



УДК 547.458.07+576.8.097

СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИГЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ
И ИХ ФРАГМЕНТОВ11*. СИНТЕЗ ИСКУССТВЕННОГО АНТИГЕНА С ГАПТЕННЫМИ ГРУППАМИ,
ПРЕДСТАВЛЯЮЩИМИ СОБОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЕ
ПОВТОРЯЮЩЕЕ ЗВЕНО ПОЛИСАХАРИДА ИЗ *SALMONELLA NEWINGTON**Кочетков Н. К., Дмитриев В. А., Черняк А. Я.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва**Покровский В. И., Тендетник Ю. Я.**Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии
Министерства здравоохранения СССР, Москва*

Синтетический трисахарид $D\text{-Man}-(\beta 1 \rightarrow 4)\text{-L-Rha}-(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{-D-Gal}$ путем связывания его β -(*п*-аминофенил)гликозида методом азосочетания с белком эдестином превращен в искусственный антиген, включающий в себя все структурные элементы биологического повторяющегося звена специфического полисахарида бактерии *Salmonella newington*. В антисыворотках, полученных при иммунизации кроликов этим антигеном и его аналогом, содержащим вместо маннозного остатка остаток глюкозы, обнаружены специфические аггитела, направленные против О-фактора 3. Иммунизацией биологического повторяющегося трисахаридного звена на сефарозе, активированной бромцианом, получен иммуноадсорбент для аффинной хроматографии.

Создание искусственных антигенов, содержащих в качестве гаптенных групп бактериальные олигосахариды, в значительной мере тормозится отсутствием подходящих олигосахаридов в достаточных количествах. Бактериальные олигосахариды можно получать по методу Галаноса [2] путем частичного гидролиза специфического полисахарида с одновременным диализом, однако этот метод не гарантирует выделение биологического повторяющегося звена полисахарида. С другой стороны, наиболее распространенные методы связывания высших восстанавливающих олигосахаридов с белком-носителем сопряжены с нарушением структуры моносахаридного остатка на восстанавливаемом конце, как это имеет место в случае связывания методом смешанных ангидридов [3], в виде гликозил-1-(*п*-аминофенил)флавазолов [4] или в условиях восстановительного аминирования [5]. При этом в полученных искусственных антигенах слабо проявляются или совсем исчезают серологические факторы, связанные со структурными элементами восстанавливающего конца [4, 6].

Химический синтез повторяющихся звеньев (в том числе и биологических) бактериальных полисахаридов позволяет решить проблему полу-

* Сообщение 10 см. [1].

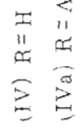
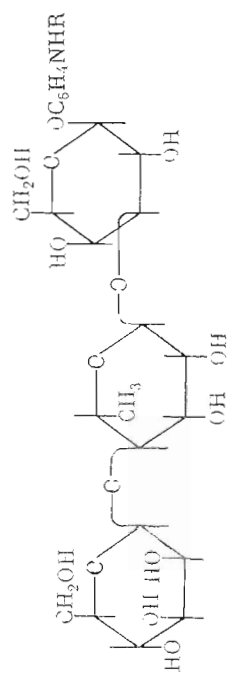
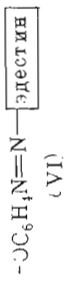
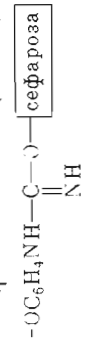
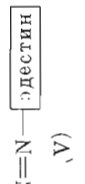
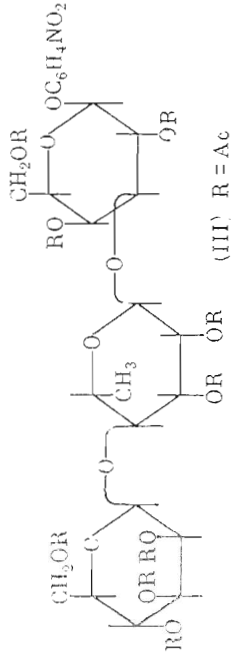
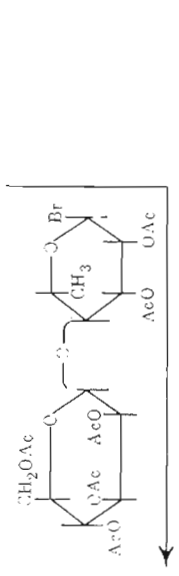
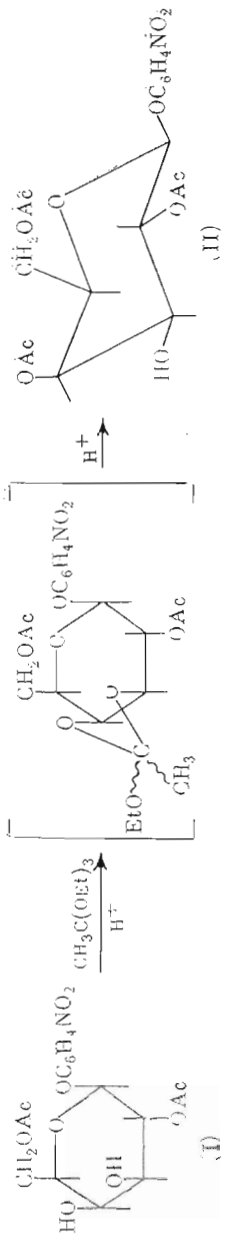
чения гаптенс в значительных количествах, причем сразу в форме, удобной для связывания с полимерным носителем. В частности, олигосахаридный синтез открывает новые перспективы в использовании метода азосочетания по Ландштейнеру [7], классического метода связывания углеводных гаптенс с белком, применявшегося преимущественно к доступным моно- и дисахаридам. В самое последнее время углевод-азопротеины нашли новое применение для получения специфических белков, используемых при изучении клеточных мембран [8, 9]. Дело в том, что генерируемые олигосахарид-азопротеинами в организме животных антитела являются углеводсвязывающими белками с узкой специфичностью, а легко получаемые при протеолитическом гидролизе этих антител Fab-фрагменты в отличие от поливалентных лектинов моновалентны и поэтому более перспективны для изучения поверхности клетки, так как не вызывают вторичных процессов (одновременного связывания с различными участками мембраны или агглютинации клеток).

