



УДК 547.963.02:579.864.088

ВЫДЕЛЕНИЕ И СТРУКТУРА АКТИВНОГО КОМПОНЕНТА
ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА БЛАСТОЛИЗИНА

Безруков М. В., Андропова Т. М., Решетова О. С.,
Малькова В. И., Сорокина И. Б., Розынов Б. В.,
Иванов В. Т.

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

Из противоопухолевого препарата бластолизина, представляющего собой смесь продуктов частичного ферментативного гидролиза клеточной стенки *Lactobacillus bulgaricus*, выделен активный компонент, являющийся гликопептидом с $M_r \sim 10000$ и содержащий в своем составе аминоксахара и аминокислоты, а также значительные количества глюкозы, галактозы и глицерофосфата теихоевой кислоты. Методом химической модификации показано, что за активность ответственны мурамилсодержащие гликопептидные фрагменты; остальные элементы структуры мало влияют на противоопухолевые свойства. Масс-спектрометрией в сочетании с высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографией, а также ^{13}C -ЯМР и химическими методами установлена структура пептидной и углеводной частей мурамилпептида.

Бактериальные препараты, такие, как BCG (*Bacillus Calmette – Guérin*) [1], *Corynebacterium parvum* [2, 3] и продигозан [4], широко используются в качестве модуляторов иммунной системы, в том числе в иммунотерапии опухолей.

К числу таких препаратов относится смесь гликопептидов, названная бластолизином, получаемая из лизоцимного гидролизата клеточных стенок *Lactobacillus bulgaricus*, обладающая способностью стимулировать иммуногенез и проявляющая противоопухолевую активность по отношению к перевиваемым и спонтанным опухолям [5]. Продукты лизоцимного гидролиза клеточной стенки *L. bulgaricus* используются болгарской группой, возглавляемой И. Г. Богдановым, в терапии опухолей [6].

Для одного из гликопептидов бластолизина была предложена структура, содержащая нехарактерный для пептидогликанов клеточных стенок циклопептидный участок [7]. Химический синтез гликоциклопептида с предложенной структурой привел к получению малоактивного продукта, отличающегося по физико-химическим свойствам от активной фракции [8]. Целью настоящей работы является дальнейший анализ химической природы компонента бластолизина, ответственного за противоопухолевую активность.

Попытки фракционирования бластолизина по молекулярным массам на сефадексах G-50sf и G-75sf в 0,01 М додецилсульфате натрия и 0,2 М NaN_2PO_4 , а также на TSK SW-3000 в буфере, содержащем 0,4 М NaN_2PO_4 и 0,3 М NaCl (рН 7), не привели к успеху из-за сильной ассоциации компонентов смеси и эксклюзии ассоциата со свободным объемом. При использовании сефадекса G-50sf в 0,1 М уксусной кислоте частично удалось избежать ассоциации компонентов и выделить фракцию Б-2 (рис. 1), проявляющую противоопухолевую активность и составляющую 62% от массы исходной смеси (табл. 1). Фракция Б-1, элюирующаяся с колонки раньше, чем Б-2, не отличается от последней по подвижности при электрофорезе в додецилсульфате натрия в ПААГ. Учитывая близость аминокислотного и углеводного состава этих фракций, а также их примерно одинаковую биологическую активность, мы считаем, что Б-1 представляет собой в основном ассоциат фракции Б-2. Ассоциацию компонентов бластолизина при хроматографии на сефадексе наблюдали и ранее [7].

Противоопухолевая активность бластолизина и его фракций
(рис. 1, 2)

Препарат	Выход фракции, %	Некроз опухоли *, %	Торможение роста опухоли **, %
Бластолизин	100	71	47
Б-1	10	103	40
Б-2	62	75	50
Б-3	8	0	0
Б-4	5	0	0
Б-5	15	0	0
Б-2-1	2	0	0
Б-2-2	6	0	0
Б-2-3	4	0	0
Б-2-4	7	0	0
Б-2-5	43	85	50
Б-2-5к	26	74	50
Б-2-5ц	26	70	50
Б-2-5ок	22	0	0

* Некроз опухоли S-180 оценивали по отношению количества мышей с некротической реакцией к общему числу мышей (в %).

