

## B型肝炎 表面抗原의 主免疫原 決定基에 特異한 合成 Peptide의 免疫原性에 관한 研究

申 光 淳·韓 壽 南  
서울大學校 獸醫科大學  
(1985. 3. 14 接受)

### Immunogenicity of Synthetic Peptide Specific for Major Immunogenic Determinat of Hepatitis B Surface Antigen

Kwang-soon Shin and Su-nam Han  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
(Received March 14, 1985)

**Abstract:** Many investigators have been pursuing various attempts so far to produce hepatitis B surface antigen(HBsAg) vaccines using the techniques such as isolation from plasma of chronic HBsAg carrier, recombinant DNA technique or preparation of synthetic peptides specific for immunogenic determinants. Hepatitis B virus can not grow on any cell lines by the tissue culture technique at the present time. The plasma of chronic HBsAg carrier is expensive and its source is limited. The HBsAg from the recombinant DNA technique gave still very low yield. Another approach, therefore, has been initiated to develop a synthetic hepatitis B virus vaccine.

The possible use of several distinct synthetic vaccines in prophylaxis can be facilitated by availability of full synthetic immunogens. Peptides synthesized for potential application as anti-viral vaccines have been mostly tested in the form of conjugates with carrier proteins, although the free synthetic peptide can be immunogenic.

To understand basic knowledges on the antigenicity and immunogenicity of a synthetic peptide specific for major immunogenic determinant of HBsAg, a nonapeptide,  $H_2N^{139}Cys-Thr-Lys-Pro-Thr-Asp-Gly-^{146}Asn-Aba\ COOH$ , which corresponds to HBsAg amino acid residues 139 to 147, was synthesized by the Merrifield's solid-phase method with a slight modification. The antigenicity and immunogenicity of this specific synthetic peptide were examined comparing with purified plasma-derived natural HBsAg. The results obtained are as follows;

1. The peptide synthesized showed the identical amino acid composition to the theoretical value. The degree of purification and molecular weight were ascertained by methods of high performance liquid chromatography and mass spectrometry.

2. Using m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester as a conjugating agent, the synthetic peptide was conjugated to rabbit albumin and  $\gamma$ -globulin, tetanus and diphtheria toxoids, and keyhole limpet hemocyanin. Their conjugation yields were 8.3, 9.5, 15.8, 13.5, and 11.2%, respectively.

3. The natural HBsAg was purified from plasma of chronic HBsAg carrier. By the electron microscopic observation of the purified natural HBsAg preparation, no Dane particles were observed and the preparation showed negative DNA polymerase activity.
4. Antigenicity of the synthetic peptide and the plasma-derived natural HBsAg was determined by competition radioimmunoassay using  $^{125}\text{I}$ -natural HBsAg. Their 50% inhibitions appeared as  $90\mu\text{g}/\text{ml}$  and  $0.12\mu\text{g}/\text{ml}$  for the synthetic peptide and the natural HBsAg, respectively. This indicates that the former was about 750-fold less antigenic than the latter.
5. Immunogenicity of the synthetic peptide was determined by administering the peptide-carrier conjugates into rabbits with and without Freund's complete adjuvant. Regardless the carrier proteins and adjuvant, positive immune responses to the synthetic peptide were observed. The higher antibody titers, however, were shown in the groups administered with Freund's complete adjuvant.
6. Immunizing dose 50% in mice of the various peptide-carrier conjugates was 5.47, 6.00, 65.16, 31.25 and  $13.03\mu\text{g}/\text{dose}$  for rabbit albumin and  $\gamma$ -globulin, tetanus and diphtheria toxoids, and keyhole limpet hemocyanin, respectively, while the natural HBsAg showed  $0.65\mu\text{g}/\text{dose}$ .
7. It was postulated that homologous proteins prefer to heterologous ones as the carriers.

## 緒 論

慢性 carrier의 血漿에서 精製한 HBsAg 백신은 안전하고 免疫原性이 높고 豫防效果가 좋은 것으로 밝혀졌으나<sup>13,23~26,30,60,61)</sup> 대량의 HBsAg를 확보하기가 어렵고 高價인 결점이 있다.<sup>3,32,44,45)</sup> 血漿由來 HBsAg백신에는 이와 같은 결점이 있기 때문에 細菌 및 酵母를 이용한 HBsAg의 생산 및 vaccinia virus를 vector로 이용한 생바이러스 백신(live vaccine)이 연구중에 있다.<sup>25)</sup> HBV DNA를 遺傳工學 技法으로 *Escherichia coli*나 *Saccharomyces cerevisiae* 등에서 발현시키는 방법이 제시되었으나<sup>11,17,21,41,53,62)</sup> 아직은 완전한 免疫原성을 갖는 粒子의 收率이 낮아 이 방법을 백신제조에 응용하기까지는 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각한다. 최근 다른 遺傳工學 技法으로 vaccinia virus vector를 이용한 생바이러스 백신을 생산하는 새로운 방법이 제시되었다.<sup>7,47)</sup>

Virus 자체 또는 그 성분을 이용하는 대신 免疫原성이 있는 부분을 合成한 peptide를 이용한 백신의 개발에 관한 연구는 10여년전부터 시도되었다.<sup>5,6,38)</sup> 그러나 바이러스 蛋白質의 아미노산 配列이 밝혀진 것이 많지 않기 때문에 극히 제한된 분야에서 이에 관한 연구가 진행중에 있다.<sup>28,29,68)</sup> 일반적으로 合成 백신을 개발하기 위하여서는 바이러스의 DNA 또는 RNA의 nucleotide 配列에 근거하여 아미노산 配列에 관한 자료를 얻고 이를 기초로 合成백신의 연구가 진행된다.<sup>59)</sup> 즉 복잡한 바이러스 蛋白質의 구조에서 免疫原성이 있고 中和抗體를 유발할 수 있는 免疫原 決定基를 찾아

야 한다.

HBsAg 蛋白質의 化學構造가 밝혀짐에 따라 抗原 決定基를 함유하는 epitope을 찾는 연구가 수행되었다. 즉 Vyas 등<sup>60)</sup>은 computer를 이용하여 규명한 2차 구조와 疎水性에 근거하여 HBsAg의 抗原的 epitope은 親水性 部分인 아미노산 殘基 37~74와 110~156 사이라고 하였다. 그리고 Hopp 및 Woods<sup>61)</sup>는 아미노산 配列을 분석하고 平均 親水性 指數가 가장 높은 141~146의 아미노산 殘基가 抗原的 epitope일 것이라고 하였다.

