



УДК 577.112.083.3

© 1991 г.

*Б. Б. Иванов, Е. А. Мецержкова, Т. М. Андропова,  
В. Т. Иванов*

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЕЙ  
И АДЬЮВАНТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ  
СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ИЗ *CS*-БЕЛКА  
*PLASMODIUM FALCIPARUM***

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

С целью повышения иммуногенности пептида  $(\text{NANP})_3$  синтезирована серия конъюгатов пептида с белком КЛН и синтетическими носителями: сополимером малеинового ангидрида с винилпирролидоном (MAVP), разветвленным поли-*D,L*-аланил-полилизинном (pAL), политафтсином  $(\text{RTKP})_n$ . Тестирование способности конъюгатов индуцировать анти- $(\text{NANP})_n$ -антитела проводили на линейных мышах, отвечающих на пептидный полимер  $(\text{NANP})_{40}$  без носителя (С57В1/6), и не отвечающих на этот антиген (BALB/C). Конъюгаты на основе политафтсина с ковалентно связанным гликопептидным адьювантом GMDP индуцировали более высокие титры антител, чем конъюгат пептида с КЛН. Введение в состав конъюгатов Т-хелперного эпитопа или присоединение к N-концу пептида димера тафтсина приводило к получению иммуногенных конструкций.

Повышение иммуногенности антигенного материала, как правило, составляет отдельную задачу в каждом случае создания вакцинного препарата или получения гипериммунной сыворотки. Особенно остро стоит эта задача для пептидных антигенов, которые являются основой вакцин нового поколения. В большинстве случаев свободные короткие пептиды (до 20 аминокислотных остатков) не способны индуцировать образование антител. Ковалентное связывание таких пептидов с крупными белками приводит к развитию полноценного иммунного ответа на конъюгат белок—пептид. В качестве белков-носителей чаще всего используются КЛН, BSA, ТТ. В этом ряду КЛН рассматривается как наиболее иммуногенный носитель. Однако природные белки имеют ряд недостатков для их применения в качестве носителей в синтетических вакцинах. Иммунизация большим белком вызывает образование значительного количества антител, направленных против самого белка. Препараты на основе белков негомогенны и обладают неоптимальными физико-химическими характеристиками. Кроме того, было показано, что повторная иммунизация другой вакциной на основе того же белка-носителя может вызывать супрессию к гаттению [1—4].

Все попытки исключения природных белков из состава вакцин можно разделить на два основных направления. Первое — это повышение иммуногенности пептидов за счет антигенспецифической активации Т-лимфо-

---

Принятые сокращения: NANP, RTKP, TKPR — тетрапептиды в однобуквенном коде, Аспт — ацетиламидометил, BSA — бычий сывороточный альбумин, DIEA — диизопропилэтиламин, GMDP — N-ацетилглюкозаминил-( $\beta 1 \rightarrow 4$ )-N-ацетилмурамоил-аланил-*D*-изоглутамин, ELISA — твердофазный иммуноферментный анализ, FAB — бомбардировка ускоренными атомами, Fm — 9-флуоренилметанол, HOBT — 1-гидроксбензотриазол, КЛН — гемоцианин улитки, MAVP — сополимер малеинового ангидрида и винилпирролидона, MCS — оксисукцинимидный эфир 6-(*N*-малеимид)-аминокапроновой кислоты, MHC — главный комплекс гистосовместимости, PBS — фосфатный буфер, Pfr — пентафторфенил, pAL — поли-*D,L*-аланил-полилизин, TEA — триэтиламин, TFA — трифторуксусная кислота, НАФ и ПАФ — неполный и полный адьювант Фрейнда, ТТ — столбнячный анатоксин.

цитов, т. е. включение Т-клеточной «помощи» и создание Т-клеточной памяти с помощью синтетических Т-эпитопов. Пептиды, одновременно содержащие Т- и В-клеточные эпитопы, являются полноценными иммуногенами без какого-либо носителя. Причем эпитопы могут или принадлежать одному белку [5], или быть заимствованы из разных белков, даже различных организмов [6, 7]. Применение этой стратегии ограничивается тем, что введение в состав вакцины одного (или нескольких) Т-эпитопов патогена может не обеспечить достаточно мощного ответа в генетически неоднородной популяции. Использование же дополнительных Т-клеточных эпитопов из чужеродных белков индуцирует Т-клеточную память, неадекватную патогену.

Второе направление подразумевает повышение иммуногенности за счет неспецифической активации антигенпредставляющих клеток с помощью адъювантов и иммуномодуляторов. К этому же направлению следует отнести применение пептидов в составе липосом, конъюгацию пептидов с жирными кислотами, а также использование в качестве носителей синтетических полимеров, обладающих собственной иммунной активностью. Так, полиэлектролитные носители — сополимеры винилпирролидона с малеиновым ангидридом или акриловой кислотой — играют роль адъюванта при иммунизации [8]. Недавно было описано успешное использование носителя, созданного на основе иммуноактивного тетрапептида — тафтсина [9].

Цель настоящей работы — дизайн полностью синтетических высокоиммунных конструкций на основе пептидного В-эпитопа. В данной статье сообщаются результаты наших исследований возможности повышения иммуногенности пептида с помощью синтетических носителей и иммуномодуляторов. В синтезированных конструкциях варьировались способы присоединения гаптена и адъюванта к носителям, а также их эпитопная плотность. При этом иммуногенность конструкций оценивалась по титру антител класса IgG после двукратной иммунизации, т. е. оценивался уровень вторичного гуморального ответа к антигену.

В качестве пептидного антигена был выбран додекапептид (NANP)<sub>3</sub> из центральной части CS-белка малярийного паразита *Plasmodium falciparum*, который вызывает наиболее опасную форму заболевания — тропическую малярию. Додекапептид (NANP)<sub>3</sub> представляет три тандемных тетрапептидных повтора и несет свойства В-эпитопа области повторов CS-белка. С (NANP)<sub>3</sub> связывают надежды на создание синтетической противомаларийной вакцины, однако вакцины на основе (NANP)<sub>3</sub> и белка-носителя ТТ, а также и рекомбинантная вакцина оказались недостаточно иммуногенны для создания протективного иммунитета в испытаниях на добровольцах [6, 10]. В натуральном CS-белке тетрапептид NANP представлен в виде 40 тандемных повторов, расположенных в центральной части белка [11]. Область повторов является иммунодоминантным В-эпитопом CS-белка, однако иммунный ответ к этому району МНС-ограничен. При иммунизации мышей полимером тетрапептида — (NANP)<sub>40</sub>, который более точно копирует тандемные повторы белка, только мыши H-2<sup>b</sup>-гаплотипа распознают в структуре (NANP)<sub>40</sub> Т-хелперный эпитоп и продуцируют анти-(NANP)-антитела [12].

В CS-белке рядом с областью повторов идентифицирован Т-хелперный эпитоп мышей H-2<sup>k</sup>-гаплотипа, расположенный в районе 323—349 [5]. Этот район, получивший обозначение TH2R, также стимулирует пролиферацию человеческих лимфоцитов, полученных от инфицированных доноров [13]. Был сконструирован антиген, содержащий ковалентно связанные пептид CSP-(326—343) (TH2R) и (NANP)<sub>6</sub>. Этот антиген вызывал образование анти-(NANP)-антител у мышей H-2<sup>k</sup>-гаплотипа, которые не отвечают на свободный (NANP)<sub>40</sub> [5]. Для исследования влияния TH2R на иммуногенность конъюгатов (NANP)<sub>3</sub> с синтетическими носителями мы синтезировали пептид CSP-(328—343) (O3c, см. ниже) из TH2R-региона.

