



УДК 547.963.32+577.27

ЗАВИСИМОСТЬ СВОЙСТВ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К (2'-5')ОЛИГОАДЕНИЛАТАМ ОТ СПОСОБА ПРИСОЕДИНЕНИЯ ГАПТЕНА К ИММУНОГЕНУ

© 1999 г. Т. И. Кулак, Е. И. Квасюк, С. Л. Сентюрера, С. М. Шуляковская, В. П. Матюшевская, М. В. Макаренко, И. А. Михайлопуло[#]

*Институт биоорганической химии НАН Белоруссии,
220141, Минск, ул. Купревича, 5/2*

Поступила в редакцию 29.05.98 г. Принята к печати 24.02.99 г.

С целью выяснения зависимости свойств антител к (2'-5')олигоаденилатам от способа присоединения гаптена к иммуногену осуществлен синтез нового производного тримера (2'-5')олигоадениловой кислоты, содержащего в качестве 2'-терминального звена N⁶-(5-карбокспентил)аденозин, а также иммуногенного ¹²⁵I-меченого конъюгата на его основе. В результате иммунизации животных указанным конъюгатом, а также конъюгатом, синтезированным ранее на основе 2',3'-O-[1-(2-карбоксетил)]этилиденового производного тримера (2'-5')олигоадениловой кислоты, получен ряд антисывороток, обладающих различным сродством к модифицированным (2'-5')олигонуклеотидам. Определены эпитопы, ответственные за связывание (2'-5')олигомеров с различными антисыворотками.

Ключевые слова: нуклеозиды; (2'-5')олигоаденилаты; радиоиммунологический анализ; антитела; кроссреактивность.

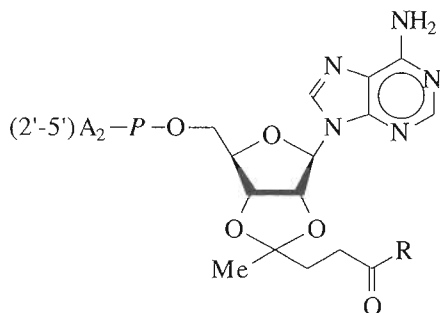
5'-Трифосфорилированные (2'-5')олигоаденилаты, главным образом тример р₃(2'-5')А₃, относятся к классу низкомолекулярных биорегуляторов, играющих роль посредников противовирусного действия интерферона в клетке [1]. Для изучения метаболизма и биораспределения этих соединений необходимы количественные методы определения их содержания в различных биологических объектах. Методы определения уровня (2'-5')олигоаденилатов, основанные на ингибировании ими синтеза белка в клетке посредством активации р₃(2'-5')А₃-зависимой рибонуклеазы L [2] и на способности дефосфорилированных (2'-5')олигоаденилатов влиять на пролиферацию клеток [3], являются сложными, трудоемкими и сравнительно малочувствительными. Наиболее удобный метод определения (2'-5')олигоаденилатов в биологических объектах – радиоиммунологический анализ [4], позволяющий детектировать данные соединения во внутриклеточных концентрациях (10⁻⁸–10⁻¹² М).

Известно, что олигонуклеотиды не обладают иммуногенными свойствами, поэтому для получения специфичных к ним антител иммунизация животных должна производиться конъюгатами олигонуклеотидов с другими соединениями, обладающими свойствами иммуногенов (белками, олигосахаридами, полилизинном и др.). В таких конъюгатах олигонуклеотиды являются гаптенами. Свойства антител к гаптенам в значительной степени зависят от способа его присоединения к иммуногенному фрагменту конъюгата. Для трифосфата тримера (2'-5')олигоадениловой кислоты, а также его дефосфорилированного производного существует ряд способов ковалентного присоединения к белку [4–8], что позволяет получать антитела, обладающие специфичностью к различным структурным элементам молекул (2'-5')олигонуклеотидов. Поэтому весьма актуальной представляется проблема выявления связи между свойствами антител и структурой гаптена, используемого при иммунизации конъюгатами на основе тримера (2'-5')А₃.

Ранее нами была разработана система радиоиммунологического анализа для определения (2'-5')олигоаденилатов с использованием иммуногенного (II) и радиоактивно меченного (III) конъюгатов на основе 2',3'-O-[1-(2-карбоксетил)]этилиденового производного тримера (2'-5')А₃ (I) [9–12].

Сокращения: (2'-5')А₃ и р₃(2'-5')А₃ – соответственно аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')аденозин и его 5'-трифосфат; BSA – бычий сывороточный альбумин; DBU – 1,8-диазабисцикло[5,4,0]ундецен-7; EDC – N-этил-N'-(3-диэтиламинопропил)карбодимид, гидрохлорид; Npe – 2-(4-нитрофенил)этил; Pn – пальмитоиламино; TPS-Cl – 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид.

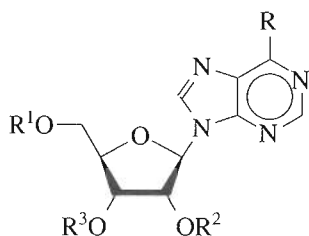
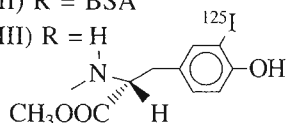
[#] Автор для переписки (тел./факс: (017) 264-83-24; e-mail: igormikh@ns.iboch.ac.by).



