



УДК 547.458.34:57.083.3

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ ТРИСАХАРИДА Le^a И МУРАМОИЛДИПЕПТИДА
НА ПОЛИАКРИЛАМИДЕ. ВСТРАИВАНИЕ АДЪЮВАНТА
В ИСКУССТВЕННЫЕ УГЛЕВОДНЫЕ АНТИГЕНЫ***Хорлин А. Я., Вовин Н. В.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Осуществлена сополимеризация β -[3-(акриламидо)пропил]гликозида трисахарида Le^a с акриламидом в мольных соотношениях 1:74 и 1:15, а также трехкомпонентная сополимеризация того же гликозида, N^1 -(N -ацетилмурамоил- L -аланил- D -изоглутаминил)- N^6 -акрилоилгексаметилендиамина и акриламида в мольном соотношении 1:1:54. Получены водорастворимые сополимеры с исходными соотношениями мономеров. Предлагаемый подход удобен для создания искусственных антигенов с заданным содержанием гаптена и встроенного адъюванта.

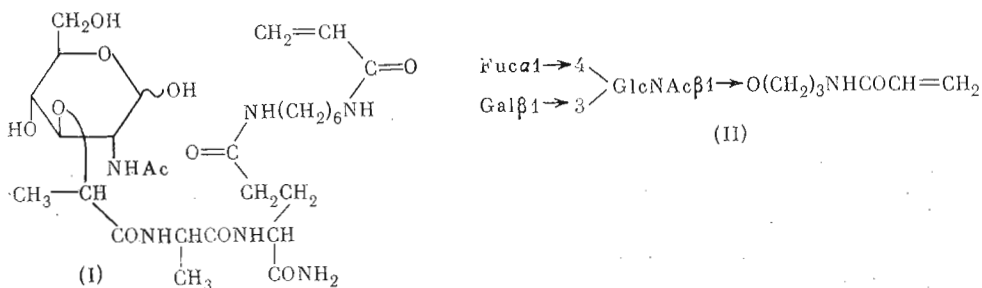
Для создания искусственных углеводных антигенов применяются два подхода. Первый основан на привязке к белкам (чаще всего, см. обзор [1]) или другим полимерам углевода, присоединенного через спейсер к функциональной группе, с использованием различных реакций конденсации. Общий недостаток большинства вариантов первого подхода — необходимость применять значительные, часто 10-кратные и большие избытки труднодоступных гаптенов; кроме того, для каждого конкретного случая нужно специально подбирать условия реакции, чтобы получить полимер с заданным содержанием гаптена.

Второй подход основан на реакции радикальной сополимеризации. Основным мономером является акриламид, из которого создается полиакриламидная матрица. Для встраивания в эту матрицу углеводных гаптенов в качестве второго мономера используются сахараиды, связанные со спейсерами, имеющими неопределенную группировку [2–6]. Сополимеризацией аллилоксиалкил- или аллилгликозидов соответствующих олигосахаридов с акриламидом были получены искусственные безбелковые антигены с групповой специфичностью крови АВН [2, 3] и серологической специфичностью О-факторов 3 и 4 сальмонелл [5, 6]. Однако и в этих случаях из-за различия в реакционной способности двойных связей аллильной группировки и акрилоильной (в акриламиде) возникает необходимость специально подбирать условия сополимеризации, прежде всего соотношение мономеров, для того чтобы получить сополимер с желаемым содержанием углеводных гаптенов. Из-за пониженной реакционной способности аллильной группировки включение углеводсодержащего мономера в сополимер ниже исходного его содержания [5, 6].

Более привлекательным представляется использование близких по реакционной способности мономеров, а именно следующего их сочетания: акриламида в качестве главного мономера, создающего полимерную цепь, и его N -замещенных производных, несущих биологически значимые группировки, — в качестве сомономеров [7]. Благодаря их близкой или тождественной реакционной способности следует ожидать, что соотношение звеньев в сополимерах может быть задано исходными количествами мономеров [8]. Такая возможность специально была проверена при изучении сополимеризации N^1 -(N -ацетилмурамоил- L -аланил- D -изоглутаминил)- N^6 -акрилоилгексаметилендиамина (I) с акриламидом; сополимеризация приводит к иммобилизации мурамоилдипептида (МДП) на полиакриламиде [8], причем исходное соотношение мономеров сохраняется. В предыдущем сообщении [9] описан синтез спейсированного трисахарида Le^a (II)

и его сополимеризация с акриламидом, в этом случае в полимере также сохранялось исходное соотношение мономеров.

В данном сообщении описывается сополимеризация гликозида (II) с акриламидом при исходных соотношениях мономеров (моль/моль) 1:74 и 1:15, а также сополимеризация трех мономеров: производного МДП (I), гликозида (II) и акриламида в мольном соотношении 1:1:54. Работа преследовала следующие цели: необходимо было на более сложном примере еще раз убедиться, сохраняется ли соотношение мономеров в сополимерах равным исходно взятому. Далее, необходимо было уточнить и обработать методику сополимеризации, в том числе и в случае, когда число мономеров превышает два.



