



УДК: 547.455 + 577.154.072

СИНТЕЗ ТИОГЛИКОЗИДОВ

ВЫДЕЛЕНИЕ N-АЦЕТИЛ-β-D-ГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ
ИЗ *АСМАЕА PALLIDA* АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

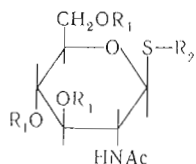
Артюков А. А., Молодцов Н. В.

Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного научного центра АН СССР, Владивосток

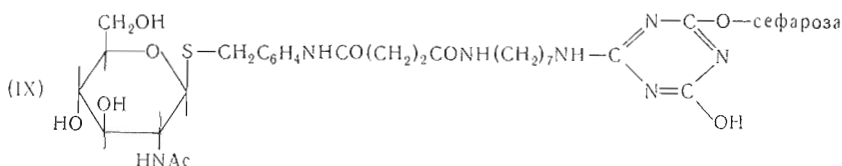
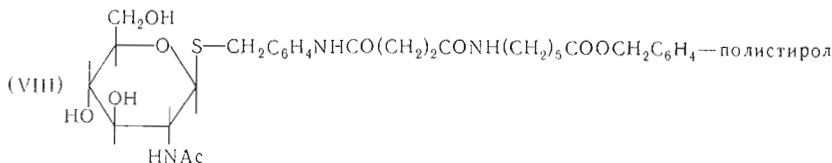
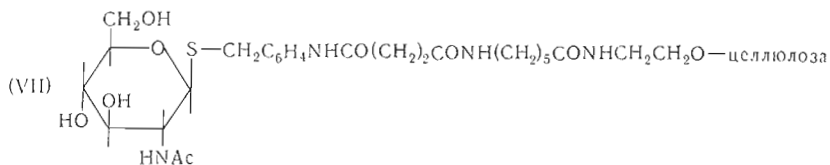
Описан метод синтеза тиогликозидов N-ацетил-D-глюкозамина и их присоединение к ряду полимеров (сефароза 4Б, полистирол и аминоэтилцеллюлоза). Полученные носители были использованы при аффинной хроматографии N-ацетил-β-D-гексозаминидазы из *Asmaea pallida*.

Аффинная хроматография представляет собой простой и удобный метод, широко используемый в последнее время в различных биохимических исследованиях, особенно при выделении и очистке ферментов. В настоящей работе описывается получение ряда тиогликозидов на основе 1-дезоксип-1-тио-2-ацетиамидо-2-дезоксип-β-D-глюкопиранозы с линейным агликоном и их использование при аффинной хроматографии в качестве активных групп сорбентов N-ацетил-β-D-гексозаминидазы (КФ 3.2.1.30). По модифицированному нами методу Матта и соавт. [1] реакцией *n*-нитробензилбромидом с хлоргидратом 2-(2-ацетиамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксип-β-D-глюкопиранозил)-2-псевдотиомочевины (I) получен *n*-нитробензил - 1-дезоксип-1-тио-2-ацетиамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксип-β-D-глюкопиранозид (II) с выходом 84%, из которого после дезацетилирования, восстановления и обработки янтарным ангидридом получен *n*-N-сукцинилиамидобензил - 1-дезоксип-1-тио-2-ацетиамидо-2-дезоксип-β-D-глюкопиранозид (V). При взаимодействии последнего с метиловым эфиром ε-аминокапроновой кислоты получен метиловый эфир N-(*n*-N-сукцинилиамидобензил-1-дезоксип-1-тио-2-ацетиамидо-2-дезоксип-β-D-глюкопиранозил)-ε-аминокапроновой кислоты (VI), далее омыленный до свободной кислоты (VIa). При конденсации кислоты (VIa) с аминоэтилцеллюлозой и хлорметиловым полистиролом были получены сорбенты (VII) и (VIII), а при конденсации соединения (V) с гексаметилендиаминным производным сефарозы 4Б получен сорбент (IX), в дальнейшем использованный для аффинной хроматографии N-ацетил-β-D-гексозаминидазы из *Asmaea pallida*.

