



УДК 547.455.9'29'466.057:542.95.6:541.69

ИММОБИЛИЗАЦИЯ N-АЦЕТИЛМУРАМОИЛ-*L*-АЛАНИЛ-*D*-ИЗОГЛУТАМИНА НА ПОЛИАКРИЛАМИДЕ *

Хорлин А. Я., Абамев Ю. П. **

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

Осуществлены синтез N¹-(N-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутаминил)-N⁶-акрилоилгексаметилендиамина и его сополимеризация с акриламидом. Действием N-оксисукцинимиды и дициклогексилкарбодимиды на N-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамин (МДП) получен активированный эфир МДП, который в реакции с 2,5 моль моно-N-акрилоилгексаметилендиамина дал продукт бис-конденсации — гликозилламин МДП-акрилоилгексаметилендиамина. Гидролиз последнего катионитом привел к МДП-акрилоилгексаметилендиамину. Сополимеризация его с акриламидом в мольных соотношениях 1:44 и 1:7 в условиях контролируемого роста полимерной цепи с использованием персульфата аммония в качестве инициатора и цистеина в качестве ограничителя полимеризации дала сополимеры с кажущейся степенью полимеризации ~10³ и с исходными соотношениями мономеров. В тестах миграции лейкоцитов стимулирующая активность полимерных производных МДП сопоставима с активностью МДП.

N-Ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамин — минимальный иммуноактивный фрагмент пептидогликанов клеточных стенок бактерий, используемых в полном адьюванте Фрейнда. Ценные свойства МДП стимулировали поиск новых иммуноактивных соединений в ряду мурамоилпептидов и изучение путей их использования в иммунологии (см. обзоры [1—4]). Интересным и важным направлением является иммобилизация МДП и его аналогов на полимерных природных и синтетических матрицах. Ковалентная привязка МДП к синтетическим полипептидам, так называемая макромолекулярная привязка МДП, приводит к «полимерным» МДП, которые, хотя и не отличаются от «мономера» по адьювантной активности, на два порядка активнее него в потенцировании устойчивости мышей к бактериальной инфекции [5, 6]. В отличие от МДП его полимерные аналоги являются иммуногенами, вызывающими продукцию антител против самого МДП [7, 8].

Для повышения иммуногенности природных антигенов предложена ковалентная привязка МДП или его производных к поверхности клеток [9], к белкам [7, 10—12] и к бактериальным полисахаридам [13, 14]. Новые возможности открывает встраивание иммуностимуляторов в синтетические вакцины, принцип создания которых впервые сформулировал Села [15]. Показана возможность повышения активности синтетических иммуногенов — гаптенов, иммобилизованных на синтетических полипептидах, путем ковалентной привязки к матрице мурамоилдипептида [5, 15—17].

При привязке МДП к полимерам использовались три его группировки: карбоксильная группа С-концевой аминокислоты, гликозидный центр и С-6-атом остатка мурамовой кислоты. Адьювантная активность надежно сохранялась только при привязке МДП за С-концевую аминокислотный остаток [7, 8, 13, 14, 16, 17].

Иммобилизация мурамоилпептидов на синтетических полимерах по реакции полимеризации до настоящего времени не была известна. Дан-

* Принятые сокращения: МДП — N-ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамин (мурамоилдипептид), TFA — трифторацетил, Ac — ацетил, DCC — N,N-дициклогексилкарбодимид, NOSu — N-оксисукцинимид.

