



УДК 578.891.083.3:577.21

© 1994 Ю. А. Семилетов, А. А. Ржанинова, М. М. Гараев

**СИНТЕЗ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНОЙ ОБЛАСТИ V3 ПОВЕРХНОСТНОГО ГЛИКОПРОТЕИДА gp120 ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ТИПА 1***НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва*

Ключевые слова: пептиды синтетические, ВИЧ, гликопротеид gp120, изменчивость V3, ИФА.

Методом твердофазного синтеза получены пептиды, соответствующие 7 различным геномным последовательностям, кодирующим основную нейтрализующую детерминанту в составе гипервариабельной области V3 поверхностного гликопротеида gp120 вируса иммунодефицита человека типа 1. Пептиды выбраны в соответствии с наиболее распространенными вариантами области V3 в популяции ВИЧ-инфицированных Юга России. Разработан лабораторный вариант непрямого иммуноферментного анализа сывороток на наличие антител к последовательности V3 с использованием синтезированных пептидов. Анализ анти-V3-антител к ВИЧ-1 инфицированных пациентов с помощью разработанной тест-системы позволил обнаружить корреляцию между распространенностью вариантов последовательностей V3 и частотой встречаемости антител к этим вариантам.

Наличие в составе генома ВИЧ вариабельных областей было обнаружено сразу после первых попыток секвенирования различных изолятов вируса [1]. Особый интерес вызывает гипервариабельный участок V3 поверхностного гликопротеида gp120, содержащий в своем составе основную нейтрализующую детерминанту вируса. Область V3 соответствует участку 296—330 gp120, представляющему собой последовательность длиной 33—37 а. о. в зависимости от варианта вируса [2, 3]. По своей функциональной нагрузке этот участок gp120, вероятно, отвечает за взаимодействие вируса с клетками-мишенями, определяя способности вируса образовывать синцитии [4—6] и его клеточный тропизм [7—9]. В крови инфицированных обнаруживают высокий титр антител к этому антигену [10, 11]. Нейтрализация вируса осуществляется за счет подавления процессов вхождения вируса в клетки, по-видимому, на этапах, следующих за взаимодействием с CD4-рецептором [4, 12, 13]. Пептидный анализ позволил осуществить картирование положения основных антигенных детерминант в составе V3 [5, 14, 15]. Присутствие антител к V3 в крови, по-видимому, пролонгирует бессимптомный

Использованные сокращения: EDIPA — этилдиизопропиламин, НОВ1 — 1-гидроксibenзотриазол, TFMSA — трифторметансульфокислота, TFA — трифторуксусная кислота, DMF — диметилформамид, BSA — бычий сывороточный альбумин, PBS — фосфатно-солевой буфер (pH 7,4), OPD — орто-фенилендиамин, SD — стандартное отклонение, ВИЧ — вирус иммунодефицита человека.

Адрес для переписки: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16, НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского.

Частота встречаемости вариантов последовательностей V3, идентичных пептидам (I)—(VII), в популяциях ВИЧ-инфицированных Юга России \*

V3-пептид	Частота встречаемости, %	
	от общего числа последовательностей **	от числа пациентов ***
I	23,2(29)	54,5(12)
II	7,2(9)	18,2(4)
III	5,6(7)	13,6(3)
IV	4,8(6)	18,2(4)
V	4,0(5)	13,6(3)
VI	6,4(8)	18,2(4)
VII	4,8(6)	4,6(1)

\* Частоту встречаемости определяли как отношение числа последовательностей, идентичных синтезированным V3-пептидам, к общему числу проанализированных последовательностей в изучаемой популяции.

\*\* В скобках приведено абсолютное число последовательностей, идентичных пептиду. Общее число последовательностей 125.

\*\*\* В скобках указано число пациентов, у которых обнаружена последовательность, идентичная пептиду. Общее число пациентов 22.

период протекания ВИЧ-инфекции и увеличивает выживаемость инфицированных пациентов, хотя и не приводит к элиминации вируса из организма и в конечном итоге не препятствует развитию СПИДа. В связи с этим изучение характера иммунного ответа к этой области gp120 представляется крайне важным для понимания механизмов персистенции вируса.