** Торможение роста опухоли S-180 определяли по среднему весу опухоли после забоя мышей (в % к контролю).

Дальнейшая очистка фракции Б-2 на DEAE-целлюлозе DE-32 (Cl⁻) в градиенте NaCl и последующее обессоливание компонентов на сефадексе G-25sf привели к получению с выходом 43% от исходной смеси фракции Б-2-5, проявляющей противоопухолевую активность, несколько превосходящую активность исходного бластолизина (табл. 1). Поскольку остальные фракции (рис. 1, 2) были неактивны, мы ограничились лишь определением их аминокислотного и углеводного состава (табл. 2). Ниже рассматриваются результаты исследования фракции Б-2-5.

По данным высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенной фазе (рис. 3) и электрофорезу в ПААГ, продукт фракции Б-2-5 гомогенен. Молекулярная масса Б-2-5, по данным электрофореза в ПААГ, составляет ~10 000. Наличие одного N-концевого остатка, аспарагиновой кислоты, также свидетельствует об однородности образца. Вместе с тем С-концевой анализ Б-2-5 выявил три С-концевые аминокислоты — изоаспарагин, лизин и аланин, что может указывать на микрогетерогенность препарата, хотя и не доказывает этого с определенностью, поскольку известно, что пептидные цепи пептидогликана разветвлены [9].

Как видно из табл. 2, гидролизат фракции Б-2-5 содержит мурамовую кислоту, глюкозамин, аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аммиак в молярном соотношении 1:1:2:1:1:1:1, характерном для пептидогликана *Lactobacillus* [9] (за исключением аммиака, который частично теряется при кислотных обработках, применяемых при получении бластолизина). Кроме того, фракция Б-2-5 содержит остатки глюкозы, галактозы и глицерина, обычно входящие в состав связанных с пептидогликаном полисахаридов и тейхоевых кислот [10]. Элементный анализ показал присутствие в образце фосфора в количествах, отвечающих содержанию остатка глицерина (табл. 2), — по-видимому, он входит в состав глицерофосфата тейхоевой кислоты. Вывод о присутствии тейхоевой кислоты согласуется также с данными ¹³C-ЯМР (см. ниже).

Чтобы исследовать влияние составных структурных элементов компонента Б-2-5 на противоопухолевую активность, мы провели несколько его модификаций.

Кислотный и щелочной гидролиз Б-2-5 в мягких условиях предусматривал получение аналогов с отщепленными пептидогликановыми компонентами. Действительно, высокомолекулярные продукты Б-2-5к и Б-2-5ц, выделенные гелевой фильтрацией на сефадексе G-50sf после кислотного и щелочного гидролиза, содержали глюкозы, галактозы и глицеро-

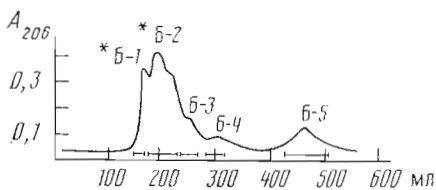


Рис. 1

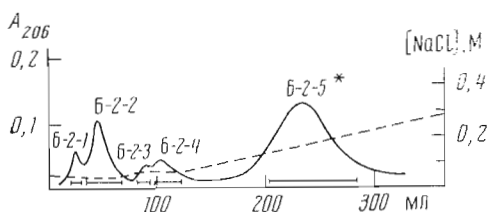


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография бластолизина (100 мг) на колонке (2,6×80 см) с сефадексом G-50 в 0,1 М АсОН. Скорость элюции 16 мл/ч, детекцию проводили при 206 нм. Звездочкой отмечены фракции, проявляющие противоопухолевую активность

Рис. 2. Хроматография фракции B-2 рис. 1 (40 мг) на колонке (0,9×30 см) с DEAE-целлюлозой DE-32 (Cl⁻). Скорость элюции 1,67 мл/мин, pH 6,0. Градиент NaCl показан пунктиром. Звездочкой отмечены фракции, проявляющие противоопухолевую активность

фосфата вдвое меньше, чем исходный B-2-5, однако сохраняли противоопухолевую активность на том же уровне. Низкомолекулярные компоненты, отделяемые при вышеприведенных модификациях, не содержали мурамилипептидов и были неактивны.

