



УДК 577.112.6

© 1991 г.

Б. Б. Иванов, В. В. Юровский*, С. М. Тертышников*,
Т. М. Андропова, В. Т. Иванов

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ — ФРАГМЕНТОВ БЕЛКОВ *PLASMODIUM FALCIPARUM* И ИХ КОНЪЮГАТОВ С БЕЛКОВЫМИ И СИНТЕТИЧЕСКИМИ НОСИТЕЛЯМИ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;
*Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Пущино

На основании анализа первичной структуры поверхностных белков малярийного паразита *Plasmodium falciparum* были синтезированы 7 пептидов — предполагаемые антигенные детерминанты из белков PMMSA, SHARP, GBP, а также 4 пептида — описанные ранее антигенные детерминанты белков CSP, CRA и RESA. Для иммунохимических исследований полученные пептиды конъюгировались с белковыми и синтетическими носителями при помощи неспецифического и регносспецифического гетеробифункционального реагента.

Быстрая адаптация малярийного паразита *Plasmodium falciparum*, вызывающего наиболее опасную форму заболевания малярией, к современным противомаларийным препаратам потребовала новых подходов к лечению и профилактике этого заболевания. Особенно перспективной представляется вакцинация, однако недоступность антигенного материала для вакцин классического типа выдвигает на первый план синтетические и рекомбинантные вакцины [2, 3]. Проблема создания синтетических вакцин по-прежнему — одна из приоритетных задач биоорганической химии. Основой таких вакцин являются синтетические пептиды, соответствующие непрерывным антигенным детерминантам белков. Такие пептиды, имитирующие антигенные свойства белков, широко применяются для получения антипептидных антител, кросс-реагирующих с нативной молекулой белка [4, 5], и для создания серологических тест-диагностикумов [6, 7]. Цель настоящей работы — синтез пептидов из поверхностных белков *P. falciparum* для определения возможности их использования в качестве компонентов вакцин и тест-диагностикумов.

Выбор фрагментов для синтеза. *P. falciparum* имеет многостадийный цикл развития в организме человека и комара, в течение которого изменяются поверхностные белки паразита, что делает его трудноуязвимым для иммунной системы человека [8]. Белки *P. falciparum* с установленной первичной структурой — CSP [9], RESA [10], GBP [11], S-антиген [12], PMMSA [13], KP [14], SHARP [15], HSP 70 [16, 17], FIRA [18], ARP [19], CRA [20] — обладают различной степенью консервативности и по-разному экспонированы на поверхности паразита или инфицированного эритроцита. Установление аминокислотных последовательностей белков паразита открыло общие особенности их строения — наличие в белках тандемных иммунодоминантных повторов, а также высокое содержание заряженных гидрофильных аминокислот [4].

В настоящей работе использованы рекомендованные [1] обозначения белков *P. falciparum* и следующие сокращения: AcM — ацетамидометил, BSA — бычий сывороточный альбумин, ELISA — твердофазный иммуоферментный анализ, FAB — бомбардировка ускоренными атомами, HOBt — 1-гидроксисбензтриазол, KLN — гемоглобин улитки, MAVP — сополимер малеинового ангидрида и винилпирролидона, MCS — оксисукцинимидный эфир 6-(N-малеимид)аминокапроновой кислоты, pAL — поли-D,L-аланил-полилизин, POP — Вос-аминоацет-2-(4-гидроксиметил)фенилацетокси-пропионил.

Аминокислотные последовательности и физико-химические характеристики синтетических пептидов

