



Эти соединения водорастворимы, устойчивы к гидролизу и обладают высокой реакционной способностью. Благодаря этому они находят все более широкое распространение.

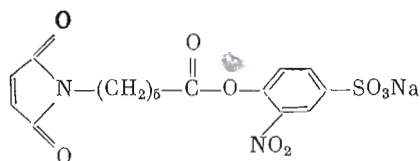
В настоящей работе описано получение новых сшивающих реагентов на основе 2-нитро-4-сульфофениловых эфиров дикарбоновых кислот. 2-Нитро-4-сульфофениловые эфиры (Nsp) были предложены нами [5–7] и независимо Клауснером с сотр. [8] в 1977 г. для синтеза пептидов в водной среде. Так как предложенный нами способ синтеза этих соединений карбодимидным методом оказался удобнее, чем способ с использованием симметричных ангидридов [8], в дальнейшем он стал общим методом синтеза Nsp-эфиров защищенных аминокислот и карбоновых кислот.

Показано, что скорость гидролиза Nsp-эфиров в водно-щелочной среде (рН 7,5–9,0) значительно ниже скорости их амиолиза [7, 9, 10], а скорость ацилирования ими белков выше [11] или сравнима [9] со скоростью ацилирования соответствующими N-оксисукцинимидными эфирами.

Хорошая растворимость в воде и высокая реакционная способность Nsp-эфиров позволяет использовать их в качестве реагента для модификации белков как по  $\epsilon$ -аминогруппам лизина [11–13], так и по  $\alpha$ -аминогруппам [9].

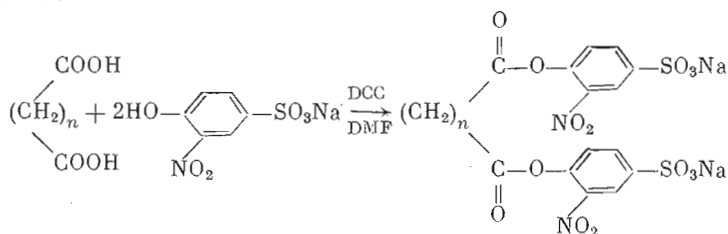
Важное преимущество Nsp-эфиров — возможность спектрофотометрического контроля их реакции с аминокислотами и белками: выделяющийся в ходе ацилирования 2-нитро-4-сульфофенил (натриевая соль) поглощает свет в видимой области ( $\lambda_{\max}=406$  нм,  $H_2O$ ;  $\epsilon=4,6 \cdot 10^3$   $M^{-1} \cdot c^{-1}$ ), в то время как исходные Nsp-эфиры практически не поглощают ( $\lambda_{\max}=300$  нм) [7, 10].

Указанные достоинства Nsp-эфиров были недавно использованы для создания нового бифункционального реагента — 2-нитро-4-сульфофенилового эфира N-малеимида-6-аминокапроновой кислоты [10]:



В отличие от широко используемого соответствующего N-оксисукцинимидного эфира новый реагент хорошо растворялся в воде и позволял определять полноту прохождения реакции ацилирования белка спектрофотометрически. Описанный реагент успешно применяли [10] для конъюгации цистеинсодержащих пептидов с белком-носителем.

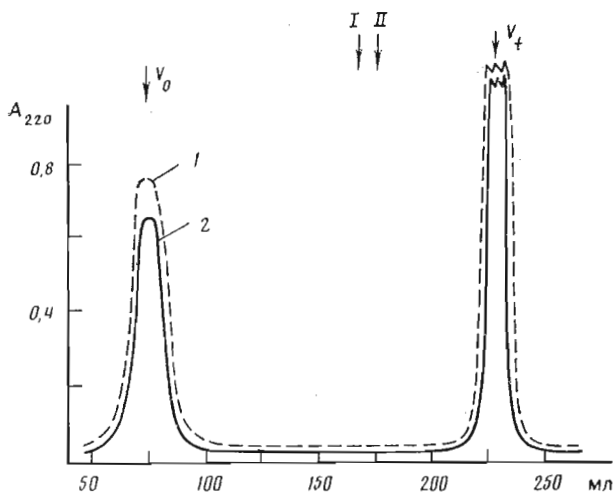
Нами получены Nsp-эфиры адипиновой и азелаиновой кислот по следующей схеме:



где  $n=4$  и  $7$ .

