



УДК 543.544.42:547.458.68

НОВЫЙ МЕТОД ПРИСОЕДИНЕНИЯ ЛИГАНДОВ К ПОЛИСАХАРИДАМ

Молотковская И. М., Дяченко В. А., Молотковский Ю. Г.*

Институт иммунологии Министерства здравоохранения СССР, Москва;

* *Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

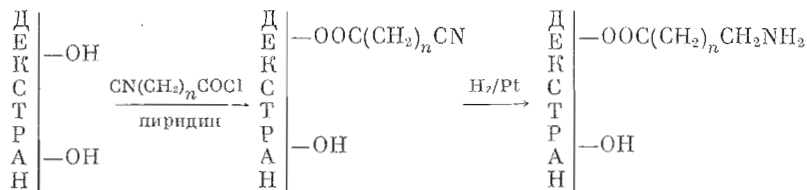
Предложен новый метод присоединения лигандов к полисахаридам: раствор полисахарида в диметилсульфоксиде ацилируют хлорангидридом ω-цианкарбоновой кислоты, цианогруппу продукта реакции гидрированием превращают в аминометильную, которая и служит местом присоединения лиганда. По этому методу синтезирована флуоресценцидекстран.

В иммунологических исследованиях в качестве антигенных молекул широко используются полисахариды, конъюгированные с низкомолекулярными соединениями, выступающими в качестве гаптенов. Методы присоединения гаптеновых остатков к углеводной матрице были разработаны в связи с развитием аффинной хроматографии. Подробные обзоры как часто используемых, так и экзотических методов ковалентной пришивки органических соединений к полисахаридной матрице (целлюлоза, декстран, сефадекс, сефароза) опубликованы ранее [1, 2]. В практике иммунохимии наибольшее распространение получил способ активации полимеров полисахаридной природы путем введения реакционноспособной иминогруппы при обработке их цианогалогенами в щелочной среде, предложенный Поратом и сотр. [3], в одной из более поздних модификаций (см., например, [4]). Другим широко используемым методом активации полисахаридов является обработка хлорацетатом в щелочной среде (вводится карбоксиметильная группа). В обоих случаях между активировавшей группой и лигандом вводится еще промежуточное удлиняющее звено. Обычно это достигается введением активированного сорбента в реакцию с α,ω-диамином, например этилендиамином (после активации хлорацетатом — в присутствии водорастворимого карбодимида [5]). При этом образуется аминокильный остаток, к которому и присоединяют затем лиганд.

Возможность изменять длину промежуточного звена важна как для аффинной хроматографии, ибо позволяет регулировать доступность лиганда, так и при работах, связанных с изучением иммуногенных свойств антигенов, так как этим путем можно контролировать подвижность гаптена.

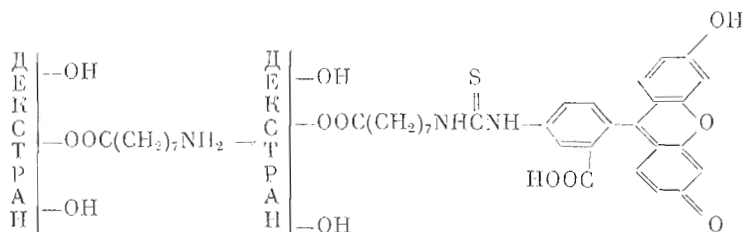
Каждый из применяемых методов связывания лиганда с полисахаридной матрицей имеет свои недостатки. Так, при обработке диаминном бромцианактивированной сефарозы реакция может идти с образованием замещенных производных изомочевины, имидокарбоната и карбамата, что не всегда допустимо.

Мы предлагаем новый метод присоединения гаптеновой группировки. Полисахарид (декстран), растворенный в сухом диметилсульфоксиде, обрабатывают хлорангидридом ω-цианалкановой кислоты с пиридином.



Частично этерифицированный декстран затем подвергают каталитическому гидрированию; полученный таким путем активированный декстран пригоден для присоединения желаемого лиганда обычными методами. Число С-атомов в исходной цианокислоте определяет расстояние между лигандом и матрицей; исходные цианокислоты легко могут быть получены из ω -бром(под)кислот, имеющих на один С-атом меньше требуемого числа, и цианистого калия или натрия по известному методу [6].