Обозначение пептидов	Белок	Область	Последовательность *	Режим хроматографии **		Масса ***, [M+H] ⁺
				препаративной	аналитической	
T1	CSP	Повторы	NANPNANPNANP	1A	2B	1208
T1c			Cys(Acm)-βAla-NANPNANPNANP	1A	2B	1453
T2	PMMSA	1064-1071	NKKKEAEI	1B	2B	959
T2c			Cys(Acm)-βAla-NKKKEAEI	1B	2B	1205
T3	CRA	34-44	SSKKNKKGSG	CM	2B	1148
T3c			Cys(Acm)-βAla-SSKKNKKGSG	CM	2B	1393
T4	HRP II	С-концевые повторы	NAHHA	1B	2B	619
T5			NAHHAANHHA	1B	2B	1220
T6	GBP (фрагмент)	12-26	REYAADPEYRKHLEI	CM	2B	1889
T6c			Cys(Acm)-βAla-REYAADPEYRKHLEI	CM	2B	2134
T7	GBP (фрагмент)	31-45	LTNTDPNDEVERRNA	DEAE	2B	1742
T7c			Cys(Acm)-βAla-LTNTDPNDEVERRNA	DEAE	2B	1988
T8	CRA	65-76	VEVNKRKSKYKI	CM	3A	1492
T8c			Cys(Acm)-βAla-VEVNKRKSKYKI	CM	3A	1737
T9	PMMSA	263-278	IDKNKNATKEEEKKKL	CM	2B	1916
T9c			Cys(Acm)-βAla-IDKNKNATKEEEKKKL	CM	2B	2162
O2	RESA	С-Концевые повторы	AENVEHDA	DEAE	2A	1014
O3	CSP	328-344	DKHIEQLKKIKNSIST	CM	3A	2044
O3c			Cys(Acm)-βAla-DKHIEQLKKIKNSIST	CM	3A	2290

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

** Цифра обозначает тип хроматографической колонки, буква — буферы. Пояснения см. в «Экспериментальной части».

*** Получены методом FAB-масс-спектрометрии.

Исходя из предполагаемой биологической функции перечисленных белков в жизнедеятельности паразита, в качестве первого шага при поиске протективных антигенных детерминант мы исследовали антигенные свойства синтезированных нами пептидных сегментов белков CSP, CRA, PMMSA, GBP и SHARP (см. табл. 1).

Циркумспорозитный белок CSP — основной поверхностный белок спорозитной стадии, содержащий иммунодоминантную антигенную детерминанту поверхности спорозита — tandemные повторы тетрапептида NANP* [21]. Известно, что додекапептид (NANP)₃ (T1, см. табл. 1) — минимальный фрагмент области повторов CSP-белка, несущий свойства антигенной детерминанты [22], а пептид 328—343 (O3) — иммунодоминантный T-эпитоп [23].

Были описаны частично-протективные свойства С-концевых повторов EENVEHDA (O2) белка эритроцитарной стадии RESA [24]. Малый

* Последовательности пептидов приведены в однобуквенном коде аминокислот.

гистидиналин-богатый белок (SHARP) относится к группе гистидин-богатых белков, вероятно, ответственных за явление адгезии инфицированных эритроцитов к клеткам эпителия сосудов [25]. Известно, что антитела против пептида (АННАА)₂ из С-концевых повторов белка SHARP связываются с нативным белком [26]. Кроме того, эта область повторов имеет гомологию с фрагментом Ala-His-His-Phe-Ser полипептидной цепи гликофорина А, эффективно ингибирующим инвазию эритроцитов мерозоитами [26]. Учитывая эти данные, мы синтезировали пептид Т5 — (НАННАА)₂.

Остальные синтезированные нами пептиды из белков РММСА, СРА и GBP не были описаны ранее.

Белок РММСА — основной поверхностный белок, содержащий иммунодоминантные детерминанты мерозоитов и стадии поздней шизогонии [27].

Белок, родственный циркумспорозоитному (СРА или р23), — небольшой белок (23 кДа), экспрессирующийся на всех паразитарных стадиях, претендует на роль универсального для всех стадий антигена [20].

GBP относится к группе гликофоринсвязывающих белков, которые, как полагали ранее [28], играют определяющую роль на начальном этапе инвазии эритроцитов мерозоитами. В более поздних сообщениях показано, что не существует убедительных доказательств связывания GBP и интактных эритроцитов. Вероятно, GBP ассоциирован с поверхностью мерозоиота как периферийный мембранный белок [1].