HBsAg 蛋白質의 아미노산 배열과 抗原 決定基에 대한 연구가 활발하여 짐에 따라 免疫原 決定基에 대한 peptide를 合成하여 그 免疫原성을 규명하는 연구가 진행되고 있다.<sup>20,22,33)</sup> Vyas 등<sup>65)</sup>은 HBsAg 蛋白質의 "d" 또는 "y" 決定基는 親水性 부분인 110~156의 아미노산 殘基에서 110~137 사이의 아미노산 조성에 따라서 결정되며 모든 HBsAg의 血清型이 공통적으로 가지고 있는 "a" 決定基는 139~147의 아미노산 조성에 따라 결정된다고 하였다.

본 실험에서는 B型 肝炎에 대한 合成 peptide 백신의 抗原性和 免疫原성을 추구하기 위하여 HBsAg 蛋白質의 아미노산 殘基 139~147의 peptide를 合成한 다음 이 合成 peptide의 抗原성에 관하여 실험하였다. 家兔 albumin 및  $\gamma$ -globulin, tetanus 및 diphtheria toxoid와 KLH 등을 carrier로 사용하여 家兔 및 마우스에서 合成 peptide의 免疫原성 및 免疫량을 조사하였다.

## 材料 및 方法

HBsAg 아미노산 殘基 139~147의 化學合成 Vyas 등

의 실험에서 사용된 HBsAg 아미노산 殘基 139~147의 peptide를 Merrifield<sup>46)</sup>의 방법을 약간 변형한 Aimoto의 방법에 따라 합성하였다. 각 아미노산의  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>基는 t-butylloxycarbonyl(BOC)基로 보호되고 이외의 side chain은 Cys, SH는 aceto amidomethyl, Lys  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>는 benzyloxycarbonyl, Asp  $\beta$ -COOH는 benzyloxy, Thr  $\beta$ -OH는 benzyl基로 보호된 재품을 사용하였다. 아미노산의 결합은 0.5M dicyclohexylcarbodiimide(DCC)를  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>의 보호기의 제거는 trifluoroacetic acid(TFA)를 사용하였고 이때 생성된 염은 N,N-diisopropylethylamine(DIEA)으로 中和하여 제거하였다.

**合成 Peptide와 carrier protein과의 결합** : Carrier protein으로 家兔 albumin 및  $\gamma$ -globulin, tetanus 및 diphtheria toxoid와 KLH를 선정하였다. Carrier protein의 아미노산 조성을 분석한 다음, Lys의 양이 8.5  $\mu$ mol이 되게 carrier protein을 각각 취하고 0.1M phosphate buffered saline(PBS, pH7.2) 1ml씩에 녹였다. 이 용액에 DMF에 녹인 m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide(MBS, Sigma, USA) 8.5 $\mu$ mol을 가하고 실온에서 교반하면서 1시간 반응시켰다. 반응액에 合成 peptide 8.5 $\mu$ mol씩을 가하고 다시 실온에서 교반하면서 1시간 반응시켜 合成 peptide와 carrier protein을 결합시켰다. 최종 반응액을 셀로판 透析膜에 넣고 실온에서 18시간 증류수로 透析하였다. 매 6시간마다 증류수를 교환하여 결합되지 않은 미반응의 合成 peptide를 완전히 제거하였다. 透析이 끝난 peptide-carrier conjugate 용액은 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

**合成 Peptide 抗原性 確認** : 合成 peptide의 抗原性を 확인하기 위하여 <sup>125</sup>I로 표지한 natural HBsAg(<sup>125</sup>I-HBsAg, Ausab Kit의 시약, Abbott, USA)를 사용하여 競争 放射免疫 分析法으로 실험하였다.<sup>63)</sup> Natural HBsAg를 山羊에 接種하여 抗血清을 만들어 affinity chromatography에 의하여 精製한 anti-HBs를 polyvinylchloride microtitration plate(Dynatech, USA)에 吸着시켰다. 合成 peptide의 抗原性を 확인하기 위하여 合成 peptide를 음성대조혈청으로 0, 25, 50, 75, 100, 200, 300 및 400 $\mu$ g/ml로 희석한 후 각 50 $\mu$ l씩을 精製 anti-HBs가 吸着된 polyvinylchloride microtitration plate의 well에 넣은 다음 여기에 음성대조혈청으로 10배 희석한 <sup>125</sup>I-HBsAg를 50 $\mu$ l씩을 가하였다. 실온에서 18시간 정지시킨 후 PBS로 세척하고 각 well을 잘라서 gamma-ray counter(Auto-gamma 500C, Packard, USA)로 放射能을 측정하였다. 抗原性的 percent inhibition은 대조(0 $\mu$ g/ml)에서의 放射能計測値를 100으로

하여 각 시료의 抑制된 放射能 計測値를 percent로 표시하였다.

**合成 Peptide의 免疫原性 確認** : Peptide와 peptide-carrier conjugate의 抗體 生成 與否를 家兔로 사용하여 조사하였다. 한편 FCA가 抗體生成에 미치는 영향도 함께 조사하였다. Carrier protein에 結合된 合成 peptide의 양으로 100 $\mu$ g의 合成 peptide에 해당하는 peptide-carrier conjugate와 合成 peptide를 취하여 FCA로 처리한 것과 처리하지 않은 것으로 구분하여 각각 3마리씩의 家兔에 皮下注射하고 接種後 30일에 血清을 채취하였다. 抗體의 생성 여부는 Ausab Kit(Abbott: USA)를 사용하여 放射免疫分析法으로 확인하였다. 抗體生成의 기준은 제조회사의 사용방법에 따라 시료의 放射能 計測値가 음성대조혈청의 放射能 計測値의 평균치에 2.1을 곱한 값 이상이면 抗體가 生成된 것으로 판정하였다.

**合成 Peptide 免疫量** : 合成 peptide의 50% 免疫量を 측정하기 위하여 結合된 peptide의 양으로 合成 peptide 2mg/0.5ml에 해당하는 peptide-carrier conjugate를 4배 단계 희석하여 2,000, 500, 125, 31.25, 7.81, 1.95 및 0.49 $\mu$ g/0.5ml이 되게 하였다. 각 희석액 0.5ml씩을 10마리씩의 BALB/c 마우스의 腹腔內에 注射하였다. 注射後 28일에 血清을 채취하여 抗體生成與否를 Ausab Kit(Abbott, USA)로 확인하였다. 抗體生成의 기준은 음성대조혈청의 放射能 計測値의 평균치에 표준편차를 합한 값(M $\pm$  $\delta$ ) 이상이면 抗體가 生成된 것으로 판정하였고, 50% 免疫量の 계산은 Reed-Muench의 방법에 준하였다.

