



УДК 577.112.4

Ю. Л. Радавский, Л. С. Зайцева, В. П. Кухарь

БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОПЕРЕЧНОСШИВАЮЩИЕ РЕАГЕНТЫ И МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ ПЕПТИД — НОСИТЕЛЬ

В обзоре рассмотрены гомо- и гетеробифункциональные поперечносшивающие реагенты и способы их применения для получения конъюгатов пептид — носитель. Представлены реагенты и методы, широко используются при изучении антигенной структуры белков, конструировании химических (синтетических) вакцин, а также весьма полезны в решении одной из основных проблем физико-химической биологии — белок-белкового узнавания.

В последние годы опубликован ряд обзоров и монографий по применению химических бифункциональных реагентов и поперечносшивающей техники [1—6]. Поперечносшивающие бифункциональные реагенты необходимы для получения конъюгатов белок — белок, белок — низкомолекулярное соединение, твердый носитель — лиганд, иммобилизованных ферментов. Эти реагенты нашли широкое применение в различных биологических, фармакологических и аналитических исследованиях.

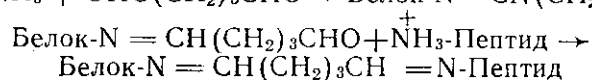
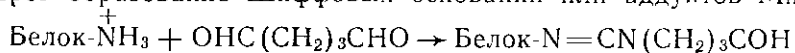
В настоящее время во многих странах мира ведутся интенсивные разработки по созданию химических (синтетических) вакцин. Одним из подходов в создании таких вакцин является химический синтез пептидов, содержащих аминокислотные последовательности протективных антигенных детерминант, определяющих выработку специфических антител. Еще в 1960 г. Села и Арнон [7—9] показали, что ковалентное связывание неиммуногенных тирозиновых и глутаминовых олигопептидов с неиммуногенным белком-носителем (желатиной) приводит к усилению антигенности полученных комплексов. Эти работы дали импульс систематическому изучению молекулярных основ антигенности. Конъюгаты пептид — белок используются при определении размера, формы, доступности, электрического заряда и конформации эпитопов для установления антигенной специфичности изучаемой белковой молекулы [10]. В 1972 г. Арнон с соавт. [11] предположили, что с использованием молекулярной белковой инженерии становится возможным дизайн синтетических компонентов, способных вызывать иммунный ответ на заданные эпитопы нативных белков. И действительно, в последние годы многими авторами показано, что после инъекции синтетических пептидов в свободной форме и в виде их конъюгатов с носителями индуцируется иммунный ответ на пептиды. Шаапер с соавт. [12] отметили, что выработка антител к пептидам зависит от способа их конъюгации. Хотя короткие пептиды иногда могут вызвать образование антител с высоким титром, часто оказывается, что эти антитела при взаимодействии с исходным белком имеют низкий титр. Последнее, вероятно, обусловлено различием в конформации пептида в нативном белке и в конъюгате пептид — белок [13—15]. Подвижный пептид на белке-носителе может принимать ту или иную предпочтительную конформацию. Этот процесс обусловлен местом присоединения пептида к носителю и способом конъюгации. Дирберг и Слэдтон [16] указывают на важность ориентации пептида. Так, антитела к октапептиду, пришитому к носителю через N-концевой остаток, не дают перекрестных реакций с этим же пептидом, пришитым через C-концевой остаток. Поэтому способ конъюгации может быть использован для изменения иммунного ответа на пептид, что дает возможность эффективного получения антипептидной сыворотки с высоким титром к нативному белку [17].

© Ю. Л. Радавский, Л. С. Зайцева, В. П. Кухарь, 1993

Практически в получении иммунопептидов, входящих в химическую (синтетическую) вакцину, можно отметить два основных аспекта: 1) выделение гомогенных синтетических пептидов; 2) выбор бифункционального реагента и способа получения иммуногенного конъюгата [18]. Сейчас, в основном, применяется ковалентное присоединение пептида к носителю, хотя разрабатываются и альтернативные подходы.

В представленном обзоре рассматриваются различные бифункциональные реагенты и методы, применяемые в получении конъюгатов пептид — белок. Практические аспекты анализируемого направления отражены в разделе, автором которого является Мюллер, монография [6].

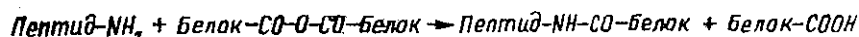
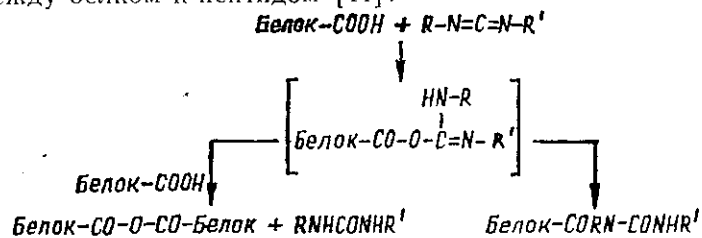
Глутаровый альдегид. Глутаровый альдегид — реагент, наиболее широко применяемый для получения конъюгатов пептид — белок [12, 19—32]. Он не обладает определенной специфичностью к какой-либо реакционноспособной группе в белке или пептиде, однако предпочтительнее реагирует в кислой среде с первичными аминогруппами [33—36] через образование Шиффовых оснований или аддуктов Михаэля.



Недостатком глутарового альдегида является его склонность к полимеризации в водных растворах. Механизм этого процесса детально изучали Монсан [37] и Петерс [38]. Авторы сделали следующий вывод: при кислых значениях рН глутаровый альдегид находится в равновесии со своим полуацеталем и полимером циклического полуацетала. Увеличение рН до нейтральных и слабощелочных значений, при которых ведется конъюгация, приводит к альдольной конденсации диальдегида с последующей дегидратацией и образованием при этом полимеров α , β ненасыщенного альдегида. При дальнейшем увеличении рН полимер выпадает в осадок. Еще одним недостатком глутарового альдегида является то, что в результате реакции могут возникать конъюгаты белок — белок и пептид — пептид [39].

Джонливет с соавт. [40] сконструировали три различные поливалентные вакцины конъюгацией глутаровым альдегидом четырех синтетических пептидов без использования носителя. Пептиды представляли собой фрагменты двух бактериальных антигенов (*M*-белка стрептококка и дифтерийного токсина), двух паразитарных антигенов (циркумспаразонных белков *Plasmodium falciparum* и *P. knowlesi*) и одного вирусного антигена (поверхностного антигена вируса гепатита В).

Водорастворимые карбодимиды. Карбодимиды реагируют с карбоксильными группами белков, давая промежуточное соединение, которое может перегруппировываться в ацилизо мочевины или взаимодействовать со второй карбоксильной группой, образуя ангидрид кислоты и дизамещенную мочевины. Ангидрид кислоты далее реагирует со свободной аминогруппой конъюгируемого пептида, формируя пептидную связь между белком и пептидом [41].



Чаще других сшивающими реагентами служат 1-этил-3-(3'-диметиламипропил)карбодимид (EDC) и 1-циклогексил-3-(2-морфолино-4-этил)карбодимид. Водорастворимые карбодимиды, как и глутаро-

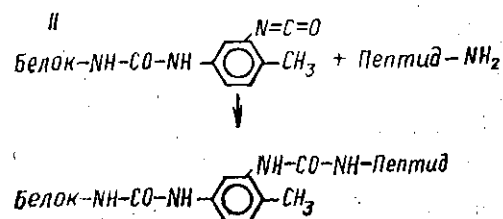
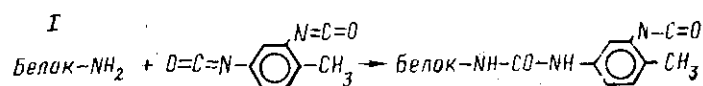
вый альдегид, нашли широкое применение при получении конъюгатов пептид — белок [20, 41—48].

Петров с соавт. [49], используя в качестве носителя полиэлектролиты (сополимер акриловой кислоты и N-винилпирролидона с малеиновым ангидридом), обладающие адъювантной активностью, синтезировали конъюгат с синтетическим додекапептидом (GLFGAIAGFIEG) из субъединицы HA₂ гемагглютинина вируса гриппа А карбодимидным методом. Иммуногенные препараты, содержащие додекапептид, стимулировали продукцию антител с широким спектром действия. Эти антитела распознавали гомологичную антигенную детерминанту в составе конъюгата пептид — бычий сывороточный альбумин (БСА) и в вирусных частицах вируса гриппа А различных серотипов.

Водорастворимые карбодимиды также довольно широко применяются при присоединении пептидов к белкам, однако их пригодность ограничена низким выходом конъюгатов. Старос с соавт. [50] показали, что добавление N-гидроксисульфосукцинимиды HOSu(SO₃) значительно повышает выход конъюгата. Для оценки эффекта HOSu(SO₃) на реакцию связывания авторы в качестве модельной системы брали глицин и гемоцианин улитки (или БСА). В результате добавления в реакционную смесь 5 мМ HOSu(SO₃) ковалентное связывание глицина (3,1 мМ) увеличивалось в 15 раз.

Впервые использование в качестве неиммуногенного носителя желатин для присоединения различных олигопептидов было предложено в 1960 г. [9]. Недавно этот носитель был применен для пришивки гаптен и пептидов через их amino- и карбоксильные группы с помощью карбодимидов [17]. На первом этапе реакции все свободные аминогруппы желатина блокировались ацетилированием уксусным ангидридом. К модифицированному белку, содержащему только свободные карбоксильные группы, с помощью EDC пришивали этилендиамин или β-аланин. Готовый раствор этилендиамина-Ас-Gel или β-Ala-Ас-Gel использовали для непосредственной конъюгации с гаптенами или пептидами также с помощью EDC.