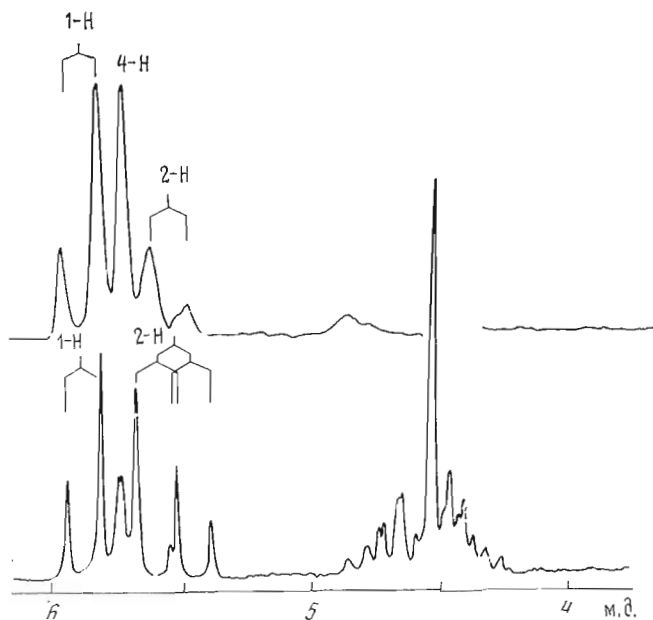
Для получения нетоксического иммуногена с заданной специфичностью мы осуществили синтез биологического повторяющегося звена О-антигенного полисахарида *Salmonella newington* (серологические факторы 3,15) [10], в виде β -(*n*-аминофенил)триозида (IV), причем схема его получения предусматривала включение агликона уже на первых стадиях синтеза.

Ранее [11], в синтезе глюкозного аналога (IV) для создания рамнозил-(1 \rightarrow 3)-галактозной связи, мы использовали гликозилирование производного галактозы (I) с двумя свободными гидроксильными группами при C₍₃₎ и C₍₄₎ *. Гликозилирование в этом случае протекало нерегиоспецифично и приводило к изомерным триозидам с (1 \rightarrow 3)- и (1 \rightarrow 4)-рамнозилгалактозными связями. Для того чтобы сделать гликозидный синтез целенаправленным, мы превратили 2,6-ди-О-ацетат (I) в 2,4,6-три-О-ацетат (II) с единственной свободной гидроксильной группой при C₍₃₎, используя свойство ортоэфирной группировки, сочлененной с пиранозным циклом, раскрываться в условиях гидролиза с образованием вицинальной системы, содержащей аксиальную сложноэфирную и экваториальную гидроксильную группы [12, 13].

Нагревание ди-О-ацетата (I) с триэтилортоацетатом в присутствии каталитического количества *n*-толуолсульфокислоты привело к 3,4-О-этилортоацетату, который без выделения гидролизовали 80% уксусной кислотой, в результате чего аксиальная ОН-группа при C₍₁₎ оказалась защищенной ацетильной группой. С выходом 65% был выделен кристаллический 2,4,6-три-О-ацетил-*n*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (II), положение ацетильных групп в котором следовало из данных спектра ПМР, снятого в (CD₃)₂SO (рисунок). В спектре производного (II) сигналы метиновых протонов пиранозного цикла и метиленовых протонов при C₍₆₎ распались на две группы. Сигналы четырех протонов образовали сложную картину в области 4,20—4,75 м. д. В области слабого поля (5,30 — 5,90 м. д.), где должны располагаться сигналы аномерного протона и метиновых протонов при C-атомах, несущих ацетоксильные группы, выявились сигналы трех протонов в виде дублета (1H, 5,86 м. д.) с *J* 8 Гц и квартета (1H, 5,45 м. д.) с диаксиальными константами *J* 8 и 9,5 Гц, частично наложившегося на квартет (1H, 5,62 м. д.) с *J* 1 и 3,5 Гц. Применение двойного резонанса с подавлением частот группы сигналов в районе 4,20—4,75 м. д. привело к следующим изменениям в области 5,30—5,90 м. д.: сохранился дублет при 5,86 м. д., квартет при 5,45 м. д. превратился в дублет с *J* 8 Гц, а второй квартет выродился в синглет. Следовательно, дублет (5,86 м. д.) соответствовал аномерному протону 1-H, квартет (5,45 м. д.) — 2-H и квартет (5,62 м. д.) — 4-H. Сигнал 3-H попал в область 4,20—4,75 м. д.; следовательно, ОН-группа при C₍₃₎ была неацетилирована-