Адъюванты, применяемые в настоящее время в клинической практике, например окись алюминия, недостаточно эффективно стимулируют иммунный ответ при вакцинации. Некоторые новые синтетические иммуно-

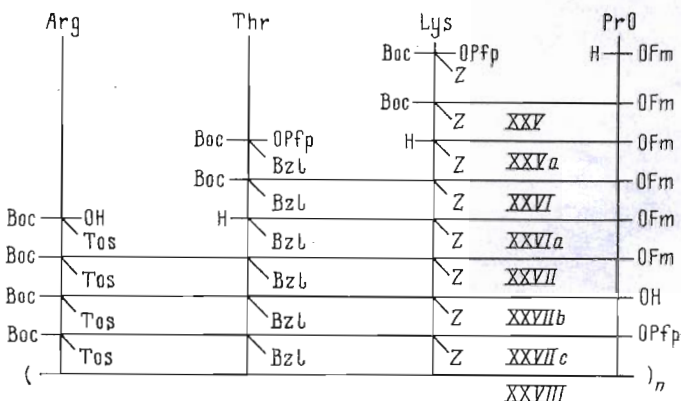
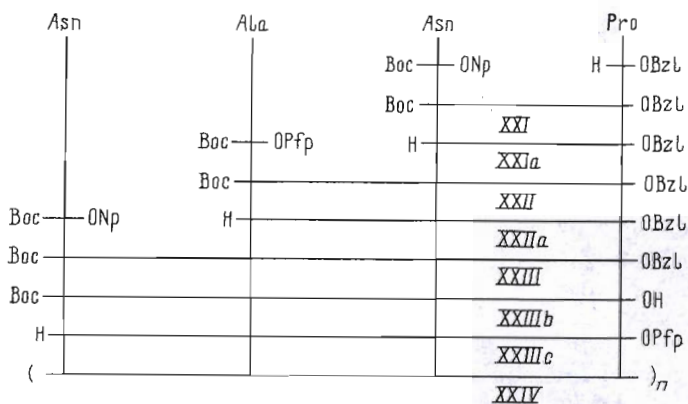


модуляторы более привлекательны как адъюванты для вакцин [14]. Синтетический гликопептидный адъювант GMDP (N-ацетилглюкозаминил)- $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -N-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамин) является хорошо изученным и перспективным объектом для практического применения [14]. Его структура позволяет синтезировать конструкции со встроеной адъювантностью.

В качестве носителей мы использовали MAVP (сополимер малеинового ангидрида и винилпирролидона) [15], политафтсин —  $(\text{RTKP})_{40}$  [10], pAL (поли-D,L-аланил-полилизин, разветвленный графт-полимер) [15]. Синтетические носители MAVP и pAL повышали иммуногенность пептидов в некоторых моделях. Например, конъюгаты синтетического пептида из гемагглютинина вируса гриппа с MAVP индуцировали первичный иммунный ответ [8]. Однако в наших исследованиях конъюгаты пептида 205—213 из VP<sub>1</sub> вируса ящера O<sub>1</sub>K с MAVP и pAL были неиммуногенными [15]. Политафтсин — tandemный полимер иммуноактивного тетрапептида тафтсина — ТКРР. Как известно, тафтсин обладает широким спектром иммуномодулирующего действия [16]. Ковалентное присоединение тафтсина к антигенам белковой природы приводило к усилению гуморального ответа на антиген [17].

Синтезированные конструкции и их характеристики представлены в табл. 1. Пептиды  $(\text{NANP})_3$  (I), Cys(Acm)- $\beta$ Ala-(NANP)<sub>3</sub> (T1c), Cys(Acm)- $\beta$ Ala-DKNI<sub>2</sub>EQILKKIKNSIST (O3c),  $(\text{TKPR})_2$  —  $(\text{NANP})_3$  (XVIII) (см. табл. 2) были синтезированы твердофазным методом, как описано в работе [18]. После отщепления от полимера и очистки пептиды были охарактеризованы аминокислотным анализом и масс-спектрометрией. Гомогенность пептидов подтверждалась ВЭЖХ.

Схема 1



Синтез пептидных полимеров  $(\text{NANP})_n$  и  $(\text{RTKP})_n$

## Состав конъюгатов пептидов с носителями

Конструкция	Номер соединения	Содержание в конъюгате, вес.% *		
		NANP	GMDP	носитель
(NANP) <sub>3</sub>	I	100	—	—
GMDP-(NANP) <sub>3</sub>	II	60	40	—
(NANP) <sub>40</sub>	III	100	—	—
[GMDP-Lys~(NANP) <sub>3</sub> ] <sub>n</sub>	IVa	99	1	—
	IVb	98	2	—
	IVc	97	3	—
[MAVP]~(NANP) <sub>3</sub>	V	6	—	94
[MAVP]~(NANP) <sub>3</sub> , GMDP GMDP-NHCH <sub>2</sub>	IV	7	6	87
[MAVP]~Cys-NHCH <sub>2</sub>   [MCS-(NANP) <sub>3</sub> ]	VII	7	4	89
KLH~(NANP) <sub>3</sub>   [KLH } MCS	XI	10	—	85
	XII	8	4	88
GMDP-Cys-βAla-(NANP) <sub>3</sub>				
KLH~Cys-MCS-(NANP) <sub>3</sub>	XIII	5	—	95
[RTKP] <sub>40</sub> ~MCS~T1c **	XIVa	14	—	86
	XIVb	50	—	50
[RTKP] <sub>40</sub>   MCS	XVa	3	1.5	95
GMDP-Cys-βAla-(NANP) <sub>3</sub>	XVb	28	12	60
[RTKP] <sub>40</sub> ~MCS~T1c   GMDP	XVI	9	7	84
(TKPR) <sub>2</sub> -(NANP) <sub>3</sub>	XVII	60	—	—
pAL~MCS~T1c	XVIII	9	—	91
pAL~MCS~O3c	XIX	—	—	—
pAL~MCS~T1c, O3c	XX	9	—	84

\* Определено аминокислотным анализом.

\*\* T1c — условное обозначение последовательности Cys(Acm)-βAla-(NANP)<sub>3</sub>, O3c—Cys(Acm)-βAla-DKHIEQILKKIKNSIST.

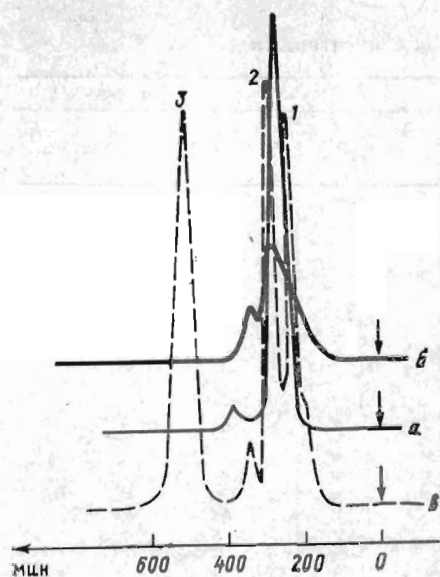
Таблица 2

## Фрагменты сз-белка, синтезированные твердофазным методом

Обозначение пептидов	Область	Последовательность *	Молекулярная масса ** [M + H] <sup>+</sup>
(I)	Повторы 328—344	NANPNANPNANP	1208
T1c		Cys(Acm)-βAla-NANPNANPNANP	1453
(XVII)		TKPRTKPRNANPNANPNANP	2173
O3c		Cys(Acm)-βAla-DKHIEQILKKIKNSIST	2290

\* Кроме β-аланина и S-ацетамидометилцистеина последовательность приведена в однобуквенном коде.

\*\* Получены методом FAB-масс-спектрометрии.