В случае водорастворимых карбодимидов трудно исключить возможность сшивки полипептидных цепей белков-носителей по amino- и карбоксильным группам. Продукты модификации белка-носителя индуцируют синтез специфических антител, которые могут исказить результаты биологических экспериментов [51]. Кроме того, полученные конъюгаты содержат труднорастворимые примеси (например, дидицилогексилмочевину). Чтобы избежать подобных трудностей, Андреев с соавт. [53] применили N-трифторацетосукцинимид (TFS), предложенный Сакакибара в 1965 г. [53] для синтеза активированных N-гидроксисулцинимидных эфиров (OSu) ряда природных и синтетических полимеров. Этот реагент избирательно взаимодействует с карбоксильными группами белков. Продукты его разложения хорошо растворимы в водных растворах, что обеспечивает их полное отделение от целевых соединений. Пептид последовательности RILAVERYL—

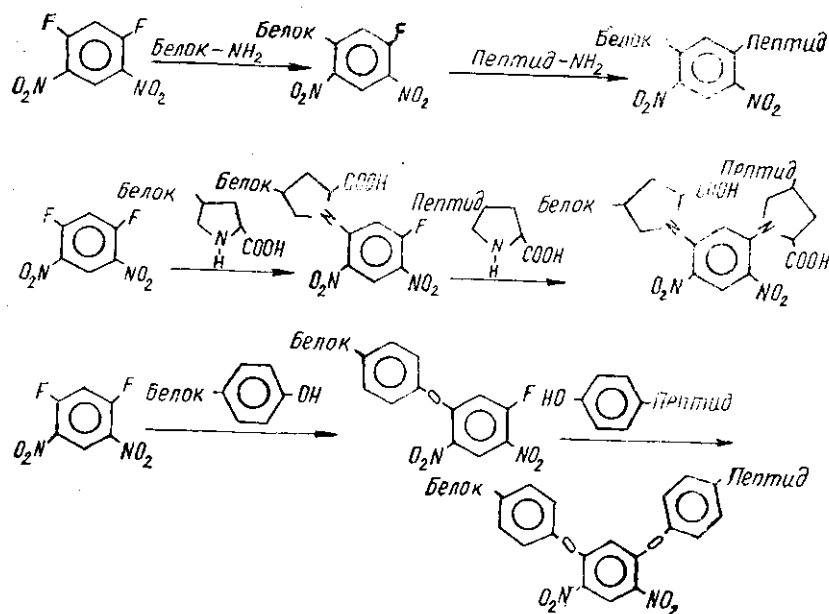


KDQQLWGCSGKLICTT(G) из белка *gp41* (584—611) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) конъюгировали с желатиной, превращенной в ОСи обработкой TFS [54].

Диизоцианаты. Диизоцианаты, как известно, легко реагируют со свободными аминогруппами белков и пептидов. Чаще других в реакции конъюгации применяется толуилен-2,4-диизоцианат. Поскольку изоцианатная группа в позиции 4 более реакционноспособна, чем в позиции 2, синтез можно осуществлять в две стадии (см. с. 5).

На первой стадии, проводимой при 0 °С, толуилен-2,4-диизоцианат взаимодействует изоцианатной группой в положении 4 с белком-носителем. Затем, на второй стадии (при 37 °С), полученный продукт реагирует с аминогруппами конъюгируемого пептида. Так с использованием данного реагента был конъюгирован инсулин с БСА [55].

Динитродифторбензол. Для получения конъюгатов пептид — белок используют 1,5-дифтор-2,4-динитробензол, который может реагировать с амино-, имино- и гидроксильными группами конъюгируемых белков и пептидов по схеме:

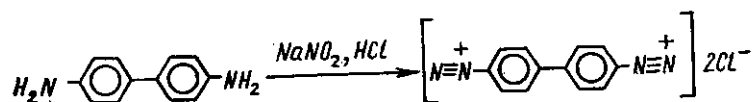


Замещение атомов фтора в молекуле динитродифторбензола может осуществляться последовательно, и, таким образом, на первой стадии реакции происходит сшивка белка за счет атаки по одному реакционному центру молекулы. При этом образуется фтординитрофенильное производное белка (F-DNP-белок). Далее можно использовать оставшийся второй реакционный центр F-DNP-остатка и провести его реакцию с пептидом, получив в итоге пептид-белковый конъюгат.

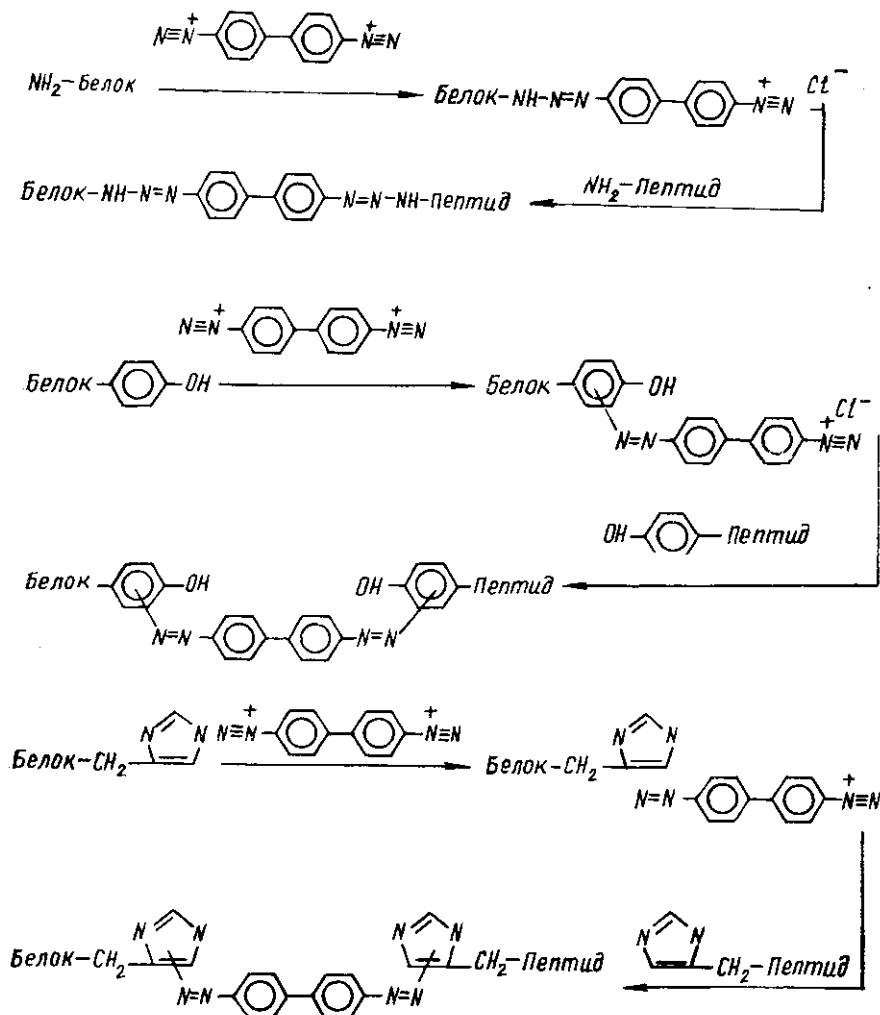
Тагер исследовал присоединение двух модельных пептидов (брадикинин и глюкагон) к БСА, используя динитродифторбензол [56]. Пептиды превращали в DNP-производные в присутствии избытка реагента в водно-органическом растворителе. После удаления непрореагировавшего реагента активированный пептид конъюгировали с белком-носителем в водном растворе. Эффективность связывания достигала 90 %. Тем не менее, соотношение пептид/белок легко изменялось выбором условий реакции. В зависимости от концентрации реагентов соотношение пептид/белок в конъюгатах варьировало от 1 до 40.

Бис-диазотированный бензидин. Благодаря простоте метода и доступности диазониевых соединений последние часто используются в реакции конъюгации пептидов с белками-носителями. Бифункциональный сшивающий реагент с диазониевой функциональной группой можно по-

лучить из легкодоступного соединения — бензидина — диазотировани-
ем азотистой кислотой:



Диазониевая группа бис-диазотированного бензидина (BDB) легко реагирует со свободными аминогруппами белков и пептидов, образуя прочную ковалентную связь. Кроме того, BDB может реагировать с ядрами тирозина и гистидина:

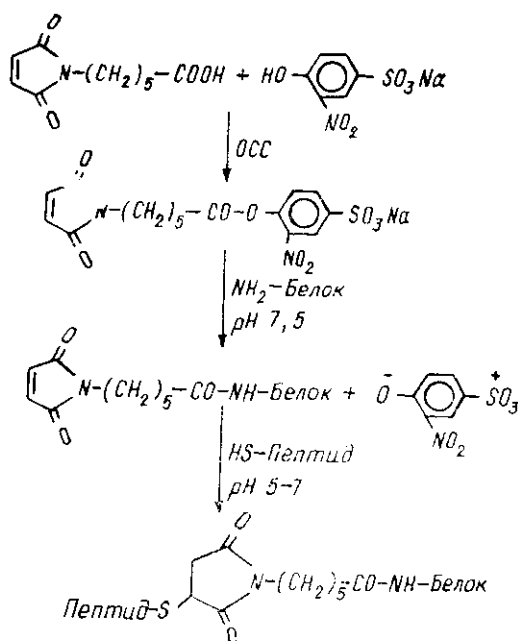


В работе [30] авторы применили BDB для конъюгации пяти синтетических пептидов, включающих различные потенциальные эпитопы α- и β-тубулина с гемоцианином улитки. При синтезе во все пять пептидов вводили радиоактивный остаток трет-бутилоксикарбонил (Boc)-[³H]-Leu или Boc-[³H]-Val.