Глубокая деструкция компонента B-2-5 избытком НЮ, в условиях, допускающих свертывание и разрушение углеводов, привела к получению неактивного препарата B-2-5ок с уменьшенным содержанием углеводов и неизменными, судя по данным амниохислотного анализа (табл. 2), олигопептидами. Таким образом, разрушение углеводных и мурамилипептидных составляющих B-2-5 приводит к потере активности, а олигопептиды сами по себе неактивны. Учитывая то, что изменения в составе нейтральных сахаров не влияют на противоопухолевую активность B-2-5 (см. образцы B-2-5к, B-2-5ц табл. 1, 2), а при разрушении или отсутствии в составе образца мурамовой кислоты активность теряется, можно предположить, что за активность препарата B-2-5 ответственны мурамилипептиды *L. bulgaricus*.

Полисахаридная цепь пептидогликанов группы *Lactobacillus* построена из чередующихся остатков GlcNAc и MurNAc, соединенных друг с другом (β1→4)-связью [9]. Поскольку процесс получения бластолизина включает лизоцимный гидролиз, при котором расщепляются (β1→4)-связи между MurNAc и GlcNAc, наиболее вероятно присутствие в бластолизине олигосахаридов [-4GlcNAcβ1-4MurNAcβ1-]_n. Учитывая относительную устойчивость тетрасахарида (n=2) к действию лизоцима [11, 12], мы предположили, что наиболее вероятный продукт расщепления клеточной стенки *L. bulgaricus* — гликопептиды, содержащие тетрасахаридный фрагмент.

Чтобы проверить это, было осуществлено боргидридное восстановление компонента B-2-5 до и после лизоцимного гидролиза. И в том, и в другом случае содержание мурамовой кислоты уменьшалось в 2 раза за счет превращения конечного остатка MurNAc в мурамитол, что соответствует восстановлению тетрасахарида. В случае одновременного присутствия в препарате B-2-5 расщепляемых лизоцимом сегментов (GlcNAcMurNAc)₃ или (GlcNAcMurNAc)₂ и дисахарида восстановление NaBH₄, проводимое после лизоцимного гидролиза, приводило бы к превращению более половины остатков мурамовых кислот в мурамитол.

Наличие тетрасахаридсодержащих гликопептидов в компоненте B-2-5 было подтверждено сравнительным анализом ¹³C-ЯМР-спектров модельного дисахарида GlcNAcβ1-4MurNAc, ГМДП — GlcNAcβ1-4MurNAc-Ala-D-Glu-NH₂, тетрасахарида — GlcNAcβ1-4MurNAcβ1-4GlcNAcβ1-4MurNAc и компонента B-2-5щ, полученного из B-2-5 частичным отщеплением теихоевых кислот мягкой щелочной обработкой.

Включенные в гликозидную связь C-1-атомы резонируют при 100,3 (GlcNAc) и 101,5 м.д. (MurNAc) (табл. 3). Соответствующая пара сиг-

Аминокислотный и углеводный состав хроматографических фракций blastолизина В-1 — В-5, В-2-1 — В-2-5; В-2-5к, В-2-5ш, В-2-5ок (нмоль/мг)

Состав	Тип анализа *	Бластолизин **	1 **	2	3	4	5	2-1	2-2	2-3	2-4 **	2-5 **	2-5к	2-5ш	2-5ок
Asp	A	540	660	645	295	—	488	444	630	536	679	633	720	706	800
Mur	A	486	584	532	700	—	545	460	656	620	606	620	690	686	68
Glu	A	567	745	940	680	—	942	922	1320	1410	1100	816	806	850	900
Ala	A	1053	1100	1470	1170	—	1120	1030	1470	1910	1420	1370	1500	1400	1600
GlcNH ₂	A, B	486	500	505	1060	290	1060	372	532	536	635	706	755	720	280
Lys	A	513	580	555	337	—	296	321	456	426	496	712	780	760	850
Gal	B	135	370	400	2080	4263	—	—	373	—	369	418	320	355	47
Glc	B	1093	800	706	2670	2300	6450	1570	340	392	242	750	370	407	22
GalNH ₂	A, B	297	230	167	—	—	—	171	—	—	128	—	—	—	—
Глицерин	B	1242	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	500	556	400
Фосфор	B	1242	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	640	656	500

