



УДК 547.458.22'418'915.5.057+579.84

СИНТЕЗ АНАЛОГОВ ЛИПИДА А. ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ 6-ФОСФАТА 2-ДЕЗОКСИ-2-(3-ОКСИМИРИСТОИЛ)АМИНО- D-ГЛЮКОЗЫ С ПОЛИМЕРНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ И ИХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

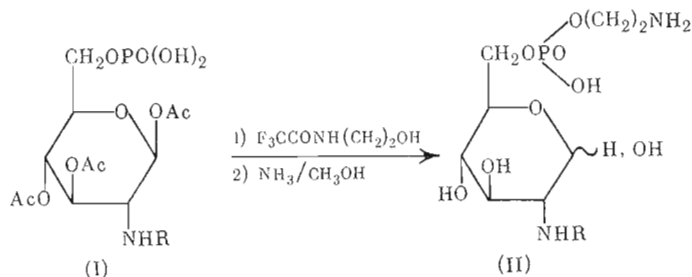
Горбач В. И., Лукьянов П. А., Соловьева Т. Ф.,
Оводов Ю. С.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток

Синтезированы производные 6-О-(2-аминоэтил)фосфоно-2-ациламино-2-дезоксид-глюкозы, ацилированные по аминогруппе сахара остатками уксусной или *D,L*-3-оксимиристиновой кислот, изучены ^{31}P - и ^{13}C -ЯМР-спектры полученных соединений. Осуществлена их конденсация с полисахаридом (фикол) и белками (альбумины, бычий γ -глобулин). Проведена иммунизация кроликов полученными конъюгатами, содержащими гаптен с 3-оксимиристиновой кислотой. Двумя иммунохимическими методами показано образование специфических антител. Методом иммуноферментного анализа обнаружена перекрестная реакция иммунной сыворотки с липидом А из *Yersinia pseudotuberculosis*.

Липид А, структурный компонент липополисахаридов грамотрицательных бактерий, в комплексе с полимерным носителем обладает иммуногенными свойствами, вызывая образование в организме специфических антител [1]. Ранее нами синтезированы некоторые аналоги липида А: 6-фосфаты *D*-глюкозамина и ($\beta 1 \rightarrow 6$)-*D*-глюкозаминобиозы, ацилированные по аминогруппам 3-оксимиристиновой кислотой. Было найдено, что эти соединения ингибируют взаимодействие липида А из *Yersinia pseudotuberculosis* со специфическими антителами в реакции пассивного гемолиза [2, 3]. Серологическая активность синтетических соединений делает возможным их использование в качестве гаптенов при получении иммуносорбентов и «искусственных» антигенов со специфичностью липида А. Для их присоединения к полимерным носителям необходимо введение в молекулу реакционноспособной группы.

С этой целью из 6-фосфатов *N*-ацил-*D*-глюкозамина (Ia) и (Iб) синтезированы их фосфодиазфирные производные с 2-аминоэтанолом по следующей схеме.



(а) R = Ac

(б) R = 3-оксимиристоил

Сокращения: HSA — человеческий сывороточный альбумин, OA — яичный альбумин, BGG — бычий γ -глобулин.

Данные спектров ^{13}C -ЯМР соединений (Ia) и (IIa) *

Соединение	Аномер	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8
(Ia)	α	92,1	55,4	71,6	70,8	71,5	64,6		
	β	96,2	58,0	74,7	70,8	76,4	64,6		
(IIa)	α	91,8	55,0	71,6	70,6	71,5	65,6	62,9	41,0
	β	95,9	57,6	74,6	70,4	75,7	65,6	62,9	41,0

* Данные спектра (Ia) взяты из работы [4] и приведены для сравнения. C-7 и C-8 — α - и β -углеродные атомы остатка этаноламина.

Таблица 2

Конденсация фосфодиэфирных гаптен (IIa) и (IIб) с фиколом 400

Гаптен	Добавлено гаптена *, моль/моль фикола	N **, моль/моль фикола	Связывание, %
(IIa)	250	51	20
	125	15	12
(IIб)	200	48	24
	125	26	21

* Количество S-трихлортриазина всегда составляло 2 моль/моль гаптена.