N-Ацетил-β-D-гексозаминидазу (6 мг белка с удельной активностью 25,5 МЕ/мг в 100 мл 0,05 М фосфатного буфера (pH 5,7)), очищенную по описанному ранее методу [2], пропускали через колонку (0,8 × 6 см) с сорбентом (IX); колонку промывали тем же буфером, затем буфером с линейно возрастающей ионной силой (0 → 2,5 М NaCl), 0,1% твин-40 в буфере и вновь 0,05 М фосфатным буфером (pH 5,7). При увеличении ион-



- (I) $R_1 = \text{Ac}$ $R_2 = \text{Cl}^-$ $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$
- (II) $R_1 = \text{Ac}$ $R_2 = n\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{—}$
- (III) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = n\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{—}$
- (IV) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = n\text{-NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{—}$
- (V) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = n\text{-HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{CONHC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{—}$
- (VI) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = n\text{-CH}_3\text{OOC}(\text{CH}_2)_5\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONHC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{—}$
- (VIa) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = n\text{-HOOC}(\text{CH}_2)_5\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONHC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{—}$



ной силы буферного раствора элюировался белковый компонент, не обладающий ферментативной активностью (рис. 1). N-Ацетил-β-D-гексозаминидазу элюировали с колонки 0,2 М боратным буфером (рН 8,5) (рис. 1) с последующим быстрым титрованием элюата 0,2 М цитратно-фосфатным буфером до рН 4,0. При этом удается стабилизировать выделенный фермент, быстро и необратимо инактивирующийся при щелочных значениях рН. Выход белка 1,5 мг, удельная активность 100 МЕ/мг. По сравнению с экстрактом тканей печени *Actaea pallida* (удельная активность экстракта 0,17 МЕ/мг) N-ацетил-β-D-гексозаминидаза была очищена в 600 раз. По данным электрофореза в полиакриламидном геле выделенный фермент содержал только один белковый компонент, совпадающий с активным пиком при исследовании гелей на ферментативную активность (рис. 2).

Белковую фракцию (400 мг белка с удельной активностью 0,26 МЕ/мг), полученную после фракционирования сульфатом аммония экстракта тканей печени *Actaea pallida*, растворяли в 45 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 5,7), раствор диализовали против того же буфера в течение 16 ч и пропускали через колонку (0,6 × 12 см) с сорбентом (VIII). При этом связывалось 47% N-ацетил-β-D-гексозаминидазы без заметной инактивации фермента. Связанный фермент элюировали так же (рис. 3), как и в предыдущем опыте (рис. 1). Выход белка 10,5 мг, удельная активность 10 МЕ/мг. Аналогичные результаты были получены при использовании сорбента (VII). Все примененные носители могли быть использованы

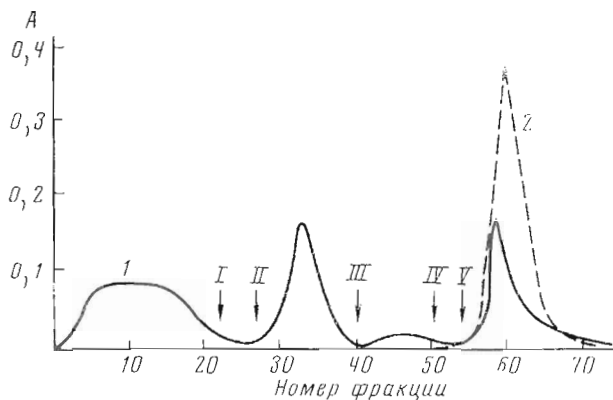


Рис. 1. Аффинная хроматография очищенной N-ацетил- β -D-гексозаминазы на модифицированной сефарозе (IX): 1 — белок (280 нм), 2 — ферментативная активность (440 нм); I — 0,05 М фосфатный буфер (рН 5,7); II — NaCl (0 \rightarrow 2,5 М) в том же буфере; III — 0,1% твин-40 в буфере; IV — 0,05 М фосфатный буфер (рН 5,7), V — 0,2 М боратный буфер (рН 8,5); объем фракций 5 мл, скорость элюции 15 мл/ч, температура 4^о

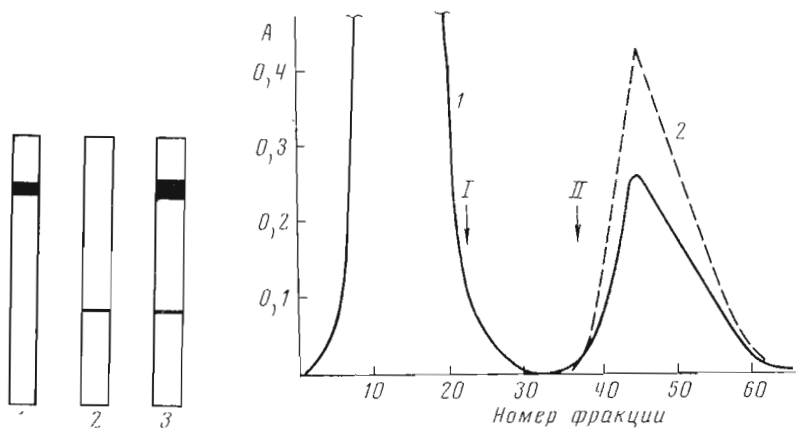


Рис. 2

Рис. 3

Рис. 2. Электрофорез в полиакриламидном геле различных фракций N-ацетил- β -D-гексозаминазы: 1 — N-ацетил- β -D-гексозаминаза, выделенная хроматографией на сефарозе (IX), 2 — белок (фракции 30—37, рис. 1); 3 — N-ацетил- β -D-гексозаминаза, выделенная ранее описанным методом [2]

Рис. 3. Аффинная хроматография экстракта тканей печени *Astaea pallida* на модифицированном полистироле (VIII). Обозначения — см. рис. 1; I — 0,05 М фосфатный буфер (рН 5,7), II — 0,2 М боратный буфер (рН 8,5), объем фракций 2,5 мл, скорость элюции 15 мл/ч, температура 25^о

повторно после их регенерации 6 М мочевиной в 1 М NaH_2PO_4 и последующего уравнивания буфером.

Аффинную хроматографию для выделения и очистки N-ацетил- β -D-гексозаминазы стали применять сравнительно недавно [3—7]. В качестве сорбентов для этого использовали полученный из носовой перегородки быка гликопептид, связанный с сефарозой 4Б, активированной BrCN [3], *n*-аминофенил-1-дезоксиглюкопиранозид, присоединенный карбодимидным методом к сукцинизированной диаминодипропиламиноагарозе [4], а также *n*-аминобензил-1-дезоксиглюкопиранозид [5], 2-ацета-

мидо-N-(ε-аминокапроил-2-дезоксид-D-глюкопиранозиламин) [6], 2-ацетамидо-2-дезоксид-D-глюконо-1,4-лактон, 2-ацетамидо-2-дезоксид-D-галактоно-1,4-лактон и 2-ацетамидо-2-дезоксид-D-манноно-1,4-лактон [7]. Примененные ингибиторы прочно связывали N-ацетил-β-D-гексозаминидазу и позволяли выделить фермент высокой степени чистоты.

Экспериментальная часть

Спектры ПМР веществ в дейтерохлороформе получены в приборе «Bruker Spectrospin-90», (ФРГ), ИК-спектры — в приборе UR-20; удельное вращение веществ определено в поляриметре «Perkin-Elmer 141» (США), точки плавления веществ измерены в приборе «Boetius» (ГДР). Использованы реактивы: аминоэтилцеллюлоза («Whatman», Англия), смола Меррифилда («Reanal», Венгрия), сефароза 4Б («Pharmacia», Швеция).

Ферментативную активность определяли при 25° в 0,3 мл 0,33 М цитрат-фосфатного буфера (рН 4,0), используя в качестве субстрата *n*-нитрофенил-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид в концентрации 0,33 мг/мл. Реакцию останавливали прибавлением 1 мл 1 М Na₂CO₃, и количество образовавшегося *n*-нитрофенола определяли по поглощению раствора при 440 нм, используя спектроколориметр «Spectol» (ГДР). За единицу активности принимали количество фермента, которое освобождает при 25° 1 мкмоль *n*-нитрофенола за 1 мин.

Белок определяли методом Лоури [8]. Электрофорез в 7,5%-ном полиакриламидном геле проводили по методу Дэвиса [9] с прокрашиванием белковых полос кумасси голубым [10].

Хлоргидрат 2-(2-ацетамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-псевдотимочевин (I) получали из 2-ацетамидо-2-дезоксид-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилхлорида по методу Хортон и Волфрама [11].

n-Нитробензил-1-дезоксид-1-тио-2-ацетамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (II). К раствору, содержащему 2,2 г (5 ммоль) соединения (I) и 1,44 г (6,7 ммоль) *n*-нитробензилбромида в 10 мл ацетона, при интенсивном перемешивании прибавляли 1,3 г (9,4 ммоль) K₂CO₃ в 12 мл воды. Смесь перемешивали при 20° и через 20 мин, когда начинал образовываться белый аморфный осадок, прибавляли еще 10 мл ацетона. После этого смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем разбавляли 20 мл воды и экстрагировали 40 мл хлороформа. Хлороформный слой промывали водой и высушивали над MgSO₄. Хлороформ упаривали почти досуха и прибавляли 20 мл абс. эфира. Выпавшие белые кристаллы отфильтровывали, промывали абс. эфиром и высушивали. Выход 2,1 г (84%), т. пл. 219—220° (из хлороформа); [α]_D¹⁷ —123° (с 1, хлороформ); по данным работы [1]: т. пл. 217—219°; [α]_D²⁵ —125° (с 1, хлороформ); ИК ν_{макс}^{КBr} 3300 (NH), 1745 (OAc), 1663, 1558 (CONH), 1531, 1378 (NO₂), 1660 см⁻¹ (аромат); ПМР (δ, м. д.), 1,87 (3H, NAc), 1,96—2,05 (9H, OAc), 3,61 (H₅), 3,92 (SCH₂), 4,14 (H₂, 2H₆), 4,36 (H₁, дублет, J 9 Гц, β-связь), 5,03 (H₃, H₄), 5,78 (1 H, NH), 7,45, 8,09 (4 H, C₆H₄). Анализ: C₂₁H₂₆N₂O₁₀S. Вычислено, %: C 50,56; H 5,26; N 5,61; S 6,42. Найдено, %: C 50,55; H 5,6; N 5,58; S 6,43.

n-Нитробензил-1-дезоксид-1-тио-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (III). Деацетилирование соединения (II) осуществляли по методу Матта и соавт. [1]. Выход 83%; т. пл. 232—233°; [α]_D¹⁷ —116° (с 1, 50%-ный водн. метанол); по данным работы [1]: т. пл. 231—233°; [α]_D²⁵ —116°.

n-Аминобензил-1-дезоксид-1-тио-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (IV) [1]. Выход 93%; т. пл. 203—206° (из метанола); [α]_D¹⁷ —119° (с 1, метанол); по данным работы [1]: т. пл. 204—207°; [α]_D²⁷ —120°.

n-N-Суцциниламидобензил-1-дезоксид-1-тио-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (V). К раствору, содержащему 2,75 г (8 ммоль) соедине-

ния (IV) в 50 мл охлажденного до 0° метанола, прибавляли 1,2-кратный мольный избыток янтарного ангидрида в 25 мл абс. хлороформа. Смесь перемешивали 2 ч при 0—4°, а затем еще 2 ч при комнатной температуре. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали метанолом и высушивали. Из маточного раствора выделено дополнительное количество соединения (V). Общий выход 3,55 г (80,7%); т. пл. 219,5—221° (из метанола); $[\alpha]_D^{17} - 106,5^\circ$ (*c* 1, пиридин); ИК $\nu_{\text{макс}}^{\text{KBr}}$ 3600—3200, 1700, 1658, 1634, 1597, 1545, 1405, 1370, 1315 см^{-1} . Анализ: $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$. Вычислено, %: С 51,57; Н 5,92; N 6,35; S 7,25. Найдено, %: С 51,71; Н 5,95; N 6,39; S 7,55.