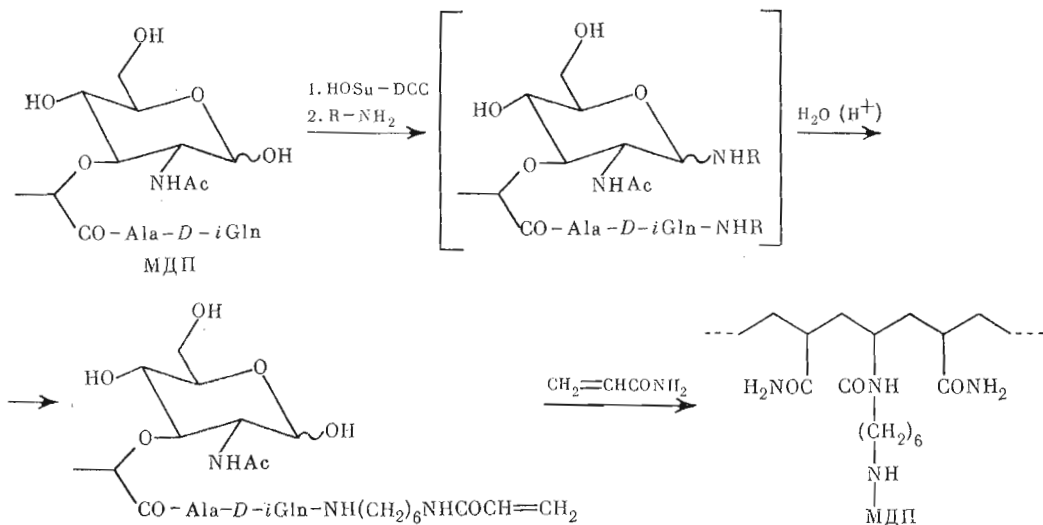
** НИИ иммунологии Министерства здравоохранения СССР, Москва.

ная работа посвящена синтезу N¹-(N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутаминил)-N⁶-акрилоилгексаметилендиамин (I) и его сополимеризации с акриламидом, которая приводит к иммобилизации МДП на полиакриламиде. Выбор структуры (I) обусловлен тем, что она позволяет привязывать МДП к полимеру за С-концевую аминокислоту, т. е. способом, дающим наибольшую вероятность сохранения иммуностимулирующей активности. Выбор полиакриламидной матрицы был обусловлен следующими причинами. В литературе показана возможность синтеза искусственных антигенов по реакции сополимеризации алкилгликозидов с акриламидом. Этим способом получены искусственные антигены с групповой специфичностью АВН [18—20] и серологической специфичностью О-факторов 3 и 4 сальмонелл [21—23]. Использование в сополимеризации мономера (I) открывает возможность встраивания иммуностимулятора в синтетические антигены, сконструированные на полиакриламидной матрице. Далее, иммобилизация МДП на полиакриламиде позволит проследить влияние матрицы на биологические свойства «макромолекуляризованного» МДП. Наконец, на основе мономера (I) возможно создание сорбентов для исследования белков, узнающих структуру МДП, подобных аффинным полиакриламидным гелям, которые применяются в исследованиях лектинов [24, 25].

В синтезе соединения (I) встретился ряд трудностей. При конденсации гексаметилендиамина с активированным эфиром МДП, полученным действием на МДП N-оксисукцинимида и дициклогексилкарбодимида, образовалась смесь продуктов реакции, из которой выделить целевое соединение — N-(N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутаминил)гексаметилендиамин — не удалось. Удовлетворительные результаты дало использование моно-N-ацелированного гексаметилендиамина. Первоначально нами был выбран моно-N-трифторацетилгексаметилендиамин. При взаимодействии эквимольных количеств последнего и активированного эфира МДП, по данным ТСХ, реакция проходила гладко: исходные соединения быстро исчезали из реакционной смеси, одновременно появлялось пятно продукта конденсации. Однако при выделении целевого продукта реакции — N¹-(N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутаминил)-N⁶-трифторацетилгексаметилендиамина, при котором имела место обработка катионитом, основная масса исходного МДП возвращалась неизменной, а целевой продукт был получен с выходами, не превышающими 10—15%. Причину такого результата следовало искать в побочном образовании гликозиламина за счет взаимодействия моноацелированного гексаметилендиамина с аномерным центром МДП. Действительно, при взаимодействии эквимольных количеств самого МДП и ТФА-гексаметилендиамина исходные вещества, по данным ТСХ, также быстро исчезали из реакционной смеси, однако выделение, включавшее в себя обработку реакционной массы катионитом, приводило к практически количественному возврату МДП.

