



УДК 547.466'56'54'96

## ПРИМЕНЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ 2-НИТРО-4-СУЛЬФОФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ КИСЛОТ ДЛЯ СИНТЕЗА ИХ КОНЪЮГАТОВ С БЕЛКАМИ

*Радавский Ю. Л., Могирева Л. А., Манько Н. И.*

*Киевский научно-исследовательский институт эпидемиологии, микробиологии, паразитологии и инфекционных болезней им. Л. В. Громышевского, МЗ УССР*

*Гершкович А. А.*

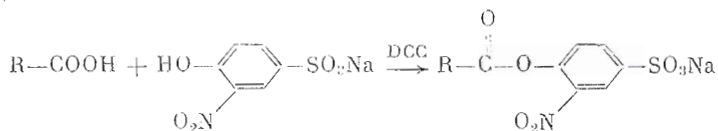
*Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев*

Получены 2-нитро-4-сульфофениловые эфиры N-динитрофенил-L-лейцина и адамантанкарбоновой кислоты. Активированные производные конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином в водно-щелочной среде. В зависимости от условий реакции к 1 моль белка присоединяется от 25 до 30 моль динитрофенил-L-лейцина. Конъюгаты, содержащие адамантан, анализировали в полиакриламидном геле.

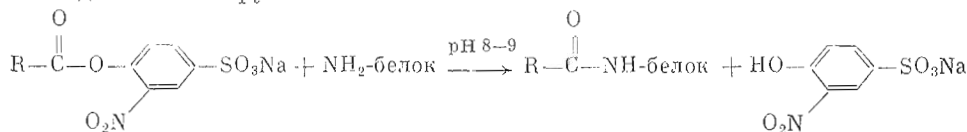
Для получения специфических антител на низкомолекулярные соединения (гаптены) последние ковалентно присоединяют к иммуногенным носителям — белкам или синтетическим полипептидам.

В настоящее время присоединение гаптенных, имеющих свободную карбоксильную группу, к белкам-носителям осуществляют главным образом с помощью водорастворимого карбодимида [1—3] или методом смешанных ангидридов [4—6]. Однако эти методы имеют ряд недостатков. Так, при использовании водорастворимого карбодимида трудно исключить возможность сшивки полипептидных цепей белка по амино- и карбоксильным группам; недостатком метода смешанных ангидридов является то, что последние нерастворимы в воде и конъюгацию с белком проводят в водно-органических смесях. Кроме того, смешанные ангидриды соединений, содержащих карбоксильную группу, неустойчивы и их приходится получать непосредственно перед применением.

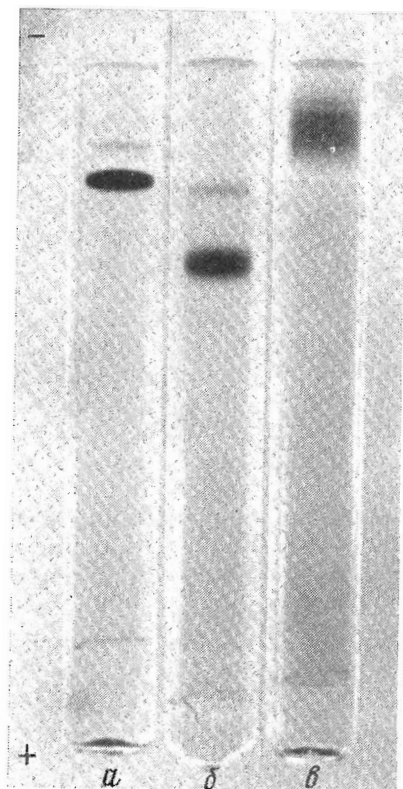
В данной работе была исследована возможность использования водорастворимых 2-нитро-4-сульфофениловых эфиров соединений, содержащих свободную карбоксильную группу, для получения их конъюгатов с белками и модификации белков по аминокетильным группам. Для получения конъюгатов был применен разработанный ранее метод, позволяющий синтезировать пептиды со свободной С-концевой карбоксильной группой в водной среде [7]. Преимуществом предлагаемого метода является хорошая растворимость активированных производных в воде, что упрощает проведение конъюгации или модификации. В отличие от смешанных ангидридов 2-нитро-4-сульфофениловые эфиры устойчивы и могут храниться длительное время. Активирование соединений, содержащих карбоксильную группу, идет по схеме