Метиловый эфир N-(n-N-сукциниламидобензил-1-дезоксид-1-тио-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-ε-аминокапроновой кислоты (VI). К раствору, содержащему 0,442 г (1,0 ммоль) соединения (V) в 10 мл 90%-ного водного тетрагидрофурана и 5 мл пиридина, прибавляли 0,182 г (1,0 ммоль) хлоргидрата метилового эфира ε-аминокапроновой кислоты, 0,11 г (1,1 ммоль) триэтиламина, 10 мл хлороформа и 0,3 г (1,46 ммоль) дициклогексилкарбодимида в 5 мл пиридина. Смесь перемешивали в течение 2 ч при 0—5°, а затем еще 10 ч при комнатной температуре. Раствор упаривали до минимального объема и к остатку прибавляли 100 мл воды. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, а фильтрат экстрагировали эфиром дважды по 30 мл. Водный слой упаривали в вакууме и получали белые кристаллы соединения (VI). Выход 0,386 г (67%); т. пл. 203—206° (из воды); $[\alpha]_D^{17} - 65,4^\circ$ (*c* 0,5, 50%-ный водн. метанол). Анализ: $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$. Вычислено, %: С 54,80; Н 6,90; N 7,36; S 5,62. Найдено, %: С 54,90; Н 7,33; N 7,41; S 5,67.

N-(n-N-сукциниламидобензил-1-дезоксид-1-тио-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-ε-аминокапроновая кислота (VIa). Гидролиз соединения (VI) осуществляли 2-кратным избытком NaOH в водно-метанольном растворе при 50° в течение 1 ч. Конец гидролиза контролировали методом электрофореза на бумаге в системе $(\text{Et})_3\text{N}-\text{NH}_4\text{OH}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (1:1:30:70). Полученную кислоту (VIa) не выделяли, а после подкисления гидролизата по конго использовали для конденсации с матрицей.

Присоединение N-(n-N-сукциниламидобензил-1-дезоксид-1-тио-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-ε-аминокапроновой кислоты (VIa) к аминоэтилцеллюлозе. К раствору, содержащему 0,2 г (0,32 ммоль) соединения (VIa) в 10 мл 50%-ного водного пиридина, прибавляли 0,5 г аминоэтилцеллюлозы и 0,1 г (0,48 ммоль) дициклогексилкарбодимида. Смесь перемешивали в течение 12 ч при 20°. Целлюлозу (VII) отфильтровывали и тщательно промывали (по 300 мл) диоксаном, водой, метанолом, ацетоном и снова водой. Сорбент (VII) суспендировали в небольшом количестве воды и ацетилировали оставшиеся свободные аминогруппы аминоэтилцеллюлозы избытком уксусного ангидрида при 0°.

Присоединение N-(n-N-сукциниламидобензил-1-дезоксид-1-тио-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-ε-аминокапроновой кислоты (VIa) к сополимеру стирола и дивинилбензола. Смолу Меррифилда хлорметилюрили по описанному методу [12]. Степень включения хлора в полимер определяли модифицированным методом Фольгарда (см. [13]). К 0,185 г (0,3 ммоль) соединения (VIa) в 20 мл пиридина прибавляли 1 г полимера (3—4 ммоль хлора) и эквимолекулярное количество триэтиламина (0,3 ммоль). Смесь встряхивали в течение 85 ч при комнатной температуре. Полимер (VIII) отфильтровывали и тщательно промывали (по 300 мл) диоксаном, пиридином, метанолом, водой, ацетоном и снова водой. Анализ полученного сорбента (VIII): Cl < 1 ммоль, D-глюкозамин — 0,04 ммоль на 1 г полимера.