Сополимеризация мономера (II) и акриламида, а также трехкомпонентная сополимеризация мономеров (I), (II) и акриламида осуществлялась в условиях радикальной реакции с использованием в качестве инициатора персульфата аммония, а в качестве ограничителя степени полимеризации — цистеина. Очистка образующихся полимеров от низкомолекулярных веществ проводилась с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-100. Молекулярные массы сополимеров определены путем сравнения подвижностей при гель-фильтрации с белками в интервале 12–150 кДа. Следует подчеркнуть, что молекулярные массы кажущиеся и могут существенно отличаться от реальных. В данной работе важной была информация не об истинных молекулярных массах, а о близости значений относительных степеней полимеризации в ряду сополимеров. Кажущиеся молекулярные массы сополимеров зависели как от количества, так и от чистоты персульфата аммония. Поэтому в каждой серии сополимеризаций сначала проводились контрольные опыты по полимеризации в стандартных условиях одного акриламида с целью подбора количества персульфата из данной партии, приводящего к степени полимеризации порядка 10^3 . В найденных условиях (см. «Экспериментальную часть») получались сополимеры, хорошо растворимые в воде, степень полимеризации $\sim 10^3$. Соотношения мономерных звеньев в синтезированных сополимерах вычислялись по результатам количественного анализа их моносахаридного состава с помощью ГЖХ. Полученные результаты суммированы в таблице. Выходы высокомолекулярной фракции во всех случаях составляли 70–80%. Как видно из данных таблицы, соотношение мономерных звеньев в сополимерах отличается от исходного соотношения мономеров незначительно, что еще раз подтверждает близкую реакционную способ-

Сополимер	Соотношение мономеров, моль/моль						Содержание углеводов в полимере (Fuc+Gal+GlcNAc), % (по весу)	
	исходное			в полимере			найдено	вычислено
	AA *	(I)	(II)	AA	(I)	(II)		
AA и (II)	74	0	1	73	0	1	9,1	9,0
AA и (II)	15	0	1	17	0	1	28,4	31,0
AA, (I) и (II)	54	1	1	58	1	1	9,4	10,4

* AA — акриламид.

ность акриламида и его N-замещенных производных в реакции радикальной сополимеризации.

Таким образом, сополимеризация позволяет одновременно иммобилизовать разные лиганды на полиакриламиде, причем соотношение лигандов можно задать исходным соотношением мономеров. Описанная трехкомпонентная сополимеризация позволила получить с высоким выходом синтетический антиген со встроенным адъювантом.

Экспериментальная часть

Сополимеризацию гликозида (II) с акриламидом (перекристаллизован из хлороформа, т. пл. 85°С) при соотношениях 1:74 и 1:15 проводили как описано в предыдущем сообщении [9].

Трехкомпонентная сополимеризация. 15 мг (23,3 мкмоль) мономера (I) [8], 15 мг (23,4 мкмоль) мономера (II) [9] и 90 мг (1270 мкмоль) акриламида растворили в 4 мл воды, прибавили 4 мг цистеина (Reanal) и 10 мг персульфата аммония (Reanal), вакуумировали при 20°С и при 15 мм рт. ст. в течение 3 мин при перемешивании, затем добавили 1,2 мкл тетраметилэтилендиамина (Reanal), повторили вакуумирование, после чего выдерживали 90 мин при 40°С. После охлаждения раствор нанесли на колонку с сефадексом G-100 (120×2 см, откалибрована по глобулярным белкам) и элюировали 0,01 М уксусной кислотой высокомолекулярную фракцию, детекция спектрофотометрическая при 220 нм (Beckman 3600). Выход лиофильно высушенного полимера 85–95 мг.

Навеску сополимера подвергали кислотному метанолизу и последующим обработкам, как описано в работе [10], после чего проводили ГЖХ триметилсилильных производных [9]. В качестве стандарта для определения мурамовой кислоты использовался МДП, время удерживания ТМС-производного метилового эфира мурамовой кислоты 1,53 относительно ТМС-производного маннита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stowell C. P., Lee Y. C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1980, v. 37, p. 225–281.
2. Бовин Н. В. Синтез группоспецифических детерминантных олигосахаридов и их иммобилизация на полимерной матрице. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М.: ИБХ АН СССР, 1982, с. 17–19.
3. Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я. Синтез искусственных группоспецифических антигенов. Тез. XII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии (Баку). М.: Наука, 1981, с. 120–121.
4. Weigel P. H., Schnaar R. L., Roseman S., Lee Y. C. *Methods in Enzymol.*, 1982, v. 83, p. 294–299.
5. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Chernyak A. Ya., Levinsky A. B. *Carbohydr. Res.*, 1982, v. 110, № 2, p. C16–C20.
6. Покровский В. И., Тендегник Ю. А., Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я. *Ж. мед. эпидем. и иммунол.*, 1983, № 4, с. 62–65.
7. Weigel P. H., Schnaar R. L., Kuhlenschmidt M. S., Schmell E., Lee R. T., Lee Y. C. *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 21, p. 10830–10838.
8. Хорлин А. Я., Абашев Ю. П. *Биоорган. химия*, 1984, т. 10, № 8, с. 1119–1126.
9. Бовин Н. В., Иванова Н. А., Хорлин А. Я. *Биоорган. химия*, 1985, т. 11, № 5, с. 662–670.
10. Pritchard D. J., Todd C. W. *J. Chromatogr.*, 1977, v. 133, № 1, p. 133–139.

Поступила в редакцию
23.X.1984

IMMOBILIZATION OF Le^a TRISACCHARIDE AND MURAMOYLDIPEPTIDE ON POLYACRYLAMIDE. BUILDING IN THE ADJUVANT INTO ARTIFICIAL CARBOHYDRATE ANTIGENS

KHORLIN A. Ya., BOVIN N. V.

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

Copolymerizations of acrylamide have been performed: a) with β -[3-(acrylamido)propyl]glycoside of the Le^a trisaccharide in 74:1 and 15:1 ratios, b) with the above glycoside and N¹-(N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutaminy)-N⁶-acryloylhexamethylenediamine in the 54:1:1 ratio. The water-soluble polymers obtained had the starting monomer ratios. The approach is useful for preparing artificial polyacrylamide-bound antigens with predicted adjuvant/hapten ratios.