** N — количество связанного гаптена, рассчитано по содержанию в конъюгатах фосфора.

Реакцию 1,3,4-три-O-ацетил-2-ациламино-2-дезоксиг-6-O-фосфоно- β -D-глюкопиранозы с 2-трифторацетиламиноэтанолом проводили с помощью мезитилсульфохлорида. Удаление O-ацетильных и N-трифторацетильной защитных групп обработкой аммиаком в метаноле привело к фосфодиэфирам (IIa, б) с выходом 40–50%.

Строение полученных соединений было подтверждено данными хроматографии, элементного анализа и спектроскопии ЯМР. Обнаружение продуктов реакции при ТСХ специфическими реагентами подтверждает их углеводную природу и наличие в составе свободной аминогруппы. В ^{31}P -ЯМР-спектре соединений (IIa, б) присутствует один сигнал фосфора с химическим сдвигом +1,24 м.д., что указывает на наличие в них фосфодиэфирной связи. ^{13}C -ЯМР-спектр был получен для соединения (IIa), его данные приведены в табл. 1.

Отнесение сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектре фосфодиэфира (IIa) сделано с помощью сравнения со спектром соединения (Ia), полученным ранее [4]. Появление в спектре (IIa) сигналов при 41,0 м.д. ($J_{\text{C-P}}$ 7,4 Гц) и 62,9 м.д. ($J_{\text{C-P}}$ 4,0 Гц), принадлежащих соответственно β - и α -атомам 2-аминоэтильного остатка, а также расщепление сигналов C-6- ($J_{\text{C-P}}$ 2,6 Гц) и C-5-атомов углеводного кольца ($J_{\text{C-P}}$ 7,1 Гц) подтверждают предложенную структуру.

Была изучена конденсация полученных фосфодиэфиров с полисахаридом (фикола) и белками, в качестве модельного соединения использовали фосфодиэфир N-ацетил-D-глюкозамина (IIa). В случае фикола его молекулы предварительно активировали S-трихлортриазинном [5] и далее проводили реакцию с гаптенем в слабощелочном растворе. Для связывания с белками нами выбран метод, основанный на обработке белковых молекул янтарным ангидридом с последующей конденсацией их с гаптенами при помощи карбодимида. В таких условиях связывание фосфодиэфира с полимерами, вероятно, идет через аминогруппу этаноламинного остатка. Количество связанного гаптена определяли по содержанию в конъюгате фосфора.

Найденные условия были применены для конденсации фикола с фосфодиэфиром N-3-оксимиристоил-D-глюкозамина (IIб). Количество связанного гаптена дополнительно определяли по содержанию в конъюгате 3-окси-

Конденсация фосфодиэфирных гаптенов (IIa) и (IIб) с белками

Белок (M _r)	Гаптен	Добавлено, моль/моль белка		N *, моль/моль белка	Связывание, %
		гаптен	карбодимид		
HSA (69 000)	(IIa)	25	250	13	52
		40	500	16	40
	(IIб)	12,5	250	8	64
		50	500	18	36
OA (45 000)	(IIб)	10	250	8	80
		30	400	17	57
BGG (175 000)	(IIб)	30	300	14	47
		50	1000	32	64

* N — количество связанного гаптена, рассчитано по содержанию в конъюгатах фосфора.

Таблица 4

Титры сывороток, полученных при иммунизации кроликов белковыми конъюгатами, в иммуноферментном анализе

Сыворотка	Конъюгат	Титр	Белок	Титр
к HSA-(IIб)	HSA-(IIб)	1/6400	HSA	1/3200
	OA-(IIб)	1/200	OA	1/100
	BGG-(IIб)	1/1600	BGG	1/100
к BGG-(IIб)	HSA-(IIб)	1/6400	HSA	1/200
	OA-(IIб)	1/800	OA	1/100
	BGG-(IIб)	1/12 800	BGG	1/6400

миристиновой кислоты, в этом случае полученные результаты были несколько ниже, чем при анализе на фосфор, что объясняется частичной деградацией остатков 3-оксимиристиновой кислоты в процессе гидролиза.

