

РГБ ОД

На правах рукописи 25.574.003

Мирзорохимов Курбонали Каримович

**Синтез и биологические свойства
аминокислотных и пептидных производных
катехоламинов**

0.2.00.03 - органическая химия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Душанбе - 2000

Работа выполнена в Технологическом университете Таджикистана на кафедре «Инженерная химия», Таджикском государственном национальном университете на кафедре «Органическая химия» и Институте химии имени В.И. Никитина АН Республики Таджикистан в лаборатории «фармакология»

Научные руководители: кандидат химических наук, доцент. **Юсупов Т.Ю.**,
кандидат биологических наук, с.н.с. **Смотров С.П.**

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор **Халиков Ш.Х.**,
кандидат химических наук, с.н.с. **Касымова Г.Ф.**

Ведущая организация: **Таджикский Государственный
Педагогический Университет
им. К.Ш. Джураева**

Защита диссертации состоится «1» ноября 2000 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 013.02.01 в Институте химии им. В.И.Никитина АН Республики Таджикистан по адресу: 734063, Республика Таджикистан, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2
E-mail: kotibilm@akademy.tajik.net.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химии им. В. И. Никитина АН Республики Таджикистан
Автореферат разослан «30» сентября 2000 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук



Абулхаев В.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одной из задач современной органической химии, является разработка путей синтеза новых лекарственных препаратов. В последние десятилетия бурное развитие получила химия пептидов, что связано с широким спектром биологической активности, проявляемой соединениями пептидной природы, которые при введении в структуру лекарственных препаратов улучшают их фармакологические характеристики: растворимость в воде, пролонгированность действия.

В последние годы увеличивается количество исследований, посвященных использованию катехоламинов в качестве лекарственных препаратов. При низком содержании в организме катехоламинов используется предшественник этих моноаминов – 3,4-диоксифенилаланин, непосредственно участвующий в биосинтезе катехоламинов. Однако эти соединения часто не оказывают желаемого терапевтического эффекта. Поэтому поиск новых препаратов как усиливающих, так и снижающих фармакологический эффект катехоламинов, является актуальным. Одним из способов снижения концентрации в организме нежелательных биологически активных соединений является применение высокоспецифичных антител к этим соединениям. В связи с этим проблема поиска соединений, с помощью которых можно получать высокоспецифичные антитела к катехоламинам и методов их синтеза, является весьма актуальной.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является синтез аминокислотных и пептидных производных 3,4-диоксифенилаланина и норадреналина, получение конъюгатов их с белковыми носителями, изучение их антигенных и фармакологических свойств.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- разработать методики синтеза аминокислотных и пептидных производных катехоламинов;
- изучить физико-химические свойства соединений;
- синтезировать конъюгаты полученных производных с белковыми носителями;
- изучить антигенные и фармакологические свойства полученных соединений.

Научная новизна. Впервые получены пролиновые, фенилаланиновые, моно-, ди-, триглицидные и аланил-фенилаланиновые производные 3,4-диоксифенилаланина и норадреналина. Впервые синтезированы конъюгаты полученных производных катехоламинов с бычьим сывороточным альбумином и тиреоглобулином. Установлено, что наиболее удобным для получения конъюгатов аминокислотных и пептидных производных 3,4-диоксифенилаланина с белковыми носителями является использование в качестве сшивающего агента глутарового альдегида.

Выявлена зависимость между специфичностью антител и длиной глицинового мостика.

Практическая значимость. Предложен способ синтеза аминокислотных и пептидных производных 3,4-диоксифенилаланина и норадреналина, и способ получения белковых конъюгатов производных катехоламинов. Полученные конъюгаты могут быть использованы для получения высокоспецифичных антител к 3,4-диоксифенилаланину.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на республиканской конференции, посвященной 50-летию Таджикского государственного национального университета (Душанбе, 1998г.), конференции молодых ученых и специалистов Республики Таджикистан (Душанбе, 1985-1989г.), третьей региональной конференции по реактивам (Ташкент, 1990г.) и на конференции биохимического общества Республики Таджикистан (Душанбе, 1998г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 100 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, и списка литературы, включающего 132 источника.