* Ди-О-ацетат (I) получен исходя из *n*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид по схеме, включающей временную защиту ОН-групп при C₍₃₎ и C₍₄₎ с помощью ацетона, последующее ацетилирование и дезацетонирование [11].





Фрагмент спектра ПМР 2,4,6-три-О-ацетил-*n*-нитрофенил- β -*D*-галактопиранозида, снятого в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ при 60 МГц

ной. Полученные нами спектральные данные в общих чертах согласовывались с данными, приведенными для раствора аналогично замещенного галактозида в хлороформе [12]; прямое сравнение спектров ПМР было невозможно в силу очень низкой растворимости соединения (II) в хлороформе.

Три-О-ацетат (II) гликозилировали в условиях Гельфериха перацетилбиозилбромидом, полученным из 1,2,3-три-О-ацетил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -*D*-маннопиранозил)- α -*L*-рамнопиранозы [13]. Из реакционной смеси хроматографией на силикагеле был выделен кристаллический нонацетат β -(*n*-нитрофенил)триозида (III) с выходом 55%, структуру которого подтверждает спектр ПМР, содержащий сигналы ароматических протонов *n*-нитрофенильной группы, а также сигналы ацетоксильных и *C*-метильных групп в соотношении 9 : 1.

При дезацетилировании нонацетата (III) по Земплеру был выделен кристаллический *n*-нитрофенилтриозид (IIIa), УФ-спектр которого с максимумом при 300 нм характерен для *n*-нитрофенилгликозидов [14]. Структуру соединения (IIIa) подтверждают следующие данные. При его гидролизе идентифицировали с помощью углеводного анализатора рамнозу, маннозу и галактозу в соотношении 1 : 1 : 0,8. Во избежание возможных осложнений, связанных с наличием *n*-нитрофенильной группировки, исчерпывающему метилированию подвергали триозид (IVa), полученный из ацетата (III), содержащий ацетамидогруппу. При анализе продуктов гидролиза метилированного триозида в виде ацетатов частично метилированных полиолов методом хромато-масс-спектрометрии и сравнением с заведомыми образцами методом ГЖХ были идентифицированы 1,4,5-три-О-ацетил-2,3-ди-О-метилрамнит, 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилманнит и 1,3,5-три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метилдульдцит, что доказывает наличие (1 \rightarrow 3)-связи между остатками рамнозы и галактозы. α -Конфигурацию рамнозидной связи в триозиде (IIIa) подтверждает расчет величин молекулярного оптического вращения по правилу Клайна (табл. 1).

Восстановлением над катализатором Адамса (PtO_2) *n*-нитрофенилтриозид (IIIa) превратили в *n*-аминофенилтриозид (IV). Полноту восстанов-

Сравнение экспериментальных и вычисленных величин молекулярного вращения

Соединение	$[M]_D$, град
Метил- β -D-маннопиранозид + метил- α -L-рамнопиранозид + <i>n</i> -нитро- Фенил- β -D-галактопиранозид	-426
Метил- β -D-маннопиранозид + метил- β -L-рамнопиранозид + <i>n</i> -нитро- Фенил- β -D-галактопиранозид	-145
Триозид (IIIa)	-500

ления контролировали УФ-спектроскопией по сдвигу максимума поглощения в спектре в более коротковолновую область (238 нм) [16].

Полученный таким образом триозид (IV), имеющий структуру биологического повторяющегося звена специфического полисахарида *Salmonella newington*, был превращен в иммуноген путем связывания с растительным белком эдестином. По данным работы [4], эдестин (M 310 000), выделяемый из семян конопли, является иммунологически более эффективным носителем для углеводных гаптенных групп в сравнении с сывороточными альбуминами. Связывание *n*-аминофенилтриозида (IV) с эдестином было осуществлено методом азосочетания по общей методике [17], причем азосочетание проводили при $pH > 11$, что связано с особенностями перевода эдестина в растворимое состояние. Полученный продукт связывания (триозид-фенилазо-эдестин (V)), содержащий около 4% углеводов, сохраняет высокий молекулярный вес исходного белка. Это подтверждают данные диск-электрофореза: исходный эдестин обнаруживается в полиакриламидном геле в виде трех полос, а углевод-белковый продукт связывания дает одну полосу с подвижностью наиболее интенсивной полосы эдестина.