BDB также использовали для присоединения четырех N-концевых синтетических пептидов из α-, β-, γ- и δ-субъединиц ацетилхолинового рецептора *Torpedo californica* и четырех C-концевых синтетических пептидов из этих субъединиц к БСА [57].

Волтер с соавт. [20] конъюгировали с помощью BDB N-концевой синтетический пептид Ac-MDKVLNR(Y) из большого опухолевого антигена SV40 с БСА.

N-малеинимидо-6-аминокапроноилвый эфир 1-гидрокси-2-нитро-4-бензоилсульфоновой кислоты. Новый водорастворимый гетеробифункциональный сшивающий реагент N-малеинимидо-6-аминокапроноилвый эфир 1-гидрокси-2-нитро-4-бензоилсульфоновой кислоты (mal-sac-HNSA) был синтезирован и использован для конъюгации пептидов, содержащих сульфгидрильную группу, с белками-носителями [58].

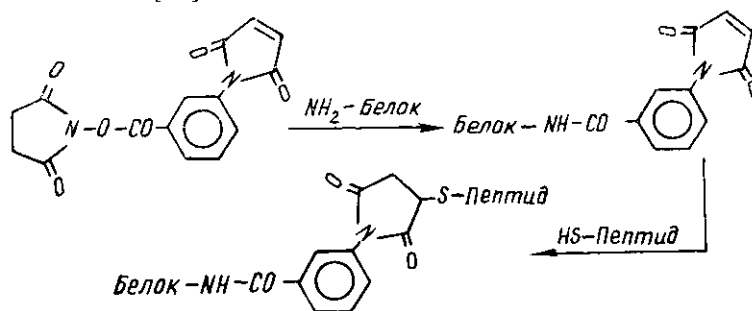


При сшивке белка с пептидом вначале обрабатывают реагентом белок, в результате чего образуется 6'-N-малеинимидокапроиламидо-производное белка, которое далее способно реагировать с SH-группами пептидов по схеме присоединения по C=C-связи малеинимидного остатка.

Реагент удобен тем, что он более стабилен в водных растворах по сравнению с рядом описанных выше соединений [59], а также тем, что фрагмент 6-аминокапроновой кислоты оказался удачным спейсером для макромолекул [60, 61].

С помощью этого реагента синтезировано более 100 конъюгатов пептид — белок, обладающих высокой потенциальной иммуногенностью и не вызывающих образования антител, специфичных к спейсеру [62, 63]. Кроме того, специфические антитела различили замену одного аминокислотного остатка в синтетических пептидах, выбранных из онкогенного белка *p21-ras*.

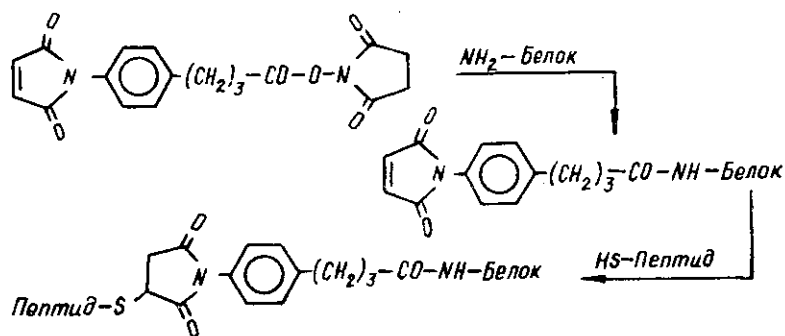
N-гидроксисукцинимидные эфиры. Широкое применение для получения конъюгатов белок — пептид нашли OSu-эфиры [64]. Среди OSu-эфиров, используемых в качестве гетеробифункциональных реагентов, наиболее часто применяется малеинимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (MBS) [12, 15, 26, 29, 64—67], синтезированный в 1976 г. Катагава с соавт. [68].



Реакция конъюгации основывается на ацилировании аминогруппы белка активированным OSu и образовании тиоэфирной связи сульфгидрильной группой пептида с малеинимидом.

Этот реагент обладает высокой эффективностью связывания, а также селективностью, однако димеризация белка исключается неполностью, так как малеинимидные группы реагируют и с амино-, и сульфгидрильными группами белка. Недостатком метода является окисление на воздухе пептидов, содержащих SH-группы.

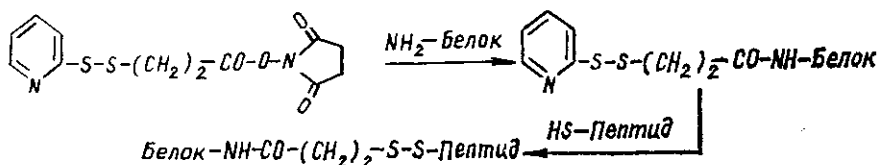
Сукцинимидил-4-(*p*-малеинимидофенил)бутират (SMPB) [68] — гетеробифункциональный реагент — взаимодействует подобно MBS со свободными аминогруппами, ацилируя их через OSu-группу, и на второй стадии — с SH-группами, присоединяя серу по двойной связи малеинимида:



В работе [69] авторы использовали SMPB для присоединения синтетического пептида из холецистокинина: GNPPAEVNGKTPNC к миоглобину.

Хотя OSu SMPB быстро реагирует с первичными аминогруппами белка-носителя при pH 8,0, малеинимидные группы конъюгата SMPB — белок обладают слабой реакционной способностью при этих значениях pH. Но если реакцию осуществлять при pH 3,9, эффективность образования конъюгата значительно возрастает. Поэтому в эксперименте SMPB реагировал с миоглобином при pH 8,0, затем pH снижали и проводили реакцию присоединения пептида к SMPB-миоглобину. Анализ аминокислотного состава конъюгата показал, что соотношение пептид/белок в конъюгате было около 1/1—1/2 (моль/моль).

Для конъюгации пептид — белок также широко используется следующий представитель OSu-эфиров — N-сукцинимидил-3-(2'-пиридилитию)пропионат (SPDP) [70]. Преимущества реагента состоят в относительно мягких условиях реакции, превосходной возможности контролировать межмолекулярное связывание. SPDP-производное белка образуется реакцией между аминогруппами белка и OSu-реагента. На второй стадии происходит реакция связывания между пиридилдисульфидной частью SPDP-производного белка и нативными или специально введенными SH-группами пептида.



Замечено, что SPDP-производные белков часто выпадают в осадок. Преципитацию объясняли либо изменением конформации благодаря уменьшению числа свободных аминогрупп, либо введением гидрофобных PDP-групп [71].

Синтетический пептид: YDRPEGIEEEGGGEERDRDRSGC, соответствующий последовательности 735—752 гликопротеина оболочки вируса

T-клеточного лейкоза человека, был конъюгирован через SH-группу цистеина с аминокруппами гемоцианина улитки и БСА посредством этого реагента. Эффективность реакции, определенная по числу связанного ^{125}I -меченного пептида, присоединенного к гемоцианину улитки и БСА, была приблизительно 62 и 68 % соответственно [67].

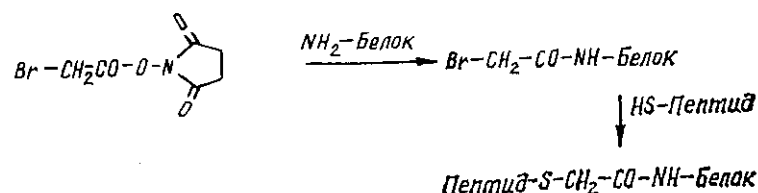
SPDP также применяли для конъюгации 36-членного синтетического пептида из поверхностного белка *preS1* вируса гепатита В с антигеном HBsAg [72] и конъюгации синтетического пептида TVGRGDPHQ из филаментозного гемагглютинина *Bordetella pertussis* с сывороточным альбумином человека [73].

Влияние спейсера, образованного между пептидом и белком с помощью OSu-эфиров, на антигенность и иммуногенность конъюгатов изучали Петерс с соавт. [74]. Для присоединения ангиотензина к столбнячному анатоксину были использованы четыре различных гетерофункциональных реагента: три из них были «маленимидного» типа — сукцинимидил-6-(N-маленимидо)гексаноат (SMH), сукцинимидил-4-(N-маленимидометил)циклогексил-1-карбоксилат (SMCC) и MBS, а один — активированный дисульфид (SPDP). Антитела вырабатывались к белку-носителю, пептиду и спейсеру. Были отмечены различия в выработке антител к спейсеру. Так, 1) SPDP-спейсер, содержащий алифатический дисульфид, почти не индуцировал выработки антител; 2) спейсер, образованный SMH и представляющий собой подвижную алифатическую цепь, связанную дисульфидным мостиком с сукцинимидным кольцом, вызывал несколько большую выработку антител; 3) спейсеры, образованные SMCC и MBS и содержащие дополнительное циклоалифатическое или ароматическое кольцо, индуцировали выработку антител с высоким титром (10^{-4} — 10^{-5}).

В работе [75] показано, что сшивающие реагенты, такие как глutarовый альдегид, карбодимиды, или реагенты, содержащие ароматические группы, образуют спейсеры, к которым также вырабатываются антитела. Алдвин и Нитецки [58] отмечали, что пептид-белковые конъюгаты, полученные с использованием mal-sac-HNSA, не индуцировали выработки антител, специфичных к спейсеру. При конъюгации с применением SMH образуется спейсер, аналогичный mal-sac-HNSA и также не индуцирующий образования антител.

Таким образом, сшивающие реагенты SMH и SPDP предпочтительнее SMCC и MBS, так как спейсеры, образованные в результате их применения, почти не вызывают выработки антител, обладают большей подвижностью и хорошей растворимостью в водных растворах. Недостатком SPDP является наличие связи —S—S—, которая склонна к восстановлению. В отличие от этого тиоэфирная связь SMH значительно стабильнее.