Ранее нами было показано, что в популяциях ВИЧ-инфицированных лиц нозокомиальных очагов Юга России (так называемая «элистинская вспышка») получил распространение вариант ВИЧ-1 с консенсусной последовательностью аминокислот в области петли V3 gp120: STRPNNTRKSIISLPGGQAFYTTGEEIGDIRQANC [16]. При этом переменные аминокислотные остатки были отмечены в положениях 13, 14, 18, 20, 22, 25 и 32. Особый интерес представляли замены в позициях 13, 14, 20 и 22, которые прилежали непосредственно к консервативному участку GPG и составляли основную массу замен в анализируемой популяции [16]. Для проведения сравнительного анализа влияния таких замен на антителный ответ нами был предпринят синтез олигопептидов, соответствующих наиболее распространенным вариантам последовательности области V3 в популяции ВИЧ-инфицированных Юга России, а также разработан лабораторный вариант непрямого иммуноферментного анализа сывороток на наличие антител к последовательностям V3 с использованием синтезированных олигопептидов. В данной работе описаны результаты этих экспериментов, а также приведены данные по распространенности антител к отдельным вариантам V3 в популяциях ВИЧ-инфицированных Юга России.

Для анализа антител к V3 были синтезированы тетрадекапептиды, соответствующие 10—23 а. о. разных вариантов V3, обнаруживаемых в исследуемой популяции. (Нумерацию остатков здесь и далее проводили с N-концевого цистеина, занимающего в gp120 штамма HIV положение 296 [17].) Выбор этого участка был обусловлен двумя обстоятельствами: 1) в его состав входит основная нейтрализующая детерминанта в районе последовательности Gly-Pro-Gly [6, 18, 19]; 2) в нем сосредоточено около 70% всех замен в изучаемой популяции. Проведенный нами анализ встречающихся замен [20] позволил установить, что

основная масса вариантов (более 50% от общего числа) представлена 7 вариантами структуры, которые продемонстрированы ниже (для пептидов (II)—(VII) приведены только замены по отношению к пептиду (I)).

10	15	20	23	
Lys-Ser-Ile-Ser-Leu-Gly-Pro-Gly-Gln-Ala-Phe-Tyr-Thr-Thr				(I)
----- Phe -----				(II)
----- Phe ----- Ile -----				(III)
----- Phe Ala -----				(IV)
----- Ile -----				(V)
----- Arg Ile -----				(VI)
----- Asn Phe ----- Ile -----				(VII)

Необходимо отметить, что приведенные варианты области V3 имеют широкое распространение среди пациентов изучаемой популяции, так как обнаруживаются у 91% ВИЧ-инфицированных лиц. Как видно из данных, представленных в табл. 1, наибольшее распространение в популяции ВИЧ-инфицированных Юга России получил вариант (I), соответствующий консенсусной последовательности для этой популяции. Эта последовательность обнаружена у 54,5% от общего числа проанализированных ВИЧ-инфицированных лиц. Варианты последовательностей, соответствующие пептидам (II)—(VI), были обнаружены у 13—18% пациентов, что также говорит о неслучайном характере их возникновения. Мотив варианта (VII) с небольшими модификациями встречался в лимфоцитах трех ВИЧ-инфицированных пациентов, однако структура, полностью соответствующая пептиду (VII), имелась только у одного пациента, для которого она была консенсусной (неопубликованные данные).

Пептиды (I)—(VII), последовательность которых отвечает 10—23 а. о. области V3 наиболее распространенных вариантов (соответственно варианты I—VII), были синтезированы на твердой фазе вручную с использованием Boc/Bzl-стратегии в соответствии с методикой, предложенной в работе [21]. В качестве носителя использовали хлорметилированную матрицу (тефлон с радиационно привитым полистиролом [22]). Для пептидов (I)—(VII) синтез пептидилполимеров (PI)—(PVII) начинали, исходя из 1 г N-Boc-O-Bzl-треонилполимера (0,22 моль/г). Пептидную цепь последовательно наращивали с С-конца, разделяя навеску пептидилполимера на пропорциональные части на стадиях, предшествующих присоединению переменных аминокислотных остатков.

Аминогруппы деблокировали 50% раствором TFA в хлористом метиле. Образовавшийся трифторацетат аминоацилполимера нейтрализовали 10% раствором EDIPA в хлористом метиле. Для проведения реакции конденсации использовали DCC в присутствии HOBT или симметричные ангидриды Boc-аминокислот. Boc-Asn и Boc-Gln вводили в реакцию в виде *n*-нитрофениловых эфиров. Полноту прохождения реакций конденсации контролировали с помощью качественного нингидринового теста [21]. Одновременно синтез всех целевых пептидилполимеров проводили не более чем в четырех реакторах (условия реакций конденсации см. в табл. 2).