Связыванию с эдестином был подвергнут также синтезированный нами ранее [10] аналог триозида (IV), в котором маннозный остаток замещен на глюкозный. В результате азосочетания был получен искусственный антиген (VI), содержащий около 4,5% углеводов и представляющий собой глюкозный аналог антигена (V).

В осуществленном ранее Вестфалем с сотр. [13] синтезе искусственного антигена был использован тетрасахарид D -Glc- $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ - D -Gal- $(\beta 1 \rightarrow 6)$ - D -Man- $(\beta 1 \rightarrow 4)$ - L -Rha, полученный при частичном кислотном гидролизе специфического полисахарида *S. illinois* (серологические факторы 3, 15, 34; серологическая группа E_3) и представляющий собой химическое повторяющееся звено этого полисахарида. В этом случае связыванию с белком предшествовала модификация восстанавливающего конца тетрасахарида, что привело к почти полному исчезновению факторов 3 и 15 за счет разрушения и пространственного экранирования соответствующих структурных элементов гаптена. Полученный таким образом искусственный антиген содержал преимущественно детерминанты O-фактора 3 $\frac{1}{4}$ и при иммунизации кроликов стимулировал образование антител к этому серологическому фактору.

Результаты серологических испытаний полученного нами искусственного антигена (V) приводятся ниже. Антиген (V), содержащий в качестве гаптенных групп биологическое повторяющееся звено, которое входит в состав антигенных полисахаридов бактерий, относящихся к серологическим группам $E_1 - E_4$ (серологический фактор 3) рода *Salmonellae*, был испытан в реакции торможения пассивной гемагглютинации с целью оценки его агглютининсвязывающей активности. Тест-система состояла из высокоиммунных антисывороток (3,10) и (3,19) и эритроцитов, sensibilizированных липополисахаридом (ЛПС) *S. anatum* (3, 10). В качестве контроля были использованы гомологичный ЛПС *S. anatum* (3,10) и ге-

Таблица 2

Серологическая активность антигенов

Препараты	Минимальная нейтрализующая доза (в мкг) при использовании 1 гемагглютинирующей единицы адсорбированной сыворотки	
	(3,19)	(3,10)
Искусственный антиген (V)	0,0036	0,04
Искусственный антиген (VI)	0,4	3,5
ЛПС <i>S. anatum</i>	0,003	0,006
ЛПС <i>S. typhimurium</i>	> 100	> 100

Таблица 3

Результаты титрования антител в антисыворотках иммунизированных кроликов

Антиген	Номер кролика	Титры антител в реакции пассивной гемагглютинации		
		до иммунизации	после 2-й иммунизации	после 3-й иммунизации
(V)	1	<1:10	1:640	1:5120
	2	<1:10	1:1280	1:10240
(VI)	1	<1:10	1:640	1:1280
	2	<1:10	1:80	1:1280

терологичный ЛПС *S. typhimurium* (1, 4, 5, 12). Параллельно проводилось испытание искусственного антигена (VI). Из приведенных в табл. 2 данных следует, что антиген (V) по агглютининсвязывающей активности близок к антигенному ЛПС *S. anatum* в системе с антисывороткой (3, 19). В случае антисыворотки (3, 10) антиген (V) менее активен, что объясняется взаимодействием фактора 10 ЛПС *S. anatum* на эритроцитах с антителами к этому О-фактору в антисыворотке. Следует также отметить, что антиген (VI), в котором маннозный остаток замещен на глюкозный, также ингибировал реакцию торможения пассивной гемагглютинации, но был на 2 порядка менее активен с антисывороткой (3, 10) и на 3 порядка — с антисывороткой (3, 10), что несомненно связано с изменением структуры гаптенной цепи антигена. Строгая специфичность использованных иммунных систем следовала из отсутствия ингибирующей активности у ЛПС *S. typhimurium* при дозе 100 мкг.

Для оценки иммуногенных свойств искусственных антигенов (V) и (VI) последние были исследованы в опытах по иммунизации, результаты которых приведены в табл. 3.

Из полученных данных видно, что до иммунизации в сыворотке отсутствовали антитела к фактору 3, тогда как двукратное введение как искусственного антигена (V), так и его аналога (VI) вызвало появление антител к фактору 3. При этом в антисыворотке кроликов, иммунизированных антигеном (VI), титры антител в общем были менее высокими, хотя в случае одного животного, которому вводился этот препарат, были выявлены антитела в довольно высоком титре. После третьей инъекции обоих антигенов произошло дальнейшее увеличение титра антител к фактору 3 в антисыворотках всех кроликов, однако в случае животных, иммунизированных искусственным антигеном (V), уровень антител был примерно в 4 раза большим.

Высокие титры антител в сыворотке кроликов, иммунизированных полученными препаратами, показывают, что искусственные антигены, представляющие высокомолекулярный белок-носитель, ковалентно связанный с синтетическими олигосахаридами сложной структуры, являются хорошими иммуногенами. Это открывает перспективу приготовления принципиально новых вакцин против ряда инфекций и получения чистых антисывороток.

