



УДК 578.891 : 578.112.083.3

© 1993 Л. Н. Кулик \*, В. С. Иванов,  
А. Э. Габриэлян, Л. Д. Чикин, В. Т. Иванов

### ПОИСК Т-ЭПИТОПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА А С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;*

*\* Институт биоорганической химии АН Беларуси, Минск*

С помощью интегрированного пакета программ был проведен компьютерный поиск предполагаемых Т-эпитопов из капсидных белков вируса гепатита А. Пептиды 75—92, 115—139, 209—221 белка VP1, 69—99 и 80—99 белка VP2, 45—57 и 137—150 белка VP3, 1—23 белка VP4, перекрывающие выбранные участки, были синтезированы твердофазным методом. Кроме того, были использованы ранее описанные пептиды 1—17, 11—25, 75—85, 10—33, 276—298 из VP1. Исследовалась способность синтетических пептидов вызывать пролиферацию клеток из лимфоузлов мышей, примированных <sup>#</sup> пептидами. Практически все выбранные пептиды влияли на пролиферацию клеток, причем это влияние зависело от гаплотипа животных, лимфоциты которых использовали для тестирования. Пептиды 10—33 и 276—298 белка VP1 вызывали пролиферацию лимфоцитов у всех тестируемых линий мышей. Пептиды 107—126 и 115—126 белка VP1 не влияли на пролиферацию лимфоцитов из лимфоузлов мышей, примированных данными пептидами, но вызывали пролиферацию клеток из лимфоузлов мышей F<sub>1</sub>(CBA × C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>), примированных пептидом 115—139 из первого капсидного белка.

Вирус гепатита А (ВГА), относящийся к семейству Picornoviridae, представляет собой патоген, попадающий в организм человека через загрязненные фекалиями продукты питания и воду [1, 2]. Профилактика гепатита А в настоящее время сводится в основном к санитарно-гигиеническим мерам. В качестве вакцины против гепатита А предлагается обработанный формалином вирус [3]. Однако особенности размножения ВГА в клеточных культурах накладывают существенные ограничения на использование таких вакцин [4]. В связи с этим синтетическая пептидная вакцина могла бы стать альтернативным вариантом, однако до настоящего времени не получено убедительных данных о локализации иммуногенных и антигенных детерминат на капсиде ВГА [5, 6]. Результаты работ по

Принятые сокращения: ВГА — вирус гепатита А; TFA — трифторуксусная кислота; Pam — *n*-гидроксиметилфенилацетамидометил; DIEA — диизопропилэтиламин; НОВТ — 1-гидроксibenзотриазол; Вос — *трет*-бутилоксикарбонил; Сол А — конканавалин А; PBS — фосфатно-солевой буфер.

<sup>#</sup> От англ. *prime* — подвергать клетку первичному воздействию антигена.

примированию вируснейтрализующего ответа рекомбинантными белками ВГА позволяют предположить, что белок VP0 (или VP2) содержит эпитопы, которые активируют непосредственно Т-хелперные клетки. Эти выводы были сделаны на основании того факта, что непосредственная иммунизация рекомбинантными белками не приводит к появлению в иммунных сыворотках вируснейтрализующих антител, в то время как последующая иммунизация субиммуногенными дозами вируса приводит к появлению антител, связывающих или нейтрализующих ВГА [7]. Авторы предполагают, что на белках VP3 и VP1 также присутствуют эпитопы, активирующие и примиряющие Т-клетки. В настоящее время в литературе отсутствуют данные по идентификации Т-эпитопов ВГА с помощью синтетических пептидов.

Поиск Т-хелперных эпитопов имеет немаловажное значение для получения синтетической вакцины, так как Т-эпитопы выступают не только как составные компоненты полной синтетической вакцины, но и могут использоваться самостоятельно в качестве так называемых Т-вакцин. В частности, в настоящее время многими авторами была доказана возможность примирования клеточного иммунитета к исходному вирусу с помощью Т-эпитопов на основе синтетических пептидов [8, 9].