Как видно из табл. 2, с полисахаридом связывается 12–24% используемого гаптена в зависимости от его количества, взятого в реакцию, замена ацильного остатка в молекуле не оказывает влияния на реакционную способность гаптена.

Конденсацию фосфодиэфиров (IIa) и (IIб) с белками проводили по двум методикам. Так как сукцинизированный HSA растворяется в абсолютном диметилформамиде, его реакцию с гаптенами осуществляли через N-оксисукцинимидный эфир, полученный с помощью N,N'-дихлоргексилкарбодимидом, как описано ранее [6]. Реакцию сукцинизированных OA и BGG с гаптенами проводили в воде с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом [7]. Во всех конъюгатах с гаптенем (IIб) после гидролиза обнаружили 3-оксимиристиновую кислоту, количество гаптена в конъюгатах рассчитывали по содержанию фосфора.

Количество связываемого гаптена составляет 30–50% от взятого в реакцию при соотношении гаптен/карбодимид 1:10 и возрастает до 60–80% при соотношении 1:20 (табл. 3).

Для определения иммунологической активности полученных конъюгатов с гаптенем (IIб) была проведена иммунизация ими кроликов. При иммунизации конъюгатом на основе фикола различными иммунохимическими методами не обнаружено образования в сыворотках специфических антител. Иммунизация белковыми конъюгатами HSA-(IIб) и BGG-(IIб) привела к получению преципитирующих сывороток, реакция происходит как с самими конъюгатами, так и с белками-носителями. Полученные сыворотки преципитируют также с конъюгатами на основе гетерологичных белков, но не преципитируют с самими белками. Титры сывороток в реакциях с различными конъюгатами были определены методом иммуноферментного анализа (табл. 4).

Как видно из табл. 4, сыворотки, полученные при иммунизации конъюгатами HSA-(IIб) и BGG-(IIб), взаимодействуют с другими конъюгатами, хотя и с более низкими титрами. Перекрестные реакции сывороток с различными конъюгатами в обоих иммунохимических тестах свидетельствуют о присутствии в них антител, специфичных к гаптену (IIб).

С помощью иммуноферментного анализа обнаружена реакция сыворотки к конъюгату BGG-(IIб) с липидом А с титром 1/200 (титр сыворотки к липиду А, полученной по методу [2], с липидом А составляет 1/12800, титр сыворотки до иммунизации конъюгатом — <1/25). Это указывает на появление в ней антител, взаимодействующих с определенными участками молекулы липида А. В то же время не обнаружено обратной реакции синтезированных конъюгатов с сывороткой к липиду А. Этот факт требует дальнейшего изучения с применением модельных соединений более близкой к липиду А структуры.

Таким образом, нами получены конъюгаты различных полимеров с фосфатами *N*-ацетил- и *N*-3-оксимиристоил-*D*-глюкозамина. Изучены иммунохимические свойства конъюгатов с *N*-3-оксимиристоил-*D*-глюкозамином — простейшим аналогом липида А.

Экспериментальная часть

Фосфор определяли по методу [8]. Спектры ЯМР снимали на приборе Bruker HX-90E с рабочей частотой 22,6 и 36,4 МГц для ^{13}C и ^{31}P соответственно в D_2O при 30° С с использованием Me_4Si и 85% H_3PO_4 в качестве внешних стандартов. Поглощение в иммуноферментном анализе измеряли на спектрофотометре Specol (ГДР) в кювете длиной 1 см при 490 нм.