Аминокислотные последовательности белков РММСА [13], СРА [20] и фрагмента GBP [11] были проанализированы с помощью эмпирических методов нахождения вероятностных антигенных детерминант [29—31]. Фрагменты, одновременно имеющие локальные максимумы гидрофильности (длина сегмента сканирования — 6 аминокислот, шкала Хоппа — Вуддса), антигенности (шкала Веллинга), подвижности полипептидной цепи (шкала Карплюса — Шульца) и обладающие высоким потенциалом β-изгиба (шкала Чоу — Фасмана), были выбраны для синтеза (аминокислотные последовательности пептидов представлены в табл. 1).

Синтез пептидов. Пептиды были синтезированы твердофазным методом [32] в неавтоматизированном варианте. Пептиды О2 и О3 были синтезированы на РОР-полимере [33], остальные пептиды — на хлорметилированном полимере Bio-Beads SX-1. После отщепления от полимера пептиды очищались хроматографией (см. табл. 1). Идентификация полученных пептидов осуществлялась с помощью аминокислотного анализа, масс-спектрометрии методом FАВ и спектроскопии ЯМР. Данные этих методов анализа подтверждали структуры синтезированных пептидов. Гомогенность пептидов контролировалась с помощью ВЭЖХ.

Конъюгация пептидов с носителями. Для получения антипептидных антител традиционно используют высокоиммуногенные конъюгаты пептидов с крупными белками типа КЛН. Стандартная конъюгация с помощью глутаральдегида или карбодиимида вызывает необратимые модификации функциональных групп пептидов, что может привести к существенным изменениям иммунохимических свойств конъюгатов [34]. Было описано что глутаральдегидные конъюгаты ε-аминосодержащих пептидов с белками индуцировали низкий титр антител, узнающих интактный пептид. Конъюгаты, полученные с помощью селективных гетеробифункциональных реагентов, показали значительно лучшие результаты [34].

С помощью обычных процедур твердофазного синтеза мы присоединили на N-концы ε-аминосодержащих пептидов дипептид Cys(Acm)-βAla. Ацетамидометильная защитная группа остается интактной при обычных процедурах деблокирования и очистки пептидов. Ацетамидометильную группу отщепляли непосредственно перед конъюгацией, разрушая меркурированные Hg(II)-производные пептидов с помощью сероводорода. Для конъюгации использовали гетеробифункциональный реагент — оксисукцинимидный эфир 6-малеимидокапроновой кислоты (MCS). Наличие в пептидно-белковых конъюгатах неприродных аминокислот — β-аланина и 6-аминокапроновой кислоты — позволило легко оценивать количест-

Состав конъюгатов пептидов с носителями *

Пептид	Конъюгат для иммунизации		Тест-антиген для ELISA	
	Носитель	Содержание пептида (вес.%)	Носитель	Содержание пептида (вес.%)
T1	KLH	5 **	MAVP	8
T2с	BSA	10	MAVP	4
T3с	BSA	12	MAVP	10
T5	KLH	15 **	MAVP	3
T6с	BSA	7	MAVP	10
T7с	BSA	16	MAVP	35
T8с	BSA	10	MAVP	9
T9с	BSA	29	MAVP	10
O2	KLH	20 **	MAVP	13
O3с	BSA	11	MAVP	7

* По данным аминокислотного анализа.

** Состав конъюгата оценивали по соотношению пептида и белка, взятых для конъюгации.

венное содержание пептидов в конъюгатах при помощи аминокислотного анализа. Пептиды T1, T5 и O2, не содержащие ε-аминогрупп, конъюгировали с белками при помощи глутарового альдегида.

Для исключения влияния антител, направленных против носителя, в качестве тест-антигена в ELISA использовали конъюгаты пептидов с носителями, отличающимися от носителей, использованных для иммунизации (см. табл. 2). Для этого были получены конъюгаты пептидов с синтетическими носителями — поли-*D,L*-аланил-полилизин (pAL) и сополимером малеинового ангидрида и винилпирролидона (MAVP).