Удовлетворительные результаты были получены при соотношениях активированного эфира МДП и ТФА-гексаметилендиамина 1:2,5—1:3,0. В этих случаях мономер был получен с выходами ~70%. Его строение было подтверждено данными элементного анализа и кислотного гидролиза, в результате которого методом ТСХ были идентифицированы мурамовая кислота, аланин, глутаминовая кислота и гексаметилендиамин, а также спектром ПМР, в котором присутствовали сигналы трех СН₃-групп, принадлежащие остаткам N-ацетилмурамовой кислоты и аланина, и четырех СН₂-групп гексаметилендиамина.

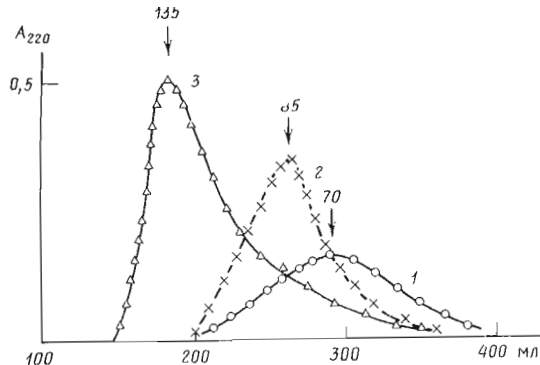
Для перехода от ТФА-производного к соединению (I) требовалось удаление ТФА-защиты и введение вместо нее остатка акриловой кислоты. Однако нам не удалось избирательно удалить ТФА-защиту. В условиях мягкого щелочного гидролиза (водный Са(ОН)₂ или ОН⁻-форма анионита в водном метаноле), применяемого для этой цели [25, 26], проходило отщепление лактилдипептида от аминоксахара по реакции β-элиминирования. Поэтому в дальнейшем в конденсацию с активированным эфиром МДП был взят моно-N-акрилоилгексаметилендиамин, синтез которого



был описан в работе [27]. Его конденсация с активированным эфиром МДП (см. схему) проходила аналогично описанному выше с образованием промежуточного продукта бис-конденсации (см. схему). При мольном соотношении моно-N-акрилоилгексаметилендиамина и активированного эфира МДП, равном 2,5:1, соединение (I) было получено с выходом ~70%. Его строение подтверждено данными элементного анализа и ПМР-спектроскопии. В ПМР-спектрах присутствовали сигналы, отвечающие трем CH_3 -группам, четырем CH_2 -звеньям гексаметилендиамина, и сигналы $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}$ -группировки (см. «Экспериментальную часть»).

Сополимеризация мономера (I) и акриламида осуществлялась в условиях реакции передачи цепи с использованием в качестве ограничителя полимеризации цистеина и в качестве инициатора — персульфата аммония. Условия были подобраны при полимеризации акриламида (см. «Экспериментальную часть»). В этих условиях образовывались полидисперсные полимеры; их кажущиеся среднечисловые молекулярные массы определялись с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-100 (рисупок). Следовало ожидать, что при сополимеризации акриламид и соединение (I) будут обладать одинаковой или близкой реакционной способностью. Экспериментально это подтверждено на двух примерах сополимеризации мономера (I) и акриламида, взятых в мольных соотношениях 1 : 44 и 1 : 7. В обоих случаях в найденных стандартных условиях сополимеризация протекала гладко, образующиеся сополимеры очищались переосаждением метанолом из водного раствора и последующей гель-хроматографией (рисунок). Количество МДП, иммобилизованного таким образом на полиакриламидной матрице, было вычислено по содержанию в полимерах N-ацетилмуравовой кислоты. Полимеры подвергались кислотному метанолизу, образующиеся метилгликозиды метилового эфира муравовой кислоты re-N-ацетилировались и превращались в триметилсилиловые эфиры, которые определялись с помощью ГЖХ. Найденное содержание N-ацетилмуравовой кислоты в сополимерах (1 : 44 и 1 : 7) было близко исходным мольным соотношениям мономеров (см. таблицу).

