



УДК 578.891:578.112.083.3

© 1994 Л. Н. Кулик\*, В. С. Иванов, Л. Д. Чикин,  
Н. П. Беркова, А. Т. Кожич, А. Э. Габриэлян, В. Т. Иванов

### МОДЕЛИРОВАНИЕ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ 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

Ключевые слова: В-эпитоп, антипептидные антитела, анти-ВГА-антитела.

С помощью моноклональных и поликлональных анти-ВГА-антител произведен поиск пептидов, моделирующих антигенные детерминанты вируса гепатита А (ВГА). Показано, что пептиды 115—139, 117—139, 126—139 белка VP1, 69—99, 80—99 белка VP2, 45—57 и 137—150 белка VP3 связываются с анти-ВГА-антителами. Пептиды VP1-(115—139), VP1-(117—139), VP2-(69—99), VP4-(1—23) были использованы для получения антипептидных сывороток. Мышей иммунизировали свободными пептидами или их конъюгатами с овальбумином. Установлено, что иммунизация мышей свободным пептидом VP2-(69—99) приводит к выработке антител, связывающих ВГА. Иммунные сыворотки, направленные к пептидам VP1-(115—139), VP1-(117—139), не взаимодействовали с нативным ВГА.

Высокая заболеваемость вирусным гепатитом А, широко распространенным на всех континентах, определяет актуальность исследований по разработке эффективной противовирусной вакцины [1]. Вакцины на основе инактивированного или ослабленного вируса, предлагаемые для использования в настоящее время, имеют ряд ограничений, связанных с особенностями размножения ВГА в клеточных культурах [2], а также с остаточной инфекционностью вакцин [3]. Относительная антигенная стабильность ВГА и наличие на капсиде вируснейтрализующих эпитопов [1, 4] могут в значительной мере облегчить работы по созданию синтетической вакцины против ВГА.

Первоочередной задачей в разработке синтетической вакцины является локализация иммуногенных и антигенных сайтов антигена. До настоящего времени не получено убедительных данных о локализации антигенных сайтов (В-эпитопов) ВГА. Предполагается, что иммунодоминантные антигенные сайты ВГА, как и у других пикорнавирусов, имеют конформационный характер, т. е. образованы

Принятые сокращения: ВГА — вирус гепатита А, OVA — овальбумин, DMF — диметилформамид, МА — моноклональное антитело, KLH — гемоцианин, BSA — бычий сывороточный альбумин, PBS — фосфатно-солевой буфер, рН 7,4.

Адрес для переписки: 117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, В. С. Иванову.

участками полипептидной цепи, сближенными в пространстве, но разделенными в первичной структуре [1]. Данные о конформационном характере эпитопов ВГА основаны на работах, в которых было показано, что поликлональные и моноклональные антитела не связывают денатурированные вирусные белки [5, 6]. Также не удалось получить ВГА-связывающие антитела при иммунизации животных рскомбинантными белками ВГА [7—9]. Однако в работе [10] было показано, что сыворотки больных гепатитом А в острой фазе и реконвалесцентов связывают в иммуноблоте отдельные белки ВГА. Причем было показано, что IgM-анти-ВГА-антитела, присутствующие в сыворотках больных в начальной фазе заболевания, преимущественно взаимодействуют с белком VP0 (VP2 + VP4), а IgA- и IgG-антитела — с белками VP1 и VP3. Иммунизация же кроликов отдельными вирусными белками не привела к появлению в сыворотках антител связывающих или иммунопреципитирующих ВГА [10]. Другим авторам удалось получить вируснейтрализующие антитела после иммунизации животных отдельными вирусными белками и разрушенным ВГА [11].

Таким образом, имеющиеся данные достаточно противоречивы; не исключено, что сам процесс выделения и иммобилизации вирусных белков может приводить к существенным изменениям в их структуре, а следовательно, и к изменению конформации антигенных детерминант. О том, что на капсиде ВГА присутствует иммунодоминантный, вируснейтрализующий участок, образованный несколькими эпитопами, говорят данные, приведенные в работе [12], где было показано, что моноклональные вируснейтрализующие антитела направлены к дискретным, перекрывающимся между собой эпитомам. До сих пор не выяснено, что представляет собой вируснейтрализующий участок ВГА — образован ли он композицией аминокислотных остатков, которые располагаются в аминокислотной цепи на значительном расстоянии друг от друга, или представлен короткими, в несколько аминокислотных остатков (3—5), последовательными эпитопами. В первом случае смоделировать эпитоп пептидом, повторяющим аминокислотную последовательность белка, в принципе невозможно, тогда как во втором такое моделирование возможно, если эти 3—5 аминокислотных остатков в синтетическом пептиде, состоящем из большего числа аминокислот, доступны и достаточны для связывания с антителами.