## 結 果

**合成 Peptide와 Carrier Protein과의 결합** : 合成 peptide의 免疫原性を 높이기 위하여 m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester(MBS)를 conjugating agent로 하여 carrier protein 즉, 家兔 albumin 및  $\gamma$ -globulin, tetanus 및 diphtheria toxoid와 KLH에 각각 結合시켰다. 結合收率을 구하기 위하여 각 carrier protein을 peptide에 結合시키기 전과 후의 아미노산 조성을 분석하여 結合시키기 전과 후의 Lys 함량의 차이를 비교하였다. Lys 함량비율을 근거로 結合收率을 계산한 결과 家兔 albumin 및  $\gamma$ -globulin, tetanus 및 diphtheria toxoid와 KLH가 각각 8.3, 9.5, 15.8, 13.5 및 11.2%이었다.

**合成 Peptide 抗原性** : 合成 peptide의 抗原性を 확인하기 위하여 <sup>125</sup>I-HBsAg를 사용하여 競争 放射免疫 분

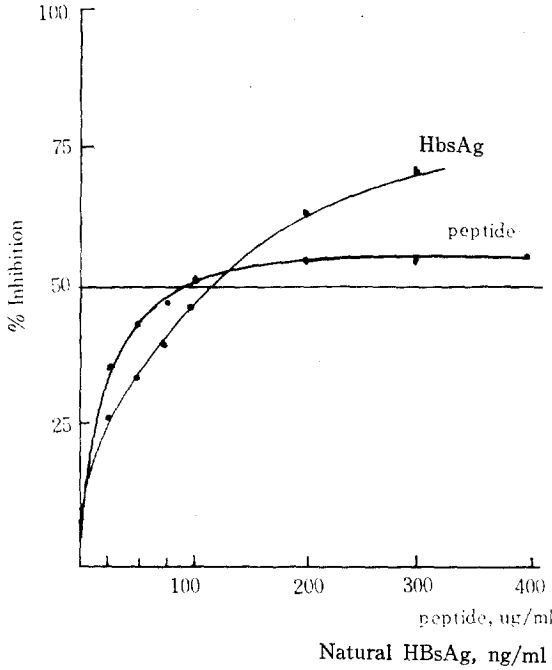


Fig. 1. Competition radioimmunoassay for synthetic peptide and natural HBsAg39.

析法으로 50% inhibition의 양을 측정하였다. 精製 anti-HBs를 microtitration plate에 吸着시킨 다음 50 $\mu$ l 씩의 合成 peptide 희석액 및  $^{125}$ I-HBsAg를 넣었다. 이것을 실온에서 18시간 반응시킨 후 세척하고 각 well을 잘라서 放射能을 측정하였다. Peptide를 함유하지 않은 대조(0 $\mu$ g/ml)에서의 放射能 計測值를 100으로 하였을 때 合成 peptide 희석액 25, 50, 75, 100, 200, 300 및 400 $\mu$ g/ml인 시료의 percent inhibition은 각 35.9, 38.8, 48.0, 52.9, 54.8, 54.4 및 55.7%이었으며 50% inhibition의 양이 약 90 $\mu$ g/ml에서 나타나 抗原性を 확인하였다(그림 1).

**合成 Peptide의 免疫原性:** 合成 peptide의 免疫原性を 확인하기 위하여 peptide-carrier conjugate 및 合成 peptide를 家兎에 注射하여 免疫原性を 조사하였으며 아울러 FCA의 免疫原성에 대한 효과도 조사하였다. 즉 合成 peptide 100 $\mu$ g과 結合된 peptide의 양으로 100 $\mu$ g에 해당하는 각 peptide-carrier conjugate를 家兎에 接種한 후 30일에 抗體生成與否를 放射免疫 分析法으로 확인하였다. Carrier protein으로 rabbit albumin 및  $\gamma$ -globulin과 KLH를 사용한 군은 FCA의 사용여부에 관계없이 3마리 모두 anti-peptide抗體를 생성하였다. 반

Table 1. Immune Responses in Rabbits against Synthetic Peptide

| Carrier protein | Rabbit albumin | Rabbit $\gamma$ -globulin | Tetanus toxoid | Diphtheria toxoid | Keyhole Lim. hemocyanin | Free peptide |
|-----------------|----------------|---------------------------|----------------|-------------------|-------------------------|--------------|
| with FCA        | 3/3            | 3/3                       | 2/3            | 3/3               | 3/3                     | 1/3          |
| without FCA     | 3/3            | 3/3                       | 1/3            | 2/3               | 3/3                     | 1/3          |

Responded/Immunized

Table 2. Immunizing Dose 50% of Peptide-Carrier Conjugate

| Carrier protein       | Rabbit albumin | Rabbit $\gamma$ -globulin | Tetanus toxoid | Diphtheria toxoid | Keyhole Lim. hemocyanin | Free peptide   |
|-----------------------|----------------|---------------------------|----------------|-------------------|-------------------------|----------------|
| ID <sub>50</sub> (ug) | 5.47           | 6.00                      | 65.16          | 13.03             | 31.25                   | not accessible |

면에서 tetanus 및 diphtheria toxoid에 FCA와 함께 接種한 군은 각각 2 및 3마리가 抗體를 생성하였으며 FCA를 사용하지 않은 군은 각각 1 및 2마리가 抗體를 생성하였다. 合成 peptide만을 家兎에 接種한 군은 FCA의 사용여부에 관계없이 각 1마리씩 抗體를 생성하였다(Table 1). 또 FCA를 사용한 군에서 사용하지 않은 군보다 높은 ratio unit(specimen cpm/negative mean cpm)를 보였다.