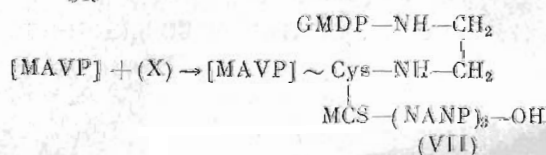
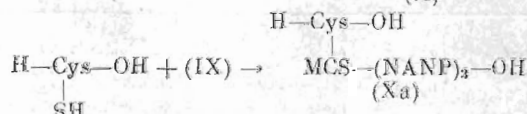
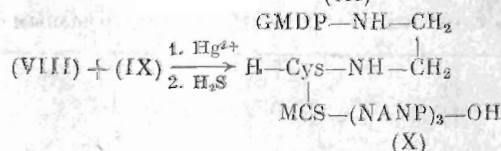
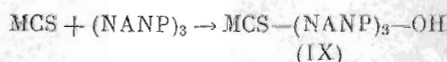
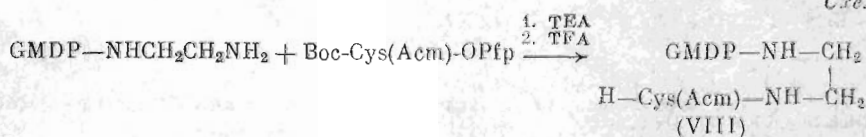
Гель-хроматография (NANP)<sub>30</sub> (а), (RTKP)<sub>40</sub> (б) и калибровочной смеси (с) (1 — BSA, 2 — цитохром с, 3 — глицилглицин) на колонке (25 × 800 мм) с HW-55f в 1% уксусной кислоте. Скорость элюции 1 мл/мин, скорость развертки 0,1 мм/мин, λ 226 нм

ных полимеров (III), (IV) и (RTKP)<sub>40</sub> оценивали по методу Марфи (см. «Экспериментальную часть»).

Низкомолекулярное соединение пептида и адьюванта (II) получили в растворе из пентафторфенилового эфира GMDP и свободного додекапептида.

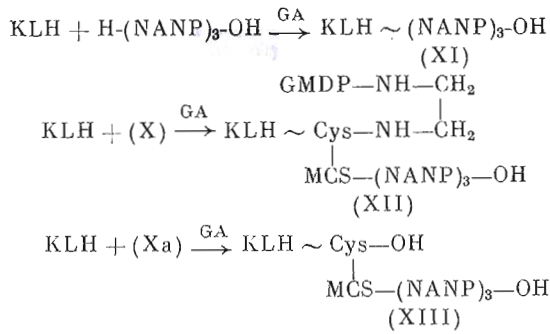
Конструкции на основе MAVP (V) — (VII) получали прямым взаимодействием ангидридных групп полимера с аминогруппами пептида и этилендиаминового производного GMDP [15]. Подробное описание конъюгации синтетических пептидов с MAVP или rAL описано в работе [15]. Для синтеза конструкции (VII), содержащей ковалентно связанные пептид и адьювант в эквимолярном соотношении, использовали трехфункциональный спейсер (X) на основе цистеина (схема 2).

Схема 2



Защищенные тетрапептиды Woc-AsnAlaAsnPro-OBzl и Woc-Arg(Tos)·Thr(Bzl)Lys(Z)Pro-OFm были получены в растворе (схема 1). После снятия С-концевых защитных групп пептиды превращали в соответствующие пентафторфениловые эфиры с помощью переэтерифицирующего реагента дипентафторфенилкарбоната. Пептидные полимеры (NANP)<sub>30</sub> и (RTKP)<sub>40</sub> получали поликонденсацией активированных эфиров тетрапептидов после снятия Woc-группы. Защитные группы политафтсина снимали жидким фтористым водородом. После обессоливания полученного полимерного материала степень полимеризации пептидных полимеров определяли с помощью гель-фильтрации на Toyopearl HW-55sf (рисунок). Для получения poly(NANP) (IV), содержащего включенный в цепь адьювант, проводили совместную поликонденсацию тетрапептида и лизинового аналога GMDP [19] с помощью дифенилфосфороилазида. Степень рацемизации пролиновых остатков в пептид-





GA — глутаровый альдегид

Конъюгаты на основе KLH (XI)—(XIII) были получены с помощью глутарового альдегида (схема 3). В этих конъюгатах варьировался тип связи пептида с белком. Если в соединении (XI) белок связывался с пептидом непосредственно через  $\alpha$ -аминогруппу N-концевого аспарагина, то в случае синтеза соединений (XII) и (XIII) пептид конъюгировали с белком через аминогруппу цистеина (схема 3) производных (X) и (Xa).

Схема 4

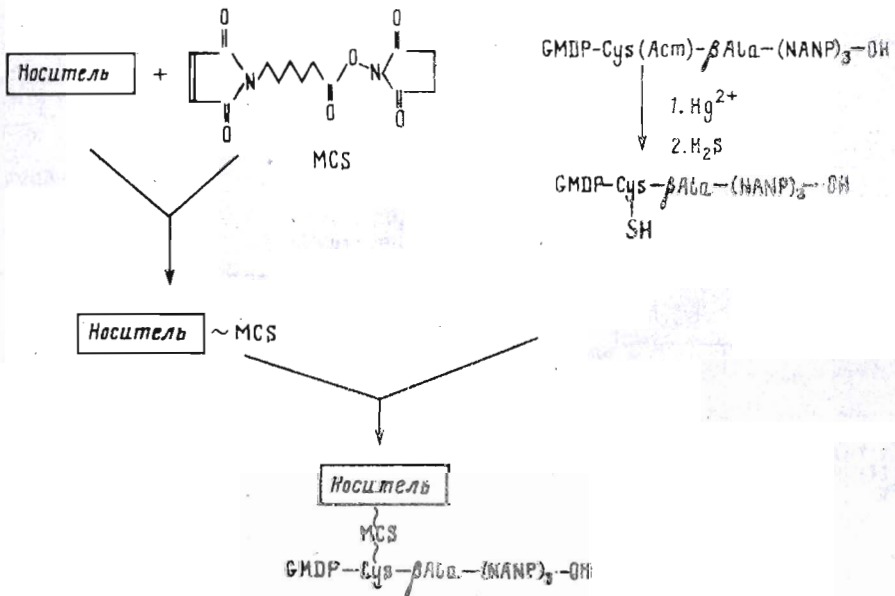


Схема 4 демонстрирует общий путь получения конъюгатов пептидов и адъювантов с аминоксодержащими носителями с помощью гетеробифункционального реагента MCS. Этот способ применялся для получения конъюгатов с полиафтаном (XIV)—(XVI) и pAL (XVIII)—(XX).

Как упоминалось выше, иммуногенность синтезированных конструкций оценивалась по их способности индуцировать гуморальный иммунный ответ после двукратной иммунизации. Титр анти-(NANP)-антител класса IgG определяли стандартным твердофазным иммуоферментным анализом (ELISA). В качестве тест-антигена мы использовали полимер (NANP)<sub>40</sub>. (NANP)<sub>40</sub> и конъюгат пептида (NANP)<sub>3</sub> с KLH (XI) рассматривали как стандарт иммуногенности для данной модели. В табл. 3—7 приведены значения титров анти-(NANP)<sub>40</sub>-антител в исследованных сыворотках.

В результате изучения серии этих конъюгатов мы показали, что в этой модели низкоиммуногенный полиэлектролитный носитель MAVP не повышает иммуногенность пептида (NANP)<sub>3</sub>. Включение адъюванта GMDP, изменение типа связи между пептидом и носителем не влияли на иммуногенность конструкций (V)—(VII). Титры анти-(NANP)<sub>40</sub>-антител не пре-

Таблица 3

## Титры антипептидных антител и условия иммунизации конструкций на основе MAVP \*

Антиген	Содержание, вес. %		Доза, мкг/мышь	Первая иммунизация	Вторая иммунизация		Титр анти-(NANP) <sub>3</sub> , Ig	
	NANP	GMDP			Адъювант	Антиген	Адъювант	C57B1/6
(V)	6	—	200	ПАФ	(V)	НАФ	<2,4	<2,4
(VI)	7	6	200	НАФ	(V)	»	<2,4	<2,4
(VII)	7	4	200	»	(V)	»	<2,4	<2,4

\* Условия иммунизации см. в «Экспер. части».

Таблица 4

## Титры антипептидных антител и условия иммунизации конструкций, содержащих T-хелперный эпитоп \*

Антиген	Содержание, вес. %		Первая иммунизация	Вторая иммунизация		Титр анти-(NANP) <sub>3</sub> , Ig		Титр анти-О3с, Ig	
	NANP	О3с		Адъювант	Антиген	Адъювант	C57B1/6	BALB/c	C57B1/6
(XVIII)	9	—	ПАФ	(XVIII)	НАФ	2,7	<2,4	<2,4	<2,4
(XIX)	—	10	»	(XIX)	»	<2,4	<2,4	2,8	2,7
(XX)	9	7	»	(XX)	»	3,8	<2,4	<2,4	2,4

\* Схему иммунизации см. в «Экспер. части».