С помощью OSu-эфира бромуксусной кислоты получали активированные производные сефарозы [76] и аффинные реагенты [77—80]. Эти исследования позволили Бернатович с соавт. [81] применить данное соединение для синтеза конъюгатов пептид—белок:

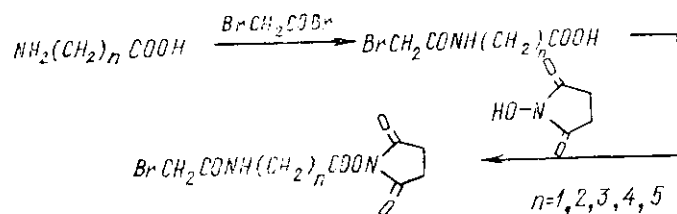


На первой стадии реакции свободные аминокруппы белков бромацетилируются избытком этого реагента. Низкомолекулярные продукты реакции, возникающие в процессе гидролиза реагента, удаляются гelfильтрацией. На второй стадии реакции бромацетилированный белок взаимодействует с SH-группами цистеинсодержащих пептидов, образуя стабильную тиольную связь между пептидом и белком.

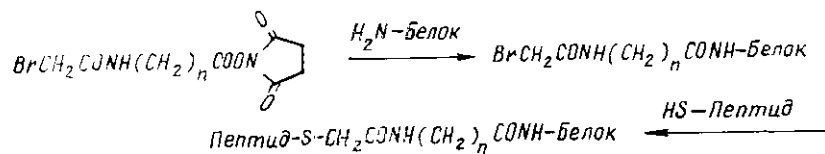
Ряд синтетических пептидов из β-цепи фибрина человека был конъюгирован с тремя белками-носителями.

Данный реагент использован также для присоединения синтетического пептида GAYKSSKDDAKGC позиции 169—179 IL-1α человека к гемоцианину улитки [82]. Эпитопная плотность данного конъюгата была 1/400.

N-(бромацетиамидо-*n*-алканоилокси)сукцинимиды. Зайцу с соавт. [83] синтезировали и предложили для получения конъюгатов белок — белок и пептид — белок новую серию гетеробифункциональных реагентов — N-(бромацетиамидо-*n*-алканоилокси)сукцинимиды, синтезируемые по схеме:



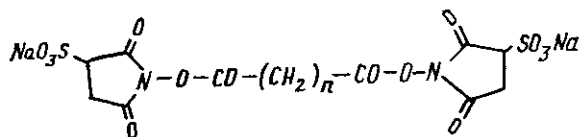
N-сукцинимидная часть таких реагентов взаимодействует с первичными аминогруппами белка, давая бромацетильное производное. Далее это производное вступает в реакцию с сульфгидрильными группами белка или пептида через бромацетильные группы, образуя конъюгат белок — белок или пептид — белок:



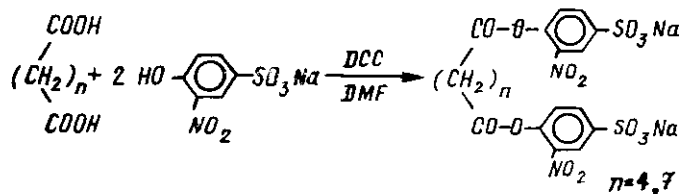
С помощью данного реагента получен конъюгат инсулина с пероксидазой хрена в молярном соотношении 1/1 [83].

Бис(2-нитро-4-сульфофениловые) эфиры дикарбоновых кислот. Впервые для синтеза пептидов в водной среде бис(2-нитро-4-сульфофениловые) (Nsp) эфиры были предложены Гершковичем и Серебряным [84—86] и независимо Клауснером с соавт. [87] в 1977 году. Nsp-эфиры N-DNP-лейцина и адамантанкарбоновой кислоты были применены для получения конъюгатов гаптен — белок [88—90].

В 1982 году Старос [91] предложил перспективные бифункциональные реагенты — бис(N-оксисукцинимидные) эфиры дикарбоновых кислот:

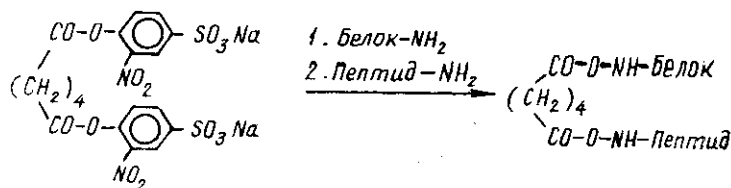


Позднее [92] были получены Nsp-эфиры адипиновой и азелаиновой кислот по схеме:



С помощью Nsp-эфира адипиновой кислоты синтетический пептид IPDGDF из капсидного белка X-вируса картофеля и синтетический

пептид YAFDFYEVTSR из капсидного белка Y-вируса картофеля были конъюгированы с БСА по схеме [93]:

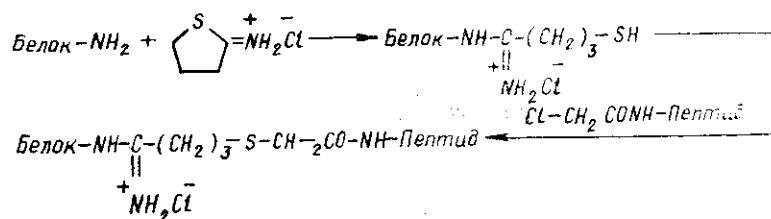


Nsp-эфиры адипиновой и азелаиновой кислот водорастворимы, устойчивы к гидролизу, обладают высокой реакционной способностью. Скорость их гидролиза в водно-щелочной среде (рН 7,5—9,0) значительно ниже таковой их аминолитиза, а скорость ацилирования белков и пептидов выше или сравнима со скоростью ацилирования соответствующими OSu-эфирами. Указанные достоинства Nsp-эфиров используются для создания нового бифункционального реагента Nsp-эфира малеимида-6-аминокапроновой кислоты [58]. Реагент успешно применяли для конъюгации цистеинилсодержащих пептидов с белком-носителем.

Автоматический синтезатор пептидов стал ценным средством для получения пептидов. Сейчас остро ставится задача расширения стратегии синтеза пептидов, содержащих высокореакционные группы. Пептиды, имеющие реакционноспособные группы, широко применяются для ковалентного присоединения последних к различным соединениям с нуклеофильными группами. На пептидном синтезаторе представляется возможным вводить реакционноактивные группы в необходимый аминокислотный остаток синтезируемого пептида.

На протяжении последних лет в лаборатории биохимии и биофизики Центра лекарств и биологических соединений в Бетезде (США) получают антитела к синтетическим пептидам и разрабатывают стратегию химии конъюгации пептид — белок. Цель исследований данной лаборатории — оптимизировать реакцию конъюгации таким образом, чтобы реакционноспособная часть пептида оставалась интактной и сайт пептида, по которому идет конъюгация, являлся универсальным. Автоматический пептидный синтезатор представляет собой удобный инструмент для введения в нужные позиции синтетического пептида реакционноспособных групп, которые могут реагировать с различными функциональными группами в белке-носителе. Здесь мы остановимся на двух работах, выполненных в этой лаборатории [94, 95].

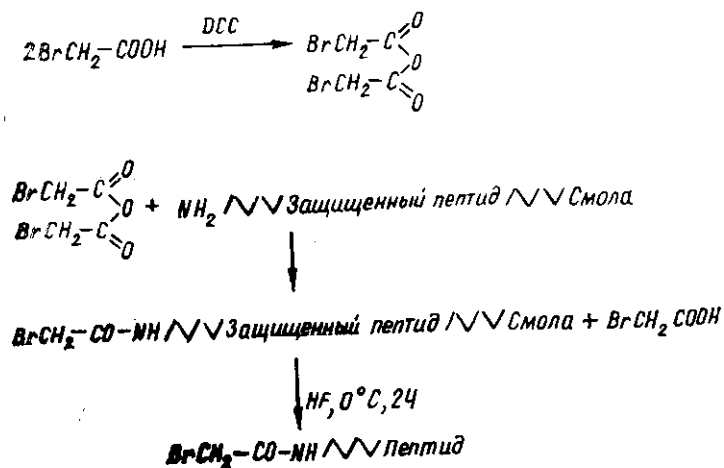
Для присоединения N-хлорацетильной группы к N-концевому остатку синтетических пептидов использовали стандартную программу для автоматического синтезатора пептидов. Схема конъюгации N-хлорацетилированных пептидов с белками-носителями следующая:



Модифицированный N-хлорацетилпептид реагирует с белками, содержащими сульфгидрильные группы, например с БСА, модифицированным 4-меркаптобутиримидом, образуя стабильные белок-пептидные конъюгаты. При включении цистеина в синтетический пептид автополимеризация или циклизация последнего осуществляется реакцией свободной сульфгидрильной группы с хлорацетильной группой. N-хлорацетильные производные пептидов могут быть использованы для получения потенциальных пептидных иммуногенов и вакцин.

Позднее в этой лаборатории был разработан метод присоединения N-бромацетильного остатка к N-концевому аминокислотному остатку синтетических пептидов.

Все стадии реакции осуществляются на автоматическом синтезаторе пептидов, хотя, как указывают авторы, реакцию можно проводить и ручным способом. Симметричный ангидрид бромуксусной кислоты был получен реакцией бромуксусной кислоты с *N,N'*-дициклогексилкарбодимидом в хлороформе. Ангидрид бромуксусной кислоты взаимодействовал с *N*-концевой аминогруппой пептида на смоле, образуя амидную связь. Окончательно с пептида снимали защиту и отщепляли от смолы обработкой безводным фтористым водородом.