Пептиды (I)—(VII) отщепляли от полимерного носителя действием 1 М раствора TFMSA в TFA в присутствии тиоанизола с последующей очисткой гель-хроматографией на сефадексе G-10 в 10% водной уксусной кислоте. Образцы пептидов, предназначенные для анализа и исследований, дополнительно очищали полупрепаративной ВЭЖХ. Выходы очищенных пептидов в расчете на исходный треонин на полимере составляли 28—47% (табл. 3). Относительно низкие выходы пептидов (V) и (II) (соответственно 28 и 32%) связаны с их потерями при очистке из-за ограниченной растворимости в 10% уксусной кислоте.

Условия и результаты синтеза пептидилполимеров (PI—PVII)

Номер остатка	Реагенты, использованные для конденсации	Избытки ацилирующих агентов, моль/моль аминокислотного полимера	Время реакции, ч	Растворитель	Нингидриновый тест
22	BocThr(Bzl)/DCC	5/2,5	2	DMF	—
21	BocTyr(Bzl)/HOBT/DCC	4/8/4	18	DMF	—
20	BocPhe/DCC	5/2,5	2	DMF	—
	BocIle/DCC	5/2,5	2	DMF	—
19	BocAla/HOBT/DCC	4/8/4	18	DMF	—
18	BocGlnONP/HOBT	4/8/4	4	DMF	—
17	BocGly/HOBT/DCC	4/8/4	18	DMF	—
16	BocPro/DCC	5/2,5	2	DMF	+
	BocPro/HOBT/DCC	2/4/2	18	DMF	—
15	BocGly/DCC	5/2,5	2	DMF	—
	BocAla/DCC	5/2,5	2	DMF	—
14	BocPhe/HOBT/DCC	4/8/4	18	DMF	—
	BocIle/DCC	5/2,5	2	DMF	—
	BocLeu/DCC	5/2,5	2	DMF	—
13	BocSer(Bzl)/DCC	5/2,5	2	DMF	—
	BocArg(NO <sub>2</sub> )/HOBT/DCC	4/8/4	18	DMF	—
	BocAsnONP/HOBT	4/8/4	18	DMF	—
12	BocIle/DCC	5/2,5	2	DMF	—
11	BocSer(Bzl)/HOBT/DCC	4/8/4	18	DMF	+
	BocSer(Bzl)/DCC	3/1,5	2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	—
10	BocLys(Z)/HOBT/DCC	5/10/5	18	DMF	—

Пептиды охарактеризованы хроматографическим поведением (ТСХ ВЭЖХ), количественным аминокислотным анализом и оптическим вращением (табл. 3).

Анализ реактивности синтезированных пептидов с применением панели из 22 плазм крови ВИЧ-положительных эпидемиологически связанных пациентов из нозокомиальных очагов Юга России проводили методом непрямого ИФА на полистироловых планшетах фирмы «Costar». Подбор условий реакции осуществляли с использованием в качестве антигена пептида (I), поскольку реактивность данной последовательности с плазмами из исследуемой популяции была показана нами ранее [16]. Концентрации пептида для сорбции подбирали в пределах 50—0,0075 мкг/мл (рис. 1). При уменьшении концентрации антигена от 50 до 2,5 мкг/мл (при разведении ВИЧ-положительной плазмы 1 : 100) значения оптического поглощения не зависели от концентрации сорбированного пептида (рис. 1). При дальнейшем снижении концентрации пептида значения  $A$  пропорционально снижались (рис. 1). Исходя из этого для проведения анализа реактивности плазм в нашей тест-системе концентрация олигопептидов 5 мкг/мл была выбрана как оптимальная для дальнейшей работы.

Специфичность этой тест-системы определяли, используя панель плазм, полученных от ВИЧ-негативных доноров (24 образца). Распределение значений оптического поглощения для ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных плазм приведено на рис. 2. Как видно из представленных данных, значения поглощения



Характеристики синтезированных пептидов

Пептид	$[\alpha]_D^{20}$	Концентрация в 10% АсОН	$R_f^*$ (ТСХ)	$t_r$ , мин (ВЭЖХ)	Аминокислотный анализ *	Выход, % **
I	-54,0	1,0	0,65	6,7	н/о	40
II	-45,2	0,5	0,62	7,2	н/о	32
III	-53,0	1,0	0,63	7,0	н/о	42
IV	-47,4	1,0	0,65	7,1	Glu(1)1,03 Ser(2)1,89 Thr(2)1,91 Glu(1)1,06 Ala(2)2,18 Ile(1)1,05 Tyr(1)1,02 Phe(2)2,00 Pro(1)1,01 Lys(1)1,01	36
V	-53,5	1,0	0,63	6,8	н/о	28
VI	-49,8	1,0	0,66	7,7	н/о	38
VII	-55,5	1,0	0,64	7,3	Asp(1)1,04 Glu(1)1,04 Ser(1)1,08 Thr(2)2,02 Gly(2)2,07 Ala(1)1,13 Ile(2)1,95 Tyr(1)0,88 Phe(1)1,00 Pro(1)1,06 Lys(1)1,00	47

\* См. «Экспериментальную часть»; н/о — не определен.

\*\* Выход очищенных ВЭЖХ пептидов приведен в расчете на стартовую аминокислоту.

$A_{492}$  для отрицательных плазм распределялись вокруг среднего значения и не выходили за пределы значений трех стандартных отклонений, рассчитанных для этой выборки (рис. 2). С другой стороны, значение  $A_{492}$  для всех положительных плазм изученной панели оставались выше, чем для любой из отрицательных сывороток. Таким образом, в качестве cut off было выбрано значение среднего арифметического для отрицательных плазм плюс три стандартных отклонения. Как правило, в наших экспериментах значение cut off не превышало 0,1—0,2 ОЕ.

В разработанном нами варианте лабораторной тест-системы был проанализирован

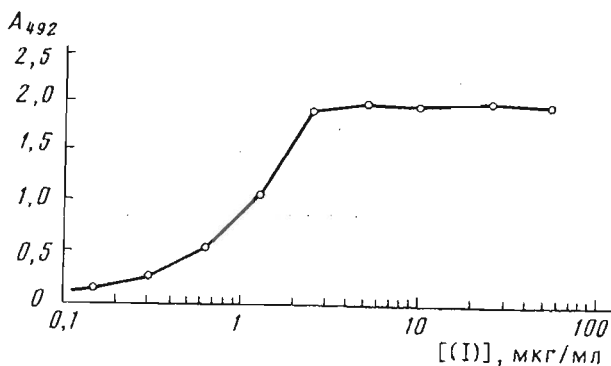


Рис. 1. Зависимость величины оптического поглощений  $A_{492}$  в реакции ИФА от концентрации сорбированного пептида (I). В реакции использовали плазму ВИЧ-инфицированного в разведении 1 : 100

спектр антител к 7 синтезированным V3-антигенам у пациентов из Калмыкии и Северо-Кавказского региона (рис. 3). Максимальной степенью распознавания положительных плазм обладали пептиды (I), (V) и (VI) (соответственно 100, 95,2 и 100%); незначительно сниженная реактивность наблюдалась с пептидами (II) и (III) (соответственно 82 и 71,4%). Пептиды (IV) и (VII) узнавались значительно меньшим числом ВИЧ-позитивных плазм (42 и 47% соответственно). Из этих данных следует, что существует определенная зависимость между реактивностью синтезированных пептидов и частотой встречаемости соответствующих последовательностей в исследуемой популяции (табл. 1, рис. 3). Однако прямого соответствия между этими параметрами не обнаружено, возможно, из-за высокой кросс-реактивности антител у ВИЧ-инфицированных пациентов по отношению к синтезированным пептидам. Проявление такой кросс-реактивности антител инфицированных пациентов к синтетическим пептидам с последовательностью, соответствующей области V3 различных маркерных штаммов ВИЧ-1, была продемонстрирована нами ранее, а также в работах других авторов [16].

Таким образом, нами получен набор синтетических олигопептидов, отвечающих последовательности 10—23 а. о. области V3 gp120 вариантов ВИЧ-1, получивших распространение во внутрибольничных очагах ВИЧ-инфекции Юга России. Показано, что эти пептиды специфично взаимодействуют с анти-V3-антителами плазм крови ВИЧ-инфицированных пациентов. На основе синтезированных пептидов разработан лабораторный вариант тест-системы для определения антител к основной нейтрализующей детерминанте ВИЧ-1. Анализ анти-V3-антител у ВИЧ-1, инфицированных с помощью описанной тест-системы, позволил обнаружить корреляцию между распространенностью вариантов последовательностей V3 и частотой встречаемости антител к этим вариантам.