Не определены

* А — аминокислотный анализ, В — данные ГЖХ. В — элементный анализ. Относительные количества переведены в абсолютные с учетом содержания GlcNH₂, поучено по методу А. Прочерк означает отсутствие.
 ** Во фракции В-1 в качестве примесей (<50 нмоль/мг) методом А были идентифицированы Arg, Ser, Glu, во фракции В-2-4 — Arg, в blastолизине методом В — 148,5 нмоль/мг молочной кислоты и 3,4 нмоль/мг Man.
 ** Фракция В-2-5 содержит 612 нмоль/мг аланина, определенного аминокислотным анализом.

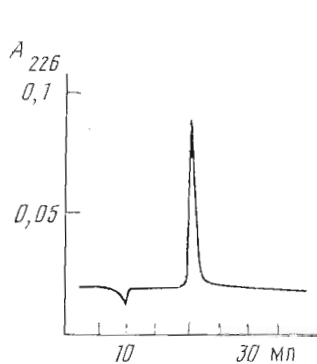


Рис. 3

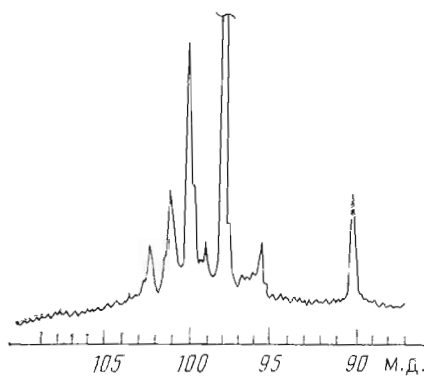


Рис. 4

Рис. 3. Высокоэффективная жидкостная хроматография фракции Б-2-5 на колонке (4,6×250 мм) с Zorbax С-8, элюция 10% MeOH в 0,01 М трифторуксусной кислоте, рН 2,15, скорость элюции 1 мл/мин

Рис. 4. Сигналы С-1-атомов углерода в спектре ^{13}C -ЯМР препарата Б-2-5щ

налов с отношением интегральных интенсивностей 2 : 1 присутствует как в спектре тетрасахарида, так и в спектре Б-2-5щ (рис. 4), что доказывает наличие тетрасахаридсодержащих гликопептидов в Б-2-5. Сигналы при 90,0–91,2 и 90,0–95,4 м.д., соответствующие С-1(α) и С-1(β) аномерного атома углерода конечного остатка *N*-ацетилмурамовой кислоты, как и следовало ожидать, присутствуют во всех четырех спектрах, что подтверждает приведенное отнесение и согласуется с литературными данными [13, 14]. Дополнительные сигналы в спектре Б-2-5щ (рис. 4) обусловлены углеводами, связанными с тейхоевой кислотой; наиболее интенсивный сигнал при 97,9 м.д. может быть отнесен к С-1-атому α -*D*-глюкозы, связанной с глицерином тейхоевой кислоты, на основании данных о строении тейхоевой кислоты *L. bulgaricus* [10] и данных ^{13}C -ЯМР, полученных для тейхоевой кислоты, содержащей α -*D*-глюкозилглицерин [13].

Структурный анализ пептидного фрагмента Б-2-5 проводили при помощи масс-спектрометрии в комбинации с газовой (ГЖХ-МС) и жидкостной хроматографией [15]. Полученные данные (табл. 4) позволили реконструировать структуру пептидных фрагментов препарата Б-2-5 (рис. 5).

Конфигурации аминокислот были подтверждены энантиомерным анализом с помощью ГЖХ на хиральной фазе *tert*-бутиламид-*N*-маргаринил-*L*-валина. Аминокислоты анализировали в виде изопропиловых эфиров *N*-трифторацетильных производных, как описано в работе [16]. При этом было показано, что остатки Glu и Asp имеют *D*-конфигурацию, а Ala присутствует в виде *L*- и *D*-энантиомерных форм. Конфигурация остатков Lys и расположение энантиомерных форм аминокислот в структуре (рис. 5) приведены с учетом общих биохимических закономерностей построения пептидогликанов [9].