Таблица 5

## Титры антипептидных антител и условия иммунизации конструкций, построенных без носителя \*

Антиген	Содержание, вес. %		Доза, мкг/мышь	Первая иммунизация	Вторая иммунизация		Титр анти-(NANP) <sub>3</sub> , Ig	
	NANP	GMDP			Адъювант	Антиген	Адъювант	C57B1/6
(I)	100	—	200	ПАФ	(I)	НАФ	<2,4	<2,4
(II)	60	40	100	НАФ	(I)	»	<2,4	<2,4
(III)	100	—	10	ПАФ	(III)	»	4,2	<2,4
			100	»	(III)	»	4,6	<2,4
			200	»	(III)	»	4,9	<2,4
			500	»	(III)	»	5,4	<2,4
			200	НАФ	(III)	»	4,3	<2,4
			200	—	(III)	—	3,0	<2,4
			20	НАФ	(III)	НАФ	4,5	<2,4
(IVa)	99	1	20	»	(III)	»	4,8	<2,4
(IVb)	98	2	20	»	(III)	»	5,1	<2,4
(IVc)	97	3	20	»	(III)	»	4,9	<2,4
			100	»	(III)	»	5,3	<2,4
			200	»	(III)	»	4,8	<2,4
			200	—	(III)	—	4,8	<2,4

\* Схему иммунизации см. в «Экспер. части».

вышли уровня контроля для всех исследованных конъюгатов пептида (NANP)<sub>3</sub> с MAVP (см. табл. 3). Полученные результаты подтверждают наши более ранние исследования с пептидным гаптенем из белка VP<sub>1</sub> вируса ящура [15], однако несколько противоречит работе [8], где было показано, что MAVP придает иммуногенность синтетическому пептиду из гемагглютинина вируса гриппа. Возможно, что адъювантные свойства MAVP антигензависимы и потому проявились с пептидом из гемагглютинина вируса гриппа, но не в случае пептида из VP<sub>1</sub> или (NANP)<sub>3</sub>. Кроме того, мы оценивали уровень вторичного иммунного ответа по титрам IgG,

а в работе [8] оценивалась сила первичного ответа по числу антителобразующих клеток, что может служить источником противоречия.

Неожиданные результаты были получены при изучении влияния Т-хелперного эпитопа ОЗс на титр анти-(NANP)-антител. В качестве носителя для «сборки» конструкций, одновременно или раздельно содержащих В-эпитоп (NANP)<sub>3</sub> и Т-хелперный эпитоп ОЗс, мы использовали низкоиммуногенный носитель рAL (см. табл. 4). Тем не менее конъюгат (XVIII) неиммуногенного (NANP)<sub>3</sub> с рAL индуцировал умеренный анти-(NANP)-ответ в мышцах Н-2<sup>b</sup>-гаплотипа, а конъюгат (XIX) — анти-(ОЗс)-ответ для мышей Н-2<sup>d</sup> и Н-2<sup>b</sup>. Использование конъюгата (XX), одновременно содержащего (NANP)<sub>3</sub> и ОЗс, приводило к существенному повышению ответа на (NANP)<sub>3</sub> для мышей Н-2<sup>b</sup> и в то же время к снижению ответа на ОЗс. При этом необходимо отметить, что ОЗс — укороченная на две аминокислоты часть района TH2R, который, как было показано в работе [5], не оказывает «помощи» в индукции иммунного ответа на (NANP)<sub>3</sub> для мышей Н-2<sup>b</sup>- и Н-2<sup>d</sup>-гаплотипов. Подобное явление возникновения иммунохимических функций пептидов при их укорачивании наблюдалось и ранее, например для пептида из R1-региона CSP, удлинение которого на шесть аминокислот с N-конца приводило к полному подавлению специфических для укороченного пептида функций [6]. Возможно, что аминокислотные остатки Pro<sup>326</sup> и Ser<sup>327</sup> пептида TH2R входят в состав Т-супрессорного эпитопа для Н-2<sup>b</sup>-гаплотипа, поэтому исключение этих аминокислот привело к проявлению Т-хелперных свойств пептида ОЗс.

В табл. 5 представлена иммуногенность пептидов без носителя. Пептид (NANP)<sub>3</sub> (I), так же как и пептид (II) с присоединенным к N-концевой аминокислотной группе GMDP, неиммуногенны в свободном состоянии. Полимеризация тетрапептида NANP до (NANP)<sub>40</sub> (III) превращает его в иммуноген, однако ответ к пептиду (III) находится под Ig-генным контролем, поскольку пептид (III) иммуногенен только для мышей Н-2<sup>b</sup>-гаплотипа (С57В1/6). Титры антител слабо зависят от дозы пептида (III) в интервале 10—500 мкг/мышь, однако в большей степени зависят от мощности адъюванта и при иммунизации в физиологическом растворе пептид (III) слабоиммуногенен. Включение GMDP в полипептидную цепь полимера (соединение (IV)) не приводит к существенному повышению иммуногенности даже для отвечающей линии мышей, однако позволяет заменять микобактерии в ПАФ. Наблюдается корреляция между титрами антител и содержанием адъюванта (ср. (IVa)—(IVc)), но в исследованных пределах эта зависимость незначительна. Применение GMDP не изменило иммуногенность конструкций (I)—(IV) для неответающей линии животных. Как и в случае неиммуногенных конструкций на основе MAVP, ни ковалентное связывание, ни механическое смещение GMDP с антигеном не приводило к появлению антител.

Конструкции на основе политафтсина (XIV)—(XVI) оказались иммуногенными для обеих линий мышей (см. табл. 6). При этом высокоиммуногенными оказались только конъюгаты с большой эпитопной плотностью пептидного гаптена (XIVb, XVb). Следует отметить, что в ПАФ высокоиммуногенными были только конструкции с ковалентно связанным GMDP, в то время как смесь (XIVb) и GMDP индуцировала значительно меньшие титры антител, т. е. для конъюгатов на основе политафтсина ковалентное присоединение GMDP заменяет микобактерии в ПАФ. Несмотря на то что политафтсин не является высокоиммуногенным соединением, конъюгаты (XIV)—(XVI) на его основе дали высокий ответ на пептидный гаптен. Во всех исследованных нами конъюгатах в качестве носителя использован политафтсин, модифицированный конъюгирующим агентом — MCS. При использовании в ELISA тест-антигена (RTKP)<sub>40</sub>-MCS титр антител достигал значения 4,2. Такая высокая иммуногенность модифицированного политафтсина может быть объяснена разными причинами. Возможно, что модификация полимера сравнительно гидрофобной аминокислотой приводит к образованию молекулярных структур, сходных с Т-хелперными эпитопами белков или пептидов. В нашем случае эти структуры должны включать Т-хелперы для двух



Титры антипептидных антител и условия иммунизации для конструкций на основе политафтсина \*

Антиген	Содержание, вес. %		Доза, мкг/мышь	Первая иммунизация	Вторая иммунизация		Титр анти-(NANP) <sub>40</sub> , Ig	
	NANP	GMDP			Адьювант	Антиген	Адьювант	C57B1/6
(XIVa)	14	—	100	ПАФ	(XIVa)	НАФ	2,8	3,0
(XIVb)	40	—	100	»	(XIVb)	»	4,2	3,9
			100	НАФ	(XIVb)	»	3,7	<2,4
			100	—	(XIVb)	—	2,7	<2,4
GMDP + (XIVb)	40	10	100	НАФ	(XIVb)	НАФ	3,3	3,3
(XVa)	3	1,5	100	—	(XIVb)	—	3,0	<2,4
(XVb)	28	12	100	НАФ	(XIVa)	НАФ	3,0	3,3
			100	»	(XIVb)	»	5,1	3,0
(XVI)	9	7	100	—	(XIVb)	—	3,2	<2,4
(XVII)	60		200	НАФ	(XIVb)	НАФ	2,8	2,8
				ПАФ	(XVII)	»	3,6	3,1

\* Схему иммунизации см. в «Экспер. части».