ТСХ проводили на пластинках с силикагелем L 5/40 мкм (Chemapol, ЧССР) в системе: *n*-бутанол — этанол — вода — 25% водный аммиак, 40:40:15:5. Вещества обнаруживали нагреванием пластинок, обработанных серной кислотой или раствором нингидрина в ацетоне. ГЖХ для обнаружения и количественного определения 3-оксимиристиновой кислоты после гидролиза конъюгатов 6 н. NaOH в течение 6 ч при 100° С проводили как описано ранее [9]. Ультрафильтрацию проводили в ячейках для ультрафильтрации на мембранах «Рипор-3-64» (Олайне, СССР).

В работе использовали фикола 400 (M_r 400 000, Pharmacia, Швеция), HSA и пероксидазу (Reanal, Венгрия), ОА (Олайне), *S*-трихлортриазин, *N,N'*-дипицклогексилкарбодимид и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид солянокислый (Serva, ФРГ), полный адъювант Фрейнда (Calbiochem, США), планшеты для иммуноферментного анализа (Titertek, США). BGG выделен из сыворотки крупного рогатого скота по методике [10].

6-O-(2-аминоэтил)фосфоно-2-ацетамидо-2-дезоксид-D-глюкоза (IIa). Раствор 500 мг (0,863 ммоль) 2-ацетамидо-1,3,4-три-*O*-ацетил-6-*O*-дифенилфосфоно-2-дезоксид-*D*-глюкозы [11] в 15 мл AsOH гидрировали над 50 мг PtO_2 в течение 12 ч при 20° С, фильтровали, упаривали. Остаток вновь упаривали с толуолом и пиридином, растворяли в 5 мл сухого пиридина. К раствору добавляли 271 мг (1,726 ммоль) 2-трифторацетиламиноэтанола и 470 мг (2,15 ммоль) мезитиленсульфохлаорида и оставляли на 24 ч при 20° С. К смеси добавляли 5 мл воды, через 6 ч ее упаривали, остаток растворяли в 15 мл метанола, насыщенного сухим аммиаком, оставляли на 12 ч, упаривали, растворяли в воде, пропускали через колонку с 5 мл амберлита CG-120 (H^+), элюировали водой. Ход элюции контролировали с помощью ТСХ, собирая фракции, дающие положительную реакцию с H_2SO_4 и нингидрином и соответствующие (IIa). Раствор упаривали, остаток растворяли в 2 мл метанола и осаждали 5 мл ацетона. Выход соединения (IIa) 135 мг (45,5%). Найдено, %: С 34,28; Н 6,22; N 7,77; P 8,23. $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$. Вычислено, %: С 34,91; Н 6,16; N 8,13; P 8,99.

6-O-(2-Аминоэтил)фосфоно-2-дезоксид-2-(D,L-3-оксимиристоил)амино-D-глюкоза (IIб). 400 мг (0,524 ммоль) 1,3,4-три-*O*-ацетил-2-дезоксид-6-*O*-дифенилфосфоно-2-(*D,L*-3-оксимиристоил)амино-*D*-глюкозы гидрировали и конденсировали со 125 мг (0,796 ммоль) 2-трифторацетиламиноэтанола

и 288 мг (1,33 ммоль) мезитиленсульфохлорида по описанной для соединения (IIa) методике. К пиридиновому раствору добавляли 10 мл воды, смесь экстрагировали дважды эфиром и затем *n*-бутанолом. Бутанольный экстракт упаривали до 2 мл, продукт реакции осаждали эфиром. Осадок обрабатывали 10 мл насыщенного аммиаком метанола в течение 12 ч, реакционную смесь фильтровали, упаривали. Остаток растворяли в 2 мл метанола и осаждали 4 мл ацетона. Выход соединения (IIб) 140 мг (51%). После переосаждения из метанола ацетоном выход хроматографически чистого (IIб) составил 108 мг. Найдено, %: С 48,93; Н 8,60; N 5,54; Р 5,61. $C_{22}H_{45}N_2O_{10}P$. Вычислено, %: С 49,94; Н 8,60; N 5,30; Р 5,86.