В заключение следует добавить, что для изучения биосинтеза бактериальных полисахаридов необходимы соответствующие трансферазы и полимеразы достаточной степени чистоты. Наиболее эффективным способом выделения необходимых ферментов из препарата клеточных мембран и их очистки является аффинная хроматография на биоспецифических сорбентах. Этот же принцип позволяет выделять фракции антител с узкой специфичностью. С целью создания такого потенциального иммуноадсорбента мы осуществили иммобилизацию триозида (IV) на сефарозе 4В, активированной бромцианом. Модификацию сефарозы *n*-аминофенилтриозидом (IV) и определение степени ковалентного связывания лигандов с сорбентом проводили по примененным нами ранее методикам [11]. По данным анализа, полученный сорбент содержит 8 мкмоль лигандов на 1 мл геля.

Экспериментальная часть

В работе использовали эдестин (Олайнский завод химреактивов) и сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция); триэтилортоацетат получали по методике [18], а BrCN — по методике [19]. ТСХ выполняли на пластинках с незакрепленным слоем силикагеля Л 5/40 ммк, содержащего 13% гипса (ЧССР), в следующих системах растворителей: хлороформ — метанол, 97 : 3 (А), хлороформ — ацетон, 75 : 25 (Б) и 85 : 15 (В); для обнаружения веществ пластинки опрыскивали 25% H_2SO_4 и нагревали. Препаративное хроматографическое выделение осуществляли на силикагеле Л 100/160 ммк (ЧССР). ВХ выполняли нисходящим методом на бумаге Filtrak FN 11 (ГДР) в системе бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3. Спектры ПМР снимали на приборе Varian DA-60-4L относительно ТМС, УФ-спектры получали с помощью саморегистрирующего спектрометра Spcord UV-VIS (ГДР). Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Varian MAT-111 с использованием колонки из нержавеющей стали ($150 \times 0,4$ см) с 3% SE-30 на варапорте-30 (100—120 меш) при 170° и скорости газа-носителя гелия 15 мл/мин. ГЖХ выполняли на приборе Pye Unicam-104, модель 64, с пламенно-ионизационным детектором с использованием колонки из нержавеющей стали ($150 \times 0,4$ см), заполненной 3% SE-30 на диатомите CQ (100—120 меш), при 180° (колонка А) и стеклянной колонки ($90 \times 0,4$ см), заполненной 3% ECNSS-M на газхроме Q (100—120 меш), при 165° (колонка Б) и скорости газа-носителя азота 45 мл/мин. Углеводный анализ проводили на анализаторе фирмы Technicon (США) с использованием колонки ($25 \times 0,6$ см), заполненной анионообменной смолой DA \times 4 (Durrum, США), в 0,5 М боратном буфере с рН 9 при 55° и скорости элюции 60 мл/ч. Диск-электрофорез осуществляли в 5% полиакриламидном геле с трис-глицериновым буфером (рН 8,3) в присутствии 0,2% додецилсульфата натрия и 0,5% β -меркаптоэтанола [20]. Удельные вращения определяли на поляриметре Perkin—Elmer, модель 141, температуры плавления — на микроблоке Кофлера.

Иммунологические и серологические методы. Иммуные антисыворотки (3, 10) и (3, 19). С целью приготовления антисывороток кроликов иммунизировали 6-кратно с интервалами в 5—7 сут формализированными и трижды отмытыми физиологическим раствором вакцинами из *S. anatum* (факторы 3, 10) и *S. senftenberg* (факторы 1, 3, 19): первые 2 инъекции подкожно по 1 млрд. микробных клеток, последующие — внутривенно по 2 млрд. клеток. Через 3 недели после окончания цикла иммунизации кро-

ликам вновь вводили внутривенно по 2 млрд. микробных клеток для получения бустер-эффекта и через неделю обескровливали, получали сыворотку отдельно от каждого кролика, прогревали ее 30 мин при 56° и проверяли в реакциях гемагглютинации и преципитации. Таким способом были получены высокоактивные сыворотки (3, 10) и (1, 3, 19). Антисыворотку (3, 19) получили в результате абсорбции иммунной сыворотки (1, 3, 19) бактериальными клетками *S. typhimurium* (факторы 1, 4, 5, 12) и *S. typhi* 0901 (факторы 9, 12). Абсорбцию проводили следующим образом: цельную иммунную сыворотку приливали к осадку формализированных и отмытых бактерий из расчета примерно 500 мг влажных клеток на 1 мл, суспензию встряхивали и помещали на сутки в холодильник при 4°, центрифугировали и использовали супернатант после проверки его в реакции агглютинации и преципитации.

Реакция торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА). С целью оценки агглютининсвязывающей способности полученных препаратов искусственных антигенов они были испытаны в РТПГА, проводимой в микроварианте [21]. Иммунная система состояла из высокоактивных сывороток (3, 10) или (3, 19) и формализированных эритроцитов барана, покрытых ЛПС *S. anatum*. В качестве контроля ингибиторов РТПГА использовали гомологичный ЛПС *S. anatum*, а строгая специфичность использованных иммунных систем в РТПГА была доказана отсутствием ингибирующего действия гетерологичного ЛПС из *S. typhimurium*, добавленного в концентрации 100 мкг.