Таблица 7

Титры антипептидных антител и условия иммунизации для конструкций на основе KLH \*

Антиген	Содержание, вес. %		Доза, мкг/мышь	Первая иммунизация	Вторая иммунизация		Титр анти-(NANP) <sub>40</sub> , Ig	
	NANP	GMDP			Адьювант	Антиген	Адьювант	C57B1/6
(XI)	10	—	200	ПАФ	(XI)	НАФ	4,6	5,1
			200	НАФ	(XI)	»	4,6	5,5
			200	—	(XI)	»	4,6	5,1
(XII)	8	4	100	НАФ	(XIII)	»	4,8	4,8
			200	»	(XIII)	»	4,6	4,6
			200	—	(XIII)	—	5,5	5,3
(XIII)	5	—	100	ПАФ	(XIII)	НАФ	5,1	4,3
GMDP + (XIII)	5	10	100	НАФ	(XIII)	»	4,9	4,5
			100	—	(XIII)	—	4,9	5,1

\* Схему иммунизации см. в «Экспер. части».

различных гаплотипов животных. Нам представляется более вероятным, что иммуногенность обуславливается неспецифической иммуноактивирующей функцией носителя.

В исследованных сыворотках не было обнаружено антител, направленных против политафтсина. Отсутствие антител, способных вызывать перекрестные реакции с иммуноглобулинами организма, — еще одно привлекательное качество политафтсина как носителя для вакцинации.

Чтобы проверить возможность использования тафтсина для стимуляции иммунного ответа на короткие синтетические пептиды, мы синтезировали «химерный» пептид (XVII) ((TKPR)<sub>2</sub>-(NANP)<sub>3</sub>). В этой конструкции к N-концу (NANP)<sub>3</sub> посредством нормальных пептидных связей присоединен димер тафтсина. Такая модификация неиммуногенного пептида (NANP)<sub>3</sub> превратила его в иммуногенный антиген, причем для обеих линий мышей (см. табл. 6). В сыворотке, полученной на пептид (XVII), титры антиполитафтсиновых антител не превышали уровня контроля. Эти данные подтверждают наше предположение о неспецифической иммуноактивирующей роли политафтсина в конъюгатах.

Как и ожидалось, конъюгаты на основе высокоиммуногенного белка KLH (XI)–(XIII) оказались иммуногенными для обеих линий мышей (см. табл. 7). Иммуногенность практически не зависела от типа связи пептида с белком, эпитопной плотности, а также адьюванта. Так, соединение

(XI) индуцировало одинаковые титры антител как в ПАФ или НАФ, так и при иммунизации в физиологическом растворе. Конъюгаты (XII), (XIII), содержащие спейсерную группировку между белком и пептидом, на линии С57В1/6 индуцировали титры, достоверно превышающие титры против (XI). Обратная тенденция просматривается с этими же конъюгатами на линии BALB/c, поэтому неясно влияние типа связи на иммуногенность в этих конструкциях.

По иммуногенности и реактивности в отношении адъювантов исследованные образцы можно разделить на три группы. Так, к группе полностью неиммуногенных конструкций относятся конструкции на основе MAVP (V)—(VII) и неиммуногенные для линий BALB/c конструкции на основе (NANP)<sub>40</sub>. В этих конструкциях отсутствуют Т-хелперные эпитопы, и они не проявляют иммуномодуляторной активности, поскольку GMDP, вероятно, как и N-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамин (MDP), эффективно стимулирует только активированные иммунокомпетентные клетки [20]. В этих случаях ни ковалентное присоединение GMDP, ни его механическое смешивание с антигеном не преодолевают I<sub>g</sub>-рестрикции. Конъюгаты второй группы на основе КЛН безусловно иммуногенны для всех линий животных. В случае КЛН, обладающего широким набором Т-эпитопов, иммуногенность конъюгатов обуславливается мощной активацией Т-хелперов и практически не зависит от адъюванта. Третья группа конструкций — конъюгаты на основе политафтсина и (NANP)<sub>40</sub> (для С57В1/6) — обладают существенно меньшим набором Т-эпитопов и в общем случае должны быть менее мощными индукторами иммунного ответа, чем КЛН-конъюгаты. Иммуногенность этих конъюгатов явно зависит от выбора адъюванта и максимальна при иммунизации в ПАФ. Ковалентное присоединение GMDP обеспечивает одновременное представление гаптена и адъюванта иммунокомпетентным клеткам, что может влиять на механизм индукции иммунного ответа. В случае политафтсина возможна дополнительная стимуляция иммунного ответа за счет неспецифической активации макрофагов.

Таким образом, в результате исследования серии конъюгатов пептидного гаптена (NANP)<sub>3</sub> с различными носителями были синтезированы полностью синтетические конструкции, иммуногенность которых сравнима с иммуногенностью традиционных пептидно-белковых конъюгатов. Было показано, что неспецифическая стимуляция В-клеточной системы позволяет повысить иммуногенность синтетических пептидов. Полученные данные позволяют надеяться, что с помощью неспецифической стимуляции возможно преодоление МНС-рестрикции иммунного ответа, что является одним из ключевых моментов разработки вакцин нового поколения. Также было показано, что ковалентное присоединение GMDP повышает гуморальный ответ к низкоиммуногенным конъюгатам и позволяет заменять микобактерии в ПАФ.

### Экспериментальная часть

Для синтеза использовали L-аминокислоты и их производные фирм Reanal (Венгрия), Fluka (Швейцария), Merck (ФРГ), PRF (Япония). Масс-спектры получали на приборе Kratos MS50TS методом FAB. Аминокислотный анализ гидролизатов выполняли на анализаторе Durrum Merck после 24-часового гидролиза образца 6 н. соляной кислотой в запаянной ампуле при 110° С. Данные аминокислотного анализа интерпретировались без учета разложения аминокислот при гидролизе. ТСХ защищенных пептидов на силикагеле проводили на пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в следующих системах растворителей: хлороформ — метанол, 95 : 5 (А), 90 : 10 (Б), 80 : 20 (В), этилацетат — хлороформ — метанол — уксусная кислота, 30 : 15 : 5 : 1 (Г), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Д). Обессоливание осуществляли на сефадексе G-10 (Pharmacia), гель-хроматографию — на сефадексе G-25sf и HW-40f (Toyo Soda) в 1% уксусной кислоте. ВЭЖХ проводили на хроматографе Beckman 340 на колонке (4,6 × 150 мм) с Ultrasphere ODS, используя градиент концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте.

Промежуточные производные (VIII), (XXI)—(XXVII) были охарактеризованы аминокислотным анализом, масс-спектрометрией и данными ТСХ. Пептиды (I), (II), T1c (XVII), O3c и промежуточные производные (VIII)—(X) охарактеризованы аминокислотным анализом, масс-спектрометрией и данными ВЭЖХ. Конструкции (III)—(VII), (XI)—(XX) охарактеризованы аминокислотным анализом.

*Определение степени рацемизации по Мэрфи.* Количественное содержание D-Pro в пептидных полимерах определяли с помощью хроматографического разделения аминокислотных гидролизатов, модифицированных 1-фтор-2,4-динитрофенил-5-L-аланиламидом (реагент Мэрфи, Pierce).

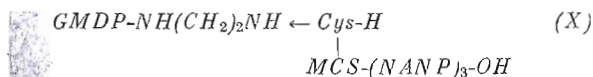
К 10 мкл раствора исследуемого гидролизата, содержащего 0,05 мкмоль аминокислот, прибавляли 100 мкг реактива Мэрфи, 20 мкл ацетона и 4 мкл 1 М NaHCO<sub>3</sub>. Смесь термостатировали при 40° С в течение 1 ч, затем охлаждали, прибавляли 20 мкл 2 М HCl, 200 мкл ацетона и 100 мкл воды. Хроматографический анализ проводили на колонке Ult-gasphere ODS, для элюции использовали градиент концентрации ацетонитрила от 20 до 40% в 0,02 М триэтиламмоний-фосфатном буфере, pH 7,0.

*Синтез пептидов и носителей.* Пептиды (NANP)<sub>3</sub> (I), Cys(Acm)-βAla-(NANP)<sub>3</sub> (T1c) были синтезированы на хлорметилированном сополимере стирола и дивинилбензола SX-1 (Bio-Rad), пептиды Cys(Acm)-βAla-DKNIHQILKIKNSIST (O3c), (TKPR)<sub>2</sub>-(NANP)<sub>3</sub> (XVIII) на аминотетраметилированном полимере с использованием в качестве линкера 4-гидроксиметилфенилуксусной кислоты. Синтез проводили в неавтоматизированном варианте. В качестве временной защиты α-аминогрупп использовали Вос-группу. Подробное описание синтеза и очистки пептидов изложено в работе [18].

*GMDP-(NANP)<sub>3</sub>-OH (II).* К раствору 61 мг (50 мкмоль) соединения (I) в 1 мл DMF прибавляли 28 мкл (200 мкмоль) триэтиламина, 86 мг (100 мкмоль) GMDP-OPfp [15] и перемешивали 24 ч, затем в реакционную смесь добавляли эфир, выпавший осадок отфильтровывали и сушили. Хроматографировали на колонке с DEAE-Toyopearl 650 M в градиенте концентрации аммоний-ацетатного буфера (0 → 0,1 М), pH 6,5. Получили 80 мг (85%) соединения (II). FAB: [MH<sup>+</sup>] 1885.

*GMDP-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH ← Cys(Acm) (VIII).* Растворяли 210 мг (300 мкмоль) GMDP-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> [15], 130 мг (300 мкмоль) Вос-Cys(Acm)-OPfp, 40 мкл (300 мкмоль) триэтиламина в 1 мл DMF, перемешивали 16 ч. Продукт осаждали эфиром, отщепляли Вос-группу трифторуксусной кислотой и выделяли соединение (VIII) препаративной обращенно-фазовой хроматографией на колонке (16 × 250 мм) с Silasorb C18. Для элюции использовали градиент концентрации ацетонитрила (0 → 40%) в 0,1% трифторуксусной кислоте. Получали 97 мг (35%) соединения (VIII). FAB: [MH<sup>+</sup>] 913.

*MCS-(NANP)<sub>3</sub>-OH (IX).* 48 мг (40 мкмоль) соединения (I) растворяли в 1 мл PBS, pH 7,5, прибавляли 240 мг (800 мкмоль) MCS в 0,5 мл 1,4-диоксана и перемешивали 40 мин. Полученную смесь обессоливали на сефадексе G-10 в 1% уксусной кислоте. Получали 48 мг соединения (IX). FAB: [MH<sup>+</sup>] 1403.



К раствору 18 мг (20 мкмоль) соединения (VIII) в 3 мл 1% уксусной кислоты прибавляли 64 мг (200 мкмоль) ацетата ртути(II). Перемешивали 1 ч, затем в течение 1 ч раствор насыщали током сероводорода, осадок отделяли центрифугированием и супернатант лиофилизовали. К лиофилизованному супернатанту прибавляли раствор 21 мг (15 мкмоль) соединения (IX) в 3 мл 1% уксусной кислоты, перемешивали 6 ч, а затем хроматографировали на G-25 sf в 1% уксусной кислоте. Собирали высокомолекулярную фракцию и лиофилизовали. Получали 11 мг (25%) соединения (X).



FAB: [MН<sup>+</sup>] 2242; хроматография на колонке; Ultrasphere ODS обнаружила наличие четырех ожидаемых пиков.

Cys

*MCS-(NANP)<sub>3</sub>-OH (Xa)*. Соединение (Xa) синтезировали из соединения (IX) и Cys(Asm) по аналогичной методике. FAB: [MН<sup>+</sup>] 1524.

*Boc-AsnPro-OBzl (XXI)*. Растворяли 7,06 г (20 ммоль) Boc-Asn-ONp, 4,84 г (20 ммоль) HCl-Pro-OBzl, 2,7 г (20 ммоль) HOBT в 40 мл этилацетата, прибавляли 2,76 мл (20 ммоль) триэтиламина и перемешивали 18 ч. Разбавляли этилацетатом до 300 мл и промывали 0,1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 раза), 3 % раствором аммиака (6 раз), насыщенным раствором NaCl (2 раза). При упаривании этилацетата на роторном испарителе начиналась кристаллизация дипептида. Получали 5,67 г (68 %) индивидуального по ТСХ дипептида (XXI), R<sub>f</sub> 0,35 (A), 0,52 (B), 0,83 (B), 0,46 (Г), 0,85 (D), FAB: [MН<sup>+</sup>] 420.

*TFA-AsnPro-OBzl (XXIa)*. 6,81 г дипептида (XXI) растворяли в 50 мл смеси хлористого метилена и трифторуксусной кислоты (1 : 1). Через 30 мин раствор упаривали до масла. Полученное масло промывали сухим эфиром, растворяли в сухом этилацетате, при этом немедленно начиналась кристаллизация. Кристаллы фильтровали, промывали сухим эфиром. Получали 6,32 г (90 %) деблокированного дипептида (XXIa). Аналогично проводили снятие Boc-группы с пептидов (XXII), (XXV), (XXVI).

*Boc-AlaAsnPro-OBzl (XXII)*. 5,2 г (12 ммоль) соединения (XXIa) суспендировали в 50 мл этилацетата, прибавляли 4,63 г (13 ммоль) Boc-Ala-OPip и 1,5 мл (12 ммоль) N-метилморфолина. После 15 мин перемешивания смесь становилась гомогенной, а еще через 1 ч выпадал осадок. Через 10 ч осадок фильтровали, промывали сухим эфиром. Получали 5,00 г (86 %) индивидуального по ТСХ трипептида (XXII), R<sub>f</sub> 0,21 (A), 0,43 (B), 0,81 (B), 0,23 (Г), 0,75 (D). FAB: [MН<sup>+</sup>] 491.

*Boc-AsnAlaAsnPro-OBzl (XXIII)*. 1,48 г (4,2 ммоль) Boc-Asn-ONp, 2 г (4 ммоль) соединения (XXIIa), 567 мг (4,2 ммоль) HOBT и 562 мкл (4 ммоль) триэтиламина растворяли в 30 мл DMF. Через 12 ч выпадал осадок. Смесь разбавляли этилацетатом и фильтровали. После перекристаллизации из горячего этанола получали 1,43 г (59 %) тетрапептида (XXIII), индивидуального по ТСХ. R<sub>f</sub> 0,06 (A), 0,21 (B), 0,52 (B), 0,07 (Г), 0,49 (D). FAB: [MН<sup>+</sup>] 607.

*Boc-AsnAlaAsnPro-OH (XXIIIb)*. 1,2 г (2 ммоль) тетрапептида (XXIII) растворяли в 30 мл метанола и гидрировали в токе водорода над палладиевой чернью. После исчезновения в смеси исходного тетрапептида (контроль с помощью ТСХ) метанол упаривали и пептид осаждали эфиром. Получали 898 мг (91 %) частично защищенного тетрапептида (XXIIIb), R<sub>f</sub> 0,34 (D).

*TFA-AsnAlaAsnPro-OPfp (XXIIIc)*. К раствору 986 мг (2 ммоль) тетрапептида (XXIIIc) в 3 мл DMF прибавляли 788 мг (2 ммоль) дипентафторфенилкарбоната и 0,5 мл (4 ммоль) триэтиламина. Через 1 ч активированный эфир тетрапептида (XXIIIc) осаждали сухим эфиром, растворяли в метаноле и снова осаждали эфиром. После снятия Boc-группы трифторуксусной кислотой осаждали соль активированного эфира тетрапептида абсолютным эфиром. Получали 990 г (64 %) (XXIIIc).