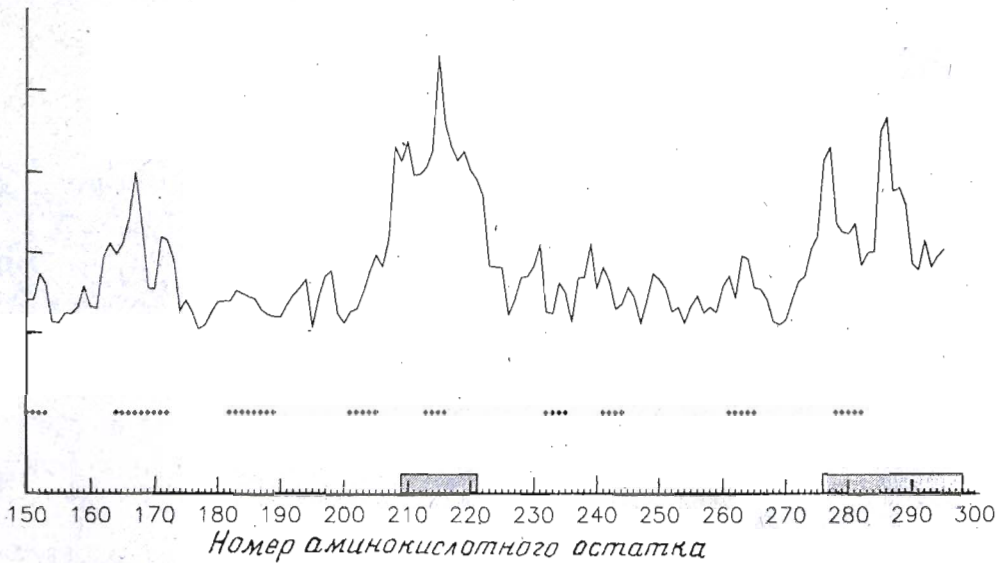
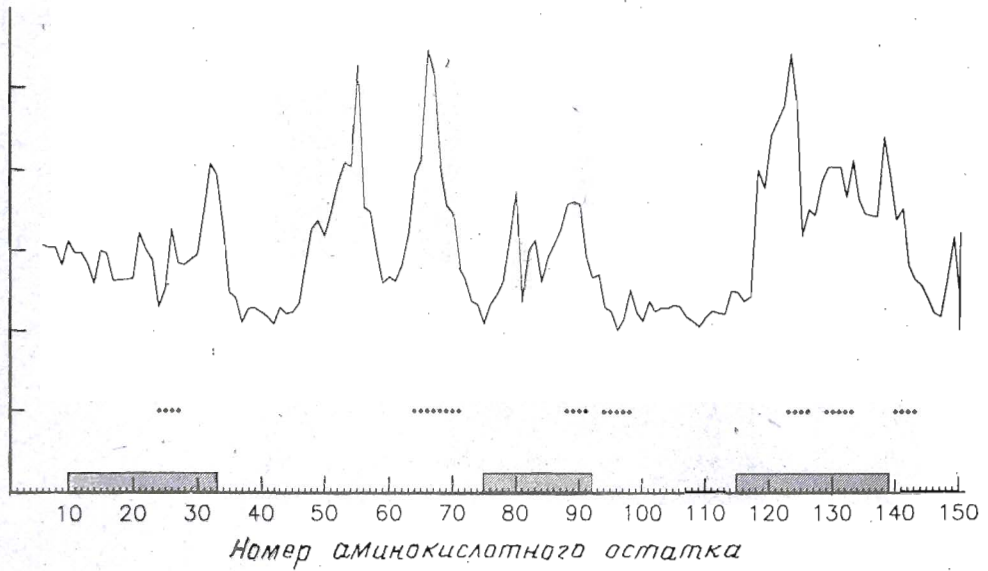
Основная стратегия поиска Т-хелперных эпитопов вирусных белков с помощью синтетических пептидов заключается в изучении влияния пептидов на активность Т-клеток, примированных исходным вирусом, рекомбинантными белками или синтетическими фрагментами вирусных белков. Тестирование проводится на лимфоцитах или Т-клеточных линиях человека, мышей или морских свинок. Во многих работах было показано, что данные по локализации Т-хелперных эпитопов, полученные на мышах, можно перенести и на другие виды животных [10—12], что существенно облегчает поиск хелперных эпитопов.

Цель настоящей работы заключалась в поиске вероятных Т-эпитопов капсидных белков ВГА с помощью компьютерных методов анализа аминокислотных последовательностей. Далее осуществлялся синтез пептидов, перекрывающих выбранные последовательности, и тестировалось влияние синтетических пептидов на пролиферацию лимфоцитов из лимфоузлов мышей, примированных этими пептидами.