В настоящем сообщении описано присоединение к декстрану остатка 7-циангептановой кислоты ($n=6$); после восстановления натриевого остатка к образовавшейся аминогруппе мы присоединяли остаток флуоресцеина, одного из применяемых в иммунологии гаптенов, действием флуоресцеинизотиоцианата по известному методу [8]:



Достоинством предлагаемого метода присоединения лиганда к матрице является то, что активация носителя и введение цепочки-удлипителя осуществляются одновременно, при этом используются доступные и удобные в работе реагенты. Синтез не дает каких-либо побочных высокомолекулярных продуктов присоединения, низкомолекулярные же примеси, например ω -цианокислота, удаляются в ходе выделения целевого продукта.

Экспериментальная часть

7-Циангептановую кислоту получали по методу [7], декстран Т-500 (Pharmacia, Швеция) и флуоресцеинизотиоцианат (Союзреактив) применяли без дополнительной очистки; растворители и хлористый тионил очищали по обычным методикам.

7-Циангептановую кислоту (1 ммоль) растворяли 2 мл сухого хлороформа, добавляли 0,2 мл сухого диметилформаида и 1,0 ммоль пиридина, охлаждали до 0°C и добавляли 1,1 ммоль хлористого тионила. Затем температуру смеси доводили до 20°C и растворитель удаляли в вакууме, добавляли 2 мл сухого хлороформа и еще раз упаривали; операцию повторяли 3 раза. Остаток растворяли в 2 мл сухого диметилсульфоксида и добавляли к перемешиваемому раствору 1,6 ммоль декстрана в минимальном количестве (обычно 2,5–3 мл) сухого диметилсульфоксида и 0,2 мл пиридина. Смесь перемешивали 12 ч в атмосфере сухого азота при 20°C . Производное декстрана выделяли осаждением трехкратным избытком изопранола с последующим центрифугированием. Осадок, растворенный в минимальном количестве дистиллированной воды, подвергали гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25 (объем 230 мл), уравновешенным дистиллированной водой. Модифицированный декстран выходил с колонки в свободном объеме. Элюат диофильно высушивали, остаток растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды и гидрировали над 50 мг предварительно восстановленной окиси платины при постоянном токе водорода (0,2 мл/мин) в течение 2 сут. Катализатор отделяли центрифугированием, рН раствора доводили до 9,2 прибавлением натрий-фосфатного буфера (конечная концентрация буфера 0,05 М). Реакцию с флуоресцеинизотиоцианатом (380 мг, или 0,98 ммоль) проводили по методике [8] при перемешивании в течение 1 сут. Побочные продукты реакции удаляли диализом (1 сут) против фосфатного буфера (0,05 М, рН 9,2) и последующей гель-фильтрацией вещества на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным тем же буфером. Концентрацию декстрана определяли

по антроновой реакции [9], производного флуоресцеина — по поглощению при длине волны 493 нм, считая молекулярный коэффициент поглощения равным $7,52 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [10]. Количество иммобилизованного флуоресцеина составило 13 группировок на 1 молекулу декстрана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы/Ред. Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К. М.: Изд-во МГУ, 1976, т. 1, с. 71–87.
2. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980, с. 177–181.
3. Porath J., Ernback S., Azen R. Nature, 1967, v. 215, № 5109, p. 1491–1492.
4. Azen R., Ernback S. Eur. J. Biochem., 1971, v. 18, № 3, p. 351–360.
5. Inman J. K. J. Immunol., 1975, v. 114, № 2, p. 704–709.
6. Methoden der Organischen Chemie (Houben – Weyl). Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1952, B. VIII, S. 293.
7. Бергельсон Л. Д., Мологковский Ю. Г., Шемякин М. М. Ж. общ. химии, 1962, т. 32, № 1, с. 58–64.
8. Kasche V., Buchtmann I. Hoppe – Seyler's Z. physiol. Chem., 1981, B. 362, № 7, S. 1007–1012.
9. Кук Дж. В кн.: Биохимическое исследование мембран/Ред. Медди Э. М.: Мир, 1979, с. 287–288.
10. Lopatin D. E., Voss E. W. Biochemistry, 1971, v. 10, № 2, p. 208–213.

Поступила в редакцию
20.XII.1983

A NEW METHOD FOR ATTACHING LIGANDS TO POLYSACCHARIDES

MOLOTKOVSKAYA I. M., LYASHENKO V. A., MOLOTKOVSKY Jul. G.*

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

A new method for linking the ligand molecules to a polysaccharide matrix was elaborated. It involves acylation of polysaccharide, dissolved in dimethylsulfoxide, with a ω -cyanocarboxylic acid chloride. The cyano group of the resulting compound is transformed by hydrogenation into aminomethyl group which is a host one for attaching the ligand. Fluorescein dextran is prepared by this procedure.