Определение кажущихся среднечисловых молекулярных масс для полиакриламида, сополимера 1 : 44 и сополимера 1 : 7 дало соответственно величины 70, 85 и 135 кДа, которые отвечали степени полимеризации $\sim 10^3$. Эти результаты были получены с использованием шкалы 10–150 кДа, справедливой для глобулярных белков, а следовательно, и для стандартов, взятых для калибровки колонки (см. «Экспериментальную часть»). Для разделяемых на сефадексе G-100 полисахаридов интервал молекулярных масс со-



Профили элюции полиакриламида (1), сополимеров 1:44 (2) и 1:7 (3) при гель-хроматографии на колонке (120××2 см) с сефадексом G-100 (средний) в 0,1 М CH_3COOH . Указаны M_r полимеров в килодальтонах

ставляет 10—100 кДа. Вычисленные по полисахаридной шкале кажущиеся среднечисловые молекулярные массы полиакриламида и сополимеров 1:44 и 1:7 соответственно составляют 65, 70 и 85 кДа, а степень полимеризации — около 700.

Подводя итоги полученным результатам, можно заключить, что соединение (1), синтезированное в данной работе, является удобным мономером для иммобилизации МДП на полиакриламидной матрице по реакции сополимеризации с акриламидом. Использование этого мономера позволяет в широких пределах варьировать содержание МДП в полимерах.

Активность сополимеров оценивалась в опытах *in vitro* в тексте активации миграции лейкоцитов в агаре. МДП и сополимеры 1:44 и 1:7 в дозах, эквивалентных по содержанию МДП, характеризовались одинаковыми миграционными индексами. Таким образом, МДП и его полимерные аналоги не различались по своей активности в этом тесте*. Эти данные позволяют предположить, что сополимеризация содержащего МДП мономера (1) может служить методом встраивания иммуностимулятора в искусственные антигены, конструируемые на полиакриламидной матрице.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на приборе Boetius (ГДР), оптическое вращение при 20°С — на поляриметре Perkin — Elmer 141 (США). Спектры ПМР сняты на спектрометре Varian SC-300 (США) относительно ТМС в шкале δ . ТСХ проводили на пластинках силуфол УФ-254 (Chemapol, СССР) в системах хлороформ — метанол, 9:1 (А), *n*-бутанол — пиридин — вода, 4:1:1 (Б). Пятна обнаруживали нагреванием пластинок при 200—250°С или опрыскиванием их раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием при 60—100°С. Гидролиз для аминокислотного анализа осуществляли в стандартных условиях; анализ проводили на аминокислотном анализаторе Liquimat (Labotron, ФРГ). Растворители упаривали в вакууме при температуре не выше 25°С.

N-Ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*-изоглутамин синтезирован способом, описанным в работе [28], $[\alpha]_D^{20} +31^\circ$ (*c* 0,85, вода), $[\alpha]_D^{20} +36^\circ$ (*c* 1,0, метанол); аминокислотный анализ Mur: 1,00; Ala 1,01; Glu 1,00. Литературные данные [28]: $[\alpha]_D^{20} +33,1^\circ$ (*c* 0,51, вода).

Моно-*N*-трифторацетилгексаметилендиамин. К раствору 8,5 г (73,3 ммоль) свежеперегнанного гексаметилендиамина в 25 мл абс. метанола добавляли 9,5 г (66,3 ммоль) этилового эфира трифторуксусной кислоты и смесь кипятили 3 ч с обратным холодильником. Реакционную смесь упаривали, полученный сироп хроматографировали на силикагеле (колонка размером 6×30 см). Элюцию проводили линейным градиентом смеси хлороформ — ацетон (1:1→1:3, по объему). Анализ фракций осуществ-

* Биологические испытания выполнены И. Б. Сорокиной и М. В. Астановой (Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР) и будут опубликованы отдельно.

Полимер	Количество мономеров, мг		Выход		MurNAc, %	
	акриламид	(I)	мг	%	Найдено	Вычислено
Полиакриламид	600	0	510	85	0	0
Сополимер (1 : 44) *	500	100	560	93	7,7	7,5
Сополимер (1 : 7)	300	300	590	98	22,1	22,5

* В скобках указано мольное соотношение мономера (I) и акриламида.