Литературные данные по белковым Т-эпитопам показывают, что число их ограничено и они обладают общими структурными признаками. Большинство известных Т-эпитопов находится в спиральных участках белков, имеющих так называемую амфипатичную структуру [13]. По этой причине поиск амфипатичных спиралей является наиболее распространенным подходом для предсказания Т-эпитопов. Один из вариантов такого подхода — методика определения «спектра мощности». Участок белка рассматривается в качестве оптимального Т-эпитопа в том случае, если гидрофобность аминокислотных остатков чередуется с частотой, равной числу остатков на виток  $\alpha$ -спирали [13, 14].

Второй метод, предложенный авторами работы [15], основан на поиске в белковой последовательности характеристического мотива, который состоит из заряженного остатка или глицина, за ним следуют два или три гидрофобных остатка и полярный или заряженный остаток. Такой мотив хорошо согласуется с моделью амфипатичной спирали.

Нами был разработан интегрированный пакет программ для поиска Т-эпитопов [16]. Такой вид анализа предпочтителен, поскольку отдельные методы позволяют получать неоднозначно трактуемые результаты. В первой программе из разработанного пакета используется оригинальный алгоритм поиска амфипатичных структур в белковых последовательностях, основанный на оценке корреляции между гидрофобностями остатков и периодической функцией [17]. Второй алгоритм, который мы использовали для поиска Т-эпитопов, основан на локализации в аминокислотной последовательности вышеописанного харак-



Профиль амфипатичности белка VP1 (по оси ординат приведены значения коэффициента корреляции между гидрофобностями остатков и периодической функцией). Точками отмечены характеристические мотивы. Заштрихованные участки соответствуют синтезированным пептидам

теристического мотива. На рисунке приведен пример использования этих алгоритмов для анализа белка VP1.

К сожалению, результатом поиска Т-эпитопов с использованием характеристических фрагментов обычно оказывается слишком большой набор предполагаемых эпитопов. Второй недостаток этого метода заключается в невозможности ранжирования предсказанных сайтов по степени их важности. Поэтому мы использовали данный метод только в комбинации с другими алгоритмами. Также была использована программа предсказания предпочтительной вторичной структуры и стандартный метод оценки конформационных состояний рассматриваемых сайтов [18]. Фрагменты с предпочтительными  $\beta$ -изгибами или неупорядоченной структурой исключались из дальнейшего анализа.

## Синтетические пептиды из капсидных белков ВГА

Белок	Фрагмент	Аминокислотная последовательность
VP1	1—17	VGDDSGGFSTTVSTEQN
	10—33	TTVSTEQNVDPDPQVGITMRDLKG
	11—25	TVSTEQNVDPDPQVGI
	75—85	GESRHTSDHMS
	75—92	GESRHTSDHMSIYKFMGR
	107—126	YTFPITLSSSTSNPPHGLPST
	115—126	STSNPPHGLPST
	115—139	STSNPPHGLPSTLRWFFNLFQLYRG
	209—221	YAVSGALDGLGDK
276—298	MSRIAAGDLESSVDDPRSEEDRR	
VP2	69—99	LTTHALFHEVAKLDVVKLLYNEQFAVQGLLR
	80—99	KLDVVKLLYNEQFAVQGLLR
VP3	45—57	GKITHFTTWTSI
	137—150	PGNELIDVTGITLK
VP4	1—23	MNMSKQGIFQTVGSGLDHILSLA

После проведенных расчетов для синтеза были выбраны следующие участки капсидных белков ВГА: 75—92, 115—139 и 209—221 белка VP1, 69—99 и 80—99 белка VP2, 45—57 и 137—150 белка VP3 и 1—23 белка VP4 (табл. 1).

Кроме того, в работе были использованы пептиды, синтезированные ранее как вероятные В-эпитопы [6], являющиеся, по расчетам, также Т-эпитопами (10—33 и 276—298 белка VP1) или перекрывающиеся с ними (1—17, 11—25 и 75—85 белка VP1).

Пептиды были синтезированы твердофазным методом на синтезаторе Beckman 990. В качестве носителя использовали аминотетраэтиловый сополимер полистирола и 1% дивинилбензола с *n*-гидроксиметилфенилацетильной якорной группировкой. Концентрация аминогрупп составляла 0,5—0,7 ммоль/г смолы. Якорные группировки вводили при помощи предварительно синтезированного Рам-производного защищенной С-концевой аминокислоты [19].