(I) R = -OH

(II) R = BSA

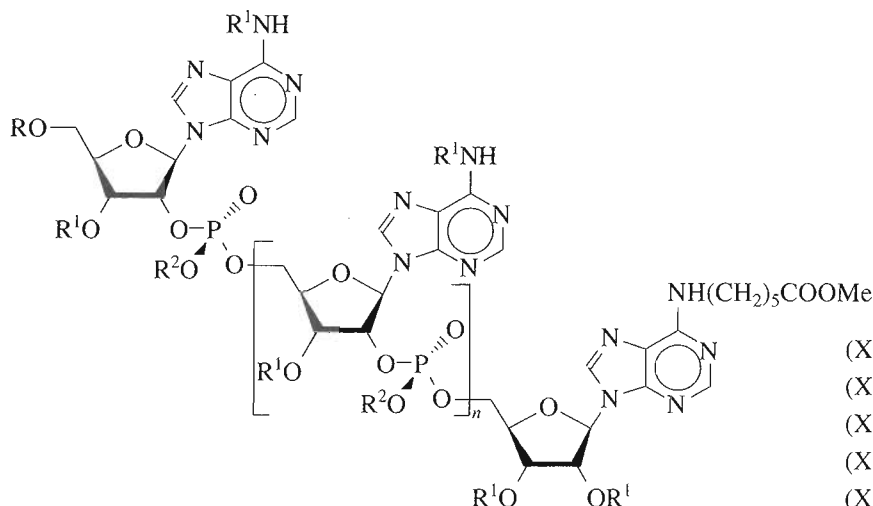
(III) R = H

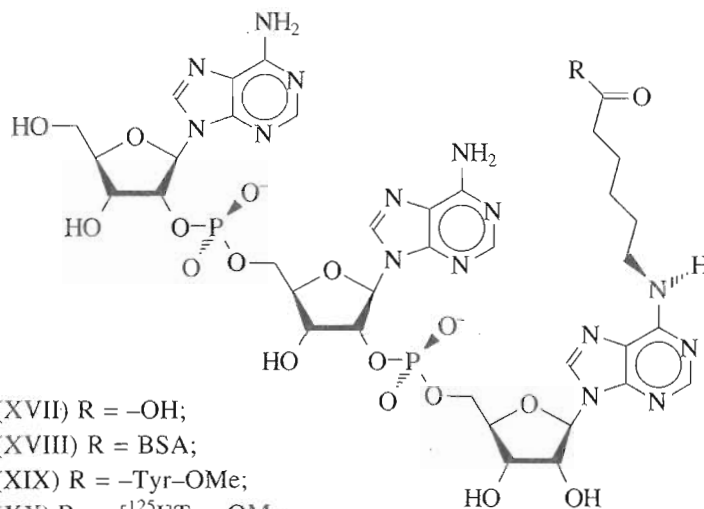
(IV) R = OH; R¹ = R² = R³ = Ac;(V) R = Cl; R¹ = R² = R³ = Ac;(VI) R = NH(CH₂)₅COOMe; R¹ = R² = R³ = Ac;(VII) R = NH(CH₂)₅COOMe; R¹ = R² = R³ = H;(VIII) R = NH(CH₂)₅COOMe; R¹ = MeOTr; R² = R³ = H;(IX) R = NH(CH₂)₅COOMe; R¹ = MeOTr; R² = R³ = Bz;(X) R = NH(CH₂)₅COOMe; R¹ = OH; R² = R³ = Bz;(XI) R = NHBz; R¹ = MeOTr; R² = -P(O)(ONpe)(O⁻NHEt₃⁺);R³ = Bz

С целью выяснения зависимости свойств анти-тел к (2'-5')олигоаденилатам от способа присоединения гаптена к иммуногенному фрагменту нами осуществлен синтез иммуногенного и ¹²⁵I-меченого конъюгатов на основе производного (2'-5')A₃, который содержит в качестве спейсерной группы остаток капроновой кислоты, присоединенный к аминогруппе основания 2'-терминального аденозина.

Исходным соединением для синтеза терминального нуклеозидного фрагмента такого олигоаденилата являлся 2',3',5'-три-*O*-ацетилюридин (IV). Взаимодействием его с тионилхлоридом в смеси хлористого метилена и DMF при кипячении [13] был получен с выходом 90% 9-(2',3',5'-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)-6-хлорпурин (V). Обработка 6-хлорпроизводного (V) раствором метилового эфира ε-аминокапроновой кислоты в хлористом метилена в течение 20 ч привела к образованию нуклеозида (VI) (61%). Полученный триацетат (VI) был обработан насыщенным при 0°C раствором аммиака в метаноле для удаления ацетильных защитных групп. Деблокированный нуклеозид (VII), выделенный с выходом 64%, был превращен далее в 5'-*O*-мометокситритильное производное (VIII) действием 4-метокситритилхлорида в пиридине (выход (VIII) составил 79%). Обработка нуклеозида (VIII) бензоилхлоридом в пиридине привела к образованию дибензоата (IX) (68%), из которого селективным удалением мометокситритильной группы действием TsOH был получен защищенный 2'-терминальный нуклеозид (X).

В качестве надстраиваемого фрагмента в синтезе тримера использовался *N*⁶,3'-*O*-добензоил-5'-*O*-мометокситритиладенозин-2'-(2-(4-нитрофенил)этил)фосфат (XI) [10]. Реакции конденсации проводили в пиридине с использованием в качестве

(XII) R = MeOTr; R¹ = Bz; R² = Npe; n = 0;(XIII) R = H; R¹ = Bz; R² = Npe; n = 0;(XIV) R = MeOTr; R¹ = Bz; R² = Npe; n = 1;(XV) R = H; R¹ = Bz; R² = Npe; n = 1;(XVI) R = R¹ = R² = H; n = 1



ве конденсирующего агента смеси TPS-Cl и тетразола в соотношении 1 : 3. Выход димера (XIII), полученного удалением монометокситритильной группы динуклеозидмонофосфата (XII), составил 62% в расчете на нуклеозид (X). Тринуклеозиддифосфат (XIV) был выделен с выходом 57%. Тример (XIV) деблокировали последовательной обработкой 2% раствором TsOH в смеси хлористый метилен-метанол (7 : 3), 1 М раствором DBU в пиридине и насыщенным при 0°C раствором аммиака в метаноле. Полученный таким образом тринуклеозиддифосфат (XVI) был очищен анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе (HCO₃⁻-форма); суммарный выход после выделения составил 67%. Метоксикарбонильную группу тримера (XVI) омылили действием 0.5 М раствора гидроксида натрия в смеси этанол-вода (1 : 1). Полностью деблокированный тример (XVII), содержащий свободную карбоксильную группу на конце спейсерного фрагмента, был выделен аналогично соединению (XVI) с выходом 52%.

Конъюгат для иммунизации (XVIII) получен взаимодействием тримера (XVII) с BSA в присутствии EDC в 0.1 М натрий-ацетатном буфере (pH 4.8). Стехиометрия полученного конъюгата, определенная спектрофотометрически по разнице оптического поглощения растворов конъюгата (XVIII) и BSA при 263 нм, составила около 4 моль тримера на 1 моль белка.

Для получения ¹²⁵I-меченого производного (2'-5')A₃ был синтезирован конъюгат (2'-5')олигоаденилата (XVII) с метиловым эфиром тирозина. Карбоксильную группу тримера (XVII) активировали бутилхлорформиатом в DMF в присутствии триэтиламина; полученный смешанный ангидрид без выделения из реакционной смеси обработали метиловым эфиром тирозина; образовавшийся конъюгат (XIX) был выделен ионооб-

менной хроматографией на DEAE-целлюлозе с выходом 42%.

Структура синтезированных соединений подтверждена данными УФ- и ¹H-ЯМР-спектров.

Радиоiodирование тримера (XIX) осуществляли при помощи Na¹²⁵I в присутствии хлорамина T [14]. ¹²⁵I-Меченый конъюгат (XX) был выделен колоночной хроматографией на TSK-геле HW-40 с выходом 74%. Радиохимическая чистота соединения (XX) составила 96-99%.

Для получения антисывороток проведена иммунизация трех групп животных (взрослых особей кроликов) иммуногенными конъюгатами (II) и (XVIII). Первую группу (А) из шести животных и вторую (В) из пяти животных иммунизировали конъюгатом (II), третью (С) из пяти животных — конъюгатом (XVIII). Из образцов крови иммунизированных животных получали антисыворотки, тестировали их на наличие связывающей способности к (2'-5')A₃ и определяли их титры и величины констант ассоциации (K_a). Из каждой группы были отобраны по двое животных, из крови которых были получены антисыворотки с наибольшими титрами, обозначенные далее как А-1, А-2, В-1, В-2, С-1 и С-2. Все они характеризовались значениями K_a > 10⁹ М⁻¹ (табл. 1).

Антитела, вырабатываемые иммунной системой животных под действием иммуногенных конъюгатов на основе (2'-5')олигоаденилатов, могут обладать существенными различиями при разных способах связывания олигонуклеотида с иммуногенным фрагментом конъюгата [16]. Это должно находить отражение в различной способности получаемых антител образовывать комплексы с природными антигенами и их аналогами. В этой связи представлялось интересным изучить влияние различных структурных элементов (2'-5')A₃ и модифицированных аналогов на связывание олигонуклеотидов с поликлональ-

Таблица 1. Константы ассоциации (K_a)* и титры** антисывороток к (2'-5') A_3

Антисыворотка	$K_a \times 10^{-9}, M^{-1}$	Титр
A-1	5.9 ± 0.3	1 : 20000
A-2	3.1 ± 0.6	1 : 20000
B-1	4.1 ± 0.4	1 : 15000
B-2	5.8 ± 0.7	1 : 18000
C-1	14.3 ± 0.7	1 : 5000
C-2	2.3 ± 0.4	1 : 5000

* Величины K_a определены графически по методу Скэтчарда с учетом рекомендаций, имеющих в литературе [15], и рассчитаны на основании трех параллельных экспериментов.