**合成 Peptide의 免疫量:** 각 peptide-carrier conjugate

와 合成 peptide만의 50% 免疫量を 家兎에서 측정하였다. 즉 合成 peptide의 50% 免疫량을 측정하기 위하여 結合된 peptide의 양으로 2,000 $\mu$ g/0.5ml에 해당하는 peptide-carrier conjugate 및 合成 peptide를 4배 단계 희석하여 실험하였다. 각 희석액 0.5ml를 10마리씩의 BALB/c 마우스에 接種한 후 28일에 放射免疫 分析法으로 抗體生成與否를 조사하고 50% 免疫량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. Carrier protein으로 家兎 albumin 및  $\gamma$ -globulin, tetanus 및 diphtheria

**Table 3.** Current Results of Immunizations with HBsAg Peptide Vaccines

| Author                      | Sequence | Carrier               | Animals Immunized | Responders | Reference |
|-----------------------------|----------|-----------------------|-------------------|------------|-----------|
| Lerner et al. (1981)        | 140~148  | KLH                   | 2 rabbits         | 2          | 39        |
| Dreesman et al. (1982)      | 117~137  | none                  | 48 mice           | 23         | 16, 31    |
| Hopp et al. (1981)          | 138~149  | KLH                   | 6 mice            | 3          | 33~35     |
| Machida et al. (1982)       | 144~155  | ovalbumin             | 5 mice            | 5          | 40        |
| Vyas et al. (1982)          | 139~147  | KLH, TT               | 7 rabbits         | 2          | 9, 65     |
| Gerin(1983)                 | 110~137  | KLH                   | 3 chimps          | 3          | 66        |
| Neurath et al. (1984) pre-S | 120~145  | liposome              | rabbits           | all        | 50        |
| Present work                | 139~147  | RA, RG, TT<br>DT, KLH | 36 rabbits        | 28         |           |

KLH: keyhole limpet hemocyanin, TT; tetanus toxoid, DT; diphtheria toxoid,  
RA: rabbit albumin, RG; rabbit  $\gamma$ -globulin

toxoid와 KLH를 사용한 peptide-carrier conjugate의 50% 免疫量은 각 5.47, 6.00, 65.16, 13.03 및 31.03  $\mu$ g/dose이었다. 반면에 合成 peptide만을 接種한 것의 50% 免疫量은 抗體生成이 극히 미미하여 본 실험에서 接種한 양으로는 계산할 수 없었다.

### 考 察

B型 肝炎 virus는 최근 *Hepadna viridae*로 분류되었다.<sup>10,42</sup> HBV는 사람에서 慢性 肝炎을 일으키고 肝癌을 유발시킬 수 있기 때문에 중요시 하고 있다.<sup>8,18,43,52,54,55,60</sup> HBV는 자연계에서 사람에게만 感染하고 실험적으로는 극소수 종의 靈長類(chimpanzee 등)에 感染한다. B型 肝炎 백신은 慢性 HBV 보유자의 血漿에서 精製한 HBsAg로 만든다. 그러나 이 HBsAg를 함유하는 血漿은 많이 얻을 수 없고 高價이므로 免疫原을 遺傳工學 技法으로 생산하려는 연구가 이루어지고 있으나 이에 관한 성과는 아직 만족스럽지 못하다. 최근에 遺傳子工學 技法으로 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 免疫性이 있는 HBsAg를 생산하게 되었으나 역시 收率이 낮아서 현재로서는 백신의 원료로 사용하기에는 적당치 않은 것으로 알려져 있다.

한편 HBV의 合成 백신 개발이 시도되었다.<sup>27,37,56-58</sup> 合成 HB vaccine에 관한 연구는 HBsAg의 아미노산 配列에서 免疫原性이 있는 決定基에 해당하는 peptide를 合成하고 이용하는데 있다. Peptide의 合成은 주로 Merrifield<sup>46</sup>가 개발한 solid-phase法에 따라 不溶性 樹脂를 이용하고 있다. Merrifield법<sup>46</sup>에서는 合成하려는 peptide의 C-말단 COOH基를 polystyrene에 結合시킬 다음 N-말단의 방향으로 Boc基로  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>基가 보호된 아미노산을 1개씩 순차적으로 結合시키는

것으로 오늘날의 solid phase법으로는 아미노산수로 보아 20개 내외로 구성되는 peptide를 合成할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 Merrifield의 solid phase peptide 合成法<sup>46</sup>을 적용하였다.

Vyas 등<sup>65,67</sup>은 HBsAg의 nucleotide配列에서 얻어진 아미노산 配列로부터 類推한 2차 구조와 抗原性에 있어서의 Lys의 중요성을 고려하여 7종의 peptide(122~137, 128~134, 139~147, 139~158, 140~158, 145~158 및 150~158)를 合成하였다. 이 peptide가 HBsAg의 "a" 決定基 特異한 사람의 anti-HBs抗體를 中和시키는가를 보아 peptide의 抗原性을 확인하였으며 이것을 다시 KLH에 結合시킨 후, FCA와 乳화하고 家兔에 接種하여 免疫原性을 확인하였다. 이 실험에서 3종의 peptide(139~147, 139~158 및 140~158)가 抗原性은 물론이고 免疫原性이 있음을 보고하였다. 이 家兔 抗血清은 natural HBsAg의 "a" 抗原 決定基를 갖고 있는 모든 血清型의 HBsAg에 의하여 特異적으로 反應함을 보고하였다. 따라서 아미노산 殘基 139~147에 해당하는 peptide가 HBsAg의 "a" 抗原 決定基의 전부이거나 필수 부분이라는 것을 시사하였다.

Hopp<sup>34</sup>는 HBsAg의 아미노산 殘基 138~149의 peptide를 合成하고 이를 conjugation agent인 glutaraldehyde를 이용하여 KLN에 結合시켜 24%의 結合收率을 얻었다. Neurath 등<sup>49</sup>은 135~155의 peptide를 合成하고, N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate(S-PDP)를 사용하여 KLH, bovine serum albumin 및 limulus polyphemus hemocyanin(LPH)에 結合시켜 20~30%의 結合收率을 얻었다. Bhatnagar 등<sup>9</sup>은 4-hydroxy-3-nitrobenzene sulfonic acid로 만든 水溶性의 活性 ester를 이용하여 HBsAg의 peptide 139~147을

KLH에 결합시켜 8~10%의 결합收率을 얻었다. 본 실험에서는 HBsAg의 peptide 139~147을 MBS를 사용하여 각종 carrier protein에 결합시켜 8~16%의 결합收率을 얻었다(8.3% 家兔 albumin, 9.5% 家兔  $\gamma$ -globulin, 15.8% tetanus toxoid, 13.5% diphtheria toxoid 및 11.2% KLH). 이와 같은 성적은 Hopp<sup>34)</sup>의 결합收率(24%)이나 Neurath 등<sup>49)</sup>의 것(20~30%) 보다는 낮으나 Bhatnagar 등<sup>9)</sup>의 것(8~10%) 보다는 높은 결합收率이라고 믿어진다.