Таблица 3

Область сигналов С-1-атомов остатков GlcNAc (С-1) и MurNAc (С-1') в содержащих их соединениях

Препарат	С-1	С-1'	С-1'(α)	С-1'(β)
GlcNAc β 1-4MurNAc (α , β)	100,3	—	90,0	95,4
GlcNAc β 1-4MurNAc	100,4	—	91,2	95,2
$\begin{matrix} \text{L-Ala-GluNH}_2 \\ \\ \text{GlcNAc}\beta\text{1-4MurNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4MurNAc}(\alpha, \beta) \end{matrix}$	100,3	101,5	90,3	95,3
Б-2-5щ	100,4	101,4	90,3	95,2

Олигопептидные фрагменты гидролизата бластолизина, идентифицированные в масс-спектре химической ионизации с аммиаком
Приведены значения массовых чисел, m/z

Пептид	$[MH]^+$	$[MH+NH_3]^+$	$[MH-32]^+$	$[MH+NH_3-32]^+$
Ala-Glu *	343	360	—	328
Glu-Ala *	343	360	—	328
Ala-Asp *	329	346	—	314
Lys-Ala *	424	441	—	—
Asp Lys *	482	499	450	467
$\left[\begin{array}{l} \text{Glu} \quad \text{Lys}^* \\ \quad \\ \text{---} \end{array} \right]$	—	513	—	—
$\left[\begin{array}{l} \text{Asp} \quad \text{Lys-Ala}^* \\ \quad \\ \text{---} \end{array} \right]$	553	570	521	538
(Glu, Lys, Ala)	567	584	—	—
(Glu, Asp, Lys)	625	642	593	610
(Ala, Glu, Lys, Asp)	696	713	664	681
(Ala, Glu, Lys, Asp, Ala)	767	784	735	752

* Аминокислотная последовательность этих пептидов установлена хроматомасс-спектрометрическим анализом (ГЛХ-МС) в виде метиловых эфиров N-трифторацетильных производных на основании данных работы [15].

Результаты определения молекулярной массы, аминокислотного и углеводного состава, конфигурации аминокислот, данные боргидридного восстановления и изучения углеводного участка при помощи ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрический анализ пептидных фрагментов и литературные данные [9] позволяют охарактеризовать препарат Б-2-5, ответственный за противоопухолевую активность, как тетрасахаридсодержащий гликопептид, связанный с тейхоевой кислотой (рис. 5). Эта структура в основном соответствует литературным данным о строении пептидогликанов группы *Lactobacillus* [9] и не противоречит субстратной специфичности лизоцима [17, 18]. Учитывая, что, по данным аминокислотного анализа, компонент Б-2-5 содержит недостаточное для полного замещения остатков D-Glu и L-Lys число остатков Ala, в предлагаемой структуре D-Ala изображен в скобках. Судя по данным определения аммиака, С-концевые остатки D-Glu, D-Asp и D-Ala могут быть амидированы не полностью. Вариации в структуре могут быть следствием микрогетерогенности химического строения клеточной стенки [9] либо возникают в ходе кислотных обработок, применяемых в процессе получения бластолизина.

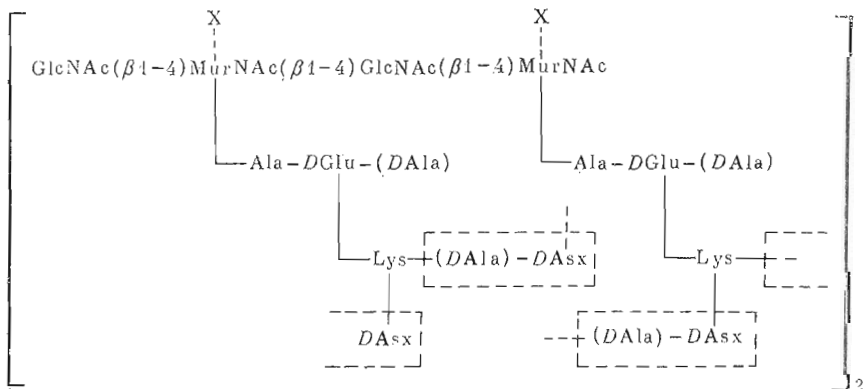


Рис. 5. Структура компонента Б-2-5. Пунктиром выделены дипептиды DAla-DAsp, возможные участки соединения Lys остатков тетрасахаридсодержащих гликопептидов. X — фрагмент, содержащий глицерофосфат, Glc, Gal