При взаимодействии с белком активированные производные ацилируют свободные аминогруппы:



Электрофорез в полнакриламидном геле (рН 7,2) БСА нативного (*a*), обработанного 2-нитро-4-сульфофениловым эфиром адамантанкарбоновой кислоты (*b*) и адамантанкарбоновой кислотой в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида (*в*)



В качестве гаптенов в наших исследованиях использовали N-динитрофенил-*L*-лейцин (Dnp-лейцин) и адамантанкарбоновую кислоту [8], в качестве носителя — бычий сывороточный альбумин (БСА).

После присоединения 2-нитро-4-сульфофенилового эфира Dnp-лейцина к БСА продукт пропускали через колонку с сефадексом G-25. В результате гель-фильтрации с внешним объемом выходил окрашенный продукт, что свидетельствовало о присоединении Dnp-лейцина к белку. Количество присоединившегося гаптена определяли по калибровочной кривой, построенной для разных концентраций Dnp-лейцина при длине волны 360 нм и по формуле, представленной в работе [9]. При проведении реакции в растворах, не содержащих 6 М мочевины, к 1 моль БСА ( $M$  68 000) присоединяется 25 моль Dnp-лейцина и при проведении реакции в присутствии 6 М мочевины — 30 моль.

Продукт, полученный после реакции 2-нитро-4-сульфофенилового эфира адамантанкарбоновой кислоты с БСА, обессоливали на колонке с сефадексом G-25. Определение эпитопной плотности конъюгатов, содержащих производные адамантана, спектрофотометрически не представляется возможным, так как адамантан не имеет характерных хромофоров. Для получения качественной характеристики модифицированного адамантанкарбоновой кислотой БСА конъюгаты анализировали электрофорезом в полнакриламидном геле при рН 7,2. Модифицированный БСА (рисунок, *b*) значительно быстрее двигался к аноду по сравнению с нативным (рисунок, *a*). Это указывало на то, что часть  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группы лигнина в молекуле БСА прореагировала с 2-нитро-4-сульфофениловым эфиром адамантанкарбоновой кислоты. При сравнении геля *b* и *v* (рисунок) видно также, что конъюгат, полученный через сульфобензольные эфиры, более однороден по сравнению с конъюгатом, полученным с помощью водорастворимого карбодимида. Последний движется диффузной полосой и обладает меньшей подвижностью при электрофорезе. Это, по-видимому, связано с большим молекулярным весом этих конъюгатов и большим содержанием в них положительных зарядов.

Таким образом, 2-нитро-4-сульфофениловые эфиры кислот могут быть рекомендованы для модификации белков по аминок группам и для получения конъюгатов соответствующих кислот с белками.

### Экспериментальная часть

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Silufol» (ЧССР) в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1).

**Синтез активированных гаптенгов.** К раствору ~2 ммоль Dnp-*L*-лейцина в диметилформамиде прибавляли 3 ммоль натриевой соли 2-нитро-4-сульфофенола и 3 ммоль *N,N'*-дидиклогексилкарбодимида отечественного производства. Реакционную смесь выдерживали 2 ч при 0° С и 12 ч при 20° С. Дидиклогексилмочевину удаляли фильтрованием с последующим промыванием диметилформамидом. Растворитель упаривали. К маслообразному остатку добавляли 4 мл метанола, продукт осаждали эфиром, через 12 ч (4° С) осадок отфильтровали, промыли несколькими порциями эфира и высушили. Выход продукта 84%.  $R_f$  — 0,48.

Аналогично из 2 ммоль адамантанкарбоновой кислоты с выходом 80% получили ее 2 нитро-4-сульфофениловый эфир.  $R_f$  — 0,56.