** Титр определялся как разведение антисыворотки, при котором в условиях эксперимента она была способна связать 50% ^{125}I -меченого (2'-5')олигоаденилата. Условия проведения иммунохимической реакции и разделения свободного и связанного с антителами лиганда здесь, а также при определении величин K_a были аналогичны описанным ниже при нахождении значений ID_{50} .

Таблица 2. Взаимодействие антисывороток к (2'-5') A_3 с модифицированными по гетерооснованиям (2'-5') олигоаденилатами

(2'-5')Олигонуклеотид*	ID_{50}					
	A-1	A-2	B-1	B-2	C-1	C-2
ApApA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
pApApA	19	7.8	5.7	44	0.6	0.6
ApApG	3.0	0.9	2.1	2.7	3.0	0.8
ApGpA	1.8	1.2	1.9	1.7	1.8	1.3
GpApA	2.7	2.9	1.2	2.9		
ApAp ^{bzl} A	1.0	1.2	0.9	0.8	0.2	0.2
Ap ^{bzl} ApA	0.6	0.7	0.5	0.5	1.2	2.0
^{bzl} ApApA	10	1.4	2.5	2.6	0.9	1.2
^{bzl} Ap ^{bzl} Ap ^{bzl} A	13	2.8	4.7	3.9	4.6	3.6
ApAp(Vir)	0.9	0.5	44	0.5	77	2.5
Ap(Vir)pA	0.8	0.5	80	0.9	0.1	0.1
(Vir)pApA	500	220	79	2.9	0.1	0.1

* ^{bzl}A – N^6 -бензиладенозин.

ми антителами, полученными при помощи конъюгатов (II) и (XVIII).

Полученные антисыворотки обладали разным средством к (2'-5')олигоаденилатам. Количественной оценкой эффективности связывания олигонуклеотида с антителами служит индекс различия (ID_{50}). Эта величина представляет собой отношение значений IC_{50} для исследуемого аналога и (2'-5') A_3 (IC_{50} – концентрация соединения, которая необходима для вытеснения 50% меченого

лиганда из комплекса с антителами). Чем больше значение ID_{50} для исследуемого соединения, тем меньшей способностью вытеснять метку из комплекса с антителами оно обладает, т.е. тем ниже связывание его с антисывороткой.

Изучено влияние на связывание различных (2'-5')олигоаденилатов с антителами следующих факторов: положение межнуклеотидной фосфодиэфирной связи, длина олигонуклеотидной цепи, структура и положение модифицированных углеводных и гетероциклических фрагментов нуклеозидов, входящих в состав олигомера. Все изученные антисыворотки групп А, В и С обладали низкой кроссреактивностью по отношению к аденозину, АМР и АТР, а также к олигомерам с (3'-5')фосфодиэфирными связями (значения ID_{50} для этих соединений составляли от 10^3 до 10^6). Это свидетельствует о высокой специфичности полученных антител, а также соответствует ранее полученным данным о низкой кроссреактивности антител к (2'-5')олигоаденилатам по отношению к олигомерам с 3' → 5'-фосфодиэфирной связью [6, 7, 16].

Длина цепи олигомера также влияла на связывание всех изученных антисывороток с (2'-5')олигоаденилатами. Увеличение либо уменьшение длины цепи олигомера приводит к некоторому ослаблению взаимодействия с антителами, хотя различия в связывании (2'-5') A_3 , димера и тетрамера для большинства антисывороток были не очень значительными (предварительные данные не приведены).

Нами изучено связывание с полученными антисыворотками (2'-5')олигонуклеотидов, в состав молекул которых входят гетерооснования, отличные от аденина (гуанин и 1,2,4-триазол-3-карбоксамид), а также N^6 -бензиладенин (табл. 2). Из рассмотрения величин ID_{50} для гуанозинсодержащих аналогов тримера (2'-5') A_3 следует, что замещение аденинового фрагмента любого из нуклеозидов на гуанин практически не сказывается на связывании олигонуклеотидов с антисыворотками всех групп. В случае антисывороток групп А и В на связывание их с олигоаденилатами также практически не влияет замена аденина на N^6 -бензиладенин в 2'-терминальном и среднем звеньях молекулы тримера. Наличие N^6 -бензиладенина в составе 5'-терминального нуклеозида приводит к незначительному ухудшению связывания олигомера с антителами, причем этот эффект становится более выраженным в случае тримера, содержащего бензильные заместители во всех трех нуклеозидных звеньях. Данное соединение слабее других из этого ряда связывается также и с антисыворотками группы С, по-видимому, вследствие изменения общей пространственной организации молекулы. Интересно отметить, что замена аденина на N^6 -бензиладенин в составе 2'-концевого нуклеози-

да несколько увеличивало эффективность связывания тримера антисыворотками С-1 и С-2 по сравнению с $(2'-5')A_3$, что, вероятно, может быть объяснено неспецифическим взаимодействием бензильной группы с иммуноглобулином.

Было изучено связывание с антителами $(2'-5')$ олигомеров, в составе которых каждый аденозиновый фрагмент был последовательно замещен на остаток 1-(β -D-рибофуранозил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (виразола). Гетероциклическое основание виразола содержит структурные элементы, аналогичные имеющимся как в аденине, так и в гуанине. Это, вероятно, и объясняет в случае антисывороток групп А и В близкие значения ID_{50} для тримеров, содержащих виразол в качестве 2'-терминального и среднего нуклеозидных звеньев, с соответствующими гуанозинсодержащими аналогами и $(2'-5')A_3$. Однако при замене на виразол 5'-концевого аденозина наблюдается сильное в случае антисывороток А-1, А-2 и В-1 или менее существенное, но все же ощутимое в случае антисыворотки В-2 падение связывания олигомера с антителами. Таким образом, прослеживается закономерность, отмеченная выше при рассмотрении бензильных производных: в случае антител, полученных при помощи конъюгата (II), на связывание их с олигоаденилатами сильнее влияет модификация 5'-концевого фрагмента $(2'-5')A_3$. Обратная зависимость наблюдалась для антисывороток группы С: замена на виразол 2'-терминального аденозинового звена приводит к снижению эффективности связывания антител с олигоаденилатами.

Отмеченные выше тенденции наблюдаются также и при взаимодействии с различными антисыворотками $(2'-5')$ олигоаденилатов, модифицированных по углеводным фрагментам (табл. 3). Так, при изучении взаимодействия с антисыворотками групп А и В тримеров, содержащих 3'-дезоксаденозин (кордицепин) в различных положениях цепи, было показано, что в этом случае наибольшее влияние на связывание оказывает 3'-гидроксильная группа 5'-концевого нуклеозида. Ее отсутствие приводит к существенному ослаблению взаимодействия с антителами тримеров $(2'-5')3'dApApA$ и в еще большей степени $(2'-5')3'dAp3'dAp3'dA$. Влияние 3'-гидроксильной группы на взаимодействие с антителами может быть объяснено как непосредственным участием ее в связывании с иммуноглобулинами, так и ее влиянием на пространственную организацию молекулы тримера. В отличие от рибофуранозного фрагмента, находящегося в равновесии $S \rightleftharpoons N$ конформаций, в случае 3'-дезоксирибозы это равновесие смещено в сторону N-конформера. Существуют, таким образом, различия в пространственном строении $(2'-5')A_3$ и его кордицепинового аналога [17].

