30 мин при 37°С. Планшеты промывали 4 раза и в лунки вносили по 100 мкл конъюгата белка А золотистого стафилококка с пероксидазой хрена (Amersham, Англия) в рабочем разведении и выдерживали 30 мин при 37°С. После очередных промывок в лунки добавляли 100 мкл раствора *o*-фенилендиамина (0,5 мг/мл) в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере, содержащем 0,006%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Через 15 мин реакцию останавливали 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и результат учитывали на фотометрическом детекторе MR-700 (Dynatech, ФРГ) при 492 нм. Для оценки результатов реакции в лунках с сыворотками вычисляли пороговое значение  $\text{PA}_{492}$  по формуле  $\text{PA}_{492} = K + 3 \cdot a$ , где  $K$  — среднее арифметическое значение поглощения не менее трех отрицательных сывороток,  $a$  — среднеквадратичное отклонение. Результат теста считался положительным, если для исследуемого образца полученное значение оптического поглощения было больше или равно  $\text{PA}_{492}$ , и отрицательным, если меньше  $\text{PA}_{492}$ .

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J. J. G., Steel S., Wisniewolski R., Wang C. Y. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 16. P. 6159–6163.
2. Gnann J. W., Schwimbeck P. L., Nelson J. A., Truax A. B., Oldstone M. B. A. // J. Infect. Dis. 1987. V. 156. № 2. P. 261–267.
3. Smith R. S., Naso R. B., Rosen I., Whalley A., Hom Y.-L., Hoey K., Kennedy C. J., McCutchan J. A., Spector S. A., Richman D. D. // J. Clin. Microbiol. 1987. V. 25. № 8. P. 1498–1504.
4. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Фомина Л. А., Луознер А. Л., Андреев С. М., Азьмуко А. А., Трубоченинова Л. П., Вафина М. Г., Иващенко М. Е., Костромкина М. И. // Иммунология. 1986. Т. 5. С. 80–81.
5. Khalife J., Guy B., Capron M., Kiény M.-P., Ameisen J.-C., Montagnier L., Lecocq J.-P., Capron A. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1988. V. 4. № 1. P. 3–9.
6. Hopp T. P., Woods K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824–3828.
7. Welling G. W., Weijer W. J., van der Zee R., Welling-Wester S. // FEBS Lett. 1985. V. 188. № 2. P. 215–218.
8. Karplus P. A., Schulz G. E. // Naturwissenschaften. 1985. B. 72. № 4. S. 212–213.
9. Garnier J., Osguthope O. J., Robson B. // J. Mol. Biol. 1978. V. 120. № 1. P. 97–120.