**Получение конъюгатов.** К раствору 1 ммоль активированного эфира Dnp-лейцина (или адамантанкарбоновой кислоты) в 10 мл 0,1 н. карбонат-бикарбонатного буфера, pH 8,8, прибавляли 15 мл того же буфера, содержащего 500 мг (8 мкмоль) БСА (Reanal, Венгрия), и выдерживали 4 ч при 4° С, поддерживая значение pH 0,1 н. NaOH.

Реакцию с БСА эфира Dnp-лейцина проводили также в присутствии 6 М мочевины. Образовавшийся продукт подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 в водном растворе аммиака, pH 8,0. Фракцию, выходящую со свободным объемом, лиофилизovali.

К раствору 8 мкмоль БСА в 10 мл 0,15 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,0, добавляли 2 ммоль адамантакарбоновой кислоты и 3 ммоль 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (Serva, ФРГ) [10]. Смесь выдерживали при 20° С в течение 8 ч и пропускали через колонку с сефадексом G-25 в водном аммиаке (pH 8,0). Фракцию, выходящую со свободным объемом, лиофилизovali.

**Электрофорез в полиакриламидном геле** проводили по методу [11]. Применяли 10% акриламид (соотношение *N,N'*-метиленабисакриламид — акриламид 1:30). Электрофорез вели при напряжении 6 В/см, силе тока 6 мА/гель в течение 2,5 ч. Окрашивание и отмывку гелей проводили по прописи, представленной в работе [12].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Goodfriend T. L., Levine L., Fasman G. D. Science, 1964, v. 144, № 12, p. 1344—1346.
2. Jaton J.-C., Ungar-Waron H. Arch. Biochem. and Biophys., 1967, v. 122, № 10, p. 157—163.
3. Liu Chi-Tan, Adler F. I. J. Immunol., 1973, v. 114, № 2, p. 472—477.
4. Erlanger B. F., Borek F., Beiser S. M., Liberman S. J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 5, p. 1090—1094.
5. Worsaae H. Acta pathol. et microbiol. scand., Sec. C, 1978, v. 86C, № 4, p. 203—204.
6. Wainer B. H., Fitch F. W., Rothberg R. M., Fried J. Science, 1972, v. 176, № 4035, p. 1143—1145.
7. Гершкович А. А., Серебряный С. Б. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 8, с. 1125—1132.
8. Радаевский Ю. Л., Гершкович А. А., Могирева Л. А., Манько Н. И., Серебряный С. Б. Тез. V Всес. симпоз. по химии и физике белков и пептидов. Баку, 1980, с. 225.
9. Eisen H. N., Carsten M. E., Belman S. J. Immunol., 1954, v. 7, № 11, p. 296—308.
10. Riceberg L. J., Van-Vunakis E., Levine L. Anal. Biochem., 1974, v. 60, № 2, p. 551—559.
11. Davis B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, № 12, p. 404—427.
12. Swank R. T., Munkres K. D. Anal. Biochem., 1971, v. 39, № 2, p. 462—472.

Поступила в редакцию  
23.II.1982  
После доработки  
5.V.1982

USE OF WATER-SOLUBLE 2-NITRO-4-SULFOPHENYL ESTERS FOR  
SYNTHESIS OF ACID CONJUGATES WITH PROTEINS

RADAVSKY Yu. L., MOGIRYOVA L. A., MAN'KO N. I.,  
GERSHKOVICH A. A.

*L. V. Gromashevski Institute of Epidemiology, Microbiology, Parazitology  
and Infectious Diseases, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev;  
Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy  
of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

2-Nitro-4-sulfophenyl esters of N-dinitrophenyl-L-leucine and adamantane carboxylic acid were prepared. Active derivatives were conjugated with bovine serum albumine in aqueous alkaline medium. Depending on the reaction conditions, 25-30 molec of dinitrophenyl-L-leucine is attached to one mole of protein. Adamantane-containing conjugates were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis.