



УДК 547.458.34

СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИГЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ
И ИХ ФРАГМЕНТОВVII. СИНТЕЗ 3-О-[4-О-(β-D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ)-α-
L-РАМНОПИРАНОЗИЛ]-β-(*n*-АМИНОФЕНИЛ)-
D-ГАЛАКТОПИРАНОЗИДА И ЕГО СВЯЗЫВАНИЕ
С БЕЛКОМ И СЕФАРОЗОЙ

Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я.

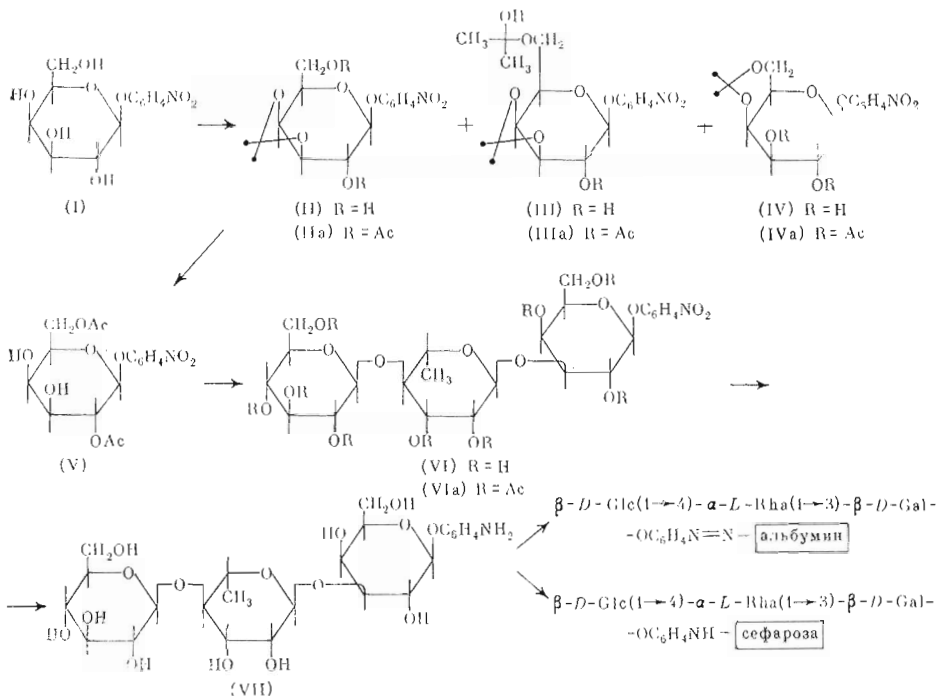
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Описан синтез трисахарида, являющегося химически модифицированным повторяющимся звеном специфического полисахарида из *Salmonella newington*, в виде гликозида, удобного для иммобилизации на полимерном носителе. Связывание полученного *n*-аминофенилтриозида с белком и сефарозой, активированной бромцианом, привело к синтетическому гликопротеину, содержащему ~10% углеводов, и сорбенту, содержащему ~15 мкмоль ковалентно связанных лигандов на 1 мл геля.

Синтетические олигосахариды в форме, удобной для присоединения к полимерному материалу, представляют интерес для иммунохимии и иммунологии, поскольку они могут быть превращены в иммуногены или использованы для получения иммуноадсорбентов для аффинной хроматографии.

Практически удобным является использование олигосахаридов в виде *n*-аминофенил- и *n*-аминобензилгликозидов [1], получение которых не связано с нарушением структуры моносахаридного остатка на восстанавливаемом конце, как в случае гликозил-1-(*m*-аминофенил)-флавазолов [2] и 1-амино-1-дезоксигликозилполиолов [3]. Ароматическая аминогруппа арилгликозидов пригодна как для образования ковалентной связи с белком, так и для связывания с сефарозой, активированной бромцианом [4], причем полученные таким образом сорбенты могут быть использованы для выделения гликозилтрансфераз методом аффинной хроматографии [5]. Кроме того, как показали Вестфаль с сотр. [6], с ростом олигосахаридной цепи в иммугене антигенные свойства ароматического фрагмента в агликоне не являются решающими при выработке антител организмом.