Синтез осуществлялся методом последовательного наращивания пептидной цепи. Для временной защиты  $\alpha$ -аминогрупп использовали *трет*-бутилоксикарбонильную группу. Боковые функциональные группы аминокислот защищали: Asp, Glu — циклогексильной, Arg — тозилльной, His — бензилоксиметильной, Ser, Thr — бензильной, Tyr — 2,4-дихлорбензильной, Lys — 2-хлорбензилоксикарбонильной, Trp — формильной защитными группами. Аминокислоты присоединяли с помощью оксисбензотриазоловых эфиров.

Полнота протекания реакции контролировалась с помощью нингидринового теста. При необходимости непрореагировавшие аминогруппы ацилировались уксусным ангидридом в присутствии диизопропилэтиламина. Для удаления Вос-группы использовали смесь TFA —  $\text{CHCl}_3$  с последующей нейтрализацией раствором диизопропилэтиламина в DMF.

Влияние синтетических фрагментов из капсидных белков ВГА на пролиферацию лимфоцитов из лимфоузлов мышей, примированных этими пептидами, тестировали по методике, описанной во многих работах [20, 21]. Для тестирования использовали мышей линии СВА, BALB/с,  $F_1$  (СВА  $\times$  С<sub>57</sub> В<sub>16</sub>), а также  $F_1$  (BALB/с  $\times$  С<sub>57</sub> В<sub>16</sub>). О пролиферации лимфоцитов судили по включению лимфоцитами меченого тригетимидина. Каждый пептид тестировали также на его митогенную активность. Для этого серийные разведения пептида добавляли к суспензии лимфоцитов из лимфоузлов мышей, не примированных

Влияние синтетических пептидов из капсидных белков ВГА на пролиферацию лимфоцитов из лимфоузлов мышей, примированных этими же пептидами

Пептиды	Индекс стимуляции *		
	BALB/c	F <sub>1</sub> (BALB/c×C <sub>57</sub> Bl <sub>6</sub> )	СВА
VP1-(1—17)	1,2	1,2**	1,2
VP1-(10—33)	4,2	6,0	2,1
VP1-(11—25)	2,1	2,5**	1,3
VP1-(75—92)	6,2	2,2	1,1
VP1-(75—85)	1,1	1,0	1,0
VP1-(115—139)	1,0	2,0	1,1
VP1-(107—126)	1,1	1,0	н.д.
VP1-(115—126)	1,0	0,9	н.д.
VP1-(209—221)	1,1	2,2	1,0
VP1-(276—298)	2,5	4,0	2,1
VP2-(69—99)	2,4	2,1	1,0
VP2-(80—99)	н.д.	1,2	1,2
VP3-(45—57)	1,2	6,1	2,0
VP3-(137—150)	1,5	1,7	1,8
VP4-(1—23)	1,1	2,2	1,5
Соп А	9,1	10,2	8,1

\* Приведено максимальное значение СИ при оптимальных концентрациях пептидов.

\*\* Эксперимент проводили на мышак F<sub>1</sub> (СВА×С<sub>57</sub> Bl<sub>6</sub>), н. д.— нет данных.

пептидом, а «иммунизированных» эмульсией, содержащей PBS и полный адьювант Фрейнда. В данном случае нами не было обнаружено увеличения включения тимидина клеточными культурами при внесении в инкубационную среду тестируемых пептидов. Как видно из табл. 2, большинство пептидов вызывало пролиферацию лимфоцитов с индексами стимуляции от 1,7 до 6. Как правило, стимуляция пептидами пролиферации лимфоцитов зависела от гаплотипа животных. Это обстоятельство характерно для всех пептидов, за исключением пептидов 10—33 и 276—298 белка VP1, которые вызывали пролиферацию лимфоцитов мышей всех используемых линий. Аналог пептида VP1-(10—33) пептид VP1-(11—25) не вызывает пролиферацию лимфоцитов у мышей линии СВА, а пептид VP1-(1—17) вообще не влиял на пролиферацию лимфоцитов мышей тестируемых линий. На основании полученных результатов можно предположить, что на белке VP1 в области 17—33 локализован иммуоактивный участок, вызывающий пролиферацию вне зависимости от гаплотипов тестируемых нами линий мышей. Возможно, что на этом участке, а также в области 276—298 белка VP1 локализованы перекрывающиеся Т-эпитопы, которые узнают разные молекулы Ia-белков, как, например, это было определено для Т-эпитопов спорозойной формы малярийного паразита [10].