Иммунохимическое исследование пептидов T2, T3, T5, T6, T7 и T8 подробно описано в работе [35]. Конъюгаты пептидов с белковыми носителями были использованы для получения антипептидных кроличьих антисывороток. С помощью ELISA показано, что антипептидные сыворотки против пептидов T3, T5, T6 и T7 специфически связывались с соответствующими пептидами. Однако только анти-T3- и анти-T5-антисыворотки связывались с гетерогенным паразитарным материалом, выделенным из несинхронизированной культуры *P. falciparum* in vitro. Моноспецифические анти-T5-антитела, выделенные с помощью аффинной хроматографии [35], обладают способностью ингибировать рост паразитов в культуре эритроцитов in vitro. Анти-T6- и анти-T7-антисыворотки не связывались с паразитарным материалом в условиях ELISA, однако в иммуноблоттинге после гель-электрофореза в денатурирующих условиях связывались с рядом белков с мол. массами от 75 до 105 кДа. Это указывает на то, что пептиды T6 и T7 либо не экспонированы на поверхности белка GBP, либо недоступны для антител в «нативном» состоянии паразита.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что участки полипептидных цепей белков CRA и SHARP, соответствующие пептидам T3 и T5, экспонированы на поверхности белков. Анти-T5-антитела обладают частичным протективным эффектом in vitro [35].

Экспериментальная часть

Для синтеза использовали *L*-аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия; Fluka, Швейцария; Merck, ФРГ; PRF, Япония).

Аминокислотный анализ гидролизатов пептидов выполняли на анализаторе Digum Matck 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. Масс-спектрометрию проводили на приборе Kratos MS50TC методом FAB.

Обессоливание осуществляли на сефадексе G-10 (Pharmacia), гель-хроматографию — на сефадексе G-25sf и HW-40f (Toyosoda) в 1% уксус-

ной кислоте. Препаративную ионообменную хроматографию проводили на CM-Toyorearl 650M и DEAE-Toyorearl 650 M в градиенте аммоний-ацетатного буфера, pH 6,5, от 0,01 до 0,5 M. Препаративную и аналитическую обращенно-фазовую хроматографию выполняли на хроматографе Du Pont 830 на колонках: 1) Silasorb C18 (16 × 250 мм), 2) Ultrasphere ODS (4,6 × 150 мм), 3) Ultrorack ODS 120T (4,6 × 150 мм). Для элюции использовали градиент концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте (А) и 0,025 M ацетате аммония, pH 6,5 (Б).

Реагенты: чистоту Вос-аминокислот проверяли ТСХ, в случае необходимости их перекристаллизовывали из подходящих растворителей. Для защиты боковых функций α-Вос-аминокислот использовали простые и сложные бензильные эфиры (Glu, Asp, Ser, Thr), 2,6-дихлорбензильный эфир (Tyr), 2-хлорбензилоксикарбонильную (Lys), 2,4-динитрофенильную (His), тозилую (Arg), ацетамидометильную (Cys) группы.

Сукцинимидный эфир 6-малеимидоаминокапроновой кислоты. 1. 6-(цис-3-Карбоксиакрилоил)аминокапроновая кислота (I). К раствору 13,1 г (100 ммоль) 6-аминокапроновой кислоты в ледяной уксусной кислоте прибавляли 9,8 г (100 ммоль) малеинового ангидрида и перемешивали 12 ч. Фильтровали выпавший осадок, промывали его водой, этанолом и сухим эфиром. После перекристаллизации из изопропанола получили 15 г (66%) белых кристаллов. Т. пл. 147—159° С.

2. 6-Малеимидокапроновая кислота (II). В 40 мл уксусного ангидрида при 40° С растворяли 1,32 г (22 ммоль) борной кислоты, 4 г (50 ммоль) плавящего ацетата натрия и 4,58 г (20 ммоль) производного (I). В течение 1 ч температуру реакционной смеси плавно доводили до 100° С. Смесь охлаждали до комнатной температуры, упаривали при пониженном давлении, растворяли в воде и экстрагировали эфиром. Эфирный слой промывали 0,1 н. серной кислотой, сушили безводным сульфатом натрия, упаривали до консистенции масла. Затем растворяли в 50 мл смеси хлороформ — уксусная кислота (95 : 5) и фильтровали через 20 г силикагеля. Упаривали и кристаллизовали из абсолютного эфира. Получили 3 г (60%) производного (II); т. пл. 87—89° С.