Bhatnagar 등<sup>9)</sup>은 HBsAg의 peptide 139~147을 합성하고 이를 KLH에 결합시켜 FCA와 함께 家兔에 接種하여 anti-peptide抗血清을 얻었다. 이 抗血清으로 autologous peptide와 natural HBsAg의 anti-peptide抗血清에 대한 anti-HBs의 活性抑制를 측정하여 合成 peptide의 抗原性を 확인하였다. Bhatnagar 등<sup>9)</sup>의 실험에서 autologous peptide는 약 400 $\mu$ g/ml에서 그리고 natural HBsAg는 약 0.2 $\mu$ g/ml에서 50% inhibition을 나타내었다. 따라서 natural HBsAg가 合成 peptide 보다 약 2,000배의 강한 抗原性を 보였다.

본 실험에서는 合成 peptide의 抗原性を 확인하기 위하여 <sup>125</sup>I-HBsAg를 이용하여 競争 放射免疫 分析法을 실시하였다. 그림 1에서 보는 바와 같이 合成 peptide는 약 90 $\mu$ g/ml에서 50% inhibition이 확인되어 抗原성이 있음을 확인하였다. 그러나 본 실험과 Bhatnagar 등<sup>9)</sup>의 실험 방법이 서로 다르기 때문에 natural HBsAg와 合成 peptide의 抗原성의 비교는 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

여러 연구자들에 의하여 HBsAg의 構成 peptide가 부분적으로 合意되어 이의 免疫성이 시험된 바 있다. 즉 Table 3에서 보는 바와 같이 Lerner 등<sup>40)</sup>은 140~148의 peptide를 合成하여 KLH에 Hopp 등<sup>33-35)</sup>은 138~149의 peptide를 合成하여 KLH 및 palmitic acid에, Machida 등<sup>40)</sup>은 144~155의 peptide를 HBsAg 蛋白質에서 分離하여 ovalbumin에 그리고 Gerin 등<sup>26)</sup>은 110~139의 peptide를 合成하여 KLH에 결합시킨 후 家兔, 마우스 또는 chimpanzee에서 免疫原性を 조사하였다. Dreesman 등<sup>16,17)</sup>은 117~137의 peptide를 合成하여 이를 마우스에 FCA, alum 및 liposome 등과 함께 接種하여 免疫原性を 조사하였다. Neurath 등<sup>50)</sup>은 HBsAg 遺傳子가 아닌 pre-S遺傳子의 아미노산 殘基에서 120~145인 合成 peptide를 liposome과 결합시켜 이의 免疫原性を 家兔에서 조사하여 이 抗體는 診斷目的에 이용할 수 있다고 하였다.

본 실험에서는 HBsAg의 아미노산 殘基 139~147의 peptide를 合成하고 이를 家兔 albumin 및  $\gamma$ -globulin,

tetanus 및 diphtheria toxoid와 KLH에 각각 결합시킨 것과 carrier와 결합시키지 않은 合成 peptide만을 만들었다. 이것을 FCA를 사용한 군과 사용하지 않은 군으로 나누어 家兔에서 免疫原性を 조사하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 거의 대부분의 군에서 3마리 모두가 抗體를 형성하였으며 특히 free peptide군에서 FCA의 처리와 관계없이 1마리씩이 anti-peptide抗體를 생성하였다. 이는 Dreesman 등<sup>15,16)</sup>의 실험에서 아미노산 殘基 117~137, peptide가 carrier에 결합시키지 않아도 마우스에서 anti-peptide抗體를 형성하였다는 보고와 일치하는 것으로 haptens의 免疫原성에 대한 검토가 있어야 할 것으로 사료된다.

본 실험에서는 monomeric peptide를 사용하였으나 Vyas 등<sup>65)</sup>은 dimeric peptide를 사용한 것 외에는 같은 아미노산 殘基의 合成 peptide를 사용하여 같은 정도의 anti-peptide抗體를 생성하였다. 그러나 monomer 및 dimer형의 peptide에 대한 免疫原성의 차이에 대한 연구도 더 필요한 것으로 생각된다.

많은 연구자들은 家兔 마우스 또는 chimpanzee 등의 실험동물을 사용하여 대부분의 경우 合成 peptide를 KLH 및 tetanus toxoid 등의 heterologous protein을 carrier로 사용하여 免疫原性を 조사하였다. 그러나 carrier protein의 유래가 免疫動物과 homologous하지 않으면 이것이 免疫原으로 작용하여 anti-carrier protein抗體가 생성되고 다시 追加接種을 하면 체내에서 peptide-carrier protein conjugate와 anticarrier protein抗體가 結合물을 형성하여 신속하게 제거되기 때문에 免疫原의 효과가 저하될 가능성이 있다.<sup>22)</sup> 따라서 본 실험에서는 家兔를 免疫動物로 사용하고 carrier protein으로 家兔 albumin과  $\gamma$ -globulin를 사용한 결과 anti-peptide抗體 생성 효과가 좋았다. 이에 관하여는 앞으로 더 많은 연구가 필요하겠지만 homologous protein을 carrier protein으로 사용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

合成 peptide의 50% 免疫량을 마우스에서 측정하였다. Table 5에서와 같이 合成 peptide를 家兔 albumin 및  $\gamma$ -globulin, tetanus 및 diphtheria toxoid와 KLH에 결합시킨 것의 50% 免疫량은 각각 5.47, 6.00, 65.16, 13.03 및 31.25 $\mu$ g/dose였다. 家兔를 사용한 실험에서와 같이 家兔 albumin 및  $\gamma$ -globulin에 결합된 合成 peptide의 50% 免疫량이 다른 carrier protein 보다 좋은 免疫效果를 보였다.