### Экспериментальная часть

Все использованные аминокислоты — *L*-ряда. В синтезе пептидов применяли Вос-аминокислоты и следующие их производные: Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(Bzl), Lys(Z), Arg(NO<sub>2</sub>), Gln-ONp, Asn-ONp (Reanal, Венгрия); DCC (Serva, Германия); EDIPA, HOBT, TEMSA, тиоанизол (Fluka, Швейцария); сефадекс G10 (Pharmacia, Швеция). Полимерной матрицей служил тефлон с радиационно привитым полистиролом (10%) [22]. ТСХ пептидов осуществляли на пластинках Cellulose F (Merck, Германия) в системе пропанол — вода — 25% аммиак (6 : 1 : 3). Вещества на хроматограммах обнаруживали нингидрином. ВЭЖХ пептидов проводили на приборе DuPont (США) в следующих условиях: колонка (10 × 250 мм) Nucleosil C18, 7 мкм (Macherey-Nagel, Германия), элюция 0,1% TFA в 30% ацетонитриле — 0,1% TFA в 60% ацетонитриле в течение 15 мин; скорость потока 4 мл/мин, детекция при 220 нм. Аминокислотный состав пептидов

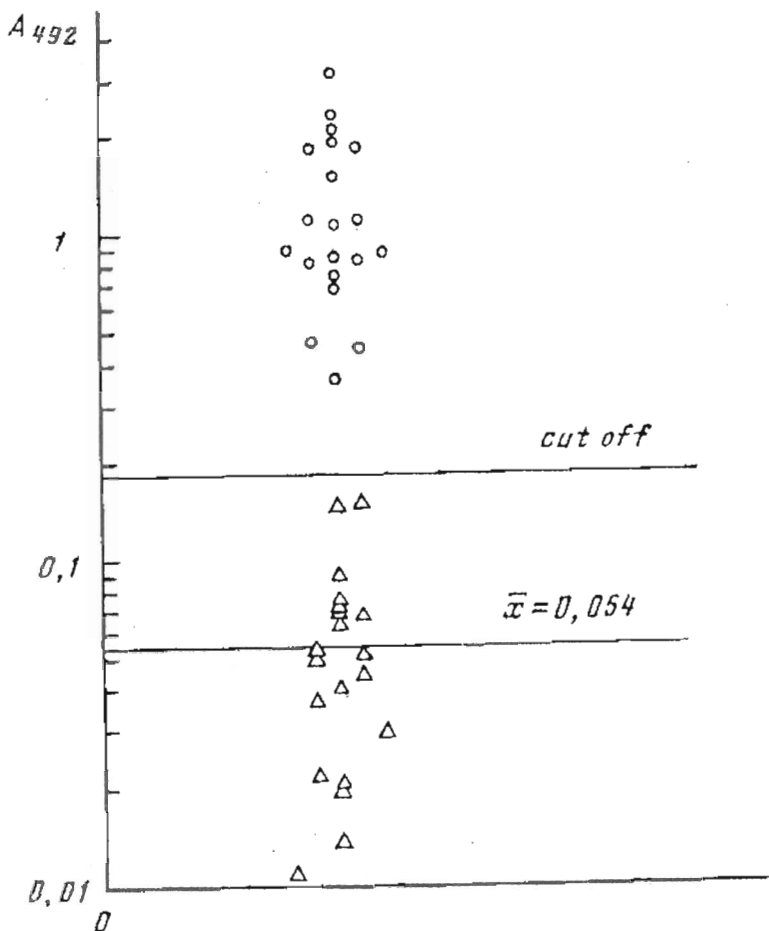


Рис. 2. Реактивность плазм ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных пациентов в тест-системе на определение антител к области V3 gp120 ВИЧ-1. Точки — плазмы ВИЧ-положительных пациентов [ $N = 21$ ]; треугольники — плазмы ВИЧ-отрицательных пациентов [ $N = 23$ ]; cut off — линия дискриминации значений оптического поглощения для плазм ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных пациентов. Положение линии рассчитано как  $\bar{X} + 3$  стандартных отклонения ( $\bar{X}$  — среднее арифметическое значений оптического поглощения  $A_{492}$  для отрицательных сывороток)

определяли на анализаторе Hitachi (Япония) после кислотного гидролиза (6 н. HCl, 110° C, 24 ч). Удельное оптическое вращение пептидов измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 241mc (Швеция). Оптическое поглощение в ИФА регистрировали на автоматическом спектрофотометре Titertek Multiscan фирмы Flow Laboratories (Великобритания).