ляли методом ТСХ в системе Б, вещества обнаруживали нингидрином. Фракции, содержащие чистый TFA-гексаметилендиамин, объединяли, упаривали и высушивали в вакууме над КОН. Получено 9,0 г (64%) сиропообразного вещества, R_f 0,71 (Б). Найдено, %: С 45,21, Н 7,21; F 26,79; N 13,12. $C_8H_{10}O_3N_2F_3$. Вычислено %: С 45,28; Н 7,12; F 26,86; N 13,20.

*N*¹-трет-Бутилоксикарбонил-*N*⁶-акрилоилгексаметилендиамин. а) К раствору 50 г (0,43 моль) свежеперегнанного гексаметилендиамина в смеси 250 мл диоксана и 40 мл воды добавляли 8 г едкого натра и 75 мл триэтиламина. После полного растворения щелочи раствор охлаждали до 5° С и поддерживали температуру не выше 10° С, в течение 5 ч по каплям добавляли раствор 33 г (0,24 моль) трет-бутилоксикарбонилзида в 200 мл диоксана. Смесь выдерживали ночь при 20° С, затем упаривали до объема 200 мл, добавляли 300 мл воды и выпавший осадок бис-трет-бутилоксикарбонилгексаметилендиамина (2,8 г) отфильтровывали. Фильтрат упаривали до объема 200 мл, добавляли 70 г NaCl и раствор экстрагировали этилацетатом (6×80 мл). Вытяжки упаривали, сиропообразный остаток растворяли в 100 мл воды и при температуре не выше 10° С и перемешивании добавляли 1 М HCl (~200 мл) до pH 3. Раствор экстрагировали этилацетатом до полного обесцвечивания, после чего добавляли 80 г NaCl. Выпавший кристаллический гидрохлорид моно-*N*-трет-бутилоксикарбонилгексаметилендиамина отфильтровывали, промывали на фильтре ацетоном и высушивали в вакууме. Выход 24,5 г (35%), т. пл. 168–169° С, R_f 0,19 (А). Литературные данные [27]: т. пл. 162,5–163° С.

б) 17 г (65 ммоль) полученного гидрохлорида моно-*N*-трет-бутилоксикарбонилгексаметилендиамина растворяли в смеси 250 мл хлороформа и 25 мл триэтиламина и к раствору при перемешивании и температуре не выше -5° С в течение 1 ч добавляли по каплям раствор 7 г (88 ммоль) свежеперегнанного акрилоилхлорида в 200 мл хлороформа. Выдерживали 15 ч при 18° С, реакционную смесь промывали водой (3×100 мл), хлороформный раствор высушивали CaCl₂ и упаривали досуха. Остаток (23 г) перекристаллизовали из бензола, выход 16,5 г (94%), т. пл. 107–108° С, R_f 0,58 (А). ПМР (CDCl₃): 1,32–1,68 м (17 Н, 3 CH₃, 4 CH₂), 3,12 кв и 3,34 кв (4 Н, J 6 Гц, CH₂-N), 5,60 кв (1 Н, J_{1,3} 9 Гц, J_{2,3}, 12 Гц, H¹H²C=CH³-CO), 6,01–6,29 м (2Н, CH₂=C-CO). Ср. [27]: п. пл. 108–109° С.

Моно-N-акрилоилгексаметилендиамин. 680 мг (2,52 ммоль) *N*¹-трет-бутилоксикарбонил-*N*⁶-акрилоилгексаметилендиамина растворяли в 5 мл трифторуксусной кислоты (0° С), выдерживали 20 мин при 18° С и упаривали. Остаток растворяли в 3 мл метанола, раствор пропускали через колонку (1×20 см) с анионитом Dowex 1×8 (ОН⁻-форма), элюировали метанолом, нингидринположительные фракции упаривали. Сиропообразный остаток моноакрилоилгексаметилендиамина высушивали в вакууме и сразу использовали в синтезе соединения (I) (см. ниже).