В настоящей работе мы описываем синтез β-(*n*-аминофенил)-гликозида 3-О-[4-О-(β-D-глюкопиранозил)-α-L-рамнопиранозил]-D-галактопиранозы (аналог биологического повторяющегося звена O-антигенного полисахарида *Salmonella newington*, в котором маннозный остаток замещен на глюкозный) и получение продуктов связывания гликозида (VII) с белком и сефарозой. Синтез гликозида (VII) осуществлен по схеме



В результате ацетонирования β -(*n*-нитрофенил)-галактозида (I) в присутствии 2,2-диметоксипропана и *n*-толуолсульфокислоты образуется смесь изопропилиденовых производных (II) — (IV) с преобладанием соединения (II), строение которых вытекает из данных спектров ПМР их ацетатов (IIa — IVa). В спектрах в области слабого поля содержатся сигналы AA'BB' — системы ароматических протонов *n*-нитрофенильной группировки в виде двух дублетов с J_{AB} 9 Гц. Пространственно неэквивалентные гем-метильные группы диоксоланового цикла в ацетате (IIa) дают сигналы с различающимися химическими сдвигами (δ 1,36 и 1,62 м.д.), а эквивалентные гем-метильные группы *m*-диоксанового цикла в ацетате (IVa) по химическим сдвигам не различаются (δ 1,40 м.д.). В минорном ацетониде (III) один изопропилиденный остаток находится в положении 3,4, а второй, по-видимому, присоединен полукетальной связью к гидроксильной группе при C₍₆₎, так как химические сдвиги сигналов C-метильных групп в ацетатах (IIa) и (IIIa) практически совпадают, а соотношение интенсивностей сигналов ацетоксильных и C-метильных групп больше, чем 1 : 2*.

Гидролиз диацетата (IIa) действием 65% уксусной кислоты при нагревании приводит к кристаллическому диацетату (V), использованному для гликозилирования 4-O-(2,3,4,6-тетра-O-ацетил- β -D-глюкопиранозил)-2,3-ди-O-ацетил- α -L-рамнопиранозилбромидом, полученным по стандартной методике из гептаацетата сциллобиозы [7]. Гликозилирование в ацетонитриле в присутствии Hg(CN)₂ дало смесь, в которой наряду с исходным соединением (V) присутствовали еще два компонента с R_f 0,54 и 0,46, выделенные хроматографией на силикагеле. УФ-спектры обоих компонентов с максимумом при 300 нм характерны для *n*-нитрофенилгликозидов [8].

При деацетилировании более подвижного компонента по Землену выделяют кристаллический *n*-нитрофенилтриозид (VI) с общим выходом на стадиях конденсации и деацетилирования 37%. Структуру его подтверждают следующие данные: при формолизе-гидролизе соединения (VI)

* Вместо теоретически ожидаемого соотношения 1 : 4 наблюдается соотношение 1 : 2,9, что объясняется значительной неустойчивостью соединения (IIIa), даже в кристаллическом состоянии содержащего продукт разложения, видимо, за счет легкости гидролиза полукетальной связи.

Сравнение экспериментальных и вычисленных величин молекулярного вращения

Соединение	[M] _D , град
β-Метил- <i>D</i> -глюкопиранозид+α-метил- <i>L</i> -рамнопиранозид+ +соединение (I)	-396
β-Метил- <i>D</i> -глюкопиранозид+β-метил- <i>L</i> -рамнопиранозид+ +соединение (I)	-116
Триозид (VI)	-467

с помощью углеводного анализатора идентифицированы рамноза, галактоза и глюкоза в соотношении 1 : 0,9 : 1; при стандартном метилировании продукта (VI) с последующим формолизом-гидролизом, боргидридным восстановлением и ацетилированием методом хромато-масс-спектрометрии идентифицированы 1,4,5-три-*O*-ацетил-2,3-ди-*O*-метилрамнит, 1,5-ди-*O*-ацетил-2,3,4,6-тетра-*O*-метилсорбит и 1,3,5-три-*O*-ацетил-2,4,6-три-*O*-метилдульцит, что доказывает наличие (1 → 3)-связи между остатками рамнозы и галактозы в гликозиде (VI). α-Конфигурацию рамнозидной связи в триозиде (VI) подтверждает расчет величин молекулярного оптического вращения по правилу Клайна (таблица).

Наконец, с предлагаемой структурой согласуется спектр ПМР нонацетата (VIa), содержащий сигналы ароматических протонов *n*-нитрофенильной группы, а также сигналы ацетоксильных и *C*-метильных групп в соотношении 9 : 1.