Основное содержание работы

1. Синтез аминокислотных и пептидных производных катехоламинов.

В качестве N-защитной группы использована карбобензоксигруппа (Cbo), которую вводили с использованием карбобензоксихлорида по стандартной методике. Карбоксильные группы защищены сложноэфирной бензильной (- OBzl) группой, которую вводили с использованием хлористого тионила или солеобразованием с NaOH.

Карбобензоксиды и бензильную группу удаляли каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле.

Пептиды получены методами активированных (p-нитрофениловых) эфиров и смешанных ангидридов с использованием в качестве конденсирующего агента изобутилхлорформиата, (время активации карбоксильного компонента 2 мин., наращиванием пептидной цепи от N-конца к C-концу). Конденсацию

аминокислот и пептидов с 3,4-диоксифенилаланином и норадреналином осуществляли методом смешанных ангидридов в атмосфере азота. При получении производных норадреналина приборы затемнялись. Сохранность гидроксильных групп контролировалась спектрофотометрически. Для очистки свободных производных катехоламинов использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию.

2. Получение конъюгатов производных катехоламинов с белковыми носителями

В качестве белковых носителей использовали бычий сывороточный альбумин и тиреоглобулин. Конъюгаты получали по реакции Манниха, с использованием конденсирующего агента глутарового альдегида. Концентрацию белка в конъюгатах определяли по методу Лоури в модификации Хабера с использованием в качестве стандартов для построения калибровочных кривых исходные нативные белки.

Содержание катехоламинов оценивали фотометрическим по методу Доти.

3 Иммунологические исследования.

Исследования проводились на кроликах породы шиншилла массой 2,5-3кг обоих полов, содержащихся на стандартной лабораторной диете. В качестве антигена использовали смесь равных объемов раствора конъюгата (1мг/мл) и адьюванта Фрейнда. Первую инъекцию 0,1 мл смеси ПАФ осуществляли в подколенном лимфатическом узле. Через 3 недели вводили 0,5 мл этой эмульсии внутривенно во множество точек в область шеи и через 2 недели 1 мл внутримышечно в бедренную мышцу. Последующую инъекцию (1 мл смеси с неполным адьювантом Фрейнда) проводили через 2 недели также внутримышечно. Через 7 дней осуществляли пробный забор крови. По окончании основного цикла проводили курс поддерживающей иммунизации (0,5 мл смеси с НАФ внутривенно с месячным интервалом). Через 7 дней после каждого введения антигена, определяли титр специфических антител в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа.

Антитела выделяли с помощью аффинной хроматографии с использованием иммуносорбента на основе бромциансефарозы 4В. Перекрестную реактивность антител определяли радиометрическим методом.

Адреномиметическую активность исследовали на изолированной полоске селезенки кролика. Сокращение полосок селезенки регистрировали на кимографе.

4. Синтез производных 3,4-диоксифенилаланина

Роль катехоламинов в функционировании симпато-адреналиновой системы организма хорошо изучена. Внимание исследователей привлекают производные этих соединений, в частности, 3,4-диоксифенилаланин и норадреналин. Одним из способов повышения специфической активности катехоламинов является модификация их молекул путем присоединения к аминокислотам, пептидам и белкам. Подобные конъюгаты могут быть использованы не только как самостоятельные терапевтические препараты, но и для получения высокоспецифичных антител к катехоламинам, которые применяются для изучения метаболизма катехоламинов в организме и снижения их содержания при гиперкатехоланемии. Первым этапом проведения наших исследований в этом направлении является синтез аминокислотных и пептидных производных 3,4-диоксифенилаланина.