3. Оксисукцинимидный эфир 6-малеимидокапроновой кислоты (MCS). 2,11 г (10 ммоль) производного (II) и 1,38 г (12 ммоль) гидроксисукцинимиды растворяли в 20 мл абсолютного тетрагидрофурана, охлаждали до 0° С и прибавляли 2,06 г (10 ммоль) дициклогексилкарбодимиды. Смесь перемешивали 3 ч, фильтровали осадок, раствор упаривали до масла. Масло растворяли в сухом этилацетате и осаждали абсолютным эфиром MCS в виде масла. После высушивания в вакууме получили 2,95 г MCS (96%).

MAVP (молекулярная масса 25 кДа) был любезно предоставлен Л. И. Фоной (Институт иммунологии Минздрава СССР). pAL (Ala : Lys = 9 : 1, молекулярная масса 100—150 кДа) был синтезирован согласно [36].

Синтез пептидов осуществляли на сополимере стирола и дивинилбензола (1%) Bio-Beads SX-1 (Bio-Rad). Пептиды T1 — T9 синтезировали на хлорметилированном полимере Bio-Beads SX-1 с содержанием активного хлора 1,34 мэкв/г. Посадку первой аминокислоты осуществляли по методу Гизина [37] с помощью цезиевой соли. При этом стремились достичь количественного замещения хлора и при необходимости повторяли процедуру. Содержание α-аминогрупп в аминокислотных полимерах составляло 1,0—1,4 мэкв/г. POP-полимер получали модификацией Bio-Beads SX-1, как описано в работе [33]. Присоединение первой аминокислоты к POP-полимеру осуществляли с помощью фторида калия [38]. Содержание α-аминогрупп в POP-аминокислотных полимерах варьировало в пределах 0,6—0,9 мэкв/г.

За полнотой прохождения конденсации следили с помощью количественного нингидринового теста [39], в случае пролина использовали пикриновый тест [40].

Синтез проводили в неавтоматизированном варианте с использованием 3-кратного избытка симметричных ангидридов или 1-оксисбензотриазоло-

вых эфиров, приготовленных при 0° С в DMF. Конденсацию повторяли, если оставалось более 0,5% непрореагировавших аминогрупп, меньшее количество блокировали уксусным ангидридом в пиридине [32].

Деблокирование и отщепление пептидов от полимера. Перед отщеплением от полимера со всех пептидполимеров снимали Вос-группу, а пептидполимеры Т4, Т5, Т6, О2 и О3 затем обрабатывали 30 мин 1% раствором тиофенола в DMF для снятия 2,4-динитрофенильной группы с гистидина. Пептид Т1 отщепляли 15% трифторметансульфокислотой в трифторуксусной кислоте при 0° С в течение 1 ч. Пептиды Т6 — Т8 отщепляли при помощи процедуры «Low-High HF», а пептиды Т2 — Т5, Т9, О2, О3 — при помощи процедуры «Low TFMSA» [41]. После отщепления от полимера пептиды обессоливали на сефадексе G-10 в 1% уксусной кислоте и подвергали дальнейшей очистке (см. табл. 1).

Конъюгация пептидов с носителями

1. *Конъюгация с помощью глутаральдегида.* Пептиды Т1, Т5, О2 были конъюгированы с КЛН при помощи глутаральдегида, как описано в работе [42].

Белок (20 мг) и 10 мг пептида растворяли в 2 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,5, и при энергичном перемешивании прибавляли (порциями по 100 мкл, в течение 2 ч) 1 мл 43 мМ (0,25%) раствора глутаральдегида. Раствор перемешивали еще 1 ч, затем прибавляли 50 мг боргидрида натрия. По окончании выделения газов диализовали против воды.

2. *Конъюгация с использованием MCS.* а) К раствору аминоксодержащего носителя (30 мг рAL или 34 мг BSA) в 3 мл 0,05 М фосфатного буфера, рН 7,5, прибавляли раствор 30,8 мг (0,1 ммоль) MCS в 0,1 мл 1,4-диоксана и перемешивали 40 мин при комнатной температуре. Раствор обессоливали на G-10 в 1% уксусной кислоте при максимально возможной скорости элюента и собирали высокомолекулярную фракцию, содержащую носитель, модифицированный MCS.