백신의 免疫原성을 높이는 데 사용하는 adjuvant는 거의 모든 백신 생산에 있어 충분히 검토하여야 한다. 특히 合成 peptide vaccine은 대체로 水溶性으로 免疫

原性이 낮아서 adjuvant의 역할이 더욱 중요하다. 실험동물을 이용한 實驗的 免疫形成에서는 water-in-oil emulsion을 만드는 Freund's complete adjuvant와 Freund's incomplete adjuvant가 흔히 사용되고 있다. 이 adjuvant는 높고 지속적인 免疫을 유도하나 接種部位에의 炎症과 granuloma 형성 및 發熱을 유발하므로 사람에는 사용하지 못한다. 그러므로 이와같은 mineral oil 대신에 接種部位에서 代謝作用에 의하여 서서히 제거되고 동시에 용이하게 代謝될 수 있는 물질이나 뒤에 완전히 제거될 수 있는 물질을 adjuvant로 사용하기 위한 연구가 계속되고 있다.<sup>3)</sup>

Freund's complete adjuvant에 흔히 사용하는 mycobacteria를 대신할 수 있는 것으로 Mycobacterium의 細胞壁에서 추출한 polysaccharide peptidylglycans<sup>19)</sup> 및 이것의 최소 구조성분인 N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine(muramyl dipeptide; MDP)의 adjuvanticity에 관한 연구가 많이 진행되고 있다.<sup>2,3,13,14,19,40)</sup> 그밖에 合成 lipoidal amine인 CP 20,961(N, N-dioctadecyl-N'N'-bis-2(hydroxyethyl-propanediamine)) 그리고 liposome 등이 알려져 있고 이와같은 adjuvant를 이용하는 일이 연구되어야겠다.<sup>1,3,51,64)</sup>

合成 peptide 백신의 중요성은 첫째로 수종의 peptide를 같은 carrier에 結合시킬 수 있어 multivalent synthetic vaccine을 개발할 수 있다. 둘째로 合成 백신은 필수적인 免疫原만 갖고 있고 불필요한 성분이 없기 때문에 백신에 의한 副作用을 감소할 수 있을 것이다. 셋째로 合成 peptide에 合成 adjuvant를 사용할 수 있게 되면, adjuvanticity를 갖고 있는 合成 peptide를 만들 수 있어 생산 및 投與가 용이하게 될 것이다.<sup>2,4)</sup> 이러한 중요성에 앞서, 合成 peptide가 백신으로서의 기초를 확립할 수 있느냐에 관한 연구가 중요하다. 즉 合成 peptide에 의하여 얻어진 體液性 免疫이나 細胞性 免疫이 실제로 豫防效果가 있는나하는 것이다.

## 結 論

HBsAg의 主抗原인 "a" 抗原의 決定基라고 알려진 HBsAg 아미노산 殘基 139~147에 해당하는 peptide (H<sub>2</sub>N Cys-Thr-Lys-Pro-Thr-Asp-Gly-Asn-Aba COOH)를 合成한 후 그 抗原性和 免疫原性を 조사 연구하여 B型 肝炎 合成 peptide 백신을 개발하는데 필요한 다음과 같은 기본적인 사항을 얻었다.

1. 合成 peptide는 아미노산 분석 결과 理論値와 일치하였고, HPLC 및 mass spectrometry로 분석한 결

과 순수성이 증명되었다.

2. 合成 peptide의 免疫原性を 높이기 위하여 家兔 albumin, 家兔  $\gamma$ -globulin, tetanus toxoid, diphtheria toxoid 그리고 keyhole limpet hemocyanin에 結合시키는 실험에서 結合 收率은 각 8.3%, 9.5%, 15.8%, 13.5% 및 11.2%로서 tetanus toxoid의 경우 가장 좋았다.

3. 合成 peptide의 抗原性を 알아보기 위하여 <sup>125</sup>I-HBsAg를 이용한 競爭 放射免疫 分析試驗에서 合成 peptide의 50% inhibition의 양은 90 $\mu$ g/ml로서 그 抗原성이 인정되었다(natural HBsAg의 50% inhibition 양: 0.12 $\mu$ g/ml).

4. Peptide-carrier conjugate의 免疫량을 마우스에서 실험한 결과, 50% 免疫량은 合成 peptide-家兔 albumin 이 5.47 $\mu$ g/dose임을 비롯하여 家兔  $\gamma$ -globulin은 6.00 $\mu$ g/dose, tetanus toxoid는 65.16 $\mu$ g/dose, diphtheria toxoid는 31.25 $\mu$ g/dose 그리고 keyhole limpet hemocyanin은 13.03 $\mu$ g/dose로서 家兔 albumin과  $\gamma$ -globulin의 結合물이 좋은 免疫原性を 보였다(精製 natural HBsAg의 50% 免疫量: 0.65 $\mu$ g/dose).

## 參 考 文 獻

- Allison, A.C. and Gregoriadis, G.: Liposomes as immunological adjuvants. Nature(1974) 252: 252.
- Arnon, R., Sela, M., Parant, M. and Chedid, L.: Antiviral response elicited by a completely synthetic antigen with built-in adjuvanticity. Proc. Natl. Acad. Sci. (1980) 77(11): 6769-6772.
- Arnon, R., Shapira, M. and Jacob, C.O.: Synthetic vaccines. J. Immunol. Methods. (1983) 61: 261-273.
- Audibert, F., Jolivet, M., Chedid, L., Arnon, R. and Sela, M.: Successful immunization with a totally synthetic diphtheria vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1982) 79: 5042-5046.
- Baron, M.H. and Baltimore, D.: Antibodies against a synthetic peptide of the poliovirus replicase protein: Reaction with native, virus-encoded and inhibition of virus-specific polymerases activities in vitro. J. Virol. (1982) 43(3): 969-978.
- Baron, M.H. and Baltimore, D.: Antibodies