Ранее нами уже сообщалось о поиске В-эпитопов ВГА с помощью синтетических пептидов [13]. Пептиды 11—25, 75—85, 97—111, 101—106, 112—122, 276—298, 290—299 белка VP1, 46—62 белка VP2 и 76—85 белка VP3 в тесте на связывание с поликлональной сывороткой реконвалесцента, а также с сывороткой морской свинки, полученной в ответ на иммунизацию нативным или денатурированным ВГА, не дали статистически достоверного положительного ответа. В настоящей работе для усиления чувствительности метода мы использовали меченные биотином поликлональные человеческие анти-ВГА-антитела, выделенные из пула сывороток реконвалесцентов. Наряду с поликлональными анти-ВГА-антителами мы использовали ранее описанные вируснейтрализующие моноклональные антитела (МА) НВ-1 (IgG2a) [14], а также полученные нами МА В.2.6.8 (IgG2a) и 1.2.2.2 (IgM) [15].

Для тестирования были взяты все синтезированные пептиды (табл. 1), которые либо представляют собой найденные компьютерным анализом потенциальные В-эпитопы, либо перекрываются с ними по некоторым аминокислотным остаткам [13, 16, 17], и пептиды 75—92, 115—139, 180—195, 209—221 белка VP1, 69—99, 80—99 и 178—190 белка VP2 и 45—57, 137—150 белка VP3, которые были синтезированы как предполагаемые Т-эпитопы [18]. По расчетам, пептиды VP1-(115—139) и VP2-(69—99) являются одновременно потенциальными В-эпитопами. На рис. 1 приведен пример использования компьютерного анализа для локализации предполагаемых В-эпитопов белка VP2.

Пептиды были синтезированы твердофазным методом на синтезаторе Beckman 990 (США). В качестве носителя использовали аминотетраметиллированный сополимер

Таблица 1. Синтетические пептиды из капсидных белков ВГА

Белок	Фрагмент	Аминокислотная последовательность
VP1	1-17	VGDDSGGFSTTVSTEQN
	2-33	GDDSGGFSTTVSTEQNVDPDPQVGITTXRDLKG
	6-17	GGFSTTVSTEQN
	10-33	TTVSTEQNVDPDPQVGITTXRDLKG
	11-25	TVSTEQNVDPDPQVGI
	64-75	KVPETFPELKPG
	75-85	GESRHTSDHXS
	75-92	GESRHTSDHXSIIYKFXGR
	107-126	YTFPITLSSTSNPPHGLPST
	112-126	TLSSTSNPPHGLPST
	115-126	STSNPPHGLPST
	115-139	STSNPPHGLPSTLRWFFNLFQLYRG
	117-139	SNPPHGLPSTLRWFFNLFQLYRG
	126-139	TLRWFFNLFQLYRG
	180-195	DYKTALGAVRFNTRRT
	209-221	YAVSGALDGLGDK
	276-298	XSRIAAGDLESSVDDPRSEEDRR
	288-298	VDDPRSEEDRR
	290-299	DPRSEEDRRF
	VP2	42-62
65-85		SADWLTTHALFHEVAKLDVVK
69-99		LTTHALFHEVAKLDVVKLLYNEQFAVQGLLR
80-99		KLDVVKLLYNEQFAVQGLLR
178-190		PVWELTIRVWSEL
VP3	45-57	GIKITHFTTWTSI
	62-75	AQFPFNASDSVGGQQ
	137-150	PGNELIDVTGITLK
	235-246	APLYHAXDVTTQ
VP4	1-23	XNXSKQGIFQTVGSGLDHILSLA

X - остаток норлейцина.

полистирола и 1% дивинилбензола. Исходная концентрация аминогрупп составляла 0,5—0,7 ммоль/г смолы. Якорные группировки вводили при помощи *n*-гидроксиметилфенилацетильного производного защищенной C-концевой аминокислоты.

Для временной защиты  $\alpha$ -аминогрупп использовали Вос-группу. В качестве защит боковых функций аминокислот использовали: для Asp, Glu — циклогексильный эфир; для Arg — тозилую; для His — бензилоксиметильную; для Ser, Thr — бензильную; для Tyr — 2,6-дихлорбензильную; для Lys — 2-хлорбензилоксикарбонильную группу. Триптофан использовали с незащищенной боковой функциональной группой. Аминокислоты конденсировали с помощью оксипензотриазоловых эфиров в диметилформамиде.

С целью упрощения синтеза в ряде пептидов остатки метионина были заменены изостерическими остатками норлейцина, при этом мы учитывали, что такая замена обычно не приводит к снижению биологической активности.