Для получения этих соединений первоначально необходимо синтезировать бензиловый эфир пара-толуолсульфонат-3,4-диоксифенилаланина, (DOPhA), который был получен методом азотропной перегонки в атмосфере инертного газа. Выход бензинового эфира 3,4- диоксифенилаланина составил 60%.

Для синтеза аминокислотных производных 3,4-диоксифенилаланина (DOPhA) использован метод смешанных ангидридов. Конденсацию проводили с использованием в качестве конденсирующего реагента изобутилхлорформиата. Оптимальное время активации карбоксильного компонента составляло 1-2 минуты при температуре -10 до - 15°C. Для связывания выделяющегося хлористого водорода и снятия п - толуолсульфо кислоты с аминогруппы бензинового эфира DOPhA использовали 2 эквивалента N-метилморфолина.

По этой методике синтезированы Cbo-Gly-DOPhA-OBzl, Cbo-Pro-DOPhA-OBzl и Cbo-Phe-DOPhA-OBzl. Для примера на рис.1 приведена схема синтеза H-Pro-DOPhA-OH. Выход Cbo-Gly-DOPhA-OBzl составил 68,3% Cbo-Pro-DOPhA-OBzl-70%, Cbo-Phe-DOPhA-OBzl-63%.

На следующем этапе работы было необходимо синтезировать пептидные производные 3,4 - диоксифенилаланина, которые получали методом активированных эфиров.

Этот метод был выбран в связи с тем, что синтез с помощью активированных эфиров стал одним из основных методов ступенчатого синтеза после введения п-нитрофениловых эфиров. Высокая эффективность этого метода была впервые продемонстрирована при синтезе окситоцина и 27-ми членного гормона - секретина свиньи.

Использование активированных эфиров при ступенчатом синтезе пептидов дает возможность применять минимальную защиту боковых групп. Кроме того, избыток активированного эфира и соль третичного основания могут

быть удалены с помощью растворителя, в котором основной продукт реакции не застворяется. Методом тонкослойной хроматографии можно наблюдать за ходом реакции, оценить количество образовавшегося пептида или освободившегося п-нитрофенола. Все эти преимущества обуславливают широкое применение ступенчатого синтеза пептидов с помощью метода активированных эфиров.

На первом этапе получен Cbo-Gly-ONp и Cbo-Ala-ONp по известной методике. Активированные эфиры обычно получают конденсацией защищенной кислоты с использованием дициклогексилкарбодиимида или методом смешанных ангидридов. Однако, в зависимости от выбора метода создания пептидной связи, эти методы используются в ограниченном виде. Мы выбрали метод смешанных ангидридов. Этот метод имеет некоторые преимущества по сравнению с карбодиимидным методом. При использовании карбодиимидного метода образуется промежуточное соединение дициклогексилмочевина, которую трудно отделить от активированного эфира. В методе смешанных ангидридов в качестве побочных продуктов образуются спирт, оксид углерода (IV) которые удаляются путем упаривания. В связи с этим при синтезе активированных эфиров аминокислот мы использовали метод смешанных ангидридов.

Для синтеза в растворе пептидов, содержащих в своем составе остатки более двух аминокислот (три-, тетрапептидов), возможно использование одного из трех путей синтеза: ступенчатого наращивания пептидной цепи, начиная с С-конца, ступенчатого наращивания пептидной цепи начиная с N-конца и блочной конденсации.

В нашем случае был использован метод ступенчатого наращивания пептидной цепи начиная с N-конца. Это связано с тем, что С-концевым остатком в данном случае является 3,4-диоксифенилаланин. Эта аминокислота в бензольном кольце содержит две гидроксильные группы, которые склонны к окислению. При ступенчатом наращивании с N-конца 3,4-диоксифенилаланин вступает в реакцию конденсации один раз, с С-концевым два раза. Следовательно, при использовании ступенчатого наращивания с N-конца потери конечного продукта от окисления 3,4-диоксифенилаланина при синтезе его дипептидных производных снижаются в два раза, по сравнению со ступенчатым наращиванием пептидной цепи С-конца. В связи с этим, мы остановились на использовании ступенчатого наращивания пептидной цепи, начиная с N-конца. Для примера синтез аминокислотных производных 3,4-диоксифенилаланина показан на схеме 1.