Активирование сефарозы 4B трихлортриазинном [14]. К суспензии 22 мг сефарозы 4B в 20 мл воды прибавляли 4 г цианурхлорида в 25 мл ацетона при 18 ± 1°. Прибавлением 1 M NaOH pH смеси доводили до 11 и поддерживали это значение pH в течение 5 мин. Полученную суспензию

добавляли к 50 мл 25% CH_3COOH , сефарозу отфильтровывали и промывали (по 300 мл) ацетоном, водой, диоксаном и снова водой.

Получение гептаметилендиаминного производного сефарозы 4Б. К раствору, содержащему 2 г гептаметилендиамина в 20 мл 5% NaHCO_3 (рН 8,3), прибавляли 22 мл сефарозы, активированной цианурхлоридом. Смесь интенсивно перемешивали в течение 10 мин при 18°. Сефарозу отфильтровывали и промывали (по 300 мл) водой, ацетоном и снова водой до отрицательной нингидриновой реакции фильтрата. Гидролиз третьего атома хлора в молекуле двузамещенного триамина проводили описанным методом [14].

Присоединение п-N-сукциниламидобензил-1-дезоксиглюкопиранозидов (V) к гептаметилендиаминному производному сефарозы 4Б. К раствору, содержащему 9,25 г (0,56 ммоль) соединения (V) в 5 мл метанола, прибавляли суспензию полученной сефарозы в 20 мл диоксана и 0,2 г (1 ммоль) дициклогексилкарбодимида. Смесь интенсивно перемешивали 12 ч при 18°. Сефарозу (IX) отфильтровывали и тщательно промывали (по 300 мл) диоксаном, метанолом, водой, ацетоном и снова водой. Полученный сорбент (IX) хранили при 4°.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matta K. L., Johnson E. A. Z., Girotra R. N., Barlow J. J. (1973) *Carbohydr. Res.*, **30**, 414—417.
2. Сундукова Е. В., Вафина М. Г., Молодцов Н. В. (1974) *Биохимия*, **39**, 834—838.
3. Dawson G., Propper R. L., Dorfman A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1102—1110.
4. Grebner E. E., Parikh I. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **350**, 437—441.
5. Rafestin M. E., Obrenovitch A., Oblin A., Monsigny M. (1974) *FEBS Lett.*, **40**, 57—61.
6. Geiger B., Ben-Yoseph Y., Arnon R. (1974) *FEBS Lett.*, **45**, 276—281.
7. Pokorny M., Glaudemans C. P. J. (1975) *FEBS Lett.*, **50**, 66—69.
8. Lowry O. H., Roserbrough N. J., Farr A. L., Randall R. H. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
9. Davis B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404.
10. Chrambach A., Reisfeld R. A., Wyckoff M., Zaccari J. (1967) *Anal. Biochem.*, **20**, 150.
11. Horton D., Wolfrom M. L. (1962) *J. Org. Chem.*, **27**, 1794.
12. Стюарт Дж., Янг Дж. (1971) Твердофазный синтез пептидов, стр. 67—68, «Мир», М.
13. Стюарт Дж., Янг Дж. (1971) Твердофазный синтез пептидов, стр. 127—129, «Мир», М.
4. Ray G., Crook E. (1967) *Nature*, **216**, 514.

SYNTHESIS OF THIOGLYCOSIDES.

SEPARATION OF N-ACETYL- β -D-HEXOSAMINIDASE FROM *ACMAEA PALLIDA* BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

ARTYUKOV A. A., MOLODTSOV N. V.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far East Scientific Centre. Academy of Sciences
of the USSR, Vladivostok*

Synthesis of thioglycosides and their coupling to Sepharose 4B, polystyrene and AE-cellulose is described. The adsorbents produced were used for affinity chromatography of N-acetyl- β -D-hexosaminidase obtained from *Acmaca pallida*.