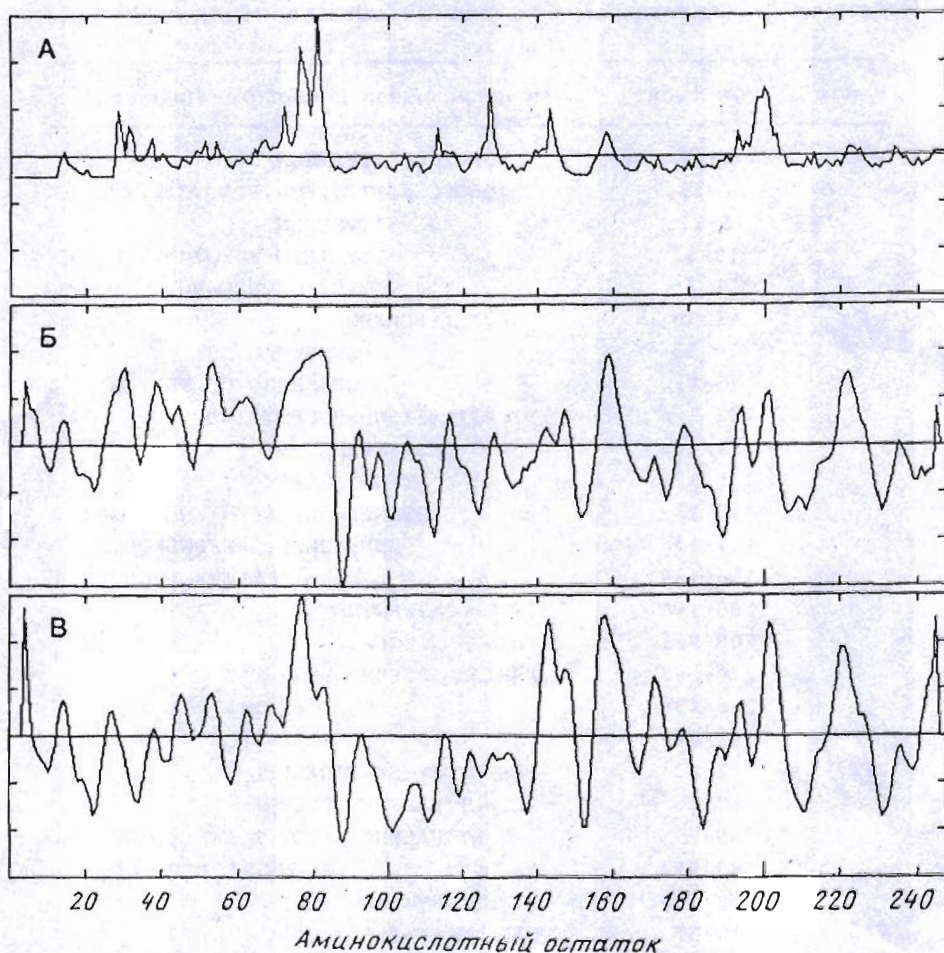


Рис. 1. Анализ антигенной структуры белка VP2. Приведены расчетные профили: доступности (А), гидрофильности (Б), локализации  $\beta$ -изгибов (В)

Связывание синтетических пептидов с МА и IgG из пула сывороток реконвалесцентов тестировали с использованием биотинстрептавидиновой системы. Для этого анти-ВГА-антитела, используемые для тестирования, биотинилировали с помощью сукцинимидного эфира биотина. Результаты тестирования приведены в табл. 2.

Предварительно было установлено, что МА В.2.6.8 и НВ-1 вызывали нейтрализацию вируса *in vitro*, а МА 1.2.2.2, вызывая полное блокирование присоединения сыворотки реконвалесцента к вирусу, не влияло на инфекционную способность ВГА, что предполагает разную эпитопную направленность используемых антител [15].

Тестирование синтетических пептидов на связывание с МА выявило, что пептиды 45—57 и 137—150 из белка VP3 и пептид последовательности 69—99 белка VP2 взаимодействовали только с МА 1.2.2.2. Пептиды, соответствующие N-концевому участку пептида 107—139 белка VP1 (107—126, 112—126 и 115—126), не взаимодействовали ни с одним из анти-ВГА-антител, в то время как пептиды, соответствующие С-концевой части пептида VP1 (107—139) — (117—139, 126—139), взаимодействовали со всеми тремя МА. Пептид 115—139, аналог пептида 117—139, связывался только с МА 1.2.2.2. Не исключено, что с удлинением пептида происходит изменение его конформации, что влияет на его антигенные

## Взаимодействие синтетических пептидов с анти-ВГА-антителами\*

Пептид	МА						Фракция IgG из пула сывороток реконвалесцентов	
	В.2.6.8		НВ-1		1.2.2.2		P/N	ответ
	P/N	ответ	P/N	ответ	P/N	ответ		
VP1-(1—17)	1,0	—	1,1	—	1,1	—	1,0	—
VP1-(2—33)	1,2	—	1,1	—	1,0	—	1,2	—
VP1-(6—17)	1,1	—	0,9	—	1,2	—	0,9	—
VP1-(10—33)	1,0	—	1,7	—	1,4	—	1,6	—
VP1-(11—25)	1,1	—	1,2	—	1,2	—	1,1	—
VP1-(64—75)	1,2	—	1,2	—	1,4	—	1,2	—
VP1-(75—85)	1,0	—	1,0	—	1,1	—	1,0	—
VP1-(75—92)	1,1	—	1,1	—	н. д.	—	1,2	—
VP1-(107—126)	1,2	—	1,3	—	1,4	—	1,2	—
VP1-(112—126)	1,4	—	1,3	—	1,6	—	1,2	—
VP1-(115—126)	1,1	—	1,2	—	1,2	—	1,1	—
VP1-(115—139)	1,3	—	1,3	—	6,2	+	1,6	—
VP1-(117—139)	4,2	+	4,9	+	9,6	+	2,0	+/-
VP1-(126—139)	2,9	+	7,1	+	18,2	+	2,4	+
VP1-(180—195)	1,0	—	1,0	—	н. д.	—	0,9	—
VP1-(209—221)	0,9	—	1,1	—	»	—	1,0	—
VP1-(276—298)	1,1	—	1,0	—	»	—	1,0	—
VP1-(288—298)	1,2	—	0,9	—	»	—	1,0	—
VP1-(290—299)	0,9	—	1,1	—	»	—	1,1	—
VP2-(42—62)	1,1	—	0,9	—	»	—	0,9	—
VP2-(65—85)	1,1	—	1,0	—	1,0	—	1,1	—
VP2-(73—85)	1,0	—	1,0	—	1,0	—	1,0	—
VP2-(69—99)	1,5	—	1,6	—	12,2	+	2,3	+/-
VP2-(80—99)	2,6	+	2,9	+	22,3	+	2,4	+
VP2-(178—190)	2,0	+/-	2,0	+/-	1,8	—	1,8	—
VP3-(45—57)	1,2	—	1,0	—	2,2	+/-	1,2	—
VP3-(62—75)	1,1	—	1,2	—	1,2	—	1,1	—
VP3-(137—150)	1,1	—	1,4	—	3,7	+	1,2	—
VP3-(235—246)	1,1	—	1,0	—	н. д.	—	0,9	—
VP4-(1—23)	1,0	—	1,0	—	1,1	—	1,5	—

\* Определение P/N (см. «Экспер. часть»). Ответ считали положительным при P/N > 2,2 (среднее арифметическое из трех определений); н. д. — нет данных.

свойства. Тот же вывод можно сделать и в отношении пептидов 69—99 и 80—99 белка VP2.

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что пептиды VP1-(126—139) и VP2-(80—99) связывались со всеми антителами, причем эти пептиды не сходны по структуре. Также можно заметить, что одни и те же антитела связывались с пептидами из различных белков, не имеющими между собой структурного сходства. Подобный феномен описан в литературе [19—21]. В частности, в работе [19] было показано, что МА к белку gE вируса герпеса связывались с пептидами из разных участков этого белка.

Нами не было обнаружено связывания пептидов 1—17, 2—33, 6—17, 11—25 и 10—33 белка VP1, охватывающих или частично перекрывающих предполагаемый В-эпитоп 11—25 белка VP1 [22, 23] с поли- или моноклональными анти-ВГА-антителами. Также нами не было обнаружено связывания анти-ВГА-антител с

## Блокирование синтетическими пептидами связывания иммунных сывороток с ВГА и с пептидами

Сыворотка	Иммобилизованный антиген	Конкурирующий пептид	A <sub>492</sub>
анти-VP2-(69—99) (1 : 200)	ВГА	—	1,334
	»	VP2-(69—99)	0,219
	»	VP2-(80—99)	0,341
	»	VP2-(73—85)	1,295
	»	VP2-(65—85)	1,139
	VP2-(69—99)	—	2,394
	»	VP2-(69—99)	0,153
	»	VP2-(80—99)	0,456
	»	VP2-(73—85)	2,454

\* Рабочая концентрация пептидов 10 мкг/мл.

\*\* Среднее значение из трех определений.

пептидом VP3-(62—75), иммунизация конъюгатом которого с КЛН приводила к появлению вируссвязывающих антител [24].

Пептиды 69—99 белка VP2, 117—139 и 115—139 белка VP1 и 1—23 белка VP4 были выбраны для получения антипептидных сывороток. Иммунизацию мышей проводили свободными пептидами и их конъюгатами с овальбумином. Линии мышей для иммунизации свободными пептидами выбирали исходя из результатов антигензависимой пролиферации. Так, пептид VP2-(69—99) влиял на пролиферацию лимфоцитов мышей линии BALB/c, а пептиды VP1-(115—139) и VP4-(1—23) — на пролиферацию лимфоцитов мышей линии C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> [20]. Поэтому мышей этих линий мы использовали для иммунизации свободными пептидами. Конъюгаты пептидов с овальбумином получали при помощи глутарового альдегида, взаимодействующего с N-концевой аминогруппой пептида и с ε-NH<sub>2</sub>-группой лизина. Пептид VP2-(69—99) содержит в своем составе два остатка лизина в положениях 80 и 85, и нас интересовало, как модификация этих остатков влияет на антигенные свойства пептида. Конъюгаты пептидов 69—99 белка VP2, 117—139 и 115—139 белка VP1 с овальбумином вводили мышам линии BALB/c. Иммунизацию проводили по стандартной схеме иммунизации — четырехкратно с 2-недельным интервалом после каждой иммунизации. Иммунную сыворотку получали на 3-й день после последней иммунизации.

Наличие антипептидных антител в сыворотках определяли методом непрямого ИФА. Для тестирования использовали пул сывороток от трех животных, иммунизированных соответствующим антигеном. Иммунизация животных свободными пептидами VP2-(69—99), VP1-(117—139), VP1-(115—139) и VP4-(1—23) привела к появлению в иммунных сыворотках антипептидных антител, связывающих исходные пептиды с титрами 1 : 15 000, 1 : 1500 для сывороток к пептидам VP2-(69—99), VP1-(117—139) соответственно и 1 : 10 000 для сывороток к пептидам VP1-(115—139) и VP4-(1—23). Иммунизация мышей конъюгатами пептидов 117—139 и 115—139 белка VP1 с овальбумином также приводила к появлению в сыворотках антипептидных антител, связывающих соответствующие пептиды с титрами 1 : 2500 и 1 : 5000. Иммунизация животных конъюгатом VP2-(69—99)-OVA не привела к появлению антител, связывающих пептид 69—99 белка VP2, что предполагает участие лизиновых остатков в формировании антигенной детерминанты, локализованной на пептиде. Антисыворотка к пептиду VP2-(69—99) связывалась с укороченным его аналогом VP2-(80—99) с титром 1 : 10 000 и не взаимодействовала с пептидами 73—85 и 65—85 белка VP2. Также эти

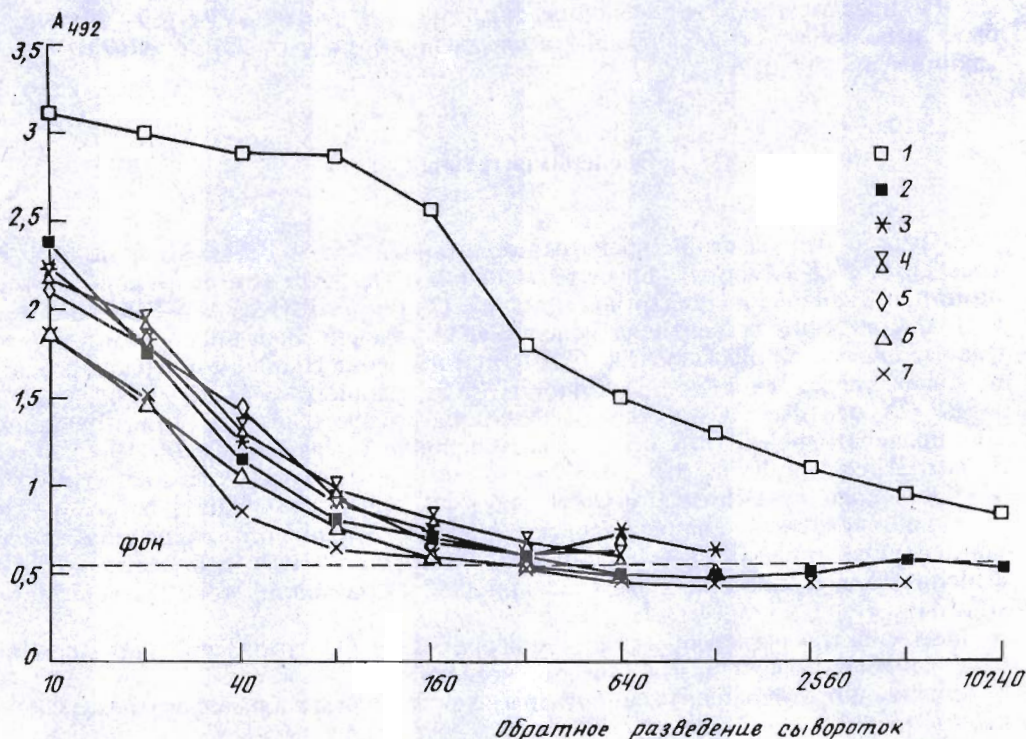


Рис. 2. Связывание с нативным вирусом гепатита А пула сывороток, полученных в ответ на иммунизацию пептидом VP2-(69—99) (1); VP2-(69—99)-OVA (2); VP1-(115—139) (3); VP1-(115—139)-OVA (4); VP1-(117—139) (5); VP1-(117—139)-OVA (6) и пула сывороток мышей, иммунизированных OVA (7). На графике приведены средние значения поглощения для трех определений