- against the chemically synthesized genome-linked protein of poliovirus react with native virus-specific proteins. *Cell*. (1982) 28: 395-404.
7. Beal, J.: Recombinant vaccinia for prevention of Hepatitis B. *Nature*. (1984) 311.
  8. Beasley, R.P., Hwang, L.-Y., Lin, C. C. and Chien, C.S.: Hepatocellular carcinoma and Hepatitis B virus. *Lancet*. (1981) 1129-1133.
  9. Bhatnagar, P.K., Papas, E., Blum, H.E., Milich, D.R., Nitecki, D., Karels, M.J. and Vyas, G.N.: Immune response to synthetic analogues of Hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1982) 79:4400-4404.
  10. Blum, H.E.C. and Vyas, G.N.: Interpreting serologic markers and patterns of immune response. *J. Med. Consul.* (1983)
  11. Brechot, C., Hadchouel, M., Scotto, J., Fonck, M., Potet, F., Vyas, G. and Tiollais, P.: State of Hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and-negative liver diseases. *Proc. Natl Acad, Sci. USA.* (1981) 78(6): 3906-3910.
  12. C.D.C.: Inactivated Hepatitis B Virus Vaccine. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* (1982) 31(24).
  13. Chedid, L., Audibert, F., Lefrancier, P., Choay, J. and Lederer, E.: Modulation of the immune response by a synthetic adjuvant and analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1976) 73(7): 2472-2475.
  14. Chedid, L.A., Parant, M.A., Audidivert, F. M., Riveau, G.J., Parant, F.J., Lederer, E., Choay, J.P. and Lefrancier, P.I.: Biological activity of a new synthetic muramyl peptide adjuvant devoid of pyrogenicity. *Inf. Immu.* (1982) 35(2): 417-424.
  15. Dreesman, G.R., Chairez, R., Suarez, M., Hollinger, F.B., Courtney, R.J. and Melnick, J.L.: Production of antibody to individual polypeptides derived from purified Hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* (1975) 16: 508-515.
  16. Dreesman, G.R., Sanchez, Y., Ionescu-Matiu, I., Sparrow, J.T., Six, H.R., Peterson, D.L., Hollinger, F.B. and Melnik, J.L.: Antibody to Hepatitis B surface antigen after a single inoculation of uncoupled synthetic HBsAg peptides. *Nature*. (1982) 295:158-160.
  17. Edman, J.C., Hallewell, R.A., Valenzuela, P., Goodman, H.M. and Rutter, W.J.: Synthesis of Hepatitis B surface and core antigen in *E. coli*. *Nature*. (1981) 291:503-506.
  18. Figue, A., Blum, H.E, Vyas, G.N., Virgilis, S.D., Cao, A., Lippi, M., Lai, E. and Bales-trieri, A.: Hepatitis B viral nucleotide sequences in non-A, non-B or Hepatitis B virus-related chronic liver disease. *Hepatology*. (1984) 4(3):364-368.
  19. Fleck, J., Mock, M., Tytgat, F., Nauciel, C. and Minck, R.: Adjuvant activity in delayed hypersensitivity of the peptidic part of bacterial peptidoglycans. *Nature*. (1974) 250:517-518.
  20. Fuchs, S., Maos, A. and Sela, M.: The ordered polymer(Pro-Gly-Pro)<sub>n</sub> an immunological model for collagen. *Isr. J. Chem.* (1974) 12:681-696.
  21. Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. and Charnay, P.: Nucleotide sequence of the Hepatitis B virus genome(subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*. (1979) 281:646-650.
  22. Gerin, J.L., Alexander, H., Shih, J.W.-K., Purcell, R.H., Dapolito, G., Engle, R., Green, N., Sutcliffe, J.G., Shinnick, T.M. and Lerner R.A.: Chemically synthesized peptides of Hepatitis B surface antigen duplicate the d/y specificities and induce subtype-specific antibodies in chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1983) 80: 2365-2369.
  23. Gerin, J.L., Ford, C.F. and Purcell, R.H.: Biochemical characterization of Australia antigen. *Amer. J. Patol.* (1975) 81(3):651-662.
  24. Gerin, J.L., Holland, P.V. and Purcell, R.H.: Australian antigen: Large-scale purification from human serum and biochemical studies of its protein. *J. Virol.* (1971) 7(5):569-576.
  25. Gerin, J.L., Lerner, R.A. and Purcell, R.H.: Alternative sources of Hepatitis B vaccine. *Develop. biot. Standard.* (1983) 54: 135-137.
  26. Gerin, J.L. and Purcell, R.H.: New approaches to hepatitis B vaccine. in: *Viral hepatitis and*



- delta infection, eds. Verme, G., Bonino, F. and Rizzetto, M. (Alan R. Liss, Inc). (1983) 369-377.
27. Gold, J.W.M., Shih, J.W.-K., Purcell, R.H. and Gerin, J.I.: Characterization of antibodies to the structural polypeptides of HBsAg: Evidence for subtype-specific determinants. *J. Immunol.* (1976) 117(4):1404-1406.
  28. Goodfriend, T.L., Levine, L. and Fasman, G. D.: Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. *Science*. (1964) 144:1344-1346.
  29. Habeeb, A.F.S.A. and Atassi, M.Z.: Enzymic and immunochemical properties of lysozyme. Evaluation of several amino group reversible blocking reagents. *Biochem.* (1970) 9(25): 4939-4944.
  30. Hamilton, J.D.: Hepatitis B virus vaccine. an analysis of its potential use in medical workers. *J. A. M. A.* (1983) 250(16):2145-2150.
  31. Hollinger, F.B., Dreesman, G.R., Sparrow, J. and Melnick, J.L.: Synthetic peptide vaccine for Hepatitis B. *Develop. biol. Standard.* (1983) 54:113-116.
  32. Hollinger, F.B. Adam, E., Heiberg, D. and Melnick, J.L.: Reponse to hepatitis B vaccine in a young adult population. in: *Viral Hepatitis 1981 International Symposium*, eds. Szmuness, W., Alter, H.J. and Maynard, J. and Maynard, J.E. (The Franklin Institute Press) (1981) 451-466.
  33. Hopp, T.P.: A synthetic peptide with Hepatitis B surface antigen reactivity. *Molecul. Immunol.* 18(9):869-872.
  34. Hopp, T.P.: Immunogenicity of a synthetic HB sAg peptide enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. *Molecul. Immunol.* (1984) 21 (1):13-16.
  35. Hopp, T.P. and Wood, K.R.: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1981) 78(6):3824-3828.
  36. Howard, C.R., Skelly, J., Tsiquaye, K.N., Zuckerman, A.J., Tabor, E., Gerety, R.J. and Kremastinou, T.: The development and properties of alternative hepatitis B polypeptide vaccine. in: *Viral Hepatitis 1981 International Symposium*, eds. Szmuness, W., Alter, H.J. and Maynard J.E. (The Franklin Institute Press). (1981) 411-423.
  37. Kamber, B., Hartmann, A., Eisler, K., Rinikre, B., Rink, H., Sieber, P. and Rittel, W.: The synthesis of cystein peptides by iodine oxidation of S-Trityl-cysteine and S-Acetamidomethyl-cysteine peptides. *Helvetica Chimica Acta.* (1980) 63:899-915.
  38. Langbeheim, H., Arnon, R. and Sela, M.: Antiviral effect on MS-2 coliphage obtained with a synthetic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1976) 73(12):4636-4640.
  39. Lerner, R.A., Green, N., Alexander, H., Liu, F.-T., Sutcliffe, J.G. and Shinnick, T.M.: Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the Hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1981) 78(6):3403-3407.
  40. Machida, At., Kishimoto, S., Ohnuma, H., Miyamoto, H., Baba, K., Oda, K., Nakamura, T., Funatsu, G., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.: A glycopeptide containing 15 amino acid residues derived from Hepatitis B surface antigen particles: Demonstration of immunogenicity to raise anti-HBs in mice. *Mole. Immunol.* (1982) 19(9):1087-1093.
  41. Mackay, P., Pasek, M., Magazin, M., Kovacic, R.T., Allet, B., Stahl, S., Gilbert, W., Schaller, H., Bruce, S.A. and Murray, K.: Production of immunologically active antigens of hepatitis B virus by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1981) 78(7):4510-4514.
  42. Mandart, E., Kay, A. and Galibert, F.: Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: Comparison with woodchuck and human Hepatitis B virus sequences. I. *Virology*. (1984) 49(3):782-792.
  43. McDonald, M.I., Hamilton, J.D. and Durack, D.T.: Hepatitis B surface antigen could harbour the infective agent of AIDS. *Lancet*, (1983) 882-884.