N-Бромацетильные производные пептидов, как отмечают авторы, могут быть весьма полезными для синтеза потенциальных пептидных иммуногенов, вакцин, терапевтических препаратов и промежуточных продуктов в производстве твердых носителей, имеющих на поверхности пептиды.

Дрийфхоут с соавт. [39] сообщили о новом селективном методе получения конъюгатов пептид — белок. Конъюгация основана на реакции между 3-нитропиридил-2-дитио-группой (*S-Npys*) пептида и сульфгидрильными группами белка.

Три пептида из гликопротеина вируса герпеса симплекса: ААТРУНРРАТPNNLe-OH, GDDPSPAAKSAVTAQE-OH, НРТТЕLDITHLI-OH были синтезированы Фмос-полиамидным методом. После снятия *N*-концевой защиты *Вос-Cys-Npys*-OH присоединяли к пептиду. Снимали защиту с *Npys*-цистеинил пептида, отщепляли от смолы и очищали. Белок-носитель (БСА) модифицировали *S*-ацетилмеркаптосукциновым ангидридом. Взаимодействие *S*-ацетилированного БСА и *Npys*-цистеинил пептида при pH 7—8 проходит полностью за несколько часов. Причем одновременно в реакционную смесь добавляют гидрохлорид гидразингидрата для удаления ацетильной защиты и *S*-ацетилированного БСА (см. верхнюю схему на с. 14).

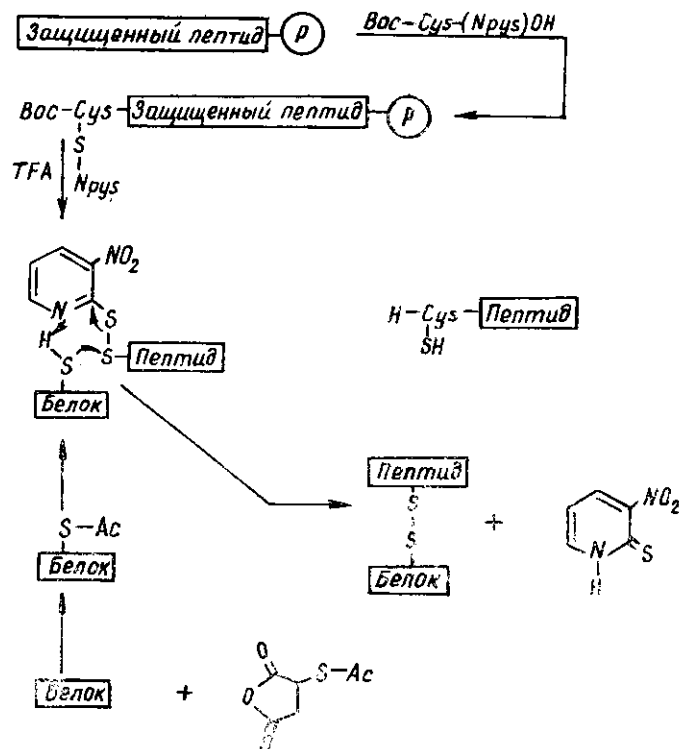
Реакцию можно контролировать по выделению 3-нитро-2-тиопиридона, который изменяет цвет реакционной смеси до темно-желтого. Реакционную смесь разделяли с помощью гель-фильтрации на белковую фракцию, пептидную фракцию (в случае использования избытка *Npys*-цистеинил пептида) и третью желтую фракцию, содержащую 3-нитро-2-тиопиридон. Эпитопная плотность конъюгата, определенная по количеству выделившегося в процессе реакции 3-нитро-2-тиопиридона, достигала 11—15 молей пептида на моль белка. Это также было подтверждено аминокислотным анализом конъюгатов.

Преимущества этого метода состоят в следующем: 1) конъюгация белка с пептидом проходит селективно; 2) количество связываемого и 3) связанного пептидов можно легко контролировать; 4) сама *Npys*-группа является хромофором и легко определяется.

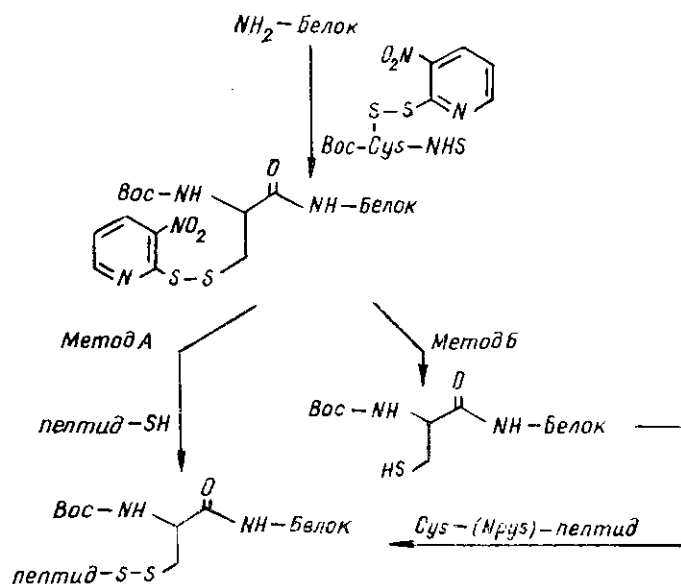
OSu-эфир *Вос-Cys-Npys*-OH — удобный гетеробифункциональный реагент для получения конъюгатов пептид — белок с химически регистрируемым образованием дисульфидных связей. Следует отметить, что

данный реагент пригоден для введения свободных сульфгидрильных групп в белок. Этот метод подобен способам тиолирования белков, при которых используют 2-иминотиолап [96] и SPDP [70].

Вос-Cys-Npys-OH применен Бернатович с соавт. [75] для получения пептид —S—S— БСА конъюгатов.



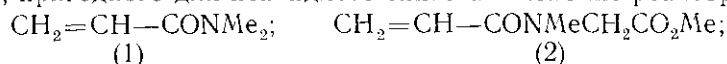
На первой стадии реакции OSu-эфир *Вос-Cys-Npys-OH* взаимодействует с аминогруппами белка. Образовавшийся *Сус-Npys*-модифицированный белок далее реагирует непосредственно с пептидом, содержащим свободные SH-группы (метод А) или его восстанавливают дитиотреитолом для получения тиолированного белкового производного, которое реагирует с *Сус-Npys*-содержащим пептидом (метод Б). В обоих случаях конъюгат содержит —S—S—мостик между пептидом и белком.



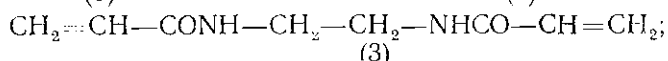
Три синтетических пептида из фибрина человека: GHRPLDKC (1), Ac-Cys-Npys-GEQHHPGGGAKQA-NH₂ (2) и его циклическое производное (3) конъюгировали с БСА. Количество связанного пептида определяется соотношением пептида и белка в реакционной смеси, и для получения максимальной эпитопной плотности требуется 4-кратный молярный избыток пептида в расчете на свободные SH-группы белка. Эпитопная плотность зависит от числа SH-или Npys-групп в белке, которые в свою очередь лимитируются относительно низкой растворимостью OSu-эфира Boc-Cys-Npys-OH в водных растворах.

Альберицино с соавт. [97] использовали Npys-группу для защиты SH-группы цистеина при синтезе 9 пептидов. Наряду с применением в качестве защиты Npys-группа способна реагировать с тиольными группами белка, образуя стабильные дисульфидные связи. Реакция легко осуществляется при слабых и нейтральных pH и позволяет избежать дополнительных процедур.

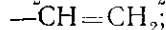
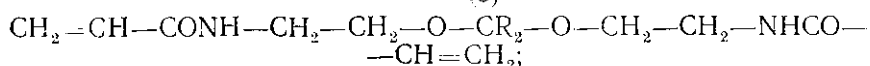
Известно, что иммуногенность коротких пептидов значительно увеличивается при присоединении к большим молекулам-носителям до иммунизации. Отсюда возникает необходимость в получении полимерного носителя, пригодного для твердофазного синтеза пептидов, который в дальнейшем с присоединенным пептидом мог бы служить в качестве водорастворимого иммуногенного носителя. Такой носитель недавно был синтезирован Годдард с соавт. [98]. При проведении синтеза он находится в нерастворимой форме, после окончания — может быть растворим и пригоден для иммунизации, а также для иммуноанализа. Синтез пептидов осуществляли на нерастворимых поперечносшитых поли(диметилакриламидных) гелях, полученных сополимеризацией диметилакриламида (1), метилового эфира акрилоилсаркозина (2) (функциональный агент) и этиленбисакриламида (3) (поперечносшивающий агент) [98]. Линейный поли(диметилакриламид) водорастворим, и авторы сконструировали новые поли(диметилакриламиды), в которых соединение (3) было заменено. Использование щелочноустойчивых и кислотолабильных структур в комбинации с Fmoc-стратегией синтеза пептидов способствовало образованию растворимого полимера с одновременным отщеплением Boc-группы от синтезируемого пептида. Полностью кислоторастворимый полимер получали сополимеризацией соединения (1), поперечносшивающего агента (4; R-Me) и нового функционального агента (5) в молярных соотношениях 17,6 : 1,2 : 1 в диметилформамиде. Соединение (5) было получено последовательным акрилоилированием и ацелированием в 6-аминогексанол. Полимеризация в частицах макропористого Кизельгура приводила к выходу связанного полимера, пригодного для пептидного синтеза в колонке реактора [100].