пептиды не блокировали присоединение сыворотки к VP2-(69—99) с пептидом и с ВГА (см. табл. 3).

Сыворотки, полученные после иммунизации мышей свободными пептидами и их конъюгатами, были протестированы на связывание с нативным вирусом гепатита А. Анализ проводили методом непрямого ИФА. В результате было установлено, что только пул сывороток животных, иммунизированных пептидом VP2-(69—99), связывался с вирусом (см. рис. 2).

Сыворотки к пептиду VP4-(1—23) не взаимодействовали с ВГА, однако эти же сыворотки специфически взаимодействовали с IgG из пула сывороток реконвалесцентов и соответственно вирус блокировал связывание сывороток к VP4-(1—23) с IgG.

Иммунные сыворотки к пептиду 69—99 белка VP2 не блокировали присоединение IgG из пула сывороток реконвалесцентов к вирусу. Отсюда следует, что эпитоп, моделируемый пептидом VP2-(69—99), не является иммунодоминантным на ВГА либо при естественном развитии заболевания в сыворотке реконвалесцентов появляются антитела, направленные к эпитопам, отличным от эпитопа, моделируемого пептидом. Возможно, пептид VP2-(69—99) моделирует эпитоп, который узнают IgM-антитела, присутствующие в сыворотках больных в начальной стадии заболевания. Полученный результат согласуется с данными, представленными в работе [10].

Пептиды VP2-(69—99) и VP2-(80—99) блокировали присоединение к ВГА сыворотки, полученной в ответ на иммунизацию животных пептидом 69—99 белка VP2, что подтверждает специфичность взаимодействия антисыворотки к VP2-(69—99) с ВГА (табл. 3).

Мы предполагаем, что обнаруженный нами В-эпитоп VP2-(69—99) может быть использован в дальнейших исследованиях по разработке синтетической вакцины против ВГА.

### Экспериментальная часть

В работе использовали производные аминокислот и реактивы фирм Reanal (Венгрия), PRF (Япония), Fluka (Швейцария). Пептиды синтезировали на аминометилированной по стандартной методике [25] смоле BIO-BEADS S-X1 (Bio-Rad, США). Для синтеза пептидов использовали модернизированный нами твердофазный синтезатор Beckman 990 (США). Отщепление со смолы и деблокирование пептидов проводили в аппарате фирмы PRF (Япония).

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).

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).

Основной протокол синтеза пептидов подробно описан в ранее опубликованной работе [13].

Вирус гепатита А (штамм HAS-15), размножаемый в перевиваемой клеточной линии почки эмбриона макаки резус (линия FRhK-4), любезно предоставлен Т. А. Насташенко (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН). N-Оксисукцинимидный эфир биотина любезно предоставлен В. А. Коваленко (ИБХ РАН).

*Биотинилирование антител.* К 2 мл 0,1 М PBS, содержащего 2—4 мг антитела, добавляли 100 мкл N-оксисукцинимидного эфира биотина в DMF с концентрацией 1 мг/мл. Смесь оставляли на 18 ч при 4° С или на 2 ч при 20° С и очищали ультрафильтрацией на мембране YM-30 (Amicon, США). Биотинилированные антитела хранили при —20° С в глицерине.

*Иммуоферментный анализ.* Тестирование связывания синтетических пептидов с биотинилированными анти-ВГА-антителами проводили методом ИФА с использованием биотин-стрептавидиновой системы. Для этого в лунки 96-луночного планшета для ИФА (Flow Laboratories, Англия) вносили соответствующие пептиды, растворенные с концентрацией 20—100 мкг/мл либо в 0,1 М PBS, pH 7,4 или 4,5 (pH до значения 4,5 доводили уксусной кислотой), либо в 0,05 М бикарбонатном буфере с pH 9,5. После инкубирования плашек в течение ночи при 20° С лунки промывали 0,01 М PBS. Затем, после обработки в течение 1 ч плашек 1% БСА, растворенным в 0,1 М PBS при 37° С и промывки 0,01 М PBS, содержащим 0,05% твин 20 (PBST), в лунки вносили по 50 мкл биотинилированных анти-ВГА-антител, растворенных в 0,1 М PBST. После инкубирования в течение 1 ч при 37° С плашку промывали 0,01 М PBST и в лунки вносили раствор стрептавидин-биотинилированной пероксидазы хрена в разведении 1:2000 (Amersham, США) и инкубировали 15 мин. После последующей промывки в лунки вносили субстрат. В качестве субстрата использовали раствор о-фенилендиамина (1 мг/мл) в 1% цитратном буфере (pH 4,5), содержащем 0,05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Оптическое поглощение измеряли при длине волны 492 нм после остановки реакции 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Результаты учитывали с помощью многоканального спектрофотометра Multiscan (LabSystems, Финляндия). Результаты считали положительными при P/N > 2,2 (P — поглощение