Второй компонент (выход 20%), полный ацетат которого имеет спектр ПМР, сходный со спектром соединения (VIa), по всей вероятности, продукт гликозилирования соединения (V) по гидроксильной группе при C₍₄₎. В осуществленном ранее гликозилировании 2,6-ди-*O*-ацетил-β-бензил-*D*-галактопиранозиды также образовывались производные двух изомерных трисахаридов [9].

Гидрирование над PtO₂ (по Адамсу) легко превращает *n*-нитрофенилтриозид (VI) в *n*-аминофенилтриозид (VII). Контроль за ходом восстановления осуществляли с помощью УФ-спектроскопии по резкому снижению интенсивности максимума при 300 нм и появлению интенсивной (первой) полосы *n*-аминофенилгруппировки при 236 нм [10].

Кристаллический *n*-аминофенилтриозид (VII) используют для связывания с кроличьим альбумином по методу Гебеля и Эвери в модификации Вестфала [11], который заключается в диазотировании аминогруппы и последующем взаимодействии с белком при pH 9. Модификация альбумина не сопровождается его деградацией, поэтому полученный продукт связывания (олигосахарид — фенилазо-альбумин), содержащий ~ 10% углеводов, сохраняет высокий молекулярный вес исходного белка, что подтверждают данные гель-фильтрации на сефадексе G-100. Однако, по данным диск-электрофореза, как исходный альбумин, так и углевод-белковый продукт связывания неоднородны и обнаруживаются в виде четырех полос.

Для иммобилизации триозида (VII) на сефарозе 4В использована модифицированная в работе [12] методика активации сефарозы бромцианом в фосфатном буфере при pH 11,9. Конденсация *n*-аминофенилтриозида (VII) с активированной сефарозой осуществлена в 0,5 М бикарбонатном буфере (pH 9,7) с последующей блокировкой остаточных активных центров сорбента этаноламином. Согласно описанному методу модификации агарозы *n*-аминофенилгликозидами [4], степень ковалентного связывания лигандов с сорбентом вычисляют косвенным способом путем определения количества вещества, остающегося в растворе после процедуры иммобилизации. Мы же для определения степени иммобилизации *n*-аминофенилтриозида (VII) на сефарозе использовали методику отщепления лигандов

в щелочных условиях, предложенную для анализа аффинных сорбентов на основе сефадекса [13]. В 1 н. растворе NaOH за 6—8 ч при 37° происходит почти полное отщепление лигандов при минимальной деградации самой сефарозы, сорбент отделяют фильтрованием, а в фильтрате после гидролиза определяют содержание рамнозы методом Дише. По данным этого анализа, в 1 мл модифицированной сефарозы находится 15 мкмоль лигандов соединения (VII).

Полученные продукты связывания содержат химически модифицированное повторяющееся звено специфического полисахарида *S. newington* и могут представлять интерес для иммунохимических и биохимических исследований.

Экспериментальная часть

ТСХ выполнена на пластинках с незакрепленным слоем силикагеля в следующих системах растворителей: хлороформ — спирт, 9 : 1 (А), бензол — спирт, 8 : 2 (Б) и 85 : 15 (В); для обнаружения веществ пластинки опрыскивают 25% H₂SO₄ и нагревают. Препаративное хроматографическое выделение осуществлено на силикагеле Л 100/160 м (ЧССР). Спектры ПМР сняты на приборе Varian DA-60-1L относительно ТМС, УФ-спектры получены с помощью саморегистрирующего спектрометра Spcord UV-VIS. Хромато-масс-спектрометрический анализ проведен на приборе Varian MAT-111 с использованием колошки из нержавеющей стали (150 × 0,4 см) с 3% SE-30 на варапорте-30 (100—120 меш) при 170° и скорости газа-носителя гелия 15 мл/мин. ГРХ выполнена на приборе Pye Unicam-104, модель 64, с пламенно-ионизационным детектором с использованием колонки из нержавеющей стали (150 × 0,4 см), заполненной 3% SE-30 на диатомите CQ (100—120 меш), при 180° (колонка А) и стеклянной колонки (90 × 0,4 см), заполненной 3% ECNSS-M на газ-хроме Q (100—120 меш), при 165° (колонка Б) и скорости газа-носителя азота 45 мл/мин. Угледородный анализ выполнен на анализаторе фирмы Technicon (США). Удельные вращения определены на поляриметре Perkin-Elmer, модель 141, температуры плавления — на микроблоке Кофлера.