Иммунизация искусственными антигенами. Полученными искусственными антигенами были проиммунизированы 4 кролика (по 2 на каждый препарат) по следующей схеме: первая инъекция подкожно по 250 мкг препарата в 1 мл, содержащего также полный адъювант Фрейнда; вторая — внутривенно через 23 сут — по 250 мкг препарата в 0,5 мл физиологического раствора (без адъюванта); третья — внутривенно через 2 недели после второй — такими же дозами препарата без адъюванта. Кровь была взята до иммунизации, через 2 недели после второй инъекции и через 7 сут после третьей инъекции. Полученные образцы сывороток были протитрованы в реакции пассивной гемагглютинации с использованием эритроцитов барана, покрытых ЛПС *S. anatum*.

*2,4,6-Три-О-ацетил-*n*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (II).* Раствор 1,9 г 2,6-ди-О-ацетил-*n*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (I) [11] в 10 мл нитрометана, свежеперегнанного над гидридом кальция, кипятили 20 ч с 8 мл триэтилортоацетата в присутствии 2—5 мг *n*-толуолсульфокислоты; продукт реакции имел R_f 0,57 (A). К охлажденной смеси добавляли 1 мл триэтиламина, выливали в смесь льда и воды и экстрагировали дихлорметаном (3×60 мл), объединенный экстракт сушили $MgSO_4$ и упаривали. Полученный красноватый сироп растворяли в 25 мл 80% CH_3COOH и выдерживали 35 мин при 20°, затем смесь упаривали с толуолом и бензолом. Остаток, состоящий в основном из соединения (II) с R_f 0,33 (B), хроматографировали на колонке с 250 г силикагеля, вымывая градиентом метанола в хлороформе (O → 3,5%), выделяли 1,3 г вещества (II), выход 65%, т. пл. 193—194° (абс. спирт — петр. эфир), $[\alpha]_D^{21} -16^\circ$ (с 1, ацетон). Спектр ПМР (в $(CD_3)_2SO$), δ , м. д.: 2,38; 2,40 и 2,47 (3с, 9H, 3 CH_3COO), 4,20—4,75 (мультиплет неразрешенных сигналов 3-H, 5-H, 6-H и 6'-H, 4H), 5,45 (к, $J_{2,1}$ 8 Гц и $J_{2,3}$ 9,5 Гц, 1H, 2-H), 5,62 (к, J 1 Гц и J 3,5 Гц, 1H, 4-H; частично накладывается на сигнал 2-H), 5,86 (д, $J_{1,2}$ 8 Гц, 1H, 1-H), 7,54 и 8,60 (2 д, J 9 Гц, 2 × 2H, $NO_2C_6H_4O$). Найдено, %: С 50,56; Н 4,91; N 3,26. $C_{18}H_{21}NO_{11}$. Вычислено, %: С 50,58; Н 4,95; N 3,28.

*2,4,6-Три-О-ацетил-3-О-[4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-маннопиранозил)-2,3-ди-О-ацетил-α-L-рамнопиранозил]-*n*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (III).* Раствор 310 мг (0,5 ммоль) 1,2,3-три-О-ацетил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозы [13] в

50 мл абс. хлороформа при 0° обрабатывали 32% раствором HBr в лед. CH₃COOH (9 мл), через 2,5 ч смесь быстро промывали водой (25 мл, 0°), насыщенным раствором NaHCO₃ (2 × 25 мл, 0°), еще раз холодной водой (25 мл), сушили MgSO₄ и упаривали, остаток, содержащий преимущественно биозилбромид с R_f 0,65 (B), высушивали в вакууме над KOH и без дополнительной очистки использовали для гликозилирования.

215 мг (0,5 ммоль) триацетата (II) гликозилировали вышеописанным гликозилбромидом в 4 мл абс. ацетонитрила в присутствии 126 мг (0,5 ммоль) Hg(CN)₂. Через 4 ч реакционную смесь упаривали, остаток экстрагировали хлороформом, экстракт промывали 1 н. KI, содержащим немного NaHCO₃, водой, сушили MgSO₄ и упаривали. Из остатка, содержащего наряду с небольшим количеством исходного ацетата (II) с R_f 0,15 продукт реакции с R_f 0,37 (B), хроматографией на колонке со 100 г силикагеля в градиенте смеси хлороформ — ацетон (0 → 7,5% ацетона) выделяли 280 мг поацетата (III), кристаллизующегося при добавлении спирта, выход 56,5%, т. пл. 268—270° (MeOH — ацетон), $[\alpha]_D^{22} -34^\circ$ (с 1,5; CCl₄). Спектр ПМР (в (CD₃)₂SO), δ , м. д.: 1,38 (д, $J_{5,6}$ 5 Гц, 3H, C-CH₃ рамнозы), 2,15—2,32 (27 П, 9 CH₃COO), 7,39 и 8,45 (2 д, J 9 Гц, 2 × 2H, NO₂C₆H₄O). Найдено, %: C 51,10; H 5,38; N 1,40. C₄₂H₅₃O₂₆N. Вычислено, %: C 51,06; H 5,41; N 1,42.