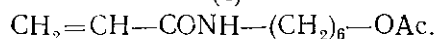
(1) (2)



(3)



(4)



(5)

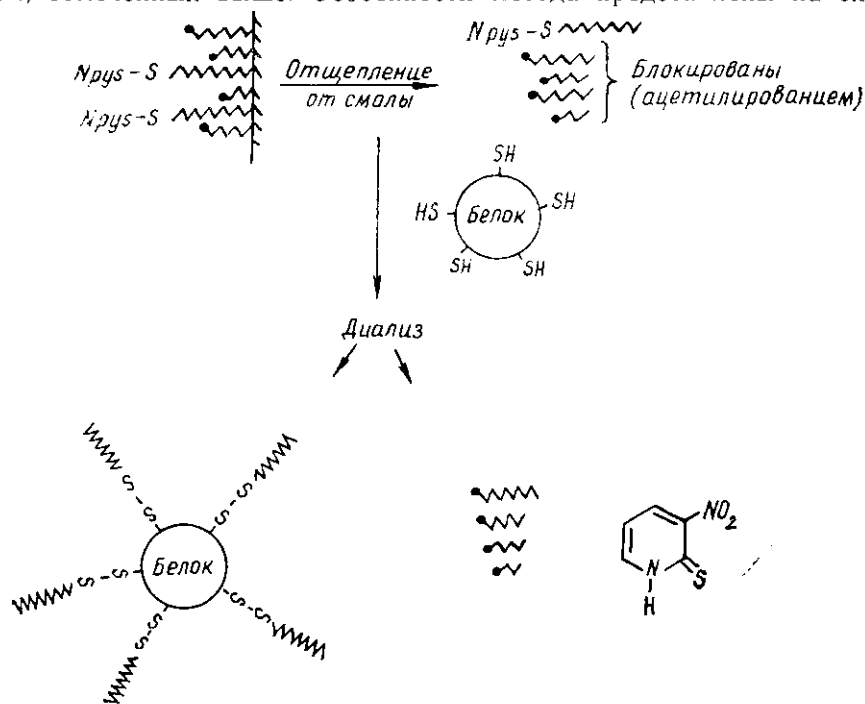
Пептиды: RPKPQQFFGLNle, HKTDSFVGIMG, входящие в вещество P и вещество K (нейрокинин А) соответственно, получены на этом нерастворимом полимерном носителе с помощью Fmoc-стратегии. Оба пептид-полимерных конъюгата были иммуногенными для кроликов.

Таким образом, использование нерастворимых гелей в твердофазном синтезе, которые в дальнейшем могут стать растворимыми, является весьма ценным приемом. При этом не требуется специального отщепления синтетических пептидов, что позволяет быстро и просто получать необходимые иммуногены. Такой подход открывает практические возможности для экономичного широкомасштабного производства

пептидных вакцин. Кроме того, эти носители играют роль адъювантов, в связи с чем являются удобным инструментом в иммунологических исследованиях.

Реагенты, описанные выше, модифицируют белок-носитель, что может вызывать значительные изменения в его структуре. Такие гетеробифункциональные реагенты, как MBS и SPDP, достаточно специфичны, но проведение реакции с ними требует значительного времени, потому что модифицированный белок необходимо подвергать очистке перед реакцией с пептидом. Гомобифункциональные реагенты (глутаровый альдегид и BDB) проще в использовании, но недостаточно специфичны и часто слишком реакционноспособны. Это приводит к нежелательному результату, так как различные аминокислотные остатки пептида, вступающие в реакцию, образуют многочисленные поперечные сшивки и вызывают агрегацию белка-носителя [51, 101].

В работе [18] описывается метод синтеза пептидов и их конъюгации с белком-носителем, который сводит к минимуму большинство проблем, отмеченных выше. Особенности метода представлены на схеме:



и состоит в следующем: 1) присоединение к N-концевому остатку синтезируемого пептида цистеина, защищенного $N\text{-pys}$ -группой; 2) постоянное ацелирование всех нереагирующих аминогрупп во время твердофазного синтеза; 3) специфическое присоединение $N\text{-pys}$ -защищенного пептида к SH -группам молекулы носителя. Постоянное ацелирование пептида в процессе синтеза дает химически однородный конъюгат. Подобным методом был конъюгирован тридекапептид $(N\text{-pys})\text{-CVNYIRKRSLSQTV-OH}$, соответствующий последовательности 141—153 белка $L270$ вируса лихорадки африканской свиньи (N-концевой цистеин был введен дополнительно), с БСА и гемоцианином улитки. При синтезе пептида преднамеренно использовали недостаточные количества реагентов, чтобы получить смесь пептидов различной длины. Все укороченные пептиды включали ацелированный N-концевой аминокислотный остаток, за исключением целевого, имеющего на N-конце $N\text{-pys}$ -защищенный цистеин. Смесь пептидов конъюгировали с белками-носителями, в результате чего образовывался конъюгат, содержащий только целевой пептид. Этот изящный прием дает возможность селективно присоединять из смеси пептидов различной длины только определенный пептид.

Дитцген с соавт. [102] предложили новый поперечносшивающий реагент *трет*-бутилоксикарбонил гидразид янтарной кислоты. Этот реагент присоединяли к синтетическому эфиру тетрапептида GPAT(Bu⁺)-OBu⁺ (С-концевой тетрапептид капсидного белка вируса табачной мозаики) с помощью 1-гидроксibenзтриазол/Н, N'-дициклогексилкарбодиимида. После обработки трифторуксусной кислотой был выделен свободный гидразид HSc-GPAT×CF₃COOH, готовый для азосочетания. Активированный пептид конъюгировали с сывороточным альбумином человека и поли-*L*-лизинном (молекулярная масса 80 000).

В настоящее время для получения конъюгатов пептид — носитель применяется большой арсенал реагентов и методов, а их выбор зависит от целей и задач, которые ставит перед собой исследователь.

Резюме. В огляді розглянуто гомо- та гетеробіфункціональні поперечносшивальні реагенти і методи їх застосування при отриманні кон'югатів пептид — носіїв. Запропоновані реагенти і методи широко використовуються при вивченні антигенної структури білків, конструюванні хімічних (синтетичних) вакцин, а також є корисними у вирішенні однієї з основних проблем фізико-хімічної біології — білок-білкового пізнавання.

Summary. Homo- and heterobifunctional reagents and methods for their using to obtain immunoconjugates on the basis of peptide's antigenic determinants are reviewed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Das M., Fox C. F. Chemical cross-linking in biology // *Ann. Rev. Biophys. and Bieng.*— 1979.— 8.— P. 165—193.
2. Butler V. F., Jr. The immunological assay of drugs // *Pharmacol. Revs.*— 1978.— 29, N 2.— P. 103—184.
3. Ковалев И. Е., Полевая О. Ю. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям.— М.: Наука, 1985.— 304 с.
4. Han K.-K., Richard C., Delacourte A. Chemical cross-links of proteins by using bifunctional reagents // *Int. J. Biochem.*— 1984.— 16, N 2.— P. 129—145.
5. Feeney R. E. Chemical modification of proteins: comments and perspectives // *Int. J. Peptide Protein Res.*— 1987.— 29, N 2.— P. 145—161.
6. Muller S. Peptide-carrier conjugation // *Synthetic polypeptides as antigens.*— Amsterdam: Elsevier, 1988.— 350 p.
7. Sela M., Arnon R. Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. 1. Antigenicity of polypeptidyl gelatins // *Biochem. J.*— 1960.— 75, N 1.— P. 91—102.
8. Sela M., Arnon R. Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. 2. Antigenic specificity of polytyrosyl gelatins // *Ibid.*— P. 103—109.
9. Sela M., Arnon R. A. Specific synthetic polypeptide antigen // *Biochim. et biophys. acta.*— 1960.— 40, N 2.— P. 382—384.
10. Selu M. Antigenicity: some molecular aspects // *Science.*— 1969.— 166, N 3.— P. 911, 1365—1474.
11. Arnon R. Immunity of viral and rickettsial disease.— New York: Plenum press, 1972.— 209 p.
12. Schaaper W. M. M., Lankhof H., Puijk W. C., Meloen R. H. Manipulation of anti-peptide immune response by varying the coupling of the peptide with the carrier protein // *Mol. Immunol.*— 1989.— 26, N 1.— P. 81—85.
13. Rhodes G., Houghten R., Taulane J. P. et al. The immune response to Epstein-Barr nuclear antigen conformational and structural features of antibody binding to synthetic peptides // *Ibid.*— 1984.— 21, N 11.— P. 1047—1054.
14. Dyson J. H., Wright P. E., Lerner R. A. The immunodominant site of a synthetic immunogen has a conformational preference in water for a type-II reverse turn // *Nature.*— 1985.— 318, N 6045.— P. 480—483.
15. Geysen H. M., Barteling S. J., Meloen R. H. Small peptides induce antibodies with sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1985.— 82, N 1.— P. 178—182.
16. Dyrberg T., Oldtone M. B. A. Peptides as antigens. Importance of orientation // *J. Exp. Med.*— 1986.— 164, N 4.— P. 1344—1349.
17. Marini S., Bannister J., Giardina B. A simple method for increasing hapten immunogenicity by a specific structural modification of the carrier // *J. Immunol. Meth.*— 1989.— 120, N 1.— P. 57—63.
18. Ponsati B., Giralt E., Andreu D. A. A synthetic strategy for simultaneous purification-conjugation of antigenic peptides // *Analyt. Biochem.*— 1989.— 181, N 2.— P. 389—395.

19. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H. O., et al. Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot and mouth disease virus // *EMBO J.*—1982.— 1, N 7.— P. 869—874.
20. Walter G., Scheidtmann K., Carbone A. et al. Antibodies specific for the carboxy and amino-terminal regions of simian virus 40 large tumor antigen // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.— 77, N 9.— P. 5197—5200.
21. Juillerat M. A., Barkas T., Tzarios S. J. Antigenic sites of the nicotinic acetylcholine receptor cannot be predicted from the hydrophilicity profile // *FEBS Lett.*—1984.— 168, N 1.— P. 143—148.
22. Гребеницкова О. Г., Андрианова Л. Е., Прозоровский В. Н. Антипептидные антитела к участку из активного центра лактатдегидрогеназы свиньи // *Иммунология*—1989.— № 4.— С. 28—31.
23. Beachey E. H., Tartar A., Seyer J. M., Chedid L. Epitope-specific protective immunogenicity of chemically synthesized 13-, 18-, and 23-residue peptide fragments of streptococcal M protein // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.— 81, N 7.— P. 2203—2207.
24. Streckert H.-I., Brussow H., Sure K., Werchau H. Antipeptide antibodies directed against the carboxyl-terminal region of SV40 structural proteins VP2 and VP3 // *J. Cell. Biochem.*—1986.— 31, N 4.— P. 277—287.
25. Babincka A., Cierniewski C. S., Koziolkiewicz W., Janecka A. Specificity of antisera obtained to substance P and its C-terminal hexapeptide // *Int. J. Peptide Protein Res.*—1985.— 25, N 1.— P. 69—75.
26. Pessino A., Gherzi R., Damiani G. et al. Antipeptide antibodies toward the extracellular domain of insulin receptor beta-subunit // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1989.— 162, N 3.— P. 1236—1243.
27. Welling G. W., Fries H. Choice of peptide and peptide length for the generation of antibodies reactive with the intact protein // *FEBS Lett.*—1985.— 182, N 1.— P. 81—84.
28. Schutze M.-P., Leclerc C., Jolivet M. et al. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines // *J. Immunol.*—1985.— 135, N 4.— P. 2319—2322.
29. Altman A., Cardenas J. M., Houghten R. A. et al. Antibodies of predetermined specificity against chemically synthesized peptides of human interleukin 2 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.— 81, N 7.— P. 2176—2180.
30. Andreu D., De La Vina S., Andreu J. M. Chemical synthesis of five tubulin antigenic sequences. Production and characterization of their corresponding anti-tubulin monospecific antibodies // *Int. J. Peptide Protein Res.*—1988.— 31, N 6.— P. 555—566.
31. Askelof P., Rodmalm K., Abens J. et al. Use of synthetic peptides to map antigenic sites of *Bordetella pertussis* toxin subunit S1 // *J. Infect. Diseases.*—1988.— 157, N 4.— P. 738—742.
32. Петров Р. В., Иванов В. Т., Кожич А. Т. Выявление антител против HIV-1 и HIV-2 с помощью синтетических антигенных детерминант // *Иммунология*.—1990.— № 2.— С. 12—15.
33. Bowes J. H., Cater C. W. The interaction of aldehydes with collagen // *Biochem. et biophys. acta.*—1968.— 168, N 2.— P. 341—352.
34. Hubeeb A. F. S. A., Hiramoto R. Reaction of proteins with glutaraldehyde // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1968.— 126, N 1.— P. 16—26.
35. Tramezzani J. H., Chiocchio S., Wasserman G. F. A technique for light and electron microscope identification of adrenalin- and noradrenalin-storing cells // *J. Histochem. and Cytochem.*—1964.— 12, N 12.— P. 890—899.
36. Wilson C. O. Textbook of organic and pharmaceutical chemistry // Eds. C. O. Wilson, O. Giswold.— Philadelphia: Lippincott Co, 1971.— P. 155.
37. Monsan P., Puzo G., Mazarguil H. On the mechanism of the formation of glutaraldehyde-protein bounds // *Biochemie.*—1975.— 57, N 11—12.— P. 1281—1292.
38. Peters K., Richards F. M. Chemical cross-linking: reagent and problems in studies of membrane structure // *Ann. Rev. Biochem.*—1977.— 46.— P. 523—551.
39. Drijfhout J. W., Perdijk E. W., Weijer W. J., Bloemhoff W. Controlled peptide-protein conjugation by means of 3-nitro-2-pyridinesulfonyl protection-activation // *Int. J. Peptide Protein Res.*—1988.— 32, N 3.— P. 161—166.
40. Jolivet M., Lize L., Gras-Masse H. et al. Polyvalent synthetic vaccines: relationship between T epitopes and immunogenicity // *Vaccine*—1990.— 8, N 1.— P. 35—39.
41. Goodfriend T. L., Levine L., Fasman C. D. Antibodies to a synthetic peptide corresponding to the N-terminal and of mouse gamma interferon (IFN) // *Science.*—1964.— 144, N 3624.— P. 1344—1346.
42. Weernink P. A. O., Rijkse G., Staal G. E. J. Production of a specific antibody against pyruvate kinase type M2 using a synthetic peptide // *FEBS Lett.*—1988.— 263, N 2.— P. 391—395.
43. Shapira M., Jibson M., Muller G., Arnon R. Immunity and protection against influenza virus by synthetic peptide corresponding to antigenic sites of hemagglutinin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.— 81, N 8.— P. 2461—2465.
44. Muller G. H., Shapira M., Arnon R. Anti-influenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate // *Ibid.*—1982.— 79, N 2.— P. 569—573.
45. Reichert C. M., Carelli C., Jolivet M. et al. Synthesis of conjugates containing N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl (MDP). Their use as hapten-carrier systems // *Mol. Immunol.*—1980.— 17, N 3.— P. 375—383.

46. *Atassi M. Z., Kazim A. L., Sakata S.* High yield coupling of peptides to protein carriers // *Biochim. et biophys. acta.*—1981.—**670**, N 2.—P. 300—302.
47. *Шибнев В. А., Шарейский А. Н., Валиев Р. В., Халиков Ш. Х.* Некоторые подходы в конструировании функционально активных детерминант на примере гемагглютинина вируса гриппа А (H₃N₂) // *Биоорг. химия.*—1990.—**16**, № 7.—С. 926—932.
48. *Carelli C., Ralamboranto L., Audibert F. et al.* Immunological castration by a totally synthetic vaccine: modification of biological properties of LH-RH after conjugation to adjuvant-active muramyl peptide // *Int. J. Immunopharm.*—1985.—**7**, N 2.—P. 215—224.
49. *Петров Р. В., Хаитов Р. М., Лиознер А. Л. и др.* Индукция антител к вирусам гриппа синтетическими пептид-полиэлектролитными комплексами со специфичностью константной части молекулы гемагглютинина // *Иммунология.*—1985.—№ 5.—С. 24—27.
50. *Staros J. V., Wright R. W., Swingle D. M.* Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions // *Analyt. Biochem.*—1986.—**156**, N 1.—P. 220—222.
51. *Briand J. P., Muller S., Van Regenmortel M. H. V.* Synthetic peptides as antigens—pitfalls of conjugation methods // *J. Immunol. Meth.*—1985.—**78**, N 1.—P. 59—69.
52. *Андреев С. М., Сидорова М. В., Ракова О. А. и др.* Синтез N-оксисукцинимидных эфиров органических кислот и карбоксилсодержащих полимеров с использованием N-трифторацетоксисукцинимидов // *Биоорг. химия.*—1987.—**13**, № 5.—С. 696—700.
53. *Sakakibara S., Inukai N.* The trifluoroacetate method of peptide synthesis. 1. The synthesis and use of trifluoroacetate reagent // *Bull. Chem. Soc. Jap.*—1965.—**38**, N 11.—P. 1979—1984.
54. *Andreev S. M., Meshcheryakova D. B., Vafina M. G., et al.* Analysis of the fine structure of the antigenic determinants of the transmembrane protein in the HIV coat with chemically modified synthetic peptides // *Biomed. Sci.*—1991.—**2**, N 3.—P. 271—278.
55. *Methods in immunology and immunochemistry* / Eds. C. A. Williams, M. W. Chase.—New York, London: Acad. press. 1967.—479 p.
56. *Tager H. S.* Coupling of peptides to albumin with difluorodinitrobenzene // *Analyt. Biochem.*—1976.—**71**, N 2.—P. 367—375.
57. *Ratnam M., Lindstrom J.* Structural features of the nicotinic acetylcholine receptor revealed by antibodies to synthetic peptides // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1984.—**122**, N 3.—P. 1225—1233.
58. *Aldwin L., Nitecki D. E.* A water-soluble, monitorable peptide and protein crosslinking agent // *Analyt. Biochem.*—1987.—**164**, N 3.—P. 494—501.
59. *Kitagawa T., Shimozone T., Aikawa T. et al.* Preparation and characterization of hetero-bifunctional cross-linking reagents for protein modifications // *Chem. Pharm. Bull.*—1981.—**29**, N 4.—P. 1130—1135.
60. *Scott D., Nitecki D. E., Kindler H., Goodman J. W.* Immunogenicity of biotinylated hapten-avidin complexes // *Mol. Immunol.*—1984.—**21**, N 11.—P. 1055—1060.
61. *Hashimoto K., Loader J. E., Kinsky S.* Iodoacetylated and biotinylated liposomes. Effect of spacer length on sulfhydryl ligand binding and avidin precipitability // *Biochim. et biophys. acta.*—1986.—**856**, N 3.—P. 556—565.
62. *Nitecki D. E., Aldwin L.* High-technology route to virus vaccines. // *Amer. Soc. Microbiol.*—Washington, 1985.—217 p.
63. *Aldwin L., Nitecki D. E.* Peptides, structure and function // *Proc. of the 9th Amer. Peptide Symp.*—Toronto, 1985.—P. 31—34.
64. *Herrera R., Petruzzelli L., Thomas N. et al.* An antipeptide antibody that specifically inhibits insulin receptor autophosphorylation and protein kinase activity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—**82**, N 23.—P. 7899—7903.
65. *Lerner R. A., Gren N., Alexander H. et al.* Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis S virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of dane particles // *Ibid.*—1981.—**78**, N 6.—P. 3403—3407.
66. *Liu F.-T., Zinnecker M., Hamaoka T., Katz D. H.* New procedures for preparation and isolation of conjugates of protein and a synthetic copolymer of D-amino acids and immunochemical characterization of such conjugates // *Biochemistry.*—1979.—**18**, N 4.—P. 690—697.
67. *Kennedy R. C., Henkei R. D., Pauletti D. et al.* Antiserum to a synthetic peptide recognizes the HTLV-III envelope glycoprotein // *Science.*—1986.—**231**, N 4745.—P. 1556—1559.
68. *Kitagawa T., Aikawa T.* Enzyme coupled immunoassay of insulin using a novel coupling reagent // *J. Biochem.*—1976.—**79**, N 1.—P. 233—236.
69. *Iwai K., Fukuoka S.-I., Fushiki T. et al.* Preparation of a verifiable peptide-protein immunogen: direction-controlled conjugation of a synthetic fragment of the monitor peptide with myoglobin and application for sequence analysis // *Analyt. Biochem.*—1988.—**171**, N 2.—P. 277—282.
70. *Carlsson J., Drevin H., Axen R.* Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl 3-(2-pyridyl)dithio)propionat, a new heterobifunctional reagent // *Biochem. J.*—1978.—**173**, N 3.—P. 723—737.
71. *Myers D. A., Murdoch W. J., Villemez C. L.* Protein-peptide conjugation by a two-phase reaction // *B. J. Letters.*—1985.—**227**—P. 343.