Сукцинилирование белков. К 1 г альбумина (HSA, OA) в 100 мл карбонатного буфера (рН 9,0) добавляли порциями раствор 3 г янтарного ангидрида в 20 мл диоксана, поддерживая рН 9,0 с помощью раствора NaOH, до отрицательной реакции на аминокгруппу с тринитробензолсульфокислотой. Смесь диализовали против воды, белок осаждали подкислением раствора до рН 3,8, осадок отделяли центрифугированием, растворяли в воде с добавлением триэтиламина (рН 9,0), раствор лиофилизовали. Выход продукта 0,8–0,85 г. По той же методике из 100 мг BGG получили 72 мг сукцинилированного белка.

Конденсация фосфодиэфиров (IIa) и (IIб) с фиколом 400. 150 мг фикола растворяли в 6 мл 0,05 н. NaOH, добавляли раствор рассчитанного количества S-трихлортриазина (табл. 2) в 0,8 мл диоксана. Через 1 мин смесь быстро фильтровали в раствор гашена (табл. 2) в 2 мл воды, рН раствора доводили до 9,5 с помощью раствора NaOH, перемешивали 12 ч при 20° С, добавляли 1 мл 0,5 М раствора этаноламина (рН 9,0, с AcOH). Раствор диализовали против воды, концентрировали ультрафильтрацией, пропускали через колонку с сефадексом G-50 в воде. Фракции, содержащие фикол, собирали, лиофилизовали. Выход конъюгатов 65–80% (на взятый в реакцию фикол).

Конденсация фосфодиэфиров (IIa) и (IIб) с белками. А) 50 мг сукцинилированного HSA растворяли при перемешивании и слабом нагревании в 10 мл абсолютного диметилформамида, добавляли эквимольные количества N-оксисукцинимида и N,N'-дициклогексилкарбодимида (табл. 3), через 1 ч добавляли раствор (IIa) или (IIб) (табл. 3) в 2 мл воды (рН 9,0, с триэтиламино). Смесь перемешивали 14 ч при 20° С, добавляли 5 мл 0,5 М раствора этаноламина (рН 9,0, с AcOH), затем через 1 ч 20 мл воды, фильтровали, раствор диализовали против воды, концентрировали ультрафильтрацией, пропускали через колонку с сефадексом G-50 в аммоний-карбонатном буфере (0,02 М, рН 8,2). Фракции белка собирали по поглощению при 280 нм, диализовали против воды, лиофилизовали. Выход конъюгатов 70–80% (на взятый в реакцию белок). Б) 40 мг сукцинилированного белка (OA, BGG) растворяли в 10 мл воды (рН 7,4, с триэтиламино) добавляли растворы 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимида и (IIб) в 1 мл воды (табл. 3), перемешивали 14 ч при 20° С, дальнейшую обработку проводили как в методе А. Выходы конъюгатов 60–75%.

Иммунологические методы. Для иммунизации использовали конъюгаты: фикол-(IIб) (N 48), HSA-(IIб) (N 18) и BGG-(IIб) (N 32). Кроликов весом 2,5–3,0 кг иммунизировали инъекцией 1 мл 0,1% раствора конъюгата в 0,9% NaCl, эмульгированного с 1,5 мл полного адъюванта Фрейнда, во множество точек на спине 3 раза с интервалом через 10 сут. Реиммунизацию проводили через 30 сут после последней инъекции половинной дозой конъюгата. Кровь отбирали через 9 и 12 сут после реиммунизации и хранили при 4° С в присутствии 0,02% NaN₃. Реакцию преципитации в агаре проводили по методике [12].

Иммуноферментный анализ. 0,2 мл раствора исследуемого конъюгата или липида А из *Y. pseudotuberculosis* [9] (1 мкг/мл) в фосфатном буфере (0,02 М, рН 7,4), содержащем 0,9% NaCl, добавляли в планшеты для иммуноферментного анализа и инкубировали 14 ч при 20° С. После промывания планшета водой, содержащей 0,05% твина-20 (3×0,2 мл), в них наносили 0,2 мл раствора полученных иммунных сывороток соответствующим