*N*¹-(*N*-Ацетилмурамоил-*L*-аланил-*D*¹изоглутаминил) -*N*⁶-акрилоилгексаметилендиамин (I). К раствору 470 мг (0,96 ммоль) МДП в 8 мл сухого пиридина добавляли 200 мг (0,97 ммоль) дициклогексилкарбодиимида и 110 мг (0,96 ммоль) *N*-оксисукцинимид. Смесь выдерживали 15 ч при 18° С, затем добавляли раствор 2,5 ммоль моно-*N*-акрилоилгексаметилендиамина, полученного в предыдущем опыте, в 3 мл пиридина. Через 1 сут при 18° С к реакционной массе добавляли 50 мл воды, осадок отфильтровывали, к фильтрату добавляли на кончике шпателя гидрохинон и

упаривали. Остаток растворяли в 10 мл воды, полученный окрашенный раствор обесцвечивали активированным углем, уголь отфильтровывали. К фильтрату добавляли метанол до концентрации 40% (по объему) и раствор пропускали через дауэкс 1×2 (Н⁺-форма) (30 мл), элюировали 40% водным метанолом. Фракции, содержащие обугливающиеся на хроматографической пластинке вещества, объединяли, добавляли к ним гидроксид и упаривали. Остаток растворяли в 10 мл метанола, к раствору добавляли 2 г мелкокристаллической целлюлозы и суспензию упаривали в вакууме. Остаток суспендировали в ацетоне и наносили на колонку (1×10 см) с целлюлозой. Вначале ацетоном элюировали N-оксисукцинимид, далее метанолом — хроматографически чистый продукт (I). Элюат упаривали до небольшого (3–5 мл) объема, добавляли сухой ацетон до прекращения высаживания осадка, осадок (325 мг) отфильтровывали и фильтрат упаривали досуха. Переосаждение остатка из метанола ацетоном дало дополнительно 120 мг хроматографически чистого соединения (I). Осадки объединяли, растворяли в 40 мл воды, раствор обрабатывали активированным углем, уголь отфильтровывали и фильтрат лиофилизировали. Выход 440 мг (71%), $[\alpha]_D^{28} +28^\circ \text{C}$ (с 0,6, метанол), $R_{\text{МДП}}$ 1,62 (Б), ПМР (CD₃OD): 1,19–1,52 м (14 Н, 2 СН₃, 4 СН₂), 1,95 с (3 Н, Ас), 3,09 кв, 3,16 кв (4 Н, СН₂–N), 5,66 кв (1 Н, J_{1,3} 9 Гц, J_{2,3} 12 Гц, Н¹Н²С=СН³–СО), 6,12–6,41 м (2Н, СН₂=С–СО). Найдено, %: С 50,76; Н 7,41; N 12,23. С₂₃Н₁₈О₁₁Н₆·Н₂О. Вычислено, %: С 50,74; Н 7,68; N 12,68.

*N*¹-(*N*-Ацетилмурамовой-*L*-аланил-*D*-изоглутаминил) - *N*⁸-трифторацетилгексаметилендиамин синтезировали, как описано в предыдущем опыте, из МДП и ТГА-гексаметилендиамина. Выход 69%, $[\alpha]_D^{26} +26^\circ$ (с 0,8, метанол), $R_{\text{МДП}}$ 1,99 (Б). ПМР (CD₃OD): 1,35–1,60 м (14 Н, 2 СН₃, 4 СН₂), 1,95 с (3 Н, Ас), 2,28 т (2 Н, J 7 Гц, СН₂), 5,18 д (1 Н, J_{1,2} 4 Гц, Н-1 МуrNAc). Найдено, %: С 47,28; Н 6,53; F 8,30; N 12,25. С₂₇Н₄₄Н₆F₃. Вычислено, %: С 47,30; Н 6,47; F 8,31; N 12,29.

Полимеризация. 600 мг акриламида или смеси акриламида и соединения (I) (см. таблицу) растворяли в 19 мл воды, добавляли 19 мг цистеина и 58 мг персульфата аммония. Полученный раствор дегазировали в вакууме, добавляли 6 мкл N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамина, после чего реакционный сосуд снова вакуумировали и раствор выдерживали при 40° С в течение 1,5 ч. Затем раствор упаривали до 3–5 мл и полимер осаждали метанолом (50 мл). Выпавший вязкий сироп отделяли декантацией, снова растворяли в 3 мл воды и осаждали метанолом. Выпавшую массу отделяли декантацией и растирали с 20 мл метанола до полного затвердевания. Твердый осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме. Выходы полимеров приведены в таблице.