### Твердофазный пептидный синтез

*Присоединение стартовой Вос-аминокислоты.* К 1 г хлорметилированного полимера (0,5 мг-экв. Cl), суспендированного в 5 мл DMF, прибавляли 309 мг (1 ммоль) Вос-Thr(Bzl), 0,14 мл (1 ммоль) триэтиламина и 75 мг (0,5 ммоль) иодистого натрия в качестве катализатора. Смесь перемешивали 4 ч при 40—50° C. Температуру регулировали освещением реакционной смеси фотолампой мощностью 500 Вт. Полимер отфильтровывали, промывали DMF (3 × 10 мл), этанолом (3 × 10 мл), трижды эфиром и гексаном, высушивали в вакууме. Выход 1,07 г.

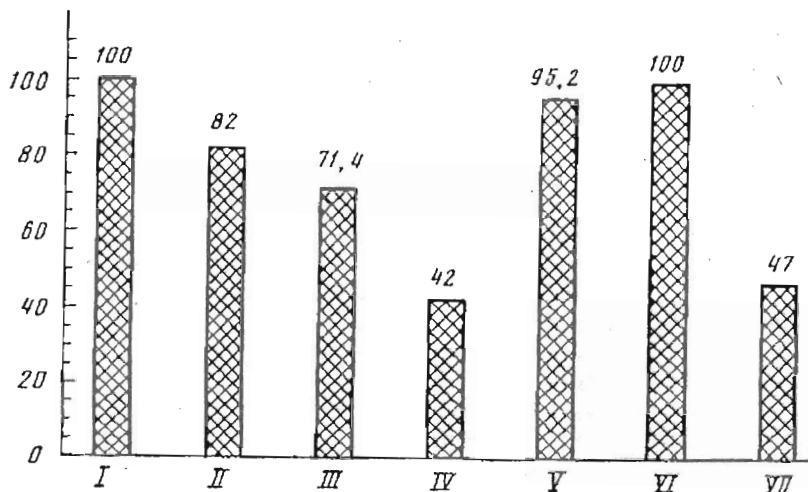


Рис. 3. Реактивность плазм ВИЧ-инфицированных пациентов из позокомиальных очагов Юга России с пептидами (I)—(VII). Общее число образцов — 22. Цифры над каждым столбцом — доля плазм (%), реагирующих с данным пептидом

Нагрузка Вос-Thr(Bzl), определенная по данным количественного аминокислотного анализа, составила 0,22 ммоль/г.

Твердофазный синтез пептидов (I)—(VII) проводили исходя из 1 г Вос-Thr(Bzl)-полимера (0,22 ммоль/г). Стандартный цикл пептидной конденсации на полимере включал в себя следующие стадии: 1) промывка хлористым метиленом ( $3 \times 1$  мин); 2) обработка 50% раствором TFA в хлористом метиле (5 + 25 мин); 3) промывка хлористым метиленом ( $3 \times 1$  мин); 4) обработка 10% раствором EDIPA в хлористом метиле ( $2 \times 5$  мин); 5) промывка хлористым метиленом ( $3 \times 1$  мин); 6) промывка DMF ( $3 \times 1$  мин); 7) конденсация с 2,5-кратным избытком симметричного ангидрида Вос-аминокислоты в DMF в течение 2 ч или с DCC в присутствии НОВт: 4 экв. Вос-аминокислоты + 8 экв. НОВт + 4 экв. DCC; 8) промывка DMF ( $3 \times 1$  мин), нингидриновый тест (при голубом окрашивании образец полимера реакцию конденсации повторяли). Объем однократной промывки 1 г пептидполимера 5 мл.