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

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

3. *Конъюгация пептидов с MAVP.* К раствору 25 мг MAVP и 10 мкмоль пептида в 1 мл воды прибавляли 20 мкмоль триэтиламина, перемешивали 12 ч, прибавляли 1 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия и перемешивали еще 12 ч. Затем подкисляли раствор уксусной кислотой до прекращения выделения углекислого газа и хроматографировали на G-25sf.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kemp D. J., Coppel R. L., Anders R. F. // Ann. Rev. Microbiol. 1987. V. 41. № 1. P. 181—208.
2. Nussenzweig V., Nussenzweig R. // CIBA Foundation Symposium. Chichester: John Wiley & Sons. 1986. V. 119. P. 150—163.
3. Perlmann P. // Nature. 1987. V. 328. № 6127. P. 205—206.
4. Lerner R. L. // Adv. Immunol. 1984. V. 36. P. 1—44.
5. Walter G. // J. Immunol. Meth. 1986. V. 88. № 2. P. 149—161.
6. Arnon R. // Trends in Biochem. Sci. 1986. V. 11. № 1. P. 521—524.
7. Brown F., Chanock R. M., Lerner R. A. Vaccines 1986. New Approaches to Immunization. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
8. Тарасов В. В. Простейшие, патогенные для человека. М.: Изд. МГУ, 1987. С. 150—151.
9. Dame B., Williams J. L., McCutchan T. F., Weber J. L., Wirtz R. A., Hockmeyer W. T., Maloy W. L., Haynes J. D., Roberts I. S. D., Sanders G. S., Reddy E. P., Diggs C. L., Miller L. H. // Science. 1984. V. 225. № 4662. P. 593—599.