β-(*n*-Нитрофенил)-*D*-галактопиранозид (I). Полученный по общей методике [14] 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-*β*-(*n*-нитрофенил)-*D*-галактопиранозид [т. пл. 149—150° (MeOH), [α]_D^{23,5} —9,25° (с 2,22; CHCl₃); литературные данные [15]: т. пл. 139—140°] кипятят 5 мин с 1,5% раствором MeONa в смеси абсолютных CHCl₃ и MeOH (2 : 1) и получают соединение (I), выход 96%, т. пл. 179—180° (спирт), [α]_D²³ —72,8° (с 1,87; MeOH); литературные данные [15]: т. пл. 173—175°.

Ацетонирование β-(*n*-нитрофенил)-*D*-галактопиранозид. 1,28 г соединения (I) перемешивают с 60 мл абс. ацетона, 3 мл 2,2-диметоксипропана и 3—5 мг *n*-толуолсульфокислоты. Через 2—3 ч в реакционной смеси появляются три вещества с *R*_f 0,72; 0,56 и 0,4 (А) с преобладанием последнего. Через 24 ч соотношение меняется в пользу компонента с *R*_f 0,56. Смесь нейтрализуют триэтиламином и упаривают, остаток хроматографируют на колонке со 100 г силикагеля в градиенте смеси CHCl₃ — спирт (0,5 → 12% спирта), содержащей 0,5% триэтиламина. Выделено 185 мг (11%) вещества (III) с *R*_f 0,72, 980 мг (67,5%) вещества (II) с *R*_f 0,56 и 290 мг (20%) вещества (IV) с *R*_f 0,40.

6-*O*-(1'-окси-1'-метилэтил)-3,4-*O*-изопропилиден-*β*-(*n*-нитрофенил)-*D*-галактопиранозид (III) — сироп, [α]_D¹⁸ —44,2° (с 1,85; CHCl₃). 2-*O*-ацетат (IIIa) (вещество содержит продукт разложения), т. пл. 205—207° (спирт), [α]_D²¹ —29,1° (с 2,05; CHCl₃). Спектр ПМР (в C₅D₅N), δ, м. д.: 1,42 (с, 5,7H, CH₃^α + (CH₃)₂C при 6-OH), 1,65 (с, 3H, CH₃^γ), 2,10 (3H, CH₃COO), 7,20 и 8,19 (2 д с *J* 9 Гц, 4H, NO₂C₆H₄O).

3,4-*O*-Изопропилиден-*β*-(*n*-нитрофенил)-*D*-галактопиранозид (II), т. пл. 157—159° (абс. ацетон — петр. эфир), [α]_D²⁰ —56,7° (с 1,95; CHCl₃). Найде-

но, %: С 52,98; Н 5,80; N 4,03. $C_{15}H_{19}O_8N$. Вычислено, %: С 52,78; Н 5,61; N 4, 10.

2,6-Ди-О-ацетат (IIa), т. пл. 190—192° (спирт), $[\alpha]_D^{20} -0,9^\circ$ (с 2,13; $CHCl_3$). Спектр ПМР (в C_5D_5N), δ , м. д.: 1,36 (с, 3H, CH_3), 1,62 (с, 3H, CH_3), 2,03 и 2,09 (2 с, 6H, CH_3COO), 7,2 и 8,19 (2 д с J 9 Гц, $NO_2C_6H_4O$). Найдено, %: С 53,64; Н 5,55; N 3,41. $C_{19}H_{23}O_{10}N$. Вычислено, %: С 53,64; Н 5,45; N 3,29.

*4,6-О-Изопропилиден- β -(*n*-нитрофенил)-D-галактопиранозид (IV)* — сироп, $[\alpha]_D^{18} -81,8^\circ$ (с 1,92; $CHCl_3$). *2,3-Ди-О-ацетат (IVa)* — сироп, $[\alpha]_D^{18} +3,1^\circ$ (с 2,1; $CHCl_3$). Спектр ПМР (в CCl_4), δ , м. д.: 1,40 (с, 6H, $(CH_3)_2C$), 1,98 и 2,05 (2 с, 6H, CH_3COO), 7,05 и 8,07 (2 д с J 9 Гц, 4H, $NO_2C_6H_4O$).