10. Myers G., Rabson A. B., Josephs S. F., Smith T. F., Wong-Staal F. // Human Retroviruses and AIDS 1988: a Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, 1988. P. II-68-II-91.
11. Ragni M. V., O'Brien T. A., Reed D., Spero J. A., Lewis J. H. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1988. V. 4. P. 223-231.
12. DeVico A. L., Veronese F. M., Lee S. L., Gallo R. C., Sarngadharan M. G. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1988. V. 4. № 1. P. 17-22.
13. Norrby E., Biberfeld G., Chiodi F., Gegerfeld A., Naucner A., Parks E., Lerner R. // Nature. 1987. V. 329. P. 248-250.
14. Närvänen A., Korkkolainen M., Kontio S., Suni J., Turtianen S., Partanen P., Soos J., Vaheeri A., Huhtala M.-L. // AIDS. 1988. V. 2. P. 119-123.
15. Ameisen J.-C., Guy B., Chamaret S., Loche M., Mouton Y., Neyrinck J.-L., Khalife J., Lèpreviat C., Beaucaire G., Boutillon C., Gras-Masse H., Maniez M., Kiény M.-P., Laustriat D., Berthier A., Mach B., Montagnier L., Lecocq J.-P., Capron A. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1989. V. 5. № 3. P. 279-291.
16. Gombert F. O., Blecha W., Tahtinen M., Ranki A., Pfeifer S., Troger W., Braun R., Müller-Lantzsch N., Jung G., Rubsamen-Waigmann H., Krohn K. // Virology. 1990. V. 176. P. 458-466.
17. De Ronde A., Reiss P., Dekker J., De Wolf F., Van Den Hoek A., Wolfs T., Deboeck C., Goudsmit J. // Lancet. 1988. V. ii. P. 574.
18. Sabatier J.-M., Clerget-Raslain B., Fontan G., Fenouillet E., Rochat H., Granier C., Gluckman J.-C., Van Rietschoten J., Montagnier L., Bahraoui E. // AIDS. 1989. V. 3. P. 215-220.
19. Wain-Hobson S., Sonigo P., Danos O., Cole S., Alizon M. // Cell. 1985. V. 40. P. 9-17.
20. Willey R. L., Ruledge R. A., Dias S., Folks T., Theodore T., Buckler C., Martin M. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 5038-5042.
21. Alizon M., Wain-Hobson S., Montagnier L., Sonigo P. // Cell. 1986. V. 46. P. 63-74.
22. Guyader M., Emerman M., Sonigo M., Clavel F., Montagnier L., Alizon M. // Nature. 1987. V. 326. P. 662-669.
23. Modrow S., Hoflacher B., Mertz R., Wolf H. // J. Immunol. Methods. 1989. V. 118. № 1. P. 1-7.
24. Palker T. J., Matthews T. J., Clark M. E., Cianciolo G. J., Randall R. R., Langlois A. J., White G. C., Safai B., Snyderman R., Bolognesi D., Haynes B. F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 2479-2483.
25. Gnann J. W., McCormick J. B., Mitchell S., Nelson J., Oldstone M. B. A. // Science. 1987. V. 237. P. 1346-1348.
26. Rosen J. I., Hom Y., Whalley A. S., Smith R. S., Naso R. B. // HIV Detection by Genetic Engineering Methods/Eds Luciw P. A., Steimer K. S. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc., 1989. P. 143-160.
27. Хауров Р. М., Сидорович И. Г., Павликов С. П., Николаева И. А., Иващенко М. Е., Андреев С. М., Скляров Л. Ю. // Иммунология. 1990. Т. 2. С. 15-20.
28. Chandra P., Gerber T., Chandra A., Sarin P. S., Pavlikov S. P., Sidorovich I., Khaitov R., Ivanov V., Kozlach A. // Biomed. Sci. 1990. V. 1. № 5. P. 507-512.
29. Padberg C., Nowlan S., Mermer B. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1989. V. 5. № 5. P. 61-71.
30. Иванов В. С., Чикин Л. Д., Кожич А. Т., Павликов С. П., Иващенко М. Е. // 5-я Конференция молодых ученых социалистических стран по биоорганической химии. Тезисы докладов. Пулицко, 1988. С. 41-42.
31. Shafferman A., Lennox J., Grosfeld H., Sadoff J., Redfield R. R., Burke D. S. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1989. V. 5. № 1. P. 33-39.
32. Люознер А. Л., Цыганков А. Ю., Меццержакова Д. В., Аугеншлюс А. Й., Кауров О. А., Прусаков А. Н., Афонин В. Г., Скляров Л. Ю., Николаев А. Ю. // Иммунология. 1990. Т. 3. С. 10-12.
33. Иванов V. S., Suvorova Z. K., Tchikin L. D., Kozhich A. T. // 4th Meeting on Bioorganic Chemistry of Peptides. Abstracts. Czechoslovakia, 1989. P. 35.
34. Döpel S.-H., Porstmann T., Henklein P., von Baehr R. // J. Virol. Methods. 1989. V. 25. P. 167-178.
35. Perrin D. D., Armarego W. L. F., Perrin D. R. // Purification of Laboratory Chemicals. Pergamon Press, 1985. P. 167-168, 224, 445-446, 448.
36. Чикин Л. Д., Кожич А. Т., Иванов В. С., Насташенко Т. А., Кузов Ю. Ю., Балаян М. С. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. № 7. С. 964-972.
37. Mitchell A. R., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B. // J. Org. Chem. 1978. V. 43. № 13. P. 2845-2852.
38. Sarin V. K., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. № 1. P. 147-157.
39. Stewart J. M., Young J. D. // Solid Phase Peptide Synthesis. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Comp., 1984. P. 85-89.

Поступила в редакцию  
17.XII.1991

V. S. IVANOV, L. D. TCHIKIN, Z. K. SUVOROVA\*, A. T. KOZHICH,  
V. T. IVANOV

**STUDY OF THE ANTIGENIC STRUCTURE OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY  
VIRUSES BY MEANS OF SYNTHETIC PEPTIDES**

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Moscow;*

*\*Central Institute of Epidemiology, Moscow*

In a search for synthetic peptide antigens fit to detect anti-HIV antibodies, a set of algorithms were used to predict the probable antigenic determinants of *gag*, *pol*, *env* and *nef* proteins of HIV-1 and HIV-2. Over forty peptides were synthesized by the solid-phase method. The reactivity of the peptide antigens was evaluated in ELISA on panels of HIV-1/2-positive sera. Application of the synthetic peptides for the early HIV diagnostics was examined.