Поскольку изменения в составе углеводных остатков, не входящих в пептидогликан, мало сказываются на проявлении противоопухолевой активности, можно считать, что противоопухолевая активность бластолизина в основном обусловлена наличием в нем тетрасахаридных мурамилсодержащих гликопептидов.

Экспериментальная часть

Бластолизин получен из клеточных стенок *L. bulgaricus* и предоставлен И. Г. Богдановым (Научно-производственная лаборатория биологически активных веществ, НРБ).

Детектирование веществ при хроматографии осуществляли при помощи Uvicord S (LKB) на длине волны 206 нм. Для определения аминокислотного и аминсахарного анализа 0,1 мг образца гидролизovali 200 мкл 6 н. HCl в запаянной ампуле при 115°С в течение 20 ч и анализировали на аминокислотном анализаторе Biotronic LC-70, как описано в работе [19]. Состав моносахаридов, количество глицерина и молочной кислоты определяли ГЖХ после метанолиза в виде триметилсилильных производных на приборе Hewlett Packard 5710 A [20]. Содержание фосфора определяли элементным анализом. Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на приборе Altex, модель 334 (Altex, США).

Электрофорез проводили в 15 и 20% ПААГ в буферной системе по Лэммли [21]. Гели окрашивали кумасси бриллиантовым голубым Р-250.

Для определения оптической конфигурации аминокислот 1 мг компонента Б-2-5 гидролизovali 6 н. HCl (90°С, 24 ч), упаривали и затем сорбировали на смоле Dowex 50×8 (H⁺, 200—400 меш, объем колонки 2 мл), промывали 8 мл бидистиллированной воды, затем десорбировали аминокислоты со смолы 10 мл 2 М NH₄OH, элюат упаривали и аминокислоты превращали в N-трифторацетильные производные изопропиловых эфиров. Смесь хроматографировали на капиллярной колонке (35 м×0,4 мм), в качестве стационарной фазы применяли *трет*-бутиламид N-маргаринонил-L-валлина в условиях, аналогичных описанным в [16].

Спектры ¹³C-ЯМР для растворов в D₂O соединений $\text{GlcNAc}\beta\text{1-4MurNAc}$, $\text{GlcNAc}\beta\text{1-4MurNAc-Ala-D-Glu-NH}_2$, $\text{GlcNAc}\beta\text{1-4MurNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4MurNAc}$, полученных по методикам [19], регистрировали при 20°С CFT-20 (Varian) с рабочей частотой 20 МГц, спектр компонента Б-2-5ц — в D₂O на приборе WM-500 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 125,7 МГц. Наличие N-концевого остатка Asp было установлено после дансильирования компонента Б-2-5 по методу Грея [22] и подтверждено получением Pth-производного по методике [23].

Масс-спектрометрический анализ. Компонент Б-2-5 гидролизovali 6 н. HCl при 100°С в течение 30 мин, гидролизат этерифицировали (HCl в метаноле) и трифторацетилировали. Полученные производные исследовали ГЖХ-МС и методом химической ионизации с аммиаком. Условия получения и анализ масс-спектров описаны в работе [15].

Для С-концевого анализа проводили обработку Б-2-5 безводным гидразином [24], затем упаривали и гидразиды аминокислот отделяли экстракцией водной эмульсии свежеперегнаным бензальдегидом, а затем толуолом. Водную фазу упаривали и дансильировали по Грею. С-Концевые аминокислоты идентифицировали тонкослойной хроматографией на силикагеле сравнением со стандартными образцами.

Для определения противоопухолевой активности использовали белых бесспорных мышей (Центральный питомник АМН СССР) с опухолью S-180. Противоопухолевый эффект оценивали по наличию некротической реакции в опухолевой ткани через 24 ч после однократного внутривенного введения препарата в дозе 1 мг/мышь (50 мг/кг) на 7—8-е сут после перевивки опухоли, а также по торможению роста опухоли через 7 сут после введения препарата [19].