*2,6-Ди-О-ацетил- β -(*n*-нитрофенил)-D-галактопиранозид (V)*. Суспензию 1,5 г продукта (IIa) в смеси 60 мл лед. CH_3COOH и 30 мл воды нагревают при 100°, через 1 ч смесь упаривают, остаток упаривают с толуолом и хроматографируют на колонке со 150 г силикагеля в градиенте смеси бензол — спирт (2 → 12% спирта), выделяют 1,06 г соединения (V) с R_f 0,45 (Б), выход 78%, т. пл. 183—184° (этилацетат — гептан), 185—187° (спирт), $[\alpha]_D^{19} -9^\circ$ (с 1,31; этилацетат). Найдено, %: С 49,39; Н 5,02; N 3,31. $C_{16}H_{19}O_{10}N$. Вычислено, %: С 49,87; Н 4,97; N 3,64.

*3-О-[4-О-(β -D-глюкопиранозил)- α -L-рамнопиранозил]- β -(*n*-нитрофенил)-D-галактопиранозид (VI)*. 1,87 г диацетата (V) гликозилируют 3,2 г гликозилбромидом, полученного по стандартной методике из гептаацетата сдиглобиозы [7], в 10—15 мл ацетонитрила, перегнанного над CaH_2 , в присутствии 1,25 г $Hg(CN)_2$. Через 3 ч реакционную смесь упаривают досуха, остаток экстрагируют хлороформом, экстракт промывают 1 н. раствором KI, водным $NaHCO_3$, сушат $MgSO_4$ и упаривают. По данным ТСХ (Б), в остатке кроме исходного вещества с R_f 0,36 имеются еще два компонента с R_f 0,54 и 0,46. Хроматографией на 350 г силикагеля в градиенте смеси бензол — спирт с возрастанием концентрации спирта от 0 до 5,5% выделяют фракцию (2,57 г), содержащую в основном компонент с R_f 0,54, и 0,87 г компонента с R_f 0,46.

Первый компонент омыляют 0,5% $MeONa$ в абс. метаноле (20°, 12 ч), полученный после нейтрализации и упаривания остаток кристаллизуют из метанола при нагревании; получено 1,1 г соединения (VI) (выход 37%, считая на продукт (V)), однородного по данным хроматографии на бумаге в системе бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3, $R_{\text{галактоза}}$ 1,5, т. пл. 228—230° (после двух перекристаллизаций из метанола), $[\alpha]_D^{21} -76,7^\circ$ (с 2,1; вода), УФ-спектр: $\lambda_{\text{макс}}$ 300 нм (10% раствор в воде). Найдено, %: С 46,87; Н 5,86; N 2,52. $C_{24}H_{35}O_{17}N$. Вычислено, %: С 47,29; Н 5,78; N 2,30.

При последовательном формолизе (85% $HCOOH$, 100°, 2 ч) и гидролизе (0,3 н. HCl , 100°, 12 ч) соединения (VI) получена смесь рамнозы, галактозы и глюкозы в соотношении 1 : 0,9 : 1 (данные анализа на углеводном анализаторе). При анализе продуктов гидролиза метилированного по Хаккомори триозида (VI) в виде ацетатов частично метилированных полиолов методом хромато-масс-спектрометрии идентифицированы 1,4,5-три-О-ацетил-2,3-ди-О-метилрамнит, 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилсорбит и 1,3,5-три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метилдальцит. Отсутствие в анализируемой смеси 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилдальцита, отвечающего изомерному триозиду с рамнозил-(1 → 4)-галактозной связью, показано сравнением методом ГЖХ [16] с заведомыми образцами 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилдальцита и 1,3,5-три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метилдальцита, различающихся по временам удерживания (относительно 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилдальцита): соответственно 1,43 и 1,38 на колонке А, 1,97 и 1,91 на колонке Б. При ацетилировании соединения (VI) получен нонаацетат (VIa), сироп, R_f 0,6 (Б), $[\alpha]_D^{20} -28,6^\circ$ (с 2,4; $CHCl_3$). Спектр ПМР (в $CDCl_3$), δ , м. д.: 1,34 (д, 3H, С-Ме рамнозы, $J_{5,6}$ 5 Гц), 2,02—2,18 (27H, CH_3COO), 7,15 и 8,25 (2 д с J 9 Гц, 4H, $NO_2C_6H_4O$).