Пептид 115—139 белка VP1 вызывал увеличение пролиферации лимфоцитов только у мышей F<sub>1</sub>(BALB/c×C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>) и F<sub>1</sub>(СВА×C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>). Его аналоги 107—126 и 115—126 не влияли на пролиферацию лимфоцитов ни у одной линии мышей, примированных данными пептидами, однако внесение этих пептидов в культуры клеток из лимфоузлов мышей F<sub>1</sub>(СВА×C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>), примированных пептидом 115—139 белка VP1, вызывало пролиферацию лимфоцитов с индексами стимуляции, равными 4 и 5 соответственно. Подобный эффект не был обнаружен для лимфоцитов мышей линий СВА и BALB/c.

Таким образом, нами было показано, что практически все предсказанные

T-эпитопы влияли на пролиферацию лимфоцитов мышей, примированных пептидами, причем это влияние зависело от гаплотипа животных, лимфоциты которых использовали для проведения тестирования.

### 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). ВЭЖХ пептидов осуществляли на приборе фирмы Gilson (Франция).

*Аминокислотный анализ* проводили после кислотного гидролиза (смесь концентрированной HCl — пропионовая кислота, 1 : 1, с добавлением 0,5% фенола, 24 ч, в запаянных ампулах, при 110° С) на анализаторе Durrum Marck (США).

*Протоколы синтеза пептидов.* Загрузка смолы составляла 0,7—1,2 г. Основной протокол, использованный для синтеза: 1)  $\text{CHCl}_3$ , 30 мл, 1×1 мин; 2)  $\text{CHCl}_3$ , 30 мл, 1×3 мин; 3) 50% TFA/ $\text{CHCl}_3$ , 30 мл, 1×1 мин; 4) 50% TFA/ $\text{CHCl}_3$ , 30 мл, 1×20 мин; 5)  $\text{CHCl}_3$ , 30 мл, 5×1 мин; 6) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×1 мин; 7) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×10 мин; 8) DMF, 30 мл, 3×1 мин; 9) DMF, 30 мл, 1×20 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 9а) НОВТ, 2 ммоль/5 мл DMF, 1×3 мин, 0° С; 9б) DCC, 2 ммоль/5 мл  $\text{CHCl}_3$ , 1×3 мин, 0° С; 9в) защищенная аминокислота, 2 ммоль/5 мл DMF, 1×10 мин, 0° С; 10) реакционная смесь (9в) добавляется к смоле; 11) перемешивание 50 мин, 20° С; 12) DMF, 30 мл, 5×1 мин; 13) отбор образца для нингидринового теста. Для Lys, Tyr, Arg, His время конденсации (операция 11) было увеличено до 75 мин.

Протокол, используемый для посадки на смолу Рам-производного защищенной аминокислоты: 1)  $\text{CHCl}_3$ , 30 мин, 2×1 мин; 2) 50% TFA/ $\text{CHCl}_3$ , 30 мл, 2×1 мин; 3)  $\text{CHCl}_3$ , 30 мин, 5×1 мин; 4) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×1 мин; 5) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×10 мин; 6) DMF, 30 мл, 3×1 мин; 7) DMF, 30 мл, 1×5 мин; параллельно — ручная активация: 1 ммоль Рам-производного защищенной аминокислоты, 1 ммоль НОВТ, 1 ммоль DCC, DMF/ $\text{CHCl}_3$  (1 : 1) до 10 мл, 10 мин, 20° С; 8) реакционную смесь вручную добавляли к смоле; 9) перемешивали 40—60 мин, 20° С; 10) DMF, 30 мл, 5×1 мин; 11) отбор проб для нингидринового теста.

Протокол ацилирования: 1) приготовление вручную смеси 2 мл DIEA, 1 мл  $\text{As}_2\text{O}$  и до 5 мл  $\text{CHCl}_3$ ; 2) добавление смеси вручную к смоле; 3) DMF, 5 мл, 1×20 мин; 4) DMF, 30 мл, 5×1 мин.