72. Neurath A. R., Strick N., Girard M. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) as carrier synthetic peptides having an attached hydrophobic tail // *Mol. Immunol.*—1989.—26, N 1.—P. 53—62.
73. Пхакадзе О. Г., Кавун Е. М., Чечот В. А. та ін. Поліклональні антитіла кролів розпізнають сайт філаментозного гемаглютиніну *B. pertussis*, що відповідає за взаємодію з CR-3 рецептором // Тез. VI Укр. біохім. з'їзду.— Київ, 1992.— Ч. III.—С. 107.
74. Peeters J. M., Hazendonk T. G., Bewery E. C., Tesser G. I. Comparison of four bifunctional reagents for coupling peptides to proteins and the effect of the three moieties on the immunogenicity of the conjugates // *J. Immunol. Meth.*—1989.—120, N 1.—P. 133—143.
75. Bernatowicz M. S., Matsueda G. R. The N-hydroxysuccinimide ester of *Boc*-[S-(3-nitro-2-pyridinesulfonyl)]-cysteine: a heterobifunctional cross-linking agent // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1985.—132, N 3.—P. 1046—1050.
76. Cuatrecasas P. Protein purification by affinity chromatography. Derivatization of agarose and polyacrylamide beads // *J. Biol. Chem.*—1970.—245, N 12.—P. 3059—3065.
77. Segal D. M., Hurwitz E. Dimers and trimers of immunoglobulin G covalently cross-linked with bivalent affinity label // *Biochemistry.*—1976.—15, N 24.—P. 5253—5258.
78. Higgins W., Miles E. W. Affinity labeling of the pyridoxal phosphate binding site of the β_2 subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase // *J. Biol. Chem.*—1978.—253, N 13.—P. 4648—4652.
79. Sayre L. M., Larson D. L., Takemori A. E., Portoghesi P. S. Design and synthesis of naltrexone-derived affinity labels with nonequilibrium opioid agonist and antagonist activities. Evidence for the existence of different μ receptor subtypes in different tissues // *J. Med. Chem.*—1984.—27, N 10.—P. 1325—1335.
80. Santi D. V., Cunnion S. O. Macromolecular affinity labeling agents. Reaction of N-bromoacetylisoleucyl transfer ribonucleic acid with isoleucyl transfer ribonucleic acid synthetase // *Biochemistry.*—1974.—13, N 3.—P. 481—485.
81. Bernatowicz M. S., Matsueda G. R. Preparation of peptide-protein immunogens using N-succinimidyl bromoacetate as a heterobifunctional cross-linking reagent // *Analyt. Biochem.*—1986.—155, N 1.—P. 95—102.
82. Davies M. E., Knight C. G., Mativi B. Y. Antibodies to short synthetic peptide cross-react with human recombinant interleukin 1α // *Immunol. Lett.*—1988.—19, N 4.—P. 293—298.
83. Zaitseva K., Ohnishi M., Hosoya H. et al. New heterobifunctional cross-linking reagents for protein conjugation, N-(bromoacetamido-*n*-alkanoyloxy)succinimides // *Chem. Pharm. Bull.*—1987.—35, N 5.—P. 1991—1997.
84. Гершкович А. А., Серебряный С. Б. Синтез и применение 2-нитро-4-сульфофениловых эфиров в синтезе пептидов // IV Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов: Тез. докл.— Минск, 1977.—С. 188.
85. Гершкович А. А., Серебряный С. Б. Применение водорастворимых 2-нитро-4-сульфофениловых эфиров в синтезе пептидов // *Биоорг. химия.*—1978.—4, № 8.—С. 1129—1131.
86. Гершкович А. А., Серебряный С. Б. Водорастворимые 2-нитро-4-сульфофениловые эфиры в синтезе пептидов // Там же.—1979.—5, № 8.—С. 1125—1132.
87. Klausner Y. S., Meiri T. H., Schneider E. Peptide synthesis in aqueous solution with *o*-nitro-*p*-sulfofenyl esters // 5-th Amer. Peptide Symp.: Proc.—New York etc.: J. Wiley and Sons.—623 p.
88. Радавский Ю. Л., Гершкович А. А., Могирева Л. А. и др. Применение водорастворимых 2-нитро-4-сульфофениловых эфиров в иммунохимических исследованиях // V Всесоюз. симпоз. по химии и физике белков и пептидов: Тез. докл.— Баку, 1980.—С. 225.
89. Радавский Ю. Л., Могирева Л. А., Манько Н. И., Гершкович А. А. Применение водорастворимых 2-нитро-4-сульфофениловых эфиров кислот для синтеза их конъюгатов с белками // *Биоорг. химия.*—1982.—8, № 11.—С. 1486—1489.
90. Лукьянчук В. Д., Луйк А. И., Радавский Ю. Л. и др. Экспериментальная специфическая иммунотерапия острых отравлений динитрофенольными соединениями // *Вестн. Акад. мед. наук. СССР.*—1988.—№ 5.—С. 38—42.
91. Staros J. V. N-hydroxysulfosuccinimide active esters: Bis(N-hydroxysulfosuccinimide) ester of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers // *Biochemistry.*—1982.—21, N 17.—P. 3950—3955.
92. Гершкович А. А., Радавский Ю. Л., Партешко А. В., Гончаренко В. С. Бис(2-нитро-4-сульфофениловые) эфиры дикарбоновых кислот как водорастворимые бифункциональные реагенты для сшивки белков // *Биоорг. химия.*—1989.—15, № 8.—С. 1056—1059.
93. Зайцева Л. С., Гершкович А. А., Радавский Ю. Л., Абакумов В. Ю. Применение водорастворимого 2-нитро-4-сульфофенилового эфира адипиновой кислоты для получения конъюгатов пептид—белок // *Укр. біохім. журн.*—1992.—64, № 3.—С. 101—104.
94. Lindner W., Robey F. A. Automated synthesis and use of N-chloroacetyl-modified peptides for the preparation of synthetic peptide polymers and peptide-protein immunogens // *Int. J. Peptide Protein Res.*—1987.—30, N 6.—P. 794—800.

95. Robey F. A., Fields R. L. Automated synthesis of N-bromoacetylmodified peptides for the preparation of synthetic peptide polymers, peptide-protein conjugates, and cyclic peptides // *Analyt. Biochem.*— 1989.— 177, N 2.— P. 373—377.
96. Jue R., Lambert J. M., Pierce L. R., Traut R. R. Addition of sulfhydryl groups to *Escherichia coli* ribosomes by protein modification with 2-iminothiolane (methyl 4-mercaptobutyrimidate) // *Biochemistry.*— 1978.— 17, N 25.— P. 5399—5406.
97. Albericio F., Andreu D., Geralt F., et al. Use of the Npys thiol protection in solid phase peptide synthesis // *Int. J. Peptide Protein Res.*— 1989.— 34, N 2.— P. 124—128.
98. Goddard P., McMurray J. S., Sheppard R. C., Emson P. A solubilisable polymer support suitable for solid phase peptide synthesis and for injection into experimental animals // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*— 1988.— N 15.— P. 1025—1027.
99. Atherton E., Gait M. J., Sheppard R. C., Williams B. J. The polyamide method of solid phase peptide and oligonucleotide synthesis // *Bioorg. Chem.*— 1979.— 8, N 3.— P. 351—370.
100. Dryland A., Sheppard R. C. Peptide synthesis. P. 8. A system for solid-phase synthesis under low pressure continuous flow conditions // *J. Chem. Soc.*— 1986.— N 1.— P. 125—138.
101. Hardy P. M., Nicholles A. C., Rydon H. N. The nature of the cross-linking of proteins by glutaraldehyde. P. 1. Interaction of glutaraldehyde with the amino-groups of 6-aminohexanoic acid and of α -N-acetyl-lysine // *Ibid.*— N 9.— P. 958—960.
102. Dietzen R. G., Sander E., Christner J., Jung G. Examination of a new cross-linker in monoclonal antibody reaction against the C-terminus of *Tobacco mosaic virus* coat protein // *Z. Naturforsch.*— 1987.— 26b.— P. 441—453.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН Украины, Киев

Получено 12.11.92