Следует упомянуть, что в литературе имеются различные сведения о взаимодействии антисывороток к $(2'-5')A_3$ с дезоксианалогами: было отмечено как ослабление связывания с антителами кордицепинового аналога $(2'-5')A_3$ и его монофосфата [8], так и усиление взаимодействия с антисыворотками олигоаденилатов, содержащих фрагменты 3'-дезоксирибозы [5]. В обоих случаях антитела получены иммунизацией животных конъюгатами на основе тримеров $(2'-5')pA_3$ или $(2'-5')A_3$, присоединенных к BSA методом периодатного окисления 2'-терминального аденозинового фрагмента.

При изучении взаимодействия полученных антисывороток группы С с 3'-дезоксидеоксианалогами тримера $(2'-5')A_3$ было установлено, что и здесь олигомер, содержащий три фрагмента кордицепина, наиболее слабо связывается с антителами. Однако в данном случае этот факт в основном обусловлен отсутствием 3'-гидроксильной группы в углеводном фрагменте не 5'-, а 2'-терминального нуклеозида. Это следует из рассмотрения значений ID_{50} для монозамещенных кордицепиновых аналогов тримера $(2'-5')A_3$, так как именно олигоаденилат, содержащий 3'-дезоксаденозин в качестве 2'-концевого звена, взаимодействует с антителами слабее двух других олигомеров. Это особенно заметно в случае антисыворотки С-1.

Аналогичные закономерности прослеживаются при более глубоком рассмотрении влияния модификации в углеводном фрагменте 2'-концевого нуклеозида на взаимодействие аналогов $(2'-5')A_3$ с различными антисыворотками. Так, замена рибофуранозы в 2'-терминальном звене на остатки 2',3'-ангидро- β -D-рибо- и 2',3'-ангидро- β -D-ликсифуранозы, а также β -D-арабино- и β -D-ксилофуранозы не приводит к существенным изменениям связывания антител групп А и В с модифицированными олигоаденилатами. Также не было заметных различий во взаимодействии указанных антисывороток с $(2'-5')$ олигоаденилатами, содержащими фрагменты 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибозы и ее 2'-амино-, 2'-азидо- и 2'-хлорпроизводных в качестве 2'-концевых углеводных звеньев. Единственным эффектом, наблюдавшимся в этом случае, было небольшое усиление связывания 2'-азидопроизводного с антисыворотками А-1, А-2 и В-1, происходящее, возможно, вследствие неспецифического взаимодействия азидогруппы кроссреагента с антителами.

В противоположность этому, как следует из данных табл. 3, все указанные модификации углеводного фрагмента 2'-терминального аденозинового звена приводят к значительному ослаблению аффинности соответствующих $(2'-5')$ олигоаденилатов по отношению к антителам группы С, причем антитела проявляют выраженную способность дискриминировать различным образом модифицированные аналоги. Например, при за-

Таблица 3. Взаимодействие антисывороток к (2'-5')A₃ серий А-С с (2'-5')олигоаденилатами, содержащими модифицированные углеводные фрагменты

(2'-5')Олигонуклеотид	ID ₅₀					
	A-1	A-2	B-1	B-2	C-1	C-2
ApApA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ApApA(Lev)(I) ¹	0.7	0.6	0.1	0.4	10	17
ApAp3'dA	1.6	2.0	2.7	17	130	2.6
Ap3'dApA	3.1	0.8	2.1	1.4	2.2	1.4
3'dApApA	19	20	18	26	0.5	1.6
3'dAp3'dAp3'dA	40	36	110	47	360	140
ApArahA ²	1.1	1.1	1.9	1.6	3.2	5.3
ApArahIA ³	1.8	0.8	0.9	0.9	500	28
ApAraA ⁴	0.8	0.7	2.1	0.6	1400	15
ApArxA ⁵	0.7	0.6	0.6	0.4	160	6.6
ApAp(2'NH ₂ , 3'FddA)	1.2	1.0	1.3	1.1	480	16
ApAp(2'N ₃ , 3'FddA)	0.1	0.4	0.2	1.1	2.4 × 10 ⁴	8600
ApAp(2'Cl, 3'FddA)	0.5	0.8	0.3	0.9	4800	130
ApAp(3'FddA)	1.0	1.2	0.5	1.2	3500	41
(5'NH ₂ , 5'dA)pApA	110	250	90	180	9.2	1.3
(5'NH ₂ , 5'dA)p3'dApA	320	120	210	280	170	110
(5'NH ₂ ddA)pApA	1800	3200	9000	700	1.8	3.0
(5'NH ₂ ddA)p3'dAp3'dA	850	1200	1.4 × 10 ⁴	1.1 × 10 ⁴	1200	330
(5'Pn5'dA)pAp3'dA ⁶	0.8 × 10 ⁴	3.0 × 10 ⁴	7.5 × 10 ⁴	0.7 × 10 ⁴	1600	750
(5'Pn5'dA)p3'dApA	4.5 × 10 ⁴	1.2 × 10 ⁵	6.5 × 10 ⁵	3.2 × 10 ⁴	20	35
(5'PnddA)pApA	3.5 × 10 ⁵	2.0 × 10 ⁵	>10 ⁶	>10 ⁶	0.2	1.5
(5'PnddA)p3'dAp3'dA	2.5 × 10 ⁵	4.8 × 10 ⁵	>10 ⁶	>10 ⁶	50	120

¹ Lev – (2-карбокситил)этилиден;² ah – 2',3'-ангидро;³ IA – 9-(β-D-липсофуранозил)аденин;⁴ aA – 9-(β-D-арабинофуранозил)аденин;⁵ xA – 9-(β-D-ксилофуранозил)аденин;⁶ Pn – пальмитоиламино.

мене остатка рибозы 2'-терминального нуклеотида на D-арабинозу или D-ксилозу происходит резкое ослабление связывания олигомеров с антителами, особенно ярко выраженное в случае арабинопроизводного. В свою очередь тример, содержащий в качестве 2'-концевого звена 2',3'-ангидро-β-D-рибофуранозу, связывается с антителами несколько хуже (2'-5')A₃ и значительно лучше ликсо-изомера. Из серии тримеров, содержащих на 2'-конце остатка 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибозы либо ее 2'-замещенных производных, лучше других связывался с антисыворотками 2'-аминоаналог. При переходе к олигомерам, имеющим в терминальном фрагменте остатка 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибозы и ее 2'-хлорпроизводного, наблюдается значительное ослабление взаимодействия с антителами. Еще ниже аффинность к данным антисывороткам тримера, содержащего в угле-

водном остатке 2'-концевого звена объемную азидогруппу, которая, по-видимому, создает стерические препятствия для связывания с антителами. Аналогичный, хотя и намного более слабый эффект наблюдается для антисывороток С-1 и С-2 в случае тримера (I). Таким образом, все исследованные аналоги (2'-5')A₃, содержащие модифицированные в углеводном остатке 2'-терминальные нуклеотидные звенья, в разной степени обладают пониженной по сравнению с (2'-5')A₃ способностью связываться с антисыворотками С-1 и С-2.