После завершения синтеза смолу промывали 50% TFA/ $\text{CHCl}_3$ , 30 мл, 2×1 мин;  $\text{CHCl}_3$ , 30 мл, 3×1 мин; 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×10 мин;  $\text{CHCl}_3$ , 30 мл, 3×1 мин; затем сушили 10—12 ч в вакууме при 20° С. Высушенную смолу хранили в темноте при —20° С. Деблокирование пептидов и снятие их со смолы осуществляли по стандартным методикам [22].

*Антигензависимая пролиферация лимфоцитов.* Для работы использовали мышей линий BALB/c, СВА,  $F_1(\text{BALB/c} \times \text{C}_{57}\text{Bl}_6)$ . За 8—10 сут до тестирования пролиферации мышей иммунизировали 100 мкг тестируемого пептида в полном адьюванте Фрейнда. Эмульсию для иммунизации готовили, смешивая раствор пептида в PBS (1 мг/мл) с равным объемом адьюванта. Животным вводили по 100 мкл эмульсии в основание хвоста и по 50 мкл в подушечки задних конечностей. По истечении 8—10 сут мышей забивали цервикальной дислокацией и в стерильных условиях извлекали паховые и подколенные лимфоузлы, помещая их в бессывороточную среду RPMI 1640 «Flow lab.» (Великобритания), содержащую 2 мМ L-глутамин,  $5 \cdot 10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанол, 20 мМ HEPES и стрептомицин (50 мкг/мл). Лимфоузлы гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе или перетирали пинцетами. Все операции по выделению лимфоцитов проводили при 4° С. После отмыва и подсчета количества жизнеспособных клеток суспензию центрифугировали, затем осадок клеток ресуспендировали в полной ростовой среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной сыворотки, и вносили в 96-луноч-

ные планшеты «Flow lab.» (Великобритания) по  $4 \times 10^5$  клеток в лунку в объеме 100 мкл полной ростовой среды. Предварительно в эти же лунки вносили серийные разведения растворов тех же тестируемых пептидов от 200 до 0,2 мкг/мл. Тестирование проводили, как правило, с тремя повторами. Пептиды растворяли в бессывороточной среде RPMI 1640, стерилизовали фильтрованием через мембраны с диаметром пор 0,2 мкм («Millipore», США).

Плашки инкубировали при 37° С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 90% влажности в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Jouan (Франция). Через 72 ч в каждую лунку вносили по 1 мкКи [<sup>3</sup>H]тимидина, еще через 16 ч клетки переносили на стекловолоконный фильтр с помощью прибора Cell Harvester «Flow lab.» (Великобритания). В качестве отрицательного контроля использовали культуры лимфоцитарных клеток, растущие в среде, не содержащей пептидов, в качестве положительного контроля — лимфоциты, к которым добавляли конканавалин А. Диск с клетками помещали во флаконы с 3 мл сцинтилляционной смеси и измеряли количество импульсов в 1 мин для каждой пробы в сцинтилляционном счетчике Beckman (США). Результаты выражали в индексе стимуляции (СИ), который равен отношению количества импульсов в 1 мин в стимулируемых культурах к количеству импульсов в 1 мин в контрольных. Результаты считали положительными при значении индекса стимуляции (при оптимальных концентрациях пептида) больше 1,7—2.