щего разведения в фосфатном буфере, содержащем 0,05% твина-20, инкубировали 2 ч при 37° С, промывали водой с твином (3×0,2 мл). В планшеты наносили 0,2 мл раствора конъюгата бараньих антител против кроличьих иммуноглобулинов G с пероксидазой (полученного по работе [13]) в разведении 1/1000 с фосфатным буфером, содержащим твин-20, инкубировали 1 ч при 37° С, промывали водой с твином (3×0,2 мл), добавляли в лунки планшета по 0,15 мл *o*-фенилендиаминового субстрата [14]. Через 30 мин реакцию останавливали добавлением 0,05 мл 6 н. H₂SO₄, поглощение растворов измеряли при 490 нм. За титр сыворотки принимали максимальное разведение, дающее $D_{490} > 0,2$ по сравнению с контролем (нормальная кроличья сыворотка, разведение 1/100). Все измерения дублировались.

ЛИТЕРАТУРА

1. Galanos C., Lüderitz O., Westphal O. Eur. J. Biochem., 1971, v. 24, № 1, p. 116–122.
2. Gorbach V. I., Krasikova I. N., Luk'yanov P. A., Razmakhnina O. Yu., Solov'eva T. F., Ovodov Yu. S. Eur. J. Biochem., 1979, v. 98, № 1, p. 83–86.
3. Горбач В. И., Иванчина Е. В., Исаков В. В., Лукьянов П. А., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 12, с. 1670–1676.
4. Горбач В. И., Исаков В. В., Кулеш Ю. Г., Лукьянов П. А., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 1, с. 81–85.
5. Gray B. M. J. Immunol. Methods, 1979, v. 28, № 2, p. 187–192.
6. Atassi M. Z., Kasim L., Sakata S. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 670, № 2, p. 300–302.
7. Reicher C. M., Carelli C., Jolivet M., Audibert F., Lefmancier P., Chedid L. Molecular Immunol., 1980, v. 17, № 3, p. 357–364.
8. Ames B., Dubin D. T. J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 3, p. 769–775.
9. Krasikova I. N., Gorbach V. I., Solov'eva T. F., Ovodov Yu. S. Eur. J. Biochem., 1978, v. 89, № 2, p. 287–289.
10. Кэббот Е., Мейер М. В кн.: Экспериментальная иммунохимия. М.: Медицина, 1968, с. 497–518.
11. Maley F., Lardy H. A. J. Amer. Chem. Soc., 1956, v. 78, p. 1393–1397.
12. Harrington J. C., Fenton J. W., Pert J. N. Immunochemistry, 1971, v. 8, № 5, p. 413–421.
13. Nakane P. K., Kawaoi A. J. Histochem. Cytochem., 1974, v. 22, № 12, p. 1084–1091.
14. Engvall E. In: Methods Enzymol./Eds Vunakis H. V., Langone J. J. New York – San Francisco – London: Acad. Press, 1980, v. 70, p. 419–438.

Поступила в редакцию
2.X.1984

SYNTHESIS OF LIPID A ANALOGUES. PREPARATION OF CONJUGATES OF 2-DEOXY-2-(3-HYDROXYTETRADECANOYL)AMINO-D-GLUCOSE 6-PHOSPHATE WITH POLYMERIC CARRIERS AND THEIR IMMUNOLOGICAL PROPERTIES

GORBACH V. I., LUK'YANOV P. A., SOLOV'eva T. F., OVODOV Yu. S.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Center,
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

The derivatives of 2-acylamino-6-O-(2-aminoethyl)phosphono-3-deoxy-D-glucose acylated with acetic or *D,L*-3-hydroxytetradecanoic acid were obtained, and their ³¹P- and ¹³C-NMR spectra investigated. These haptens were bound with a polysaccharide (Ficoll) or proteins (albumins, bovine γ -globulin). The protein conjugates were immunogenic in rabbits, specific antibodies against the hapten being revealed by two immunochemical methods. As shown by the enzyme-linked immunoadsorbent assay, the specific rabbit antiserum reacted with lipid A from *Yersinia pseudotuberculosis*.