Нами было изучено взаимодействие с антителами к (2'-5')A₃ различных олигоаденилатов, 5'-гидроксильная группа которых была заменена на amino- и пальмитоиламиногруппу. При этом оказалось, что замена 5'-гидроксильной группы олигомеров на аминогруппу приводит к сильному ос-

лаблению взаимодействия олигонуклеотидов с антисыворотками групп А и В. Так, 5'-аминоаналог (2'-5') A_3 , связывается с антителами групп А и В на два порядка слабее. Введение аминогруппы вместо 5'-гидроксильной в кордицепинсодержащие (2'-5')олигомеры также приводит к ослаблению связывания с антителами. Наименьшими значениями ID_{50} в ряду этих соединений характеризуются олигонуклеотиды, содержащие в качестве 5'-терминального звена 5'-амино-3',5'-дидезоксиаденозин. Дополнительная модификация 5'-концевого нуклеозида – замена 5'-гидроксила на пальмитоиламиногруппу – вызывает дальнейшее ослабление аффинности к антителам групп А и В на два-три порядка. При этом в случае тримеров, содержащих 5'-пальмитоиламино-3',5'-дидезоксиаденозин, наблюдается почти полная потеря связывания антисыворотками В-1 и В-2.

При рассмотрении взаимодействия с антителами группы С 5'-аминопроизводных, содержащих в различных положениях цепи 3'-дезоксиаденозин, и сравнении полученных значений ID_{50} с соответствующими данными для кордицепиновых аналогов тримера (2'-5') A_3 становится ясным, что различия во взаимодействии указанных олигомеров с антисыворотками С обусловлены в первую очередь не модификацией 5'-терминального фрагмента, а наличием 3'-гидроксильной группы. Это особенно заметно в 2'-концевом нуклеозидном звене, поскольку замена 5'-гидроксильной группы соответствующих 3'-дезокситримеров на амино- либо пальмитоиламиногруппу не приводила к столь впечатляющим изменениям связывания олигонуклеотидов с антителами, как в случае антисывороток А и В. Низкая чувствительность антител С-1 и С-2 к модификациям 5'-терминального фрагмента олигомеров подтверждается также данными о связывании 5'-монофосфата тримера (2'-5') A_3 с антителами различных групп: если в случае антисывороток А и В наблюдалось ухудшение связывания с 5'-монофосфатом по сравнению с дефосфорилированным соединением, то с антисыворотками С-1 и С-2 этот эффект не проявлялся.

Таким образом, из полученных данных следует вывод, что существенным образом различаются свойства поликлональных антител к (2'-5') A_3 , полученных при помощи конъюгатов с различным типом связывания гаптена и белка-носителя. Антисыворотки, полученные с помощью различных конъюгатов, по-разному взаимодействовали с модифицированными (2'-5')олигоаденилатами. Имеющийся в нашем распоряжении ряд аналогов тримера (2'-5') A_3 с широким спектром модификаций позволял установить, какие фрагменты молекул олигоаденилатов ответственны за связывание с антителами в каждом отдельном случае.

Так, важным фактором, определяющим аффинность изученных аналогов по отношению к антисывороткам, являлся тип фосфодиэфирной связи, которая в значительной степени обуславливает пространственную структуру молекул олигомеров. Другим важным элементом, определяющим связывание всех полученных антисывороток с (2'-5')олигоаденилатами, было наличие в молекулах нуклеотидов немодифицированных рибозных фрагментов, особенно в нуклеозидных звеньях, входящих в структуру эпитопа. Влияние модификаций углеводных фрагментов молекул олигоаденилатов на их взаимодействие с антителами было в целом выражено заметно сильнее, чем влияние строения их гетероциклических оснований. Это может объясняться как непосредственным участием гидроксильных групп углеводных фрагментов олигомеров в связывании с иммуноглобулинами, так и важным вкладом конформации данных фрагментов во вторичную (пространственную) структуру олигоаденилатов, которая, по-видимому, определяющим образом влияет на их способность взаимодействовать с антителами.

Из полученных данных о взаимодействии антител с олигоаденилатами, модифицированными в различных участках цепи, следует, что в случае антисывороток, полученных на основе 2',3'-*O*-[1-(2-карбоксиитил)]этилиденового производного тримера (2'-5') A_3 , в структуру эпитопа антигена входил его 5'-концевой нуклеозидный фрагмент, модификации которого, как правило, приводили к изменению способности олигомеров-кроссреактантов связываться с антисыворотками. Влияние среднего нуклеозидного звена на взаимодействие с антителами было выражено заметно слабее, в то время как изменение структуры 2'-терминального нуклеозида практически не сказывалось на связывании (2'-5')олигоаденилатов с данными антисыворотками.

Обратная картина наблюдалась для антисывороток, полученных с помощью конъюгата, в котором связывание молекулы тримера с BSA осуществлялось через аминогруппу гетерооснования 2'-терминального фрагмента. В этом случае антитела оказывались высокоспецифичными по отношению к структуре 2'-концевого нуклеозида, особенно его углеводной части, и практически нечувствительными к модификациям 5'-терминального звена олигомера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

УФ-спектры записывали на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss, ГДР), 1H -ЯМР-спектры – на спектрометре WM-250 (Bruker, ФРГ). Для записи ^{13}C -ЯМР-спектров соединений (VI)–(X) использовали их растворы в $CDCl_3$ (внутренний стандарт – тетраметилсилан), для соединений

(XVI), (XVII) и (XIX) – растворы в D₂O (внутренний стандарт – *трет*-бутанол). Приведены химические сдвиги протонов (δ , м.д.) и константы спин-спинового взаимодействия (J , Гц). ТСХ проводили на пластинках силикагеля Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия). Системы растворителей для ТСХ: хлороформ–метанол, 24 : 1 (А); хлороформ–метанол, 19 : 1 (Б); хлороформ–метанол, 9 : 1 (В); изопропанол–гидроксид аммония (25%)–вода, 7 : 1 : 2 (Г). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (Merck, Германия), DEAE-целлюлозе SS-23 (Serva, Германия), сефадексе G-10 (Farmacia, Швеция) и TSK-геле HW-40 (Toyo Soda MFG Co., Ltd., Япония). Все операции, если специально не оговорено в тексте, проводились при комнатной температуре.

2',3',5'-Три-*O*-ацетил-*N*⁶-[(5-метоксикарбонил)пентил]аденозин (VI). Смесь 0.70 г (1.70 ммоль) нуклеозида (V) и 2.50 г (17.22 ммоль) метилового эфира ϵ -аминокапроновой кислоты в 4 мл хлористого метилена перемешивали в течение 20 ч, затем упарили досуха. Остаток после упаривания хроматографировали на силикагеле (200 см³), элюируя продукты метанолом в хлороформе (линейный градиент концентрации 0 \rightarrow 5 об.%; 1.4 л). Получали 0.54 г (61%) соединения (VI); R_f 0.29 (А). УФ-спектр, λ_{\max} (MeOH), нм (ϵ): 269 (17200). ¹H-ЯМР-спектр: 8.37, 7.92 (2с, H₂, H₈), 6.19 (д, 1H, $J_{1,2}$ 5.5, H_{1'}), 5.92 (дд, 1H, $J_{2,1}$ 5.5, $J_{2,3}$ 5.5, H_{2'}), 5.68 (дд, 1H, H_{3'}), 4.50–4.32 (м, 3H, H_{4'}, H_{5'}, H_{5''}), 3.68 (с, 3H, COOCH₃), 2.33 (дд, 2H, CH₂COOCH₃), 2.15, 2.13, 2.08 (3с, 9H, 3 \times OAc), 1.79–1.38 (м, 8H, NHС₄H₈).