Выделение активной фракции. Раствор 200 мг бластолизина в 10 мл 0,1 М AcOH наносили на колонку (2,6×80 см) с сефадексом G-50sf, урав-

повешенным тем же буфером, и элюировали со скоростью 16 мл/ч. Фракции объединяли, как показано на рис. 1, и лиофилизировали. Выход активной фракции Б-2 — 124 мг (62%). Раствор 20 мг фракции Б-2 в 0,5 мл воды наносили на колонку (0,9×20 см) с целлюлозой DE-32 (Cl⁻), уравновешенной 0,05 М NaCl, и элюировали сначала этим раствором, а затем в ступенчатом градиенте концентрации NaCl (рис. 2). Полученные фракции обессоливали на колонке (2,6×30 см) с сефадексом G-25sf. Выход активной фракции Б-2-5 — 14 мг (70%).

Лизоцимный гидролиз. К 20 мг фракции Б-2-5 добавляли 1 мл 0,05 М NH₄OAc (рН 6,0), затем 1 мг лизоцима (НПО «Биолар», марка «Б») и 0,1 мг NaN₃ и инкубировали 24 ч при 36° С, затем добавляли 4 мг Dowex 50×8 (200—400 меш) в Н⁺-форме, после перемешивания в течение 10 мин отфильтровывали смолу, фильтрат лиофилизировали и дополнительно очищали гель-фильтрацией на колонке с G-50sf (1×20 см). Выход высокомолекулярной фракции 18 мг (90%).

Боргидридное восстановление. Образец, содержащий 20 мг фракции Б-2-5 в 0,5 мл воды, смешивали с 3 мл свежеприготовленного 1 М NaBH₄ и оставляли на 4 ч при 20° С, затем добавляли 6 мл 1 М AcOH, лиофилизировали, обессоливали на колонке (1×20 см) с сефадексом G-25sf. Вещество, выходящее со свободным объемом, собирали и лиофилизировали, получали 18 мг восстановленной фракции Б-2-5.

Мягкий щелочной гидролиз. Навеску 20 мг фракции Б-2-5 растворяли в 2 мл 0,05 М NH₄OH (или в 2 мл 0,5 М K₂CO₃) и оставляли при 20° С на 12 ч. Образовавшиеся продукты реакции разделяли гель-фильтрацией на колонке (1×20 см) с G-50sf. Выход высокомолекулярного продукта Б-2-5ц составляет 12 мг (60%).

Мягкий кислотный гидролиз. 20 мг образца Б-2-5 растворяли в 1 мл 5% трихлоруксусной кислоты и оставляли на 100 ч при 40° С. Низкомолекулярные продукты гидролиза и трихлоруксусную кислоту разделяли гель-фильтрацией на колонке (1×20 см) с G-25sf. Выход высокомолекулярной фракции Б-2-5к 12 мг (60%).

Окисление HIO₄. 20 мг образца Б-2-5 растворяли в 1 мл 0,2 М NH₄OH, рН 4,0, добавляли 5 мг HIO₄, реакционную смесь оставляли в темноте при 4° С на 260 ч. По окончании реакции высокомолекулярную фракцию выделяли на колонке (1×20 см) с G-50sf. Выход компонента Б-2-5ок 10 мг (50%).