Защищенные дипептиды Cbo-Gly-Gly-OH и Cbo-Ala-Phe-OH были получены конденсацией Cbo-Gly-ONp и Cbo-Ala-ONp с альфа-СООН группами, которые были защищены глицином и фенилаланином путем солеобразования в присутствии одного эквивалента NaOH.

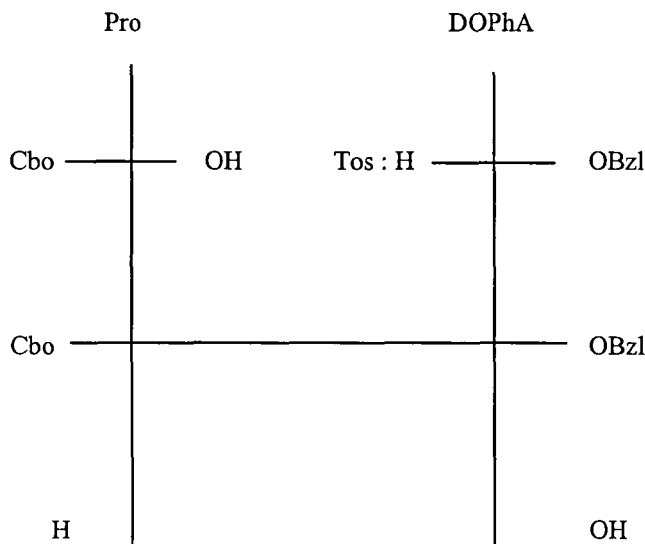


Схема 1. Синтез H-Pro-DOPhA-OH

Конденсация проведена в растворе диметилформаида. Выделившийся п-нитрофенол удаляли экстракцией эфиром из водного раствора реакционной смеси. Основной продукт был выделен экстракцией бутанолом из подкисленного водного раствора. Очистку основного продукта осуществляли путем перекристаллизации из эфира.

При синтезе трипептидных производных 3,4-диоксифенилаланина синтезирован Cbo-Gly-Gly-Gly-OH. Для этого из дипептида Cbo-Gly-Gly-OH каталитическим гидрированием удаляли карбобензоксигруппу, а затем полученный свободный дипептид конденсировали с п-нитрофениловым эфиром карбобензоксиглицина. Выход защищенного трипептида составил 71,2%. Конденсацию карбобензоксиглицина с 3,4-диоксифенилаланином осуществляли методом смешанных ангидридов с использованием в качестве конденсирующего реагента изобутилхлорформиата. (Схема. 1,2)

Выход продуктов на каждой стадии конденсации и физико-химические характеристики синтезированных защищенных пептидов приведены в табл. 1.

Для примера на схеме 2 приведен синтез H-Gly-Gly-Gly-DOPhA-OH

Деблокирование защищенных пептидов осуществляли каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле.

Очистку свободных пептидов осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