Дополнительную очистку полимеров и определение их кажущихся среднечисловых молекулярных масс осуществляли с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-100 (Pharmacia, Швеция) (рисунок). Для калибровки колонки использовали (в скобках — *M*, кДа): цитохром с (12,4), трипсиновый ингибитор (22), бычий сывороточный альбумин (67) и иммуноглобулин G (150). Выходы полимеров после гель-хроматографии и лиофильной сушки отобраных фракций (указаны на рисунке) составляли 70–80% от нанесенного на колонку материала.

Определение содержания N-ацетилмурамовой кислоты. Навеску сополимера подвергали метанолу и последующим обработкам (ре-N-ацетилированию, силилированию) в стандартных условиях [29]. ГЖХ проводили на хроматографе Hewlett Packard 5710A (США), используя капиллярную колонку (40×0,25 мм) со стационарной фазой SE-30, газ-носитель — гелий (60 мл/мин). Температурный режим: 2 мин при 100° С, 100→230° С (4° С/мин) и далее изотерма. Внутренний стандарт — маннит. Относительные времена удерживания для триметилсилильного производного метилового эфира метилгликозида N-ацетилмурамовой кислоты составляли 1,53–1,54. В качестве стандарта для определения пересчетного коэффициента использовался МДП. Результаты приведены в таблице.

Авторы искренне благодарны академику АМН СССР Р. В. Петрову и чл.-корр. АН СССР К. П. Кашкину за ценные замечания, высказанные при обсуждении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stewart-Tull D. E. S. Ann. Rev. Microbiol., 1980, v. 34, p. 311-340.
2. Lefrancier P., Lederer E. Prog. Chem. Org. Natur. Products, 1981, v. 40, p. 1-47.
3. Adam A., Petit J.-F., Lefrancier P., Lederer E. Mol. and Cell. Biochem., 1981, v. 41, p. 27-47.
4. Jollès P., Werner G. H. TIBS, 1981, № 12, p. 330-333.
5. Chedid L., Carelli C., Audibert F. J. Reticuloendothel. Soc., 1979, 26 suppl., p. 631-641.
6. Chedid L., Parant M., Parant F., Audibert F., Lefrancier P., Choay J., Sela M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 12, p. 6557-6561.
7. Reichert C. M., Carelli C., Jolivet M., Audibert F., Lefrancier P., Chedid L. Molec. Immunol., 1980, v. 17, p. 357-363.
8. Bahr G. M., Carelli C., Audibert F., Modabber F., Chedid L. Molec. Immunol., 1982, v. 19, p. 737-745.
9. Binz H., Tarcsay L., Wegzell H., Dukor P. Transplant. Proc., 1981, v. 13, № 1, p. 566-573.
10. Jäschke G., Dietrich F. M., Gisler R., Hartmann A., Stanek J., Tarcsay L. Swiss Appl. 78/2035, 24.2.78; Eur. Pat. Appl. 3833, 5.9.79 (Cl C107G7/00); Chem. Abstr., 1980, v. 92, 116411.
11. Audibert F., Jolivet M., Chedid L., Alauf J. E., Boquet P., Pivaille P., Siffert O. Nature, 1981, v. 289, p. 593-594.
12. Yomomura Y., Kishimoto T., Hirai Y., Azuma I. Ger. offen. 2.912.865 (Cl C07G7/00) 18.10.1979; Jpn. Appl., 78/37901, 31.3.78; Chem. Abstr., 1980, v. 92, 181670.
13. Ponpipom M. M., Rupprecht K. M. Carbohydr. Res., 1983, v. 113, p. 45-56.
14. Ponpipom M. M., Rupprecht K. M. Carbohydr. Res., 1983, v. 113, p. 57-62.
15. Sela M. In: Molecular mechanisms of biological recognition/Ed. Balaban M. Elsevier: North-Holland Biomedical Press, 1979, p. 21-25.
16. Mozes E., Sela M., Chedid L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 4933-4937.
17. Arnon R., Sela M., Parant M., Chedid L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 6769-6772.
18. Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я. Тез. XII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии (Баку). Наука, 1981, с. 120-121.
19. Хорлин А. Я., Бовин Н. В., Зурабян С. Э. Тез. докл. VII Всес. конф. «Химия и биохимия углеводов». Пуццино, 1982, с. 5-6.
20. Бовин Н. В. Синтез группоспецифических детерминантных олигосахаридов и их иммобилизация на полимерной матрице. Канд. дис. М., ИБХ, 1982.
21. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Chernyak A. Ya., Levinsky A. B. Carbohydr. Res., 1982, v. 110, p. C16-C20.
22. Покровский В. И., Тендегник Ю. Я., Покровский В. В., Овчарова Н. М., Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я. Ж. мед. эпидем. иммунол., 1983, № 4, с. 62-65.
23. Покровский В. В., Тендегник Ю. Я., Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я. Ж. мед. эпидем. иммунол., 1983, № 4, с. 65-67.
24. Hořejší V., Smolek P., Kocourek J. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 538, № 2, p. 293-298.
25. Weigel P. H., Schnaar R. L., Roseman S., Lee Y. C. In: Methods in Enzymol./Ed. Ginsburg V. N. Y.-L.: Acad. Press, 1982, v. 83, p. 294-299.
26. Chiano C. K., McAndrew M., Barker R. Carbohydr. Res., 1979, v. 70, p. 93-102.
27. Stahl G. L., Walter R., Smith C. W. J. Org. Chem., 1978, v. 43, № 11, p. 2285-2286.
28. Kusumoto S., Tarumi J., Ikenaka K., Shiba T. Bull. Chem. Soc. Jap., 1976, v. 49, p. 533-539.
29. Pritchard D. J., Todd C. W. J. Chromatogr., 1977, v. 133, p.133-139.