***N*⁶-[(5-Метоксикарбонил)пентил]аденозин (VII).** Раствор 0.54 г (1.03 ммоль) нуклеозида (VI) в 16 мл насыщенного при 0°C раствора аммиака в метаноле выдерживали в течение 3 ч, затем упаривали досуха. Остаток хроматографировали на силикагеле (100 см³), элюируя продукты метанолом в хлороформе (линейный градиент концентрации 0 \rightarrow 10 об.%, 1.0 л). Получали 0.34 г (64%) соединения (VII); R_f 0.55 (В). УФ-спектр, λ_{\max} (MeOH), нм (ϵ): 269 (16900). ¹H-ЯМР-спектр: 8.12, 7.76 (2с, H₂, H₈), 5.82 (д, 1H, $J_{1,2}$ 6.5, H_{1'}), 3.68 (с, 3H, COOCH₃), 2.33 (дд, 2H, CH₂COOCH₃), 1.68 (м, 4H, C₂H₄), 1.44 (м, 2H, CH₂), 1.25 (м, 2H, CH₂).

5'-*O*-Монометокситритил-*N*⁶-[(5-метоксикарбонил)пентил]аденозин (VIII). К раствору 0.33 мл (0.83 ммоль) нуклеозида (VII) в 3.6 мл пиридина добавляли 0.31 г (1.00 ммоль) монометокситритилхлорида. Смесь перемешивали в течение 24 ч и упаривали досуха. Остаток растворяли в хлороформе (50 мл), полученный раствор промывали водой (2 \times 20 мл), высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали. Остаток упаривали с толуолом (5 мл), растворяли в 5 мл хлороформа и добавляли к 150 мл гексана. Осадок отфильтровывали и высу-

шивали. Получали 0.44 г (79%) соединения (VIII), R_f 0.39 (А). УФ-спектр, λ_{\max} (MeOH), нм (ϵ): 232 (16900), 269 (16500). ¹H-ЯМР-спектр: 8.33, 8.06 (2с, H₂, H₈), 7.29–6.73 (14H, Ar), 5.95 (д, 1H, $J_{1,2}$ 6.0, H_{1'}), 4.77 (дд, 1H, $J_{2,1}$ 6.0, $J_{2,3}$ 5.0, H_{2'}), 4.45 (м, 1H, H_{4'}), 4.38 (дд, 1H, H_{3'}), 3.78 (с, 3H, PhOCH₃), 3.67 (с, 3H, COOCH₃), 3.46 (дд, 1H, $J_{5',4}$ 3.5, $J_{5',5''}$ 11.0, H_{5'}), 3.23 (дд, 1H, $J_{5'',4}$ 3.0, $J_{5'',5}$ 11.0, H_{5''}), 2.33 (дд, 2H, CH₂COOCH₃), 1.81–1.40 (м, 8H, C₄H₈).

2',3'-Ди-*O*-бензоил-*N*⁶-[(5-метоксикарбонил)пентил]аденозин (X). К раствору 0.43 г (0.64 ммоль) соединения (VIII) в 3.6 мл пиридина добавляли при 0°C в течение 15 мин при перемешивании 0.17 мл (1.41 ммоль) бензоилхлорида, после чего охлаждение снимали и перемешивали смесь в течение 24 ч, затем упаривали досуха. Остаток растворяли в хлороформе (100 мл), полученный раствор промывали водой (2 \times 50 мл), высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали. Остаток упаривали с толуолом (5 мл) и добавляли к нему 39 мл 2% раствора TsOH в смеси хлористый метилен–метанол, 7 : 3. Полученный раствор выдерживали в течение 15 мин, затем разбавляли его хлороформом (100 мл), промывали 0.1 М фосфатным буфером (рН 7.0; 2 \times 70 мл), высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали. Остаток хроматографировали на силикагеле (120 см³), элюируя продукты реакции метанолом в хлороформе (линейный градиент концентрации 0 \rightarrow 4 об.%; 1.0 л). Получали 0.29 г (68%) нуклеозида (X); R_f 0.56 (А). УФ-спектр, λ_{\max} (MeOH), нм (ϵ): 231 (24700), 269 (19200). ¹H-ЯМР-спектр: 8.41 (с, 1H, H₂), 8.08–7.30 (м, 11H, Ar, H₈), 6.42 (дд, 1H, $J_{2,1}$ 7.5, $J_{2,3}$ 5.5, H_{2'}), 6.26 (д, 1H, $J_{1,2}$ 7.5, H_{1'}), 6.07 (дд, 1H, H_{3'}), 5.98 (дд, 1H, 5'-OH), 4.62 (м, 1H, H_{4'}), 4.14–4.04 (м, 2H, H_{5'}, H_{5''}), 3.68 (с, 3H, COOCH₃), 2.33 (дд, 2H, CH₂COOCH₃), 1.79–1.40 (м, 8H, C₄H₈).

Аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')-*N*⁶-[(5-метоксикарбонил)пентил]аденозин (XVI). К раствору 0.16 г (0.26 ммоль) нуклеозида (X) и 0.34 г (0.32 ммоль) диэфира (XI) в 3 мл пиридина добавляли 0.13 г (1.89 ммоль) тетразола и после его растворения 0.19 г (0.63 ммоль) TPS-Cl. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч, после чего разбавляли хлороформом до 150 мл, полученный раствор промывали 0.05 М раствором TEAB (2 \times 50 мл), высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали досуха.

К полученному остатку, содержащему динуклеозидмонофосфат (XII), добавляли 21 мл 2% раствора TsOH в смеси хлористый метилен–метанол, 7 : 3. Выдерживали реакционную смесь в течение 20 мин, затем разбавляли ее хлороформом до 100 мл, промывали 0.05 М раствором TEAB (2 \times 75 мл), высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали. Остаток хроматографировали на сили-

кагеле (170 см³), продукты реакции элюировали метанолом в хлороформе (линейный градиент концентрации 0 → 5 об.%; 1.4 л). Фракции, содержащие димер (XIII), объединяли и упаривали досуха. Остаток растворяли в 3 мл хлороформа и добавляли при перемешивании к 150 мл гексана. Осадок отфильтровывали и высушивали. Получали 0.21 г (62%) динуклеозидмонофосфата (XIII); R_f 0.60 (Б). УФ-спектр, λ_{\max} (MeOH), нм (ϵ): 230 (40000), 275 (33300).

К раствору 0.19 г (0.15 ммоль) соединения (XIII) и 0.22 г (0.21 ммоль) диэфира (XI) в 2 мл пиридина добавляли 0.13 г (1.86 ммоль) тетразола и 0.19 г (0.62 ммоль) TPS-Cl. Реакционную смесь выдерживали и обрабатывали аналогично описанному в синтезе соединения (XII). Остаток после упаривания хроматографировали на силикагеле (170 см³), элюируя продукты реакции метанолом в хлороформе (линейный градиент концентрации 0 → 2 об.%; 1.5 л). Получали 0.19 г (57%) тринуклеозиддифосфата (XIV); R_f 0.65 (Б).

Раствор 0.19 г (0.084 ммоль) соединения (XIV) в 6.8 мл 2% TsOH в смеси хлористый метилен-метанол, 7 : 3, выдерживали в течение 20 мин, разбавляли хлороформом до 70 мл, промывали 0.05 М раствором ТЕАВ (2 × 50 мл), высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали. Остаток хроматографировали на силикагеле (150 см³). Продукты реакции элюировали метанолом в хлороформе (линейный градиент концентрации 0 → 4 об.%; 1.4 л). Получали 0.15 г (90%) тримера (XV); R_f 0.58 (Б).