3-О-[4-О-(β-D-маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозил]-п-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (IIIa). 30 мг поацетата (III) омыляли 3,3% раствором MeONa в 12 мл смеси абс. CHCl₃ и абс. MeOH 1 : 1 (20°, 12 ч), полученный после нейтрализации K₂CO₃ (H⁺) и упаривания остаток кристаллизировали из метанола, выделяли 17 мг соединения (IIIa), однородного по данным хроматографии на бумаге, R_{Gal} 1,6, т. пл. 218—220° (после двух перекристаллизаций из метанола), $[\alpha]_D^{21} -82^\circ$ (с 0,44; водн. MeOH). Найдено, %: C 47,26; H 5,79; N 2,27. C₂₄H₃₅O₁₇N. Вычислено %: C 47,29; H 5,78; N 2,30.

При гидролизе соединения (IIIa) (0,3 н. HCl, 100°, 12 ч) получили смесь рамнозы, маннозы и галактозы в соотношении 1 : 1 : 0,8 (данные анализа на углеводном анализаторе). Эфирный экстракт гидролизата имеет УФ-спектр с максимумом при 310 нм, характерный для п-нитрофенола.

5 мг поацетата (III) последовательно восстанавливали над PtO₂ в смеси CHCl₃ и этилацетата, N-ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине с получением ацетата (IVa), дезацетилировали по Земплеру и метилировали по Хакомори. При анализе гидролизата продукта метилирования методом хромато-масс-спектрометрии ацетатом частично метилированных полиолов [21] и сравнением методом ГЖХ с известными образцами идентифицировали 1,4,5-три-О-ацетил-2,3-ди-О-метилрамнит, 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилманнит и 1,3,5-три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метилдульцит.

3-О-[4-О-(β-D-маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозил]-п-аминофенил-β-D-галактопиранозид (IV). К раствору 14 мг триозида (IIIa) в смеси 1 мл воды и 3 мл метанола при перемешивании добавляли 10 мг PtO₂, приготовленной по Адамсу, и гидрировали 2 ч при атмосферном давлении, катализатор отделяли фильтрованием через слой фильтрцеля, фильтрат упаривали и растворяли в небольшом количестве метанола, при охлаждении из раствора осаждалось 11 мг мелкокристаллического осадка (IV), т. пл. 165—172° (с разложением), $[\alpha]_D^{20} -57^\circ$ (с 1, вода), вещество однородно по данным хроматографии на бумаге, R_{Gal} 0,67. УФ-спектр (раствор в метаноле): первая полоса поглощения с λ_{max} 238 нм и малоинтенсивная вторая полоса с λ_{max} 298 нм.

Диазотирование β-(п-аминофенил)-триозида (IV) и связывание с эдстином. 11 мг триозида (IV) растворяли в 2,5 мл воды, добавляли 1,5 мл 0,1 М HCl и диазотировали при 0—2°, добавляя по каплям раствор 3 мг NaNO₂ в 1 мл воды, смесь перемешивали 30 мин при 0° и затем медленно

добавляли к охлажденному раствору 20 мг эдестина в 3,5 мл 0,1 н. NaOH. Для завершения азосочетания смесь перемешивали еще 3—4 ч при 0—5°. Полученный светло-коричневый раствор с pH 11,8 диализовали 10 раз против 0,1 М NaOH-глицинового буфера с pH 10,5, используя для каждого диализа 1 л буферного раствора. Внутренний диализат (6 мл, pH 10,5), представляющий собой раствор искусственного антигена (V), хранили при 4°, в качестве консерванта к раствору добавляли 1 мг мертиолатата. Содержание белка в растворе олигозид-фенилазо-эдестина (V) определяли по методу Жоури [22], а количество гаптенных углеводных групп рассчитывали по данным анализа продукта связывания на рамнозу по методу Дише [23] с использованием калибровочного графика, построенного для смеси рамнозы, маннозы и галактозы в том же весовом соотношении, что и в триозиде (IV). Из результатов обоих анализов следует, что в полученном после диализа растворе находится 13,5 мг продукта связывания, содержащего около 4% углеводов. Факт ковалентного связывания триозидом (IV) с эдестином подтверждается исследованием продукта (V) методом диск-электрофореза: исходный эдестин обнаруживается в виде трех полос близкой подвижности, а углевод-белковый продукт связывания дает одну полосу с подвижностью наиболее интенсивной полосы эдестина, окрашивающуюся на белок с кумасси бриллиантовым синим и на углеводы — с HIO_4 — фуксинсернистой кислотой.

*Иммобилизация β -(*p*-аминофенил)-триозида (IV) на сефарозе.* Активацию сефарозы 4В бромцианом проводили как описано ранее [11]. Сразу после активации к 1,5 мл BrCN-сефарозы добавляли 87 мг (~150 мкмоль) триозида (IV) в 1 мл бикарбонатного буфера с pH 9,7 и встряхивали 24 ч при 4—5°. После этого гель переносили на фильтр и промывали 20 мл дистиллированной воды, затем количественно переносили в центрифужную пробирку и перемешивали с 1 мл 0,25 М этаноламина (20°, 2,5 ч). Гель переносили на фильтр и промывали 20 мл 0,1 М CH_3COONa и 20 мл 0,5 М NaCl в 0,1 М NaHCO_3 .