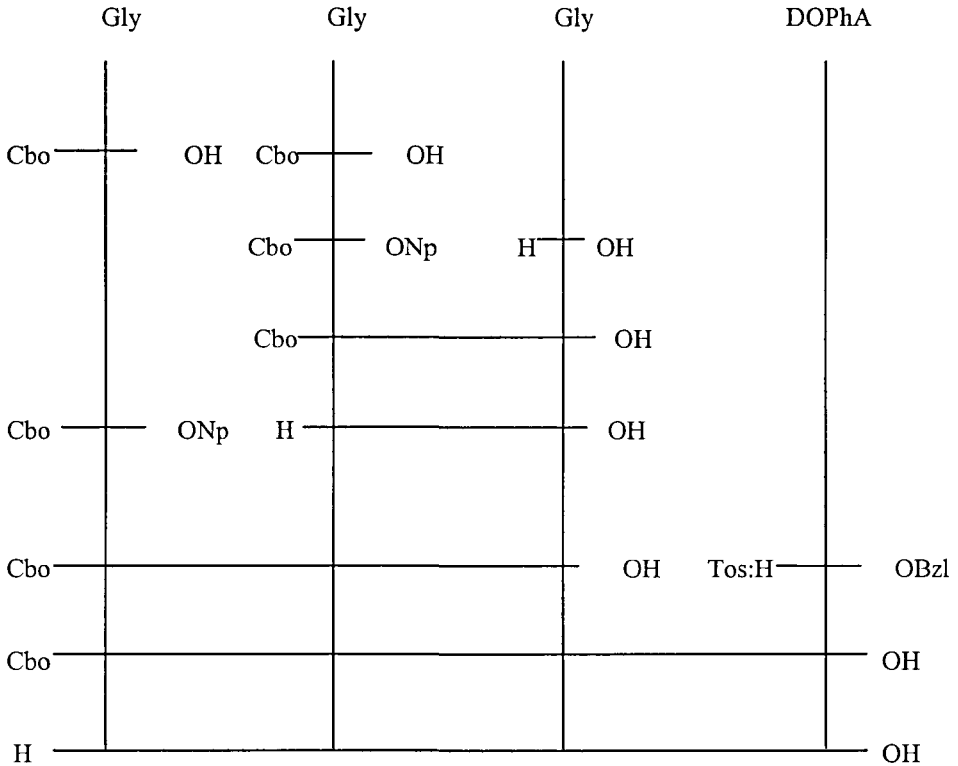


Схема 2. Синтез H-Gly-Gly-Gly-DOPhA-OH

Аминокислотный состав синтезированных пептидов был подтвержден данными аминокислотного и элементного анализов. Физико-химические характеристики свободных пептидов также приведены в таблице 1.

Таблица 1. Синтезированные соединения и их константы

№ п/п	Название соединения	Выход %	Т.пл	Rf				
				А	Б	В	Г	Д
1.	Cbo-Gly-Gly-OH	85,4	172-174			0,81	0,94	0,41
2.	Cbo-Ala-Phe-OH	78,5	118-122		0,78	0,67	0,80	0,95
3.	Cbo-Gly-Gly-Gly-OH	71,2	184-186		0,53	0,94	0,43	0,21
4.	Cbo-Gly-DOPhA-OBzl	68,3	Масло		0,79	0,66	0,73	
5.	Cbo-Phe-DOPhA-OBzl	63,5	Аморф	0,83	0,91	0,85		0,90
6.	Cbo-Pro-DOPhA-OBzl	70,2	Аморф		0,70	0,64	0,83	0,95
7.	Cbo-DOPhA-Gly-OBzl	58,7	Аморф		0,98	0,81	0,95	0,96
8.	Cbo-Gly-Gly-DOPhA-OBzl	76,1	Аморф		0,77	0,37	0,73	0,91
9.	Cbo-Gly-Gly-Gly-DOPhA-OBzl	75,4	Аморф	0,93	0,92		0,94	0,88
10.	Cbo-Ala-Phe-DOPhA-OBzl	73,3	Аморф			0,89	0,89	0,98
11.	H-Gly-DOPhA-OH	81,2	160-162	0,19	0,04	0,42		0,01
12.	H-Pro-DOPhA-OH	78,2	178-180	0,28	0,08	0,25		
13.	H-Phe-DOPhA-OH	83,8	150-152	0,45		0,00	0,00	0,08
14.	H-DOPhA-Gly-OH	68,9	196-198	0,35		0,00	0,00	0,03
15.	H-Gly-Gly-DOPhA-OH	74,5	178-180	0,19	0,03	0,35		0,03
16.	H-GlyGly-Gly-DOPhA-OH	88,8	188-190	0,29	0,02	0,16		0,08
17.	H-Ala-Phe-DOPhA-OH	72,6	140-142	0,50		0,00	0,00	0,05