К 0.15 г (0.075 ммоль) тринуклеозиддифосфата (XV) добавляли раствор 1.4 мл DBU в 22 мл пиридина. Реакционную смесь выдерживали в течение 20 ч, добавляли к ней 11 мл 1 М раствора уксусной кислоты в пиридине и упаривали. Остаток растворяли в 25 мл насыщенного при 0°C раствора аммиака в метаноле, выдерживали в течение 18 ч и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма, 70 см³), элюируя продукты раствором ТЕАВ (линейный градиент концентрации 0.001 → 0.2 М; 1 л). Фракции, содержащие тример (XVI), объединяли и лиофилизовали. Получали 71 мг (75%) соединения (XVI); R_f 0.64 (Г). УФ-спектр, λ_{\max} (MeOH), нм (ϵ): 263 (37000). ¹H-ЯМР-спектр: 6.88, 6.85, 6.74, 6.69, 6.63, 6.50 (6с, 3 × H2 и 3 × H8), 4.80 (д, 1H, $J_{1,2}$ 4.0, H1'), 4.68 (д, 1H, $J_{1,2}$ 3.0, H1'), 4.59 (д, 1H, $J_{1,2}$ 4.0, H1'), 2.40 (с, 3H, COOCH₃), 1.15 (дд, CH₂COOCH₃).

Аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')-N⁶-(5-карбокспентил)аденозин (XVII). Раствор 42 мг (0.033 ммоль) тримера (XVI) в 4 мл 0.5 М раствора гидроксида натрия в смеси этанол-вода, 1 : 1, выдерживали в течение 20 мин, затем разбавляли 100 мл этой же смеси, нейтрализовали при пере-

мешивании смолой Амберлит IRC-50 в H⁺-форме до pH 7.0. Смолу отфильтровывали, промывали 60 мл вышеупомянутой смеси. Объединенные фильтрат и промывные воды упаривали досуха. Остаток хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой в HCO₃⁻-форме (100 см³), элюируя продукты раствором ТЕАВ (линейный градиент концентрации 0.001 → 0.25 М; 1.5 л). Фракции, содержащие тример (XVII), объединяли и лиофилизовали. Получали 23 мг (52%) соединения (XVII); R_f 0.58 (Г). УФ-спектр, λ_{\max} (H₂O), нм (ϵ): 263 (36000). ¹H-ЯМР-спектр: 6.89, 6.84, 6.75, 6.68, 6.63, 6.52 (6с, 3 × H2 и 3 × H8), 4.80 (д, 1H, $J_{1,2}$ 4.0, H1'), 4.68 (д, 1H, $J_{1,2}$ 3.0, H1'), 4.60 (д, 1H, $J_{1,2}$ 4.0, H1'), 0.99 (дд, 2H, CH₂COO⁻).

Конъюгат аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')-N⁶-(5-карбокспентил)аденозина с BSA (XVIII). К раствору 11 мг BSA в 1 мл 0.1 М натрий-ацетатного буфера, pH 4.8, добавляли 10 мг (0.007 ммоль) тримера (XVII) и 11 мг (0.040 ммоль) EDC. Реакционную смесь выдерживали в течение 20 ч, диализовали при 0-4°C против 0.01 М натрий-фосфатного буфера, pH 7.35, содержащего 0.15 М NaCl (4 × 250 мл), и хроматографировали на колонке с сефадексом G-10 (200 см³), элюируя продукты реакции водой. Фракции, содержащие конъюгат (XVIII), объединяли и лиофилизовали. Получали 9 мг (82%) соединения (XVIII). Содержание гаптена в конъюгате (XVIII), определенное спектрофотометрически, составляло около 4 моль на 1 моль белка.

Конъюгат аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')-N⁶-(5-карбокспентил)аденозина и метилового эфира тирозина (XIX). К раствору 5.8 мг (4.1 мкмоль) тримера (XVII) в смеси 0.3 мл DMF и 5.7 мкл (41 мкмоль) триэтиламина, охлажденному до 0-4°C, добавляли 5.4 мкл (41 мкмоль) бутилхлорформиата. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, затем добавляли к ней суспензию, полученную при смешивании 4.7 мг (20 мкмоль) гидрохлорида метилового эфира тирозина, 0.3 мл DMF и 2.8 мкл (20 мкмоль) триэтиламина. Смесь выдерживали в течение 16 ч, добавляли к ней 0.1 мл насыщенного при 0°C раствора аммиака в метаноле и упаривали. Остаток после упаривания хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма, 30 см³), элюируя продукты реакции раствором ТЕАВ (градиент концентраций 0.001 → 0.25 М; 0.6 л). Фракции, содержащие конъюгат (XIX), объединяли и лиофилизовали. Получали 2.6 мг (42%) соединения (XIX). УФ-спектр, λ_{\max} (H₂O): 263 нм. ¹H-ЯМР-спектр: 6.91, 6.89, 6.79, 6.76, 6.67, 6.58 (6с, 3 × H2 и 3 × H8), 5.69 (д, 2H, J 8.5, 2 *o*-H-Ph), 5.42 (д, 2H, J 8.5, 2 *m*-H-Ph), 4.80 (д, 1H, $J_{1,2}$ 4.0, H1'), 4.68 (д, 1H, $J_{1,2}$ 2.0, H1').

3.0, Н1'), 4.60 (д, 1Н, $J_{1,2}$ 4.0, Н1'), 2.12 (с, 3Н, OCH_3), 1.12 (дд, 2Н, CH_2CONH).

^{125}I -Меченый конъюгат аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')- N^6 -(5-карбокспентил)аденозина с метиловым эфиром тирозина (XX). К раствору 3 мкг (2.1 нмоль) конъюгата (XIX) в 10 мкл 0.1 М натрий-фосфатного буфера, pH 7.5, добавляли раствор 200 МБк Na^{125}I в 15 мкл 0.1 М гидроксида натрия и раствор 7 мкг (3.5 нмоль) хлорамина Т в 10 мкл того же натрий-фосфатного буфера. Реакционную смесь перемешивали в течение 40 с, добавляли к ней раствор 5 мкг (26 нмоль) метабисульфита натрия в 10 мкл того же буфера, затем 100 мкл 0.1 М натрий-фосфатного буфера, pH 6.8, содержащего 0.15 М NaCl и 0.02% азида натрия. Полученный раствор наносили на колонку с TSK-гелем HW-40 (0.8 × 26 см), уравновешенную тем же буфером; продукты реакции элюировали этим же буфером. Фракции, содержащие ^{125}I -меченый конъюгат (XX), объединяли и добавляли к ним 0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 6.8, содержащий 1% BSA и 0.02% азида натрия, до получения активности раствора около 50 кБк на 1 мл. Полученный раствор лиофилизировали. Получали 148 МБк (74%) соединения (XX) с радиохимической чистотой 96–99%.

Иммунизация и получение антисывороток. Антисыворотки к (2'-5')олигоаденилатам получали путем иммунизации животных (взрослых особей кроликов породы шиншилла). Животным группы А вводили подкожно в 5–6 точек спины эмульсию, состоящую из 0.25 мл полного адьюванта Фрейнда, 0.25 мл физиологического раствора и 0.25 мг конъюгата (II) в расчете на одного кролика. Повторное введение эмульсии того же состава проводили 6 раз с интервалом в 2 недели, затем через месяц до получения антисывороток с высокими титрами.