*(AsnAlaAsnPro)<sub>n</sub> (XXIV)*. К раствору 1,1 г (1,4 ммоль) соединения (XXIIIc) в 4 мл DMF прибавляли 400 мкл (3 ммоль) триэтиламина и 25 мг (0,2 ммоль) диметиламинопиридина и перемешивали в закрытом сосуде 80 сут при 18° С. Затем упаривали DMF, растворяли смесь в 10 мл 1 % уксусной кислоты и обессоливали на G-25sf, в 1 % уксусной кислоте. Получали 560 мг высокомолекулярного пептидного материала (XXIV). Высокомолекулярную фракцию (XXIV) хроматографировали на колонке с HW-40f в 1 % уксусной кислоте. Получали 260 мг полипептида (III). Кажущаяся молекулярная масса, определенная на HW-55sf, составляла 20—25 кДа, что соответствует содержанию 40—50 тетрапептидных блоков. Тест по Мэрфи показал присутствие не более 3 % D-Pro в кислом гидролизате полимера (III).

[GMDP-Lys ~ (NANP)<sub>3</sub>]<sub>n</sub> (IVa—c). 24 мг (20 мкмоль) соединения (I), 0,8 мг (1 мкмоль) лизинового производного GMDP (GMDP-Lys [19]) растворяли в 0,5 мл DMF, прибавляли 13 мкл (100 мкмоль) триэтиламина, 17 мкл (80 мкмоль) дифенилфосфоилазида и перемешивали 30 сут. К реакционной массе прибавляли 1,5 мл воды и хроматографировали на G-25 sf в 0,1 М уксусной кислоте. Собирали высокомолекулярную фракцию, лиофилизировали и хроматографировали на Toyopearl HW-40 в том же элюенте. После лиофилизации фракции, содержащей высокомолекулярные продукты, получали 2,5 мг пептидного полимера (IVa) с молекулярной массой 5—10 кДа. При получении соединений (IVa) и (IVb) по аналогичной методике использовали 1,6 мг (2 мкмоль) и 2,4 мг (3 мкмоль) GMDP-Lys.

*Boc-Lys(Z)Pro-OFm* (XXV). К раствору 3,52 г (6 ммоль) *Boc-Lys(Z)-OPfp*, 3,25 г (8 ммоль) TFA·*Pro-OFm* и 1,08 г (8 ммоль) HOBT в смеси 30 мл этилацетата и 5 мл DMF прибавляли 1,1 мл (8 ммоль) DIEA. Перемешивали 2 ч, упаривали, растворяли в 300 мл этилацетата и промывали 0,1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 раза), насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2 раза), насыщенным раствором NaCl (3 раза). Этилацетат упаривали на роторном испарителе, растворяли полученное масло в эфире и осаждали пентаном дипептид (XXV) в виде масла. После высушивания в вакууме масляного насоса получали 5 г пептида (XXV), *R<sub>f</sub>* 0,78 (A), 0,82 (B), 0,89 (B), 0,76 (Г), FAB: [MH<sup>+</sup>] 655.

*Boc-Thr(Bzl)Lys(Z)Pro-OFm* (XXVI) синтезировали аналогично пептиду (XXV), получали 3,6 г масла, *R<sub>f</sub>* 0,62 (A). FAB: [MH<sup>+</sup>] 846.

*Boc-Arg(Tos)Thr(Bzl)Lys(Z)Pro-OFm* (XXVII). К раствору 2,996 г (7 ммоль) *Boc-Arg(Tos)-OH* в 20 мл абсолютного тетрагидрофурана прибавляли 780 мкл (6 ммоль) N-метилморфолина, раствор охлаждали до -20° С и прибавляли при перемешивании 784 мкл (6 ммоль) изобутилхлорформата. Через 1,5 мин к этому раствору прибавляли предварительно охлажденный до -20° С раствор 3,5 г (4 ммоль) TFA·*Thr(Bzl)Lys(Z)·Pro-OFm* (XXVIa) и 750 мкл (4 ммоль) DIEA в DMF. Перемешивание продолжали 30 мин при -20° С, затем 1 ч при комнатной температуре и упаривали. Реакционную смесь растворяли в этилацетате, промывали аналогично методике получения (XXV) и снова упаривали. Полученное масло (4,3 г) наносили на колонку с силикагелем и элюировали соединение (XXVII) 5% раствором метанола в хлороформе. После упаривания элюента и вспенивания получали 1,7 г соединения (XXVII), *R<sub>f</sub>* 0,40 (A), 0,66 (B), 0,73 (B). FAB: [MH<sup>+</sup>] 1157.

*Boc-Arg(Tos)Thr(Bzl)Lys(Z)Pro-OH* (XXVIIb). 1,7 г соединения (XXVII) растворяли в 25 мл 20% раствора пиперидина в этилацетате. Через 30 мин прибавляли 150 мл этилацетата и промывали раствор 0,1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 раза). Растворитель упаривали, остаток наносили на колонку с силикагелем, промывали 5% метанолом в хлороформе и элюировали соединение (XXVIIb) 20% раствором метанола в хлороформе. После упаривания получили 1,5 г соединения (XXVIIb). *R<sub>f</sub>* 0,31 (Г), 0,87 (Д).

*Boc-Arg(Tos)Thr(Bzl)Lys(Z)Pro-OPfp* (XXVIIc). К раствору 978 мг (1 ммоль) соединения (XXVIIb) в 3 мл этилацетата прибавляли 140 мкл (1 ммоль) N-метилморфолина и 600 мг (1,5 ммоль) дипентафторфенилкарбоната. Через 1 ч осаждали соединение (XXVIIc) смесью эфира и пентана (1 : 1). Получали 900 мг (92%) соединения (XXVIIc). *R<sub>f</sub>* 0,66 (Г).

(*ArgThrLysPro*)<sub>n</sub> (XXVIII). 900 мг (0,78 ммоль) соединения (XXVIIc) растворяли в смеси трифторуксусной кислоты и хлористого метилена (1 : 1), через 2 ч упаривали и затирали полученное масло с эфиром. Полученный порошок промывали эфиром, сушили в вакууме и затем растворяли в 1,5 мл DMF. Прибавляли 260 мкл (2 ммоль) N-метилморфолина, 25 мг (0,2 ммоль) диметиламинопиридина и перемешивали в плотно закрытом сосуде 30 сут. После осаждения эфиром получали 600 мг защищенного полиптафсина. Деблокирование проводили по методике «High HF», как описано в работе [21]. После обессоливания на G-25sf в 1% уксусной кислоте получали 250 мг полимерного пептидного материала, который фракционировали на HW-40f в 1% уксусной кислоте. С помощью гель-

филтрации на HW-55sf определяли кажущуюся молекулярную массу — 15—20 кДа, что соответствует 30—40 тетрапептидным блокам. Тест по Мэрфи показал присутствие не более 1,4% D-Prо в кислотном гидролизате соединения (XXVIII).

### Конъюгация пептидов с носителями

1. *Конъюгация с MAVP.* 25 мг MAVP и 10 мкмоль пептида растворяли в 1 мл воды и прибавляли 20 мкмоль триэтиламина, перемешивали 12 ч, прибавляли 1 мл насыщенного раствора  $\text{NaHCO}_3$  и перемешивали еще 12 ч. Затем раствор подкисляли уксусной кислотой до прекращения выделения углекислого газа и хроматографировали на G-25sf.

2. *Конъюгация с помощью глутаральдегида.* К раствору 20 мг белка и 10 мг пептида в 2 мл 0,1 М PBS, pH 7,5, при энергичном перемешивании прибавляли (порциями по 100 мкл, в течение 2 ч) 1 мл 0,25% раствора глутаральдегида. Раствор перемешивали еще 1 ч, затем прибавляли 50 мг боргидрида натрия. По окончании выделения газов диализовали против воды.

3. *Конъюгация с использованием MCS.* а) К раствору 30 мг аминоксодержающего носителя (pAL или политафтсина) в 3 мл 0,05 М PBS, pH 7,5, прибавляли раствор 30,8 мг (0,1 ммоль) MCS в 0,1 мл 1,4-диоксана и перемешивали 40 мин при 18° С. Раствор обессоливали на G-10 в 1% уксусной кислоте при максимально возможной скорости элюента и собирали высокомолекулярную фракцию, содержащую модифицированный носитель.