Авторы выражают благодарность А. Т. Кожичу (ИБХ, Москва) за всестороннюю помощь в проведении работы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gust I. D., Coulepis A. G., Feinstone S. M., Locarnini S. A., Moritsugu Y., Najera R., Siege G. // *Intervirology*. 1983. V. 20. № 1. P. 1—17.
2. Cohen J. I., Ticehurst J. R., Purcell R. H., Buckler-White A., Baroudy B. M. // *J. Virol.* 1987. V. 61. № 1. P. 50—59.
3. Кусов Ю. Ю., Эльберт Л. Б., Казачков Ю. А., Вальяно Н. М., Нельга И. В., Гришина Г. К., Крутянская Г. Л., Лисицына Е. А., Полещук В. Ф., Соболев А. В., Титова И. П., Карпович Л. Г., Калашникова Т. В., Балаян М. С. // *Вопр. вирусологии*. 1991. № 3. С. 206—209.
4. Жданов В. М., Апаньев В. А., Стаханова В. М. *Вирусные гепатиты*. М.: Медицина, 1986. P. 20—63.
5. Siegl G., Lemon S. M. // *Virus Res.* 1990. V. 17. № 2. P. 75—92.
6. Чикин Л. Д., Кожич А. Т., Иванов В. С., Иванов В. Т., Насташенко Т. А., Кусов Ю. Ю., Балаян М. С. // *Биоорган. химия*. 1991. Т. 17. № 7. С. 964—971.
7. Powdrill T. F., Johnston J. M. // *J. Virol.* 1991. V. 65. № 5. P. 2686—2690.
8. Milich D. R., McLachlan A., Tornton G. B., Huges J. L. // *Nature*. 1987. V. 329. № 6139. P. 547—549.
9. Boots A. M. H., Kusters J. G., van Noort J. M., Zwaagstra K. A., Rijke E., van der Zeijst B. A. M., Hensen E. J. // *J. Immunol.* 1991. V. 74. № 1. P. 8—13.
10. Sinigaglia F., Guttinger M., Kilgus J., Doran D. M., Matile H., Etilinger H., Trzeciak A., Gillessen D., Pink J. R. L. // *Nature*. 1988. V. 336. № 6201. P. 778—780.
11. Rimmelzwaan G. F., Poelen M. C. M., Meloen R. H., Carlson J., UytdeHaag F. G. C. M., Osterhaus A. D. M. E. // *J. Gen. Virol.* 1990. V. 71. № 5. P. 1095—1102.
12. Cease K. B., Margalit H., Cornette J. L., Putney S. D., Robey W. G., Ouyang C., Streicher H. Z., Fischinger P. J., Gallo R. C., DeLisi C., Berzofsky J. A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. № 12. P. 4249—4253.
13. Berzofsky J. A. // *Immunol. Lett.* 1988. V. 18. № 2. P. 83—92.
14. Margalit H., Spouge J. L., Cornette J. L., Cease K. B., DeLisi C., Berzofsky J. A. // *J. Immunol.* 1987. V. 138. № 7. P. 2213—2229.
15. Rothbard J. B., Taylor W. R. // *EMBO*. 1988. V. 7. № 1. P. 93—100.
16. Kozhich A. T., Gabriellian A. E., Ivanov V. S., Tchikin L. D., Kulik L. N., Ivanov V. T. // *J. Cell. Biochem.* 1989. Supplement. 13 A. P. 272.
17. Габриэлян А. Э., Иванов В. С., Кожич А. Т. // *Биоорган. химия*. 1989. Т. 15. № 7. С. 985—986.
18. Garnier J., Osguthope O. J., Robson B. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 120. P. 97—120.

19. Mitchell A. R., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B.//Anal. Biochem. 1981. V. 43. № 13. P. 147—157.
20. Fox B. S., Chen C., Fraga E., French C. A., Singh B., Schwartz R. H.//J. Immunol. 1987. V. 139. № 5. P. 1578—1588.
21. Milich D. R., McLachlan A., Moriarty A., Tornton G. B.//J. Immunol. 1987. V. 139. № 4. P. 1223—1231.
22. Stewart J. M., Young J. D.//Solid Phase Peptide Synthesis. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Comp. 1984. P. 85—89.

Поступила в редакцию  
21.V.1993

После доработки  
7.VII.1993

*L. N. Kulik \*, V. S. Ivanov, A. E. Gabrielian,  
L. D. Tchikin, V. T. Ivanov*

### SEARCH FOR THE HEPATITIS A VIRUS T CELL EPITOPES USING SYNTHETIC PEPTIDES

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow;*

*\* Institute of Bioorganic Chemistry, Belorussian Academy of Sciences, Minsk*

Computer search for probable T-epitopes of the hepatitis A virus capsid proteins was performed using developed integrated set of programmes. The following peptides were chosen and synthesised by solid phase technique: 75—92 VP1, 115—139 VP1, 209—221 VP1, 69—99 VP2, 80—99 VP2, 45—57 VP3, 137—150 VP3 and 1—23 VP4. Peptides 1—17 VP1, 10—33 VP1, 11—25 VP1, 75—85 VP1 and 276—298 VP1 previously examined as probable B-epitopes were used as well. All the peptides were tested for their ability to stimulate proliferation of lymph node T-cells primed with synthetic peptides. Almost all the predicted T-epitopes did affected the T-cell proliferation. 10—33 VP1 and 276—298 VP1 stimulated lymph node proliferation of all tested mouse strains. 107—126 VP1 and 115—126 VP1 did not influence proliferation of lymphocytes of mice primed with these peptides but stimulated proliferation of T-cells of F1 (CBA×C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>) mice primed with 115—139 VP1.