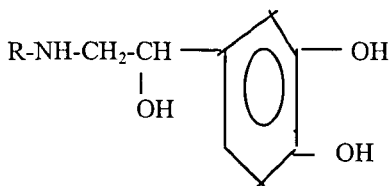
5. Синтез аминокислотных и пептидных производных норадреналина

Другим катехоламином, играющим большую роль в организме является норадреналин (1-(3,4-диоксифенил)-2-аминоэтанол). Его действие в организме в основном направлено на альфа-адренорецепторы и он является медиатором (передатчиком) нервного возбуждения в нервной симпатической системе.

Исходя, из этого определенный интерес представляет изучение реакции взаимодействия норадреналина с аминокислотами и пептидами.

Для получения производных норадреналина необходимо было синтезировать ряд исходных и промежуточных соединений: Cbo -Gly-OH, Cbo -Ala-OH, Cbo-D-Ala-OH, Cbo -Phe-OH, Cbo -Тур (Z)-OH, HCl:H-Тур-OBzl, Cbo -Gly-ONp, Cbo-D-Ala-ONp, Cbo-Ala-ONp, которые были получены методом активированных (п-нитрофениловых) эфиров и их выход составил соответственно 73,3, 68,0, 73,3%.

Затем аминокислоты и дипептиды были присоединены к молекуле норадреналина по аминогруппе, находящейся в боковой цепи. В результате были получены соединения общей формулы



где, R – остаток аминокислоты или пептида

Синтез осуществлен методом смешанных ангидридов с использованием в качестве конденсирующего реагента изобутилхлорформиата и в качестве основания – триэтиламина.

Следует отметить, что в связи с наличием в молекуле норадреналина двух фенольных гидроксильных групп, склонных к окислению, все синтезы проводили в атмосфере азота. Кроме того, при получении производных норадреналина приборы затемнялись.

Ход реакций конденсации и чистоту полученных соединений контролировали тонкослойной хроматографией и ИК – спекиральным анализом.

В ИК-спектрах полученных веществ обнаружены полосы поглощения групп, входящих в состав этих соединений.

Физико-химические характеристики полученных соединений также приведены в таблице 2.

Таблица 2: Выход и физико-химические характеристики синтезированных пептидов и производных норадrenalина

№ п/п	Соединение	Выход %	Т.пл °С	Хроматографическая подвижность, R			
				Б	В	Е	Ж
1.	Cbo-Ala-Phe-OH	73,3	73-74	0,58	—	0,77	0,71
2.	Cbo-Phe-Ala-OH	68,0	Масло	0,47	0,44	0,51	0,60
3.	Cbo-D-Ala-Phe-OH	73,3	73-74	0,58	—	0,71	0,47
4.	Cbo-Ala-Phe-ONp	75,5	Масло	0,91	—	0,87	0,92
5.	Cbo-Phe-Ala-ONp	82,6	Масло	0,87	—	0,33	0,93
6.	Cbo-Gly-Nor	78,4	Масло	0,60	—	0,52	—
7.	Cbo-D-Ala-Nor	86,0	Масло	0,51	—	0,46	0,62
0.	Cbo-Phe-Nor	64,2	Масло	06,4	—	0,62	0,73
9.	Cbo-Tyr-Nor	80,2	Масло	0,39	—	0,35	—
10.	Cbo-Phe-Nor	80,0	Масло	0,44	—	0,45	—
11.	Cbo-Tyr(z)-Nor	86,5	Масло	0,76	—	0,63	—
12.	Cbo-D-Ala-Phe-Nor	81,0	Масло	0,60	—	0,57	0,68
13.	Cbo-Ala-Phe-Nor	80,3	Масло	0,67	—	0,68	0,83

6. Получение конъюгатов производных 3,4-диоксифенилаланина с белковыми носителями

Получение антител к DOPhA важно для выяснения их роли в патогенезе целого ряда заболеваний. В современной литературе описано получение антител к DOPhA, которые могут быть использованы для определения содержания катехоламина в крови и тканях.