3-О-[4-О-(β-D-глюкопиранозил)-α-L-рамнопиранозил]-β-(*p*-аминофенил)-D-галактопиранозид (VII). К раствору 70 мг соединения (VI) в смеси 1 мл воды и 7 мл метанола при перемешивании добавляют 20 мг PtO₂, приготовленной по Адамсу, и гидрируют 1,5 ч при атмосферном давлении, отделяют катализатор, фильтрат упаривают, получают стекловидный остаток, кристаллизующийся при нагревании со спиртом. После перекристаллизации из метанола получают 52 мг продукта (VII), выход 79%, т. пл. 218—220°, [α]_D²⁰ —51,5° (с 2,5; вода). УФ-спектр (раствор в метаноле): первая полоса поглощения с λ_{макс} 236 нм и малоинтенсивная вторая полоса с λ_{макс} 297 нм. Найдено, %: С 49,39; Н 6,35; N 2,19. С₂₄H₃₇O₁₅N. Вычислено, %: С 49,72; Н 6,43; N 2,42.

*Диазотирование β-(*p*-аминофенил)-гликозида (VII) и связывание с кроличьим альбумином.* К раствору 50 мг соединения (VI) в 2 мл холодной 0,1 М HCl при перемешивании добавляют по каплям 2,25 мл холодного 0,05 М раствора NaNO₂ до появления синего окрашивания иод-крахмальной индикаторной бумаги избыточной HNO₂. Раствор 150 мг кристаллического кроличьего сыроточного альбумина (Calbiochem, США) в 7,5 мл 0,15 М раствора NaCl с помощью 0,5 М NaOH доводят до pH 9, затем при 0—3° и перемешивании добавляют по каплям раствор полученной выше соли диазония и одновременно поддерживают в растворе pH 9 добавлением 0,1 М NaOH. Полученный оранжевый раствор выдерживают 2 ч при 0—3°, поддерживая pH 9 с помощью 0,1 М NaOH, затем нейтрализуют 0,05 М HCl до pH 7 и диализуют 2 сут против дистиллированной воды, недиализуемый остаток лиофилизуют; получено 165 мг углеводов-белкового продукта связывания в виде светло-оранжевого порошка.

Содержание углеводов в олигозид — фенилазо-альбумине рассчитано по данным анализа продукта связывания на рамнозу по методу Диге [17] с использованием калибровочных кривых, построенных для рамнозы и смеси рамнозы, глюкозы и галактозы в том же весовом соотношении, что и в триозиде (VII), и на белок по методу Лоури [18] с использованием калибровочного графика, построенного по кроличьему альбумину. Из данных обоих анализов следует, что полученный продукт связывания содержит 9,5 ± 0,5% углеводов. В условиях гель-фильтрации на сефадексе G-100 при элюировании 0,05 М раствором CH₃COONa он элюируется с холостым объемом колонки в виде симметричного пика, а при исследовании методом диск-электрофореза в 10% полиакриламидном геле с Трис-глициновым буфером (pH 8,3) в присутствии 0,5% додецилсульфата натрия и 0,5% β-меркаптоэтанола [19, 20] как исходный альбумин, так и углеводов-белковый продукт связывания обнаруживаются в виде четырех зон различной интенсивности, окрашивающихся на белок с кумасси бриллиантовым синим и на углеводы — с НЮ₄ — фуксинсернистой кислотой [21].

*Иммобилизация β-(*p*-аминофенил)-гликозида (VII) на сефарозе.*

а. Активация сефарозы 4В бромцианом. К 1,5 мл сефарозы 4В (Pharmacia, Швеция) добавляют 1,5 мл 5 М фосфатного буфера (pH 11,9), составленного из 3,33 М K₃PO₄ и 1,67 М K₂HPO₄; полученную суспензию охлаждают до 4° и добавляют при интенсивном перемешивании раствор 100 мг BrCN в 0,1 мл свежеперегнанного CH₃CN; после полного растворения BrCN (через 13 мин) гель промывают на стеклянном фильтре 25 мл холодного раствора 0,5 М NaHCO₃ с pH 9,7.

б. Иммобилизация. К 1 мл свежеективированной сефарозы 4В добавляют 58 мг (~ 100 мкмоль) триозида (VII) в 1 мл бикарбонатного буфера с pH 9,7 и встряхивают 20 ч при 4°. Гель переносят на фильтр и промывают 20 мл дистиллированной воды, затем количественно переносят его в центрифужную пробирку, добавляют 1 мл 0,25 М этаноламина и перемешивают 2—3 ч при 20°. Гель переносят на фильтр и промывают 20 мл 0,1 М CH₃COONa и 20 мл 0,5 М NaCl в 0,1 М NaHCO₃.

Степень иммобилизации лигандов на сефарозе определяют следующим образом: аликвоту геля инкубируют с равным объемом 2 н. NaOH (37°,

6 ч, периодическое перемешивание), гель отфильтровывают и промывают водой, объединенный фильтрат нейтрализуют 1 н. HCl и упаривают, остаток гидролизуют 0,3 н. HCl (100°, 12 ч). В гидролизате определяют содержание рамнозы по Деше [17]. Для контроля полноты отщепления лигандов проведена повторная щелочная обработка аликвоты геля в тех же условиях, в результате дополнительно отщепилось еще ~4% лигандов. Таким образом, степень иммобилизации составляет 15 мкмоль триозида (VII) на 1 мл модифицированной сефарозы.

Авторы благодарят канд. хим. наук Ю. Ю. Кусова и Н. А. Калининчук за помощь при осуществлении иммобилизации триозида (VII) на активированной сефарозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. McBroom C. R., Samanen C. H., Goldstein I. J. (1973) *Methods in Enzymology* (V. Ginsburg, ed.), 28, 212.
2. Himmelspach K., Westphal O., Teichmann B. (1971) *Eur. J. Immunol.*, 1, 106—112.
3. Gray G. R. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 163, 426—428.
4. Bloch R., Burger M. M. (1974) *FEBS Lett.*, 44, 286—289.
5. Berger E. G., Weiser M. M. (1976) *Experientia*, 32, 690—691.
6. Kleinhammer G., Himmelspach K., Westphal O. (1973) *Eur. J. Immunol.*, 3, 834—838.
7. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я., Байрамова Н. Э. (1974) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2331—2334.
8. Jansen A. P., Wydeveld P. G. A. V. (1958) *Nature*, 182, 525—526.
9. Торгов В. И., Черняк А. Я. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 455—458.
10. Dearden J. C., Forbes W. F. (1960) *Can. J. Chem.*, 38, 896.
11. Westphal O., Fejer H. (1956) *Chem. Ber.*, 89, 582—588.
12. Шиббаев В. Н., Кусов Ю. Ю., Калининчук Н. А., Кочетков Н. К. (1977) *Биоорганическая химия*, 3, 120—126.
13. Chipowsky S., Lee Y. C., Roseman S. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 2309—2312.
14. Lathman H. G., May E. L., Mossettig E. (1950) *J. Org. Chem.*, 15, 884—889.
15. Beiser S. M., Burke G. C., Tanenbaum S. W. (1960) *J. Mol. Biol.*, 2, 125—132.
16. Björndal H., HELLERQVIST C. G., Lindberg B., Svensson S. (1970) *Angew. Chem.*, 9, 610—618.
17. Dishe Z., Shettles L. B. (1948) *J. Biol. Chem.*, 175, 595—603.
18. Lowry O. H., Rosbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275.
19. Маурер Г. (1971) Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле, «Мир», М.
20. Webber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 4406—4412.
21. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. (1975) *Практикум по общей биохимии*, с. 108—110, «Просвещение», М.

Поступила в редакцию
15.XI.1976

SYNTHESIS OF ANTIGENIC BACTERIAL POLYSACCHARIDES AND THEIR FRAGMENTS. VII. SYNTHESIS OF *p*-AMINOPHENYL 3-O-[4-O-(β -D-GLUCOPYRANOSYL)- α -L-RHAMNOPYRANOSYL]- β -D-GALACTOPYRANOSIDE AND ITS COUPLING TO PROTEIN [AND SEPHAROSE

KOCHETKOV N. K., DMITRIEV B. A., CHERNYAK A. Ya.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The synthesis has been described of a chemically modified trisaccharide repeating unit of the specific polysaccharide from *Salmonella newington* in the form of glycoside which is ready for attachment to polymeric carrier. The *p*-aminophenyl trisaccharide obtained was coupled to a protein or cyanogen bromide-activated Sepharose to give, respectively, synthetic glycoprotein containing about 10% carbohydrates and adsorbent carrying 15 μ mol of covalently bound ligands per 1 ml of gel.