44. Melnick, J.L.: Historical aspects of hepatitis B vaccine. in: INSERM symposium No.18, eds. Maupas, P. and Guesry, P. (Elsevier/North Holland). (1981) 23-31.
45. Melnick, J.L., Dreesman, G.R. and Hollinger, F.B.: Approaching the control of viral hepatitis type B. *J. Inf. Dis.* (1976) 133(2):210-229.
46. Merrifield, R.B.: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Amer. Chem. Soc.* (1963) 85:2149-2153.
47. Moss, B., Smith, G.L., Gerin, J.L. and Purcell, R.H.: Live recombinant vaccinia. Virus protects chimpanzees against Hepatitis B. *Nature.* (1984) 311:67-69.
48. Mozes, E., Sela, M. and Chedid, L.: Efficient genetically controlled formation of antibody to a synthetic antigen (poly(LTyr, LGlu)-poly(DLAla)-poly(LLys)) covalently bound to a synthetic adjuvant(N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine). *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1980) 77(8):4933-4937.
49. Neurath, A.R., Kent, S.B. and Strick, N.: Specification of antibodies elicited by a synthetic peptide having a sequence in common with a fragment of a virus protein The Hepatitis B surface antigen. *Develop. Biol. Standard.* (1983) 54:103-112.
50. Neurath, A.R., Kent, S.B. and Strick, N.: Location and chemical synthesis of a pre-S gene coded immunodominant epitope of Hepatitis B virus. *Science.* (1984) 224:392-396.
51. Neurath, A.R., Kent, S.B.H. and Strick, N.: Antibodies to Hepatitis B surface antigen (HBsAg) elicited by immunization with a synthetic peptide covalently linked to liposomes. *J. gen. Virol.* (1984) 65:1009-1014.
52. Nielsen, J.O., Dietrichson, O., Elling, P. and Christoffersen, P.: Incidence and meaning of persistence of Australia antigen in patients with acute viral hepatitis: Development of chronic hepatitis. *N.E.J. Med.* (1971) 285(21):1157-1159.
53. Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zinc, B., Schaller, H., Mackay, P., Leadbetter, G. and Murray, K.: Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature.* (1979) 282:575-579.
54. Scullad, G.H., Greenberg, H.B., Smith, J.L., Gregory, P.B., Marigan, T.O. and Robinson, W.S.: Antiviral treatment of chronic Hepatitis B virus infection: Infectious virus cannot be detected in patient serum after permanent responses to treatment. *Hepatology.* (1982) 2(1):39-49.
55. Sherlock, S.: Predicting progression of acute type-B hepatitis to chronicity. *Lancet* (1976) 354-356, August. 14.
56. Shih, J.W.-K. and Gerin, J.L.: Immunochemistry of Hepatitis B surface antigen (HBsAg): Preparation and characterization of antibodies to the constituent polypeptides. *J. Immunol.* (1975) 115(3):934-639.
57. Shin, J.W.K. and Gerin, J.L.: Proteins of Hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* (1977) 21(1):347-357.
58. Shih, J.W. K., Gerety, R.J., Liu, D.T. K., Yajima, H., Fujii, N., Nomizu, M., Hayashi, Y. and Katakura, H.: Immunogenicity of the uncojugated synthetic polypeptides of Hepatitis-B surface antigen. in: *Modern Approaches to Vaccines Molecular and Chemical Basis of Virus Virulence and Immunogenicity*, eds. Chanock, R.M. and Lerner, R.A. (CSH Cold Spring Harbor Lab). (1984) 127-132.
59. Sutcliffe, J.C., Shinnick, T.M., Green, N., Liu, F. T., Niman, H.L. and Lerner, R.A.: Chemical synthesis of a polypeptide predicted from nucleotide sequence allows detection of a new retroviral gene product. *Nature.* (1980) 287: 801-805.
60. Szmuness, W., Steven, C.E., Harley, E.J., Zang, E.A., Oleszko, W.R., William, D.C., Sadovsky, R., Morrison, J.M. and Kellner, A.: Hepatitis B vaccine. *N.E.J. Med.* (1980) 303(15):833-841.
61. Tyrrell, D.A.J.: Vaccination against influenza A. *Bri. Med. Bulletin.* (1979) 35(1):77-85.
62. Valenzuela, P., Medina, A. and Rutter, W.J.: Synthesis and assembly of Hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature.* (1982) 298:347-350.
63. Vnek, J.: personal communication.

64. Vogelstein, B., Dintzis, R.Z. and Dintzis, H. M. : Specific cellular stimulation in the primary immune response: A quantized model. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A(1982)79:395-399.
65. Vyas, G.N., Bhatnagar, P.K., Expose, J. and Heldebrandt, C.M. : Appraisal and prospects of a mimetic synthetic peptide coupled with tetanus toxoid for b bifunctional vaccine against hepatitis B virus infection. Develop. biol. Standard. (1983) 54:93-102.
66. Vyas, G.N. and Blum, H.E. : Hepatitis B virus infection. WestJ. Med. (1984) 140:754-762.
67. Vyas, G.N. : Molecular immunology of the hepatitis B vaccine (HBsAg). in: INSERM symposium No.18, eds. Maupas, P and Guesry. (1981) P. (Elsevier/North Holland). 227-237.
68. Walter, G., Scheidtmann, K.H., Carbone, A., Laudano, A.P. and Doolittle, R.F. : Antibodies specific for the carboxy and amino terminal regions of simian virus 40 large tumor antigen. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. (1980) 77(9): 5197-5200.
-