В результате проведенных ранее исследований Миwa (Miwa A., 1977) и Динером (Diner U., 1980) было установлено, что антитела с катехоламинами обладают различной специфичностью, которая зависит от вида применяемого конъюгированного антигена. При этом основное внимание авторами уделялось способу конъюгации катехоламина с носителем. Специфичность антител к гаптенам зависит также и от ряда других факторов, к которым относятся: количество гаптена, ковалентно связанного с антигенным носителем, вид этого носителя.

В этой работе мы попытались получить специфические антитела к DOPhA. При этом мы основывались на сведениях о существовании определенной зависимости между специфичностью, титром индуцируемых антител и способами конъюгации, видом входящего в состав конъюгата гаптена и количеством присутствующего в антигене гаптена.

Так имеются данные, свидетельствующие о том, что с удлинением "ножки", связывающей гаптен и носитель, возрастает специфичность антител к гаптену (Grota L.J., 1976). На наш взгляд, применение сочетающего реагента, позволяющего создать такую "ножку", может определенным образом повлиять на эту характеристику антител к DOPhA. Возможно, этим объясняется неудачная попытка получения специфических антител к катехоламинам, предпринятая Спектором, который осуществил связывание катехоламина с белком путем непосредственного взаимодействия алифатической аминогруппы НА с карбоксильными группами носителя с образованием пептидной связи.

Далее, мы также попытались оценить влияние различных антигенных носителей, входящих в состав конъюгированного антигена, на иммунохимические параметры индуцируемых антител к DOPhA аминокислотными и пептидными производными DOPhA. Из литературных источников (Spector S., 1971, Смотров С.П. 1984,) известно, что применение в качестве носителя белков с разной молекулярной массой приводит к получению антител с неодинаковой специфичностью.

В связи с этим нами были использованы BSA и Туг, отличающиеся по молекулярной массе и антигенной активности. Кроме того, эти белки, имея определенную первичную структуру, содержат разное количество тех аминокислотных остатков, к которым ковалентно присоединяются молекулы гаптена.

На схемах 3 и 4 приведен синтез таких антигенов двумя различными способами. При этом один из способов основан на использовании такого сочетающего бифункционального реагента как глутаровый альдегид, а другой - на реакции Манниха. Синтезированные конъюгированные антигены после очистки диализом анализировали на содержание связанного белком DOPhA.

Полученные конъюгаты отличались друг от друга по содержанию DOPhA, которое мы выражали в виде молярного соотношения DOPhA/белок. Как видно из табл. 3 наибольшее количество DOPhA связывается BSA (от 15 до 20 молей DOPhA на 1 моль белка) и несколько меньше Туг (от 7 до 10 молей на 1 моль белка).

Исходя из этого, можно заключить, что наибольшие изменения в химической структуре претерпевает BSA за счет его модификации DOPhA.

Таблица 3. Характеристика антител к DOPhA

№ п/п	Вид антигена	Молярное соотношение белок-DOPhA	Титры антител к DOPhA	Сродство антител к DOPhA, Касс, в м ⁻¹	Перекрестная реактивность антител
1.	BSA-DOPhA	1:18	1:512	4,82+0,09×10 ⁸	12,6
2.	BSA-Gly-DOPhA	1:15	1:512	6,31+0,22×10 ⁸	6,8
3.	BSA-Gly-Gly-DOPhA	1:17	1:2048	8,73+0,27×10 ⁸	1,3
4.	BSA-Gly-Gly-Gly-DOPhA	1:20	1:8192	1,13+0,18×10 ⁹	0,8
5.	Tyr-DOPhA	1:7	1:64	1,77+0,17×10 ⁷	11,9
6.	Tyr-Gly-DOPhA	1:8	1:32	2,40+0,09×10 ⁷	5,9
7.	Tyr-Gly-Gly-DOPhA	1:8	1:128	5,94+0,11×10 ⁷	2,7
8.	Tyr-Gly-Gly-Gly-DOPhA	1:10	1:256	1,36+0,27×10 ⁸	1,2