Для определения степени иммобилизации лигандов на сефарозе проводили предварительное отщепление лигандов в щелочных условиях инкубированием аликвоты геля с равным объемом 2 н. NaOH (37°, 10 ч, периодическое перемешивание). Гель отфильтровывали и промывали водой, объединенный фильтрат нейтрализовали 1 н. HCl и уааривали, остаток гидролизовали 0,3 н. HCl (100°, 12 ч). Из результатов анализа гидролизата на содержание рамнозы по Дише [23] следует, что степень ковалентного связывания лигандов составляет 8 мкмоль триозида (IV) на 1 мл модифицированной сефарозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Николаев А. В., Байрамова Н. Э., Шашков А. С. (1979) Биоорг. химия, 5, 64—75.
2. Galanos C., Lüderitz O., Himmelspach K. (1969) Eur. J. Biochem., 8, 332—336.
3. Lönngren J., Goldstein I. J., Niederhuber J. E. (1976) Arch. Biochem. and Biophys., 175, 661—669.
4. Kleinhammer G., Himmelspach K., Westphal O. (1973) Eur. J. Immunol., 3, 834—838.
5. Schwartz B. A., Gray G. R. (1977) Arch. Biochem. and Biophys., 181, 542—549.
6. Kamicker B. J., Schwartz B. A., Olson R. M., Drinkwitz D. C., Gray G. R. (1977) Arch. Biochem. and Biophys., 183, 393—398.
7. McBroom C. R., Samanen C. H., Goldstein I. J. (1973) Methods in Enzymology (Ginsburg V., ed.), vol. 28, p. 212.
8. Kieda C. M. T., Delmotte F. M., Monsigny M. L. P. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 168—172.
9. Bloch R., Maccacchini M. L., Jumblatt J., Buttrick P., Burger M. M. (1977) Eur. J. Biochem., 80, 261—266.
10. Hellerqvist C. G., Lindberg B., Lönngren J., Lindberg A. A. (1971) Acta chem. scand., 25, 939—944.
11. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я. (1977) Биоорг. химия, 3, 752—758.

12. King J. F., Allbutt A. D. (1970) *Can. J. Chem.*, **48**, 1754—1769.
13. Lemieux R. U., Driguez H. (1975) *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 4069—4075.
14. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Malysheva N. N., Chernyak A. Ya., Klimov E. M., Bayramova N. E., Torgov V. I. (1975) *Carbohydr. Res.*, **45**, 283—290; Behault G. M., Dutton G. S. (1974) *Carbohydr. Res.*, **37**, 309—319.
15. Jansen A. P., Wydeveld P. G. A. B. (1958) *Nature*, **182**, 525—526.
16. Dearden J. C., Forbes W. F. (1960) *Can. J. Chem.*, **38**, 896—910.
17. Westphal O., Feier H. (1956) *Chem. Ber.*, **89**, 582—588.
18. McElvain S. M., Nelson J. W. (1942) *J. Amer. Chem. Soc.*, **64**, 1825—1827.
19. Slotta K. H. (1934) *Ber.*, **67**, 1028—1030.
20. Webber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
21. Тендетник Ю. Я., Овчарова Н. М. (1978) *Ж. микробиол.*, № 4, 37—41.
22. Björndal H., Lindberg B., Svensson S. (1967) *Carbohydr. Res.*, **5**, 433—440.
23. Lowry O. H., Rosbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
24. Dische Z., Shettles L. B. (1948) *J. Biol. Chem.*, **175**, 595—603.

Поступила в редакцию
24.VII.1978

**SYNTHESIS OF ANTIGENIC BACTERIAL POLYSACCHARIDES AND THEIR
FRAGMENTS. 11. SYNTHESIS OF AN ARTIFICIAL ANTIGEN COMPRISING
BIOLOGICAL REPEATING UNIT OF THE POLYSACCHARIDE FROM
SALMONELLA NEWINGTON AS HAPTENIC GROUPS**

KOCHETKOV N. K., DMITRIEV B. A., CHERNYAK A. Ya.,
POKROVSKY V. I., TENDETNIK Yu. Ya.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; Central Research Institute of Epidemiology,
Health Ministry of the USSR, Moscow*

Synthetic trisaccharide β -D-Man-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal was coupled via its β -(*p*-aminophenyl)glycoside to edestin by the azo-method to give an artificial antigen possessing all structural elements of the biological repeating unit of the species-specific polysaccharide from *Salmonella newington*. Antisera obtained after immunization of rabbits with both this antigen and its analog having glucose as non-reducing terminal sugar contained specific antibodies against the O-factor 3. The immunoadsorbent for affinity chromatography was prepared by coupling the same biological repeating trisaccharide unit to cyanogen bromide activated Sepharose.