Животным групп В и С вводили аналогичным образом эмульсию, состоящую из 0.5 мл полного адьюванта Фрейнда, 0.5 мл физиологического раствора и 1 мг конъюгата (II) и (XVIII), соответственно. Повторное введение эмульсии того же состава проводили 4 раза с интервалом в 2 недели, затем через месяц до получения антисывороток с высокими титрами.

Начиная с третьего месяца иммунизации, проводили у животных пробные заборы крови из краевой вены уха на 7–10-е сут после очередной инъекции антигенного материала. Из собранных образцов обычным образом выделяли свободные от эритроцитов антисыворотки, тестировали их на наличие связывающей способности по отношению к (2'-5') A_3 и определяли их титр. При получении антисывороток с титром выше 1 : 3000 проводили забор крови до 50 мл. Из собранных образцов выделяли антисыворотки и хранили их при -20°C либо лиофилизировали и хранили при 4°C .

Определение значений индексов различия (ID_{50}) для модифицированных (2'-5')олигоаденилатов. В две серии аналитических пробирок в дубликатах вносили в первую – по 0.1 мл калибровочных проб (2'-5') A_3 с различными концентрациями (от 0 до 10 нМ), 0.1 мл раствора ^{125}I -меченого лиганда (около 30000 расп./мин на 1 пробу) и 0.1 мл антисыворотки в разведении, при котором она была способна связать 50% меченого (2'-5') A_3 , внесенного в пробу (табл. 1); во вторую серию – такие же объемы точно приготовленных растворов анализируемого олигоаденилата с концентрациями от 0 до 10 нМ, а также растворов ^{125}I -меченого лиганда и антисыворотки. Для приготовления всех растворов использовали 0.05 М натрийацетатный буфер, pH 6.2, содержащий 1% BSA. Пробы инкубировали в течение 2 ч, после чего добавляли к ним по 1 мл 10% раствора полиэтиленгликоля (M 6000), содержащего 2 мкл раствора бараньих антител к иммуноглобулинам кроликов с концентрацией белка 1 мг/мл и 0.05 мл плазмы-наполнителя, предварительно обработанной углем, покрытым декстраном, для удаления эндогенных олигонуклеотидов [18]. Пробирки выдерживали в течение 20 мин, периодически встряхивая, а затем центрифугировали при 1500–2000 г в течение 15 мин. Супернатант удаляли, пробирки помещали в γ -счетчик и измеряли скорость счета в каждой пробирке (время счета 1 мин). Для каждой пары пробирок определяли величину V/V_0 , где V – скорость счета связанного антителами ^{125}I -меченого соединения, находящегося в осадке, V_0 – скорость счета осадка при максимальном связывании меченого антигена с антисывороткой (при нулевой концентрации конкурента – немеченого олигоаденилата). Строили графики зависимости величины V/V_0 (%) от концентрации (2'-5') A_3 и исследуемого олигоаденилата в пробе. Построения проводили в координатах logit-log . По графикам находили концентрацию (2'-5') A_3 , которая вызывает в условиях эксперимента уменьшение связывания меченого лиганда на 50% (IC_{50} для (2'-5') A_3 , а также концентрацию исследуемого аналога, оказывающего такой же эффект (IC_{50} для аналога). Делением первой величины на вторую получали ID_{50} .

Авторы выражают благодарность Фонду фундаментальных исследований Республики Беларусь за финансовую поддержку исследований (грант № Х94-066).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnston M.I., Torrence P.F. // Interferon: Mechanism of Production and Action. V. 3 / Ed. R.M. Friedman. Amsterdam, New York: Elsevier Sci. Publ. B.V., 1984. P. 189–293.
2. Williams B.R.G., Brown R.E., Gilbert C.S., Golgher R.R., Wrechner D.H., Roberts W.K., Silverman R.H.,

- Kerr I.M. // *Methods Enzymol.* 1981. V. 79B. P. 198–208.
3. Kimchi A., Shure H., Revel M. // *Nature (London)*. 1979. V. 282. P. 849–851.
 4. Knight M., Cayley P.J., Silverman R.H., Wrechner D.H., Gilbert C.S., Brown R.E., Kerr I.M. // *Nature (London)*. 1980. V. 288. P. 189–192.
 5. Sawai H., Shinomiya T. // *J. Biochem.* 1982. V. 92. P. 1723–1730.
 6. Hersh S.L., Reid T.R., Friedman R., Stark G.R. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 1727–1730.
 7. Cailla H., Le Borgue De Kaouel C., Roux D., Debage M., Marti J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. P. 4742–4746.
 8. Johnston M.I., Iwai J., Lesiak K., Torrence P.F. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 3453–3460.
 9. Kvasyuk E.I., Kulak T.I., Zaitseva G.V., Mikhailopulo I.A., Charubala R., Pfeleiderer W. // *Tetrahedron Lett.* 1984. V. 25. P. 3683–3686.
 10. Квасюк Е.И., Кулак Т.И., Зайцева Г.В., Михайлопуло И.А., Пфляйдерер В. // *Биоорган. химия*. 1984. Т. 10. С. 506–514.
 11. Kvasyuk E.I., Kulak T.I., Shulyakovskaya S.M., Makarenko M.V., Mikhailopulo I.A. // *Int. J. Purine and Pyrim. Res.* 1991. V. 2. P. 73–74.
 12. Kvasyuk E.I., Kulak T.I., Shulyakovskaya S.M., Makarenko M.V., Mikhailopulo I.A., Charubala R., Pfeleiderer W. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996. V. 6. P. 521–524.
 13. Ikehara M., Uno N., Ishikawa F. // *Chem. Pharm. Bull.* 1964. V. 12. P. 267–271.
 14. Hunter W.M., Greenwood F.C. // *Nature (London)*. 1962. V. 194. P. 495–496.
 15. Rosental H.E. // *Anal. Biochem.* 1967. V. 20. P. 525–532.
 16. Johnston M.I., Iwai J., Lesiak K., Jakobsen H., Sawai H., Torrence P.F. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 4710–4718.
 17. Doornbus J., Charubala R., Pfeleiderer W., Altona C. // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. P. 4569–4582.
 18. Sawai H., Ishibashi K., Itoh M., Watanabe S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984. V. 125. P. 1061–1066.

The Relation between the Properties of Polyclonal Antibodies to (2'-5')Oligoadenylylates and the Mode of the Hapten–Immunogen Conjugation

T. I. Kulak, E. I. Kvasyuk, S. L. Sentyureva, S. M. Shulyakovskaya, V. P. Matyushevskaya, M. V. Makarenko, and I. A. Mikhailopulo*[#]

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

To elucidate the antibody–(2'-5')oligoadenylylate relation to the mode of the hapten–immunogen conjugation, a new (2'-5')oligoadenylylic acid trimer derivative containing a 2'-terminal *N*⁶-(5-carboxypentyl)adenosine and its ¹²⁵I-labeled immunogenic conjugate were synthesized. The immunization with this conjugate and with a conjugate based on the 2',3'-*O*-[1-(2-carboxyethyl)]ethylidene derivative of the (2'-5')trienylylic acid gave antisera with different affinities toward modified (2'-5')oligonucleotides. Epitopes involved in the (2'-5')oligomer-binding to different antisera were found.

Key words: antibodies, cross-reactivity, (2'-5')oligoadenylylates, radioimmunoassay

* To whom correspondence should be addressed; phonelfax: +7 (017) 264-8324; e-mail: igormikh@ns.iboch.ac.by.