Соединения растворимы в воде (3–5%) и оказались устойчивыми при хранении в течение 1 года при комнатной температуре (контроль по т.пл. и ТСХ). По-видимому, немаловажен и тот факт, что необходимая для синтеза этих соединений натриевая соль 2-нитро-4-сульфофенола — значительно более доступное соединение, чем N-гидроксисульфосукцинимид, который использовал Старос [4] для получения описанных выше бифункциональных реагентов.

Для испытания новых бифункциональных реагентов нами производилась сшивка модельных белков — миоглобина ( $M$  17,6 кДа) и капсидного



Гель-фильтрация конъюгированного миоглобина (2) и капсидного белка X-вируса картофеля (1) на сефадексе G-200 в 0,1% водном аммиаке (рН 9). Колонка 3×45 см, скорость элюции 40 мл/ч. Маркеры: голубой декстран ( $V_0$ ), Dnp-Gly ( $V_t$ ), интактный капсидный белок X-вируса картофеля (I) и интактный миоглобин (II)

белка X-вируса картофеля ( $M$  24,8 кДа). Реакционную смесь разделяли на колонке с сефадексом G-200, предварительно калиброванной соответствующим интактным белком, голубым декстраном ( $M$  2000 кДа) и Dnp-глицином. Конъюгаты выходили со свободным объемом. Следовательно, их молекулярные массы не менее 600 кДа (предел эксклюзии у сефадекса G-200 для глобулярных белков). Белкового материала на месте выхода интактных белков не отмечалось (рисунок). Гель-фильтрацию конъюгатов проводили также в 0,1% водном аммиаке (рН 9,0) с добавкой 6 М мочевины или 4 М гуанидингидрохлорида, что позволяло исключить наличие агрегатов после модификации белков. Профиль элюции не отличался от представленного на рисунке.

Описанные нами бис(2-нитро-4-сульфофениловые) эфиры дикарбоновых кислот могут быть использованы для получения белковых конъюгатов, пептидо-белковых конъюгатов, а также для иммобилизации ферментов.

### Экспериментальная часть

*Динатриевая соль бис(2-нитро-4-сульфофенилового) эфира адипиновой кислоты.* К раствору 1,46 г (10 ммоль) адипиновой кислоты и 6 г (20 ммоль) тригидрата натриевой соли 2-нитро-4-сульфофенола в 50 мл DMF при 0° С и перемешивании прибавляли 4,2 г (20 ммоль) DCC, выдерживали 2 ч при этой температуре и оставляли на 16 ч при 20° С. Отфильтровывали дициклогексилмочевину, удаляли в вакууме DMF и остаток затирали с эфиром. После перекристаллизации желтого осадка из спирта получили 5 г (85%) динатриевой соли бис(2-нитро-4-сульфофенилового) эфира адипиновой кислоты с т.пл. 305–307° С (разл.). Найдено, %: С 37,49; Н 2,61; N 4,99.  $C_{18}H_{14}O_4N_2S_2Na \cdot 1/2 C_2H_5OH$ . Вычислено, %: С 37,09; Н 2,78; N 4,55.

*Динатриевая соль бис(2-нитро-4-сульфофенилового) эфира азелаиновой кислоты.* Получали аналогично из 1,15 г (6 ммоль) азелаиновой кислоты, 3,6 г (12 ммоль) натриевой соли 2-нитро-4-сульфофенола и 2,5 г (12 ммоль) DCC. После перекристаллизации из смеси метанол – этанол (1:1) получили 1,9 г (60%) бис(2-нитро-4-сульфофенилового) эфира азелаиновой кислоты с т.пл. 300–302° С (разл.). Найдено, %: С 38,65; Н 3,44; N 4,48.  $C_{21}H_{20}O_4N_2S_2Na \cdot H_2O$ . Вычислено, %: С 38,65; Н 3,40; N 4,29.