( $\lambda$  492 нм) в лунках с пептидами,  $N$  — поглощение в лунках с иммобилизованным BSA).

Тестирование связывания антипептидных сывороток с синтетическими пептидами проводили методом непрямого ИФА. Для тестирования использовали пул сывороток от группы животных, иммунизированных соответствующим антигеном. Для этого в лунки с иммобилизованными пептидами (1 мкг в лунку) вносили иммунные сыворотки, разведенные в 0,1 М PBST, и инкубировали при 37° С 60 мин. Затем планшет промывали 0,01% PBST. Наличие связавшихся с пептидами антител из иммунных сывороток тестировали мечеными пероксидазой кроличьими антимышиными антителами.

Связывание иммунных сывороток с ВГА анализировали методом непрямого ИФА. В качестве первых антител для иммобилизации вируса использовали сыворотку реконвалесцента в разведении 1 : 20 000. Планшет с нанесенными анти-ВГА-антителами человека инкубировали ночь при 20° С, промывали PBS и инкубировали с 1% БСА в течение 1 ч. После промывки вносили препарат вируса и инкубировали ночь при 20° С. Затем плашку промывали и в лунки вносили мышинные иммунные сыворотки, разведенные в 0,1% PBST. После нанесения сывороток планшет инкубировали 60 мин при 37° С и промывали PBST. Затем вносили в лунки конъюгат меченных пероксидазой кроличьих антител. После инкубирования планшет промывали PBST и вносили субстрат.

Блокирование иммунными сыворотками присоединения IgG из пула сывороток реконвалесцентов проводили методом конкурентного ИФА. Для этого в лунки планшета с иммобилизованным вирусом вносили мышинные сыворотки, разведенные в 0,1 М PBST, и инкубировали 60 мин при 37° С. Затем планшет промывали 0,01 М PBST и вносили меченные пероксидазой IgG из пула сывороток реконвалесцентов. После инкубирования при 37° С в течение 60 мин планшет промывали PBST и в лунки вносили *o*-фенилендиамин.

Блокирование синтетическими пептидами связывания сыворотки к VP2-(69—99) с ВГА и синтетическими пептидами тестировали методом непрямого ИФА. В данном случае тестировали способность синтетических пептидов блокировать присоединение иммунной сыворотки к антигену. Для этого плашки, иммобилизованные ВГА или синтетическими пептидами, инкубировали с разведенной в 200 раз сывороткой к VP2-(69—99), предварительно проинкубированной в течение 30 мин с растворенным с разными концентрациями в 0,1 М PBST тестируемым пептидом. Наличие связавшихся с иммобилизованным антигеном антител тестировали мечеными пероксидазой кроличьими антимышиными антителами.

*Иммунизация животных.* Самок мышей линий BALB/c и C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> (3—4 особи на один антиген) иммунизировали внутрибрюшинно 4 раза с интервалом в 2 недели: первая иммунизация — 100 мкг антигена в 200 мкл суспензии полный адъювант Фрейнда — PBS (1 : 1); вторая иммунизация — 100 мкг антигена в 200 мкл суспензии неполный адъювант Фрейнда — PBS (1 : 1); последующие две иммунизации — 100 мкг антигена в 200 мкл PBS. Сыворотку брали через 3—4 сут после последней иммунизации.

Авторы выражают благодарность Т. А. Насташенко (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН) за помощь в организации работы.