10. Favaloro J. M., Coppel R. L., Corcoran L. M., Foote S. J., Brown G. V., Anders R. F., Kemp D. J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 21. P. 8265—8277.
11. Ravetch J. V., Kochan J., Perkins M. // Science. 1985. V. 227. № 4694. P. 1593—1597.
12. Saint R. B., Coppel R. L., Cowman A. F., Brown G. V., Shi P.-T., Barzaga N., Kemp D. J., Anders R. F. // Mol. Cell. Biol. 1987. V. 7. № 8. P. 2968—2973.
13. Holder A. A., Lockyer M. J., Odink K. G., Sandhu J. S., Riveros-Moreno V., Nicholls S. C., Hillman Y., Davey L. S., Tizard M. L. V., Schwartz R. T., Freeman R. R. // Nature. 1985. V. 317. № 6034. P. 270—273.
14. Ardeshir F., Flint J. E., Matsumoto Y., Aikawa M. // EMBO J. 1987. V. 6. № 5. P. 1421—1427.
15. Stahl H. D., Kemp D. J., Crewther P. E., Scanlon D. B., Woodrow G., Brown G. V., Bianco A. E., Anders R. F., Coppel R. L. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 21. P. 7837—7846.
16. Bianco A. E., Favaloro J. M., Burkot T. R., Culvenor J. G., Crewtner P. E., Brown G. V., Anders R. F., Coppel R. L., Kemp D. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 22. P. 8713—8717.
17. Ardeshir F., Flint J. E., Richman S. J., Reese R. T. // EMBO J. 1987. V. 6. № 2. P. 493—499.
18. Stahl H. D., Crewtner P. E., Anders R. F., Brown G. V., Coppel R. L., Bianco A. E., Mitchel G. F., Kemp D. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 2. P. 543—547.
19. Stahl H. D., Bianco A. E., Crewtner P. E., Burkot T., Coppel R. L., Brown G. V., Anders R. F., Kemp D. J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 7. P. 3089—3102.
20. Coppel R. L., Favaloro J. M., Crewtner P. E., Burkot T. R., Bianco A. E., Stahl H. D., Kemp D. J., Anders R. F., Brown G. V. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 15. P. 5121—5125.
21. Zavala F., Tam J. P., Hollingdale M. R., Cochrane H., Quakyi I., Nussenzweig R. S., Nussenzweig V. // Science. 1985. V. 228. № 4706. P. 1436—1440.
22. Ballou W. R., Rothbard J., Wirtz R. A., Gordon D. M., Williams J. S., Gore R. W., Schneider I., Hollingdale M. R., Beaudoin R. L., Maloy W. L., Miller L. H., Hockmeyer W. T. // Science. 1985. V. 228. № 4703. P. 996—999.
23. 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.
24. Collins W. E., Anders R. F., Pappaioanou M., Campbell G. H., Brown G. V., Kemp D. J., Coppel R. L., Skinner J. C., Andrysiak P. M., Favaloro J. M., Corcoran L. M., Broderson J. R., Mitchel G. F., Campbell C. C. // Nature. 1986. V. 323. № 6085. P. 259—262.
25. Campbell G. H., Aley S. B., Ballou W. R., Hall T., Hockmeyer W. T., Hoffman S. L., Hollingdale M. R., Howard R. J., Lyon J. A., Nardin E. H., Nussenzweig R. S., Nussenzweig 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.
26. Lacombe J. M., Ferrari B., Andriamanampisoa R., Pavia A. A. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1988. V. 32. № 1. P. 104—116.
27. Schmidt-Ulrich R., Brown J., Whittle H., Lin P.-S. // J. Exp. Med. 1986. V. 163. № 1. P. 179—188.
28. Perkins M. E. // J. Exp. Med. 1984. V. 160. № 3. P. 788—798.
29. Chou P. Y., Fasman G. D. // Adv. Enzymol. 1987. V. 47. P. 45—148.
30. Hopp T. P., Woods K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824—3828.
31. Hopp T. P. // J. Immunol. Meth. 1986. V. 88. № 1. P. 1—18.
32. Barany J., Merrifield R. B. // The Peptides. V. 2 / Eds Gross E., Meinhofer J., N. Y.: Acad. Press. 1980. P. 3—285.
33. Tam J. P., Tjoeng F. S., Merrifield R. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1980. V. 102. № 19. P. 6117—6127.
34. Briand J. P., Miller S., van Regenmortel M. H. V. // J. Immunol. Meth. 1985. V. 78. № 1. P. 59—69.
35. Тертышников А. М., Юровский В. В., Иванов Б. Б., Садовников В. Б., Аллавердиев А. М. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 4. С. 494—503.
36. Пар 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.
37. Gisin B. F. // Helv. chim. acta. 1973. V. 56. P. 1477—1482.
38. Horiki K., Igano K., Inouye K. // Chem. Lett. 1978. № 2. P. 165—168.
39. Sarin V. K., Kent S. B. H., Tam J. P., Merrifield R. B. // Analyt. Biochem. 1981. V. 117. № 1. P. 147—157.
40. Hodges R. S., Merrifield R. B. // Analyt. Biochem. 1975. V. 65. P. 241—272.
41. Tam J. P., Merrifield R. B. // The Peptides. V. 9 / Eds Udenfriend., Meinhofer J., N. Y.: Acad. Press, 1987. P. 185—248.
42. Reichlin M. H. // Meth. Enzymol. 1980. V. 70. P. 159—165.

Поступила в редакцию
2.II.1990

После доработки
5.V.1990

B. B. IVANOV, V. V. YUROVSKY*, S. M. TERTYSHNIKOVA*, T. M. ANDRONOVA,
V. T. IVANOV

PEPTIDES FROM *PLASMODIUM FALCIPARUM* PROTEINS: SYNTHESIS
AND CONJUGATION TO PROTEINS AND SYNTHETIC CARRIERS

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

** Branch of M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region*

To study coat proteins of *Plasmodium falciparum*, seven putative antigenic determinants of PMMSA, SHARP, GBP and four known determinants of CSP, CRA and RESA were synthesized. Computerized methods for predicting protein antigenic determinants were employed to select the peptides. For immunochemical studies the peptides were conjugated to proteins and synthetic carriers by means of nonspecific and regiospecific heterobifunctional reagents.