б) 10 мкмоль пептида, защищенного по сульфгидрильной функции ацетамидометильной группой, растворяли в 2 мл, 0,02 М аммоний-ацетатного буфера, pH 5,0, прибавляли 0,1 ммоль (30 мг) ацетата ртути(II) и перемешивали 1 ч. Затем в течение 1 ч раствор насыщали током сероводорода, фильтровали осадок и лиофилизовали свободный пептид.

в) Немедленно после лиофилизации свободный пептид растворяли в 0,02 М аммоний-ацетатном буфере, pH 5,0, прибавляли носитель, модифицированный MCS, перемешивали 3 ч при 20° С и хроматографировали на G-25sf в 1% уксусной кислоте. Собирали высокомолекулярную фракцию, содержащую конъюгат пептида с носителем.

*Иммунизация животных.* Мышей линии BALB/c, C57B1/6 или  $F_1(\text{C57B1/6} \times \text{BALB/c})$ , самок 4—5-недельного возраста иммунизировали в основание хвоста подкожно в объеме 0,1 мл эмульсией конъюгата в физиологическом растворе с полным или неполным адьювантом Фрейнда или конъюгатом в физиологическом растворе. На 28-е сут после первой иммунизации проводили повторную иммунизацию той же дозой конъюгата. Антисыворотку получали на 7-е сут после второй иммунизации и тестировали методом иммуноферментного анализа.

*Иммуноферментный анализ.* 96-луночные планшеты с плоским дном (Nunc) заполняли раствором  $(\text{NANP})_{40}$  в PBS, pH 7,4, концентрации 5 мкг/мл по 100 мкл в каждую лунку и инкубировали 12 ч при 4° С. Затем планшеты обрабатывали раствором BSA (Sigma) в PBS концентрации 1 мг/мл в течение 1 ч при 37° С. После промывки планшеты наносили антисыворотки в соответствующих разведениях и инкубировали 12 ч при 4° С. Планшеты промывали, прибавляли в каждую лунку по 100 мкл раствора конъюгата антимышиных IgG-антител и пероксидазы хрена (Bio-Rad) в разведении 1 : 3000 в PBS с 0,05% Tween-20 (Bio-Rad) и инкубировали 1,5 ч при 37° С. Затем планшеты промывали, добавляли в каждую лунку по 100 мкл раствора *o*-фенилендиамина (Sigma) концентрации 1 мг/мл в 1% лимонной кислоте, pH 4,4, и 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Планшеты инкубировали 10 мин при 37° С и реакцию останавливали 2 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Оптическое поглощение измеряли при 492 нм на приборе Multiskan MCC. Титр антисыворотки определяли при  $D = 0,1$ .



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hezzenberg L. A., Tokihisa T., Hezzenberg L. A. // Nature. 1980. V. 225. № 5767. P. 664—667.
2. Hezzenberg L. A., Tokihisa T. // J. Exp. Med. 1982. V. 155. № 6. P. 1730—1740.
3. Hezzenberg L. A., Tokihisa T., Parks D. R., Hezzenberg L. A. // J. Exp. Med. 1982. V. 155. № 6. P. 1741—1748.
4. Schutze M.-P., Lecler C., Jolivet M., Audibert F., Chedid L. // J. Immunol. 1985. V. 135. № 4. P. 2319—2322.
5. Good M. F., Maloy W. L., Lunde M. N., Margalit H., Cornette J. L., Smith G. L., Moss B., Miller L. H., Berzofsky J. A. // Science. 1987. V. 235. № 4792. P. 1059—1062.
6. Campbell G. H., Aley S. B., Ballou W. R., Hall T., Hockmeyer W. T., Hoffman S. L., Holingdale M. R., Howard R. J., Lyon J. A., Nardin E. H., Nussenzveig R. S., Nussenzveig V., Tsang V. C. W., Weber J. L., Wellems T. E., Young J. F., Zavala F. // Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1987. V. 37. № 3. P. 428—444.
7. Milich D. R., Hughes J. L., McLachlan A., Thornton G. B., Moriarty A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 5. P. 1610—1614.
8. Петров П. В., Хаитов П. М., Лиознер А. Л., Фомина Л. А., Некрасов А. В., Степанова Е. К., Андреев С. М., Борисова В. К., Ракова О. А., Волюнская Н. А. // Иммунология. 1985. № 5. С. 24—27.
9. Trudelle Y., Brack A., Delmas A., Pedoussaut S., Rivaille P. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1987. V. 30. № 1. P. 54—60.
10. Etlinger H., Felix A. M., Gillessen D., Heimer E. P., Just M., Pink J. R. L., Singaglia F., Sturchler D., Takacs B., Trzeciak A., Matile H. // J. Immunol. 1988. V. 140. № 2. P. 626—633.
11. Enea V., Arnot D., Schmidt E. C., Cochrane A., Gwadz R., Nussenzveig R. S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 23. P. 7520—7524.
12. Giudice G. D., Cooper J. A., Merino J., Verdini A. S., Pessi A., Togna A. R., Engers H. D., Corradin G., Lambert P.-H. // J. Immunol. 1986. V. 137. № 9. P. 2952—2955.
13. Good M. F., Pombo D., Quakyi I. A., Riley E. M., Houghten R. A., Menon A., Alling D. W., Berzofsky J. A., Miller L. H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 4. P. 1199—1203.
14. Андропова Т. М., Иванов В. Т. Синтетические иммуномодуляторы. М.: Наука, 1991.
15. Рар В. А., Макаров Е. А., Юровский В. В., Мещерякова Е. А., Андропова Т. М., Иванов В. Т. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 7. С. 904—915.
16. Витп Н. J., Najjar V. A. // Mol. Cell. Biochem. 1984. V. 63. № 2. P. 137—142.
17. Dagan S., Tzeboval E., Fridkin F., Felfman M. // J. Biol. Response Modifiers. 1987. V. 6. № 6. P. 625—636.
18. Иванов В. В., Юровский В. В., Тертышникова С. М., Андропова Т. М., Иванов В. Т. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 4. С. 486—493.
19. Кайдалов А. А., Уткин Ю. Н., Андропова Т. М., Цетлин В. И., Иванов В. Т. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1523—1529.
20. Souvannavong V., Brown S., Adam A. // Mol. Immunol. 1988. V. 25. № 4. P. 385—391.
21. Tam J. P., Merrifield R. B. // The Peptides. V. 9 // Eds Udenfriend S., Meienhofer J. N. Y.: Acad. Press, 1987. P. 185—248.

Поступила в редакцию  
24.VII.1990

B. B. IVANOV, E. A. MESHCHERYAKOVA, T. M. ANDRONOVA, V. T. IVANOV  
SYNTHETIC CARRIERS AND ADJUVANTS INCREASE IMMUNOGENICITY  
OF THE SYNTHETIC PEPTIDE, B-EPI TOPE FROM CS-PROTEIN  
OF *PLASMODIUM FALCIPARUM*

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow

In order to increase immunogenicity of the peptide (NANP)<sub>3</sub>, we have prepared a large set of fully synthetic constructions based on the peptide, glycopeptide adjuvant GMDP and some synthetic carriers. Immunogenicity of these constructions was tested on mice (line C57B1/6) responding to the peptide polymer (NANP)<sub>40</sub> without carrier and on mice (line BALB/c) not responding to this antigen. Immunogenic constructions based on synthetic polytuftsin induced as high titres of anti-(NANP)<sub>3</sub> antibodies as the standard conjugate KLH—(NANP)<sub>3</sub>. The chimeric peptide consisting of (NANP)<sub>3</sub> and tuftsin dimer induced anti-(NANP)<sub>3</sub> antibodies in both lines of mice as well. The GMDP covalent attachment to the immunogenic constructions increased the anti-peptide antibodies titre. The results are discussed in terms of an approach to synthetic vaccines.