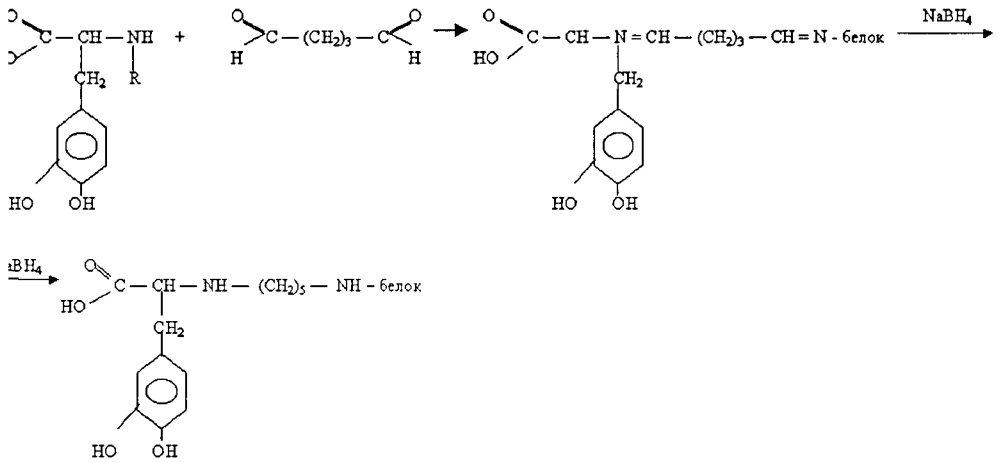
7. Иммунохимические исследования полученных конъюгатов

Полученные конъюгаты на основе BSA и Tyr были использованы для иммунизации лабораторных животных. В зависимости от типа конъюгированного антигена, кролики были разбиты на 8 групп по 4 животных в каждой. В работе в качестве стимулятора антигенотенеза мы использовали адьювант Фрейда. По мере проведения курса иммунизации с месячным интервалом у всех животных из 8 групп производили забор крови. Полученные сыворотки от каждого кролика исследовали с использованием иммуноферментного анализа (И.Ф.А.).

Для выбора оптимального антигена предварительно осуществляли иммунизацию кроликов двумя конъюгатами BSA-DOPhA, полученными двумя способами: с использованием ГА и по реакции Манниха. В таблице 3 приведена динамика антителообразования при иммунизации кроликов полученными конъюгатами.

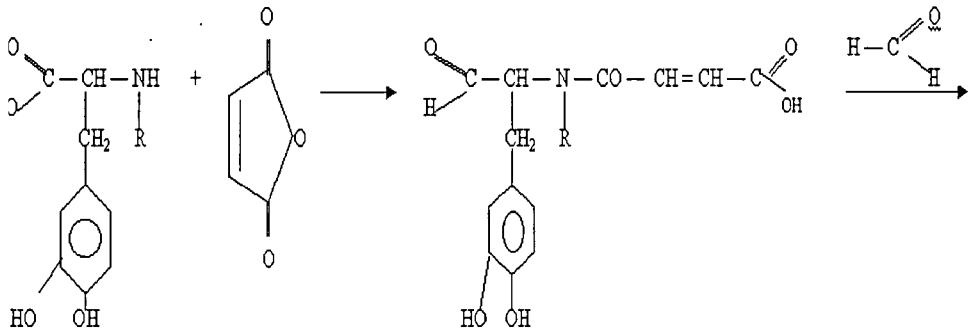
Из таблицы 3 видно, что введение конъюгата BSA-DOPhA, полученного с помощью ГА, индуцирует большее количество антител к DOPhA (титр по истечении 12 месяцев, составляет 1:512), нежели введение конъюгата