Вос-Asn и Вос-Gln вводили в конденсацию в виде *n*-нитрофениловых эфиров, взятых в четырехкратном избытке, с добавлением эквивалентных количеств НОВт в DMF. Симметричные ангидриды получали в хлористом метиле, используя на 1 ммоль Вос-аминокислоты 0,5 ммоль DCC. После выдерживания при 0° С в течение 30 мин реакционную смесь фильтровали. Фильтрат сразу вводили в реакцию пептидообразования или сначала упаривали в вакууме, остаток растворяли в DMF и реакцию с аминоацилполимером проводили в DMF.

В конце синтеза, после отщепления Вос-группы, пептидполимер последовательно промывали этанолом, эфиром, гексаном и высушивали в вакууме над щелочью. Аналогичные операции проводили при разделении пептидполимера на пропорциональные части перед присоединением переменных аминокислотных остатков (13—15-го и 20-го). Выход пептидполимеров (I)—(VII) колебался от 180 до 200 мг.

*Отщепление пептидов от полимерного носителя.* К 185 мг пептидполимера (VI) последовательно прибавляли 5 мл TFA, 0,6 мл тиоанизола и 0,45 мл TFMSA. Смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 2 ч при 20° С. Полимер отделяли фильтрованием и промывали TFA ( $3 \times 0,5$  мл). Фильтрат и промывные жидкости объединяли, охлаждали до 0° С и при перемешивании добавляли 50 мл сухого диэтилового эфира. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, промывали эфиром и сушили в вакууме над щелочью.

Очистку пептидов проводили гель-фильтрацией на колонке (2,5 × 50 см) с



сефадексом G-10, уравновешенным 10% водной уксусной кислотой. Собирали и лиофилизировали фракции, выходящие с колонки со свободным объемом. Образцы пептидов, предназначенные для анализа и исследований, дополнительно очищали полупрепаративной ВЭЖХ.

### Непрямой иммуноферментный анализ

*Плазмы крови.* Использовали плазмы крови 22 ВИЧ-положительных пациентов из Калмыкии и Северо-Кавказского региона, полученные в процессе выделения лимфоцитов (в которых были определены V3-последовательности) из гепаринизированной крови. В качестве отрицательных контролей использовали образцы плазм и сывороток ВИЧ-негативных доноров.

*Иммуноферментный анализ.* Пептиды (I)—(VII) растворяли в 20 мМ карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6) и наносили на планшеты «Costar» в концентрации 5 мкг/мл. После инкубации в течение 16—18 ч при 37° С планшеты отмывали от несвязавшихся компонентов и для уменьшения неспецифического связывания использовали раствор 0,01 М PBS — 2% BSA — 2% сухое молоко — 0,1% твин-20 (1,5 ч, 37° С). Тестируемые плазмы разводили 1 : 200 и инкубировали с адсорбированным на твердой фазе пептидом при 37° С. После инкубации отмывали 5 раз раствором 0,01 М PBS — 0,1% твин-20. Реакцию с раствором конъюгата анти-IgG-человека с пероксидазой в рабочем разведении проводили 1 ч при 37° С. Для выявления комплексов использовали смесь 5 мг орто-фенилендиамина — 60 мкл 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — 10 мл 0,1 М цитратно-фосфатного буфера (pH 4,5). Реакцию останавливали 2 н. серной кислотой. Cut off определяли как среднее значение величин оптического поглощения для плазм 24 ВИЧ-негативных доноров + 3 SD. Значения cut off для отдельных пептидов колебались в пределах 0,1—0,2 при сорбции пептида в концентрации 5 мкг/мл.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hahn B. H., Gonda M. A., Shaw G. M., Popovic M., Hoxie J. A., Gallo R. C., Wong-Staal F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 4813—4817.
2. La Rosa G. J., Davide J. P., Weinhold K., Waterbury J. A., Profy A. T., Levis W. A., Langlois A. J., Dreesman G. R., Boswell R. N., Shaddock P., Holey L. H., Karplus M., Bolognesi D. P., Matthews T. J., Emini E. A., Putney S. D. // Science. 1990. V. 249. P. 932—935.
3. Leonard C. K., Spellman M. W., Riddle L., Harris R. J., Thomas J. N., Gregory T. J. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 18. P. 10373—10382.
4. Rusche J. R., Jawaherian K., McDanal C., Petro J., Lynn D. L., Grimaila R., Langlois A., Gallo R. C., Arthur L. O., Fischinger P. J., Bolognesy D. P., Putney S. D., Matthews T. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 3198—3202.
5. Palker T. J., Clark M. E., Langlois A. J., Matthews T. J., Weinhold K. J., Rendall R. R., Bolognesi D. P., Haynes B. F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 1932—1936.
6. Goudsmit J., Boucher C. A., Meloen R. H., Epstein L. G., Smit L., Hoek van der L., Bakker M. // AIDS. 1988. № 2. P. 157—164.
7. Chesebro B., Nishio J., Perimann S., Cann A., O'Brien W., Chen I. S. Y., Wehrly K. // J. Virol. 1991. V. 65. P. 5782—5789.
8. Hwang S. S., Boyle T. J., Lyerly H. K., Cullen B. R. // Science. 1991. V. 253. P. 71—74.
9. Cann A. J., Churcher M. J., Boyd M., O'Brien W., Zhao J., Zack J. A., Chen I. S. Y. // J. Virol. 1992. V. 66. P. 305—309.
10. Robert-Guroff M., Brown M., Gallo R. C. // Nature. 1985. V. 316. P. 72—74.
11. Weiss R. A., Clapham P. R., Cheingsong-Popov R., Dalgleish A. G., Carne C. A., Weller I. V. D., Tedder R. S. // Nature. 1985. V. 316. P. 69—72.
12. Haigwood N. L., Barker C. B., Higgins K. W., Skiles P. V., Moore J. K., Mann K. A., Lee D. R., Eichberg J. W., Steimer K. S. // Vaccines 90. N. Y.: Harbor Lab. Press, 1990. P. 313—319.
13. Steimer K. S., Scandella C. J., Skiles P. V., Heigwood N. L. // Science. 1991. V. 254. P. 105—108.
14. Takahashi H., Merli S., Putney S. D., Houghten R., Moss B., Germein R. N., Berzofsky J. A. // Science. 1989. V. 246. P. 118—121.
15. McKeating J. A., Willey R. L. // AIDS. 1989. V. 3. [suppl. 1]. S35—S41.