Поступила в редакцию
30.III.1984

IMMOBILIZATION OF N-ACETYLMURAMOYL-L-ALANYL-D-ISOGLUTAMINE ON POLYACRYLAMIDE

KHORLIN A. Ya., ABASHEV Yu. P.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the U S S R, Moscow

The synthesis of N¹-(N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl)-N⁶-acryloylhexamethylenediamine (MDP-AHDA) and its copolymerization with acrylamide were performed. Activated ester obtained by MDP treatment with N-hydroxysuccinimide and dicyclohexylcarbodiimide was condensed with 2,5 moles of mono-N-acryloylhexamethyle-

nediamine (AHDA) to give a bis-condensation product, i. e. glycosylamine of MDP-AHDA. It was converted into MDP-AHDA by a cation-exchanger catalyzed hydrolysis. The copolymerization of MDP-AHDA and acrylamide was performed at their 1:44 and 1:7 ratios, controlling the polymer chain growth and using ammonium persulfate for an initiation and cysteine for a limitation of the polymerization. The polymers thus obtained had an apparent degree of polymerization about 10^3 and the starting monomer ratios. The synthesis of the copolymers suggests that the contents of immobilized MDP can be predicted and varied over a wide range. According to leukocyte migration tests, the polymeric derivatives of MDP had a stimulating activity close to that of MDP, thus inferring that MDP-AHDA can be used for preparing polyacrylamide-bound synthetic antigens with a built-in adjuvant activity.

Зав. редакцией Г. В. Ветрова

Адрес редакции: 117990, ГСП-1, Москва, ул. Вавилова, дом 34, комн. 335

Телефон 135-97-27

Технический редактор Кузьмишкина Е. С.

Сдано в набор 21.05.84 Подписано к печати 03.07.84 Т-05166 Формат бумаги 70×108¹/₄
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6+1 вкл. Усл. кр.-отт. 11,2 тыс. Уч.-изд. л. 14,1 Бум. л. 4,5
Тираж 867 экз. Зак. 176

Издательство «Наука». 103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 10