Авторы выражают благодарность М. Б. Сапоровской и С. В. Витту (ИПЭОС АН СССР) за проведение ГЭЖХ-энантиомерного анализа, Л. А. Коряковой за снятие ¹³C-ЯМР-спектров, И. А. Богдановой за снятие масс-спектров химической ионизации, И. Е. Федуловой и С. В. Кожкину за определение аминокислотного и углеводного состава.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mathe G. Adv. Cancer. Res., 1971, v. 14, p. 1.
2. Milas L., Scott M. T. Adv. Cancer. Res., 1978, v. 26, p. 251.
3. Silobreic V. Folia biol. (Praha), 1980, v. 26, p. 145.
4. Ермолаева З. В., Вайсберг Г. Е. Сов. медицина, 1974, № 2, с. 10—14.
5. Богданов Н. Г., Величков В. Т., Гуревич А. И., Далева П. Г., Колосов М. Н., Малькова В. П., Сорокина П. В., Христова Л. Н. Бюл. эксперим биологии и медицины, 1977, № 12, с. 709—712.
6. Bogdanov I. G. Observations on the therapeutic effect of the anti-cancer preparation from *Lactobacillus bulgaricus* LB-51 tested on 100 oncologic patients (Sofia), 1982, p. 1.
7. Bogdanov I. G., Dalev P. G., Gurevich A. I., Kolosov M. N., Malkova V. P., Plemyanitsova L. A., Sorokina I. B. FEBS Lett., 1975, v. 57, № 3, p. 259—261.
8. Андропова Т. М., Ростовцева Л. И., Добрушкина Е. П., Гаврилов Ю. Д., Дешко Т. Н., Исанов В. Т. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1831—1841.
9. Schliefier K. H., Kandler O. Bacteriol. Rev., 1972, v. 36, № 4, p. 407—477.
10. Dalev P. G., Tsoneva P. N., Bogdanov I. G. C. r. Acad. Bulg. sci., 1977, v. 30, № 9, p. 1305—1308.
11. Bailey R. W., Pridham J. B. In: Adv. in Carbohydr. chem./Eds Wolfrom M. L., Tipson R. S. N. Y.—L.: Acad. Press, 1962, v. 17, p. 132, 137.

12. *Ghuysen J.-M.* Bacteriol. Rev., 1968, v. 32, № 4, p. 425-464.
13. *De Boer W. R., Wouters J. T. M., Anderson A. J., Archibald A. R.* Eur. J. Biochem., 1978, v. 85, № 2, p. 433-436.
14. *Klaic B.* Carbohydr. Res., 1982, v. 110, p. 320-325.
15. *Решетова О. С., Розынов Б. В., Безруков М. В., Богданова И. А.* Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 12, с. 1625-1636.
16. *Белоконов Ю. П., Черноглазова Н. П., Кочетков К. А., Гарбалинская Н. С., Рыжов М. П., Бахмутов В. И., Сапоровская М. Б., Писколова Е. А., Малеев В. И., Витт С. В., Беликов В. И.* Изв. АН СССР. Сер. хим., 1984, № 4, с. 804-813.
17. *Chirnan D. M., Pollock J. J., Sharon N. J.* Biol. Chem., 1968, v. 243, № 3, p. 487-496.
18. *Migliore D., Jolles P.* FEBS Lett., 1968, v. 2, № 1, p. 7-9.
19. *Ростовцева Л. Н., Андропова Т. М., Малькова В. П., Сорокина И. Б., Иванов В. Т.* Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1843-1858.
20. *Jackson L. K., Slodk E., Platner R. P., Burton K. A., Cadmus M. C.* Carbohydr. Res., 1982, v. 110, p. 267-276.
21. *Laemmli U. K.* Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680-685.
22. *Gray W. R.* Meth. Enzymol., 1967, v. 11, p. 469-475.
23. *Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жижулина Е. Б., Виноградова Е. И.* Биохимия, 1972, т. 37, с. 410-426.
24. *Дэвени Т., Гергей Я.* Амнинокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976, с. 290.

Поступила в редакцию
4.VI.1986

ISOLATION AND STRUCTURAL ANALYSIS OF THE ACTIVE COMPONENT OF ANTITUMOUR DRUG BLASTOLYSIN

BEZRUKOV M. V., ANDRONOVA T. M., RESHETOVA O. S., MAL'KOVA V. P.,
SOROKINA I. B., ROSYNOV B. V., IVANOV V. T.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of
Sciences of the USSR, Moscow*

Active principle of blastolysin, comprising ca. 40% of the total weight of *Lactobacillus bulgaricus* cell wall preparation, has been isolated and structurally studied by chemical and spectral methods. The substance a glycopeptide with M_r ca. 10 000, consists of two tetrasaccharide moieties connected by oligopeptide bridges; glycerophosphate, glucose, and galactose moieties are also attached to N-acetylmuramyl residue of the peptidoglycan core. Tetrasaccharide-containing muramylpeptides were shown to be responsible for the antitumour activity.