16. Cheingsong-Popov R., Bobkov A. F., Garaev M. M., Kaleebu P., Callow D., Rzhainova A. A., Saukhat S. R., Burdayev N. P., Kolomejets N. D., Weber J. N.//J. Inf. Dis. 1993. V. 168. P. 292—297.
17. Ratner L., Haseltine W., Padarca R., Livak K. J., Starich B., Josephs S. F.//Nature. 1985. V. 313. № 6000. P. 277—284.
18. Javaherian K., Langlois A. J., McDanal C., Ross K. L., Eckler R. K., Jellis C. L., Profy A. T., Rusche J. R., Bolognesi D. P., Putney S. D., Matthews T. J.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6768—6772.
19. Meloen R. H., Liskamp R. M., Goudsmit J.//J. Gen. Virol. 1989. V. 70. P. 1505—1512.
20. Garaev M. M., Cheingsong-Popov R., Bobkov A. F., Rzhainova A. A., Pitman R., Weber J. N.//IXth Int. Conf. AIDS. Abstr. Berlin, 1993. V. 1. P. 165.
21. Семилетов Ю. А., Карпова В. А., Смирнов В. Д., Вязов С. О.//Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 3. С. 277—285.
22. Potapov V. K., Veyko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A.//Nucl. Acids Res. 1979. V. 6. P. 2041—2056.

Поступила в редакцию  
11.1.1994

После доработки  
1.11.1994

*Yu. A. Semiletov, A. A. Rzhainova, M. M. Garaev*

**SYNTHESIS AND COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIGENIC  
ACTIVITY OF PEPTIDES CORRESPONDING TO VARIOUS GENOMIC  
SEQUENCES OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS  
TYPE 1 gp120 SURFACE GLYCOPROTEIN  
HYPERVARIABLE V3 DOMAIN**

*D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences,  
Moscow*

Key words: synthetic peptides, HIV, glycoprotein gp120, V3 loop variability, ELISA.

A set of peptides (amino acid positions 10—23) corresponding to seven most widely spread variants of the gp120 V3 domain in the HIV-infected population of South Russia were prepared by the solid-phase synthesis. A laboratory variant of the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for the determination of V3 specific antibodies with use of the peptides synthesized. The analysis of the V3-specific antibodies in HIV-infected using the elaborated test-system revealed a correlation between the V3 variants distribution and the occurrence of antibodies against these variants.