Сшивка миоглобина бис(2-нитро-4-сульфобензильным) эфиром адипиновой кислоты. К раствору 2 мг миоглобина скелетной мышцы лошади в 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$  (рН 8,0) добавляли 2 мг сшивающего реагента, выдерживали 2 ч при 20° С и делили реакционную смесь на колонке с сефадексом G-200. Элюирование проводили 0,1% водным раствором аммиака при рН 9,0. При этом разложение реакционноспособных групп реагента, оставшихся в случае моноацилирования белков, происходит в течение нескольких минут (спектрофотометрический контроль). Конъюгат выходил со свободным объемом (рисунок).

Сшивка вирусного белка бис(2-нитро-4-сульфобензильным) эфиром азелаиновой кислоты. Апалогично обрабатывали 2 мг капсидного белка Х-вируса картофеля 2 мг бифункционального реагента. Конъюгат выходил со свободным объемом.

Авторы выражают благодарность д-ру биол. наук В. К. Кибиреву за интерес, проявленный к работе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Han K.-K., Richard C., Delacourte A. // *Int. J. Biochem.* 1984. V. 16. № 2. P. 129–145.
2. Hartman F. C., Wold F. // *Biochemistry.* 1967. V. 6. № 2. P. 2439–2448.
3. Hill M., Bechet J. J., D'Albis A. // *FEBS Lett.* 1979. V. 102. P. 282–286.
4. Staros J. V. // *Biochemistry.* 1982. V. 21. № 17. P. 3950–3955.
5. Гершкович А. А., Серебряный С. Б. // IV Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов: Тез. докл. Минск, 1977. С. 188.
6. Гершкович А. А., Серебряный С. Б. // *Биоорганическая химия.* 1978. Т. 4. № 8. С. 1129–1131.
7. Гершкович А. А., Серебряный С. Б. // *Биоорганическая химия.* 1979. Т. 5. № 8. С. 1125–1132.
8. Klausner Y. S., Meiri T. H., Schneider E. // *Peptides. Proc. of the 5-th American Peptide Symposium/Eds Goodman M., Meienhofer J. N. Y.: Wiley, 1977. P. 536–538.*
9. Медведкин В. Н., Митин Ю. В., Пермяков Е. А. // *Биоорганическая химия.* 1987. Т. 13. № 8. С. 1019–1022.
10. Aldwin L., Nitecki D. E. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 164. № 3. P. 494–501.
11. Bhatnagar P. K., Nitecki D. E., Raubitschek A. // *Peptides. Proc. of the 7-th American Peptide Symposium/Eds Rich D., Gross E. Rockford, IL: Pierce Chemical Co., 1981. P. 521–524.*
12. Радавский Ю. Л., Гершкович А. А., Могирева Л. А., Манько Н. И., Серебряный С. Б. // Тез. V Всесоюз. симпоз. по физике и химии белков и пептидов. Баку, 1980. С. 225.
13. Радавский Ю. Л., Могирева Л. А., Манько Н. И., Гершкович А. А. // *Биоорганическая химия.* 1982. Т. 8. № 11. С. 1486–1489.

Поступила в редакцию  
4.XI.1988

После доработки  
3.II.1989

#### BIS(2-NITRO-4-SULPHOPHENYL) ESTERS OF DICARBOXYLIC ACIDS AS WATER-SOLUBLE BIFUNCTIONAL REAGENTS FOR PROTEIN CROSS-LINKING

GERSHKOVICH A. A., RADAUSKY Yu. L., PARTESHKO A. V.,  
GONCHARENKO V. S.

*Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

Bis(2-nitro-4-sulphophenyl) esters of adipic and azelaic acids, were synthesized and used as novel water-soluble bifunctional reagents for cross-linking of proteins. Conjugates of some model proteins prepared with the use of these reagents had molecular masses over  $8 \cdot 10^5$ . These reagents are of interest for biochemical studies.