Эта работа была частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siegl G., Lemon S. M.//Virus Res. 1990. V. 17. № 2. P. 75—92.
2. Жданов В. М., Ананьев В. А., Стаханова В. М. Вирусные гепатиты. М.: Медицина, 1986. P. 20—63.
3. Wiedermann G., Ambrosch F., Kollaritsch H., Hofmann H., Kunz Ch., Hondt E. D., Delem A., Andre F. E., Safary A., Stephenne J.//Vaccine. 1990. V. 8. № 6. P. 581—584.
4. Cohen J. I., Ticehurst J. R., Purcell R. H., Buckler-Whiht A., Baroudy B. M.//J. Virol. 1987. V. 61. № 1. P. 50—59.
5. Gerlich W. H., Frosner G. G.//Med. Microbiol. Immunol. 1983. V. 172. P. 101—106.
6. Hughes J. V., Stanton L. W., Tomassini J. E., Long W. J., Scolnick E. M.//J. Virol. 1984. V. 52. № 2. P. 465—473.
7. Ostermayr R., Helm K., Gauss-Muller V., Winnacker E. L., Deinhardt F.//J. Virol. 1987. V. 61. № 11. P. 3645—3647.
8. Gauss-Muller V., Mingquan Z., von der Helm K., Deinhardt F.//J. Med. Virol. 1990. V. 31. P. 277—283.
9. Powdrill T. F., Johnston J. M.//J. Virol. 1991. V. 65. № 5. P. 2686—2690.
10. Gauss-Muller V., Deinhardt F.//J. Med. Virol. 1988. V. 24. P. 219—228.
11. Hughes J. V., Stanton L. W.//J. Virol. 1985. V. 55. № 2. P. 395—401.
12. Stapleton J. T., Lemon S. M.//J. Virol. 1987. V. 61. № 2. P. 491—498.
13. 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.
14. Беркова Н. П., Насташенко Т. А., Кусов Ю. Ю., Шамборант О. Г., Кожич А. Т., Балаян М. С., Иванов В. Т. Штамм гибридных культивируемых клеток животных *mus musculus* L — продуцент моноклональных антител к вирусу гепатита А человека: А. с. 1657527 СССР//Б. И. 1991. № 23. С. 70.
15. Кулик Л. Н., Насташенко Т. А., Беркова Н. П., Попова О. К., Хазинская Г. А., Стукачева Е. А., Иванов В. С.//Биотехнология. 1993. № 9. С. 2—6.
16. Kozhich A. T., Gabrielian A. E., Ivanov V. S., Kulik L. N., Tchikin L. D., Nastashenko T. A., Kusov Yu. Yu., Balayan M. S.//7th Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins. USSR—FRG/Abstract. 1989. P. 22.
17. Иванов В. С., Чикин Л. Д., Кожич А. Т., Кусов Ю. Ю., Насташенко Т. А.//VII Всесоюз. симпозиум по химии белков и пептидов. Таллинн, СССР. Сб. тез. 1987. С. 182.
18. Кулик Л. Н., Иванов В. С., Габриэлян А. Э., Чикин Л. Д., Иванов В. Т.//Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 12. С. 1169—1176.
19. Williams R. C., Kievit E., Tsuchiya N., Malone Ch., Hutt-Fletcher L.//J. Immunol. 1992. V. 149. № 7. P. 2415—2427.
20. Brown L. E., McInerney T., Anders E. M., White D. O., Jackson D. C.//Immunol. Lett. 1991. V. 28. № 3. P. 213—218.
21. de Macedo Brigido M., Sabbaga J., Brentani R. R.//Immunol. Lett. 1990. V. 24. № 3. P. 191—197.
22. Emini E. A., Hughes J. V., Perlow D. S., Boger I.//J. Virol. 1985. V. 55. P. 836—839.
23. Lemon S. M., Barclay W., Ferguson M., Murphy P., Jing L., Burke K., Wood D., Katrak K., Sangar D., Minor P., Almond J. W.//Virology. 1992. V. 188. P. 285—295.
24. Кусов Ю. Ю., Казачков Ю. А., Дзагуров Г. К., Насташенко Т. А., Кожич А. Т., Габриэлян А. Э., Чикин Л. Д., Иванов В. Т., Балаян М. С.//Вопр. вирусологии. 1991. № 2. С. 114—117.
25. Mitchell A. R., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B.//Anal. Biochem. 1981. V. 43. № 13. P. 147—157.

Поступила в редакцию  
17.IX.1993

После доработки  
20.I.1994

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

HEPATITIS A VIRUS ANTIGENIC DETERMINANTS MAPPING BY  
MEANS OF SYNTHETIC PEPTIDES

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

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

Key words: anti-peptide antibodies, B-epitope, anti-HAV antibodies.

Monoclonal and polyclonal anti-hepatitis A (HAV) antibodies were used to search for peptides mimicking the antigenic determinants of HAV. Synthetic peptides VP1 115—139, VP1 117—139, VP1 126—139, VP2 69—99, VP2 80—99, VP3 45—57, VP3 137—150, were shown to bind the anti-HAV antibodies in ELISA. Peptides VP1 115—139, VP1 117—139, VP2 69—99 were utilized to produce the antipeptide antibodies. Mice were immunized with the free peptides or with their conjugates with ovalbumin. Only the free VP2 69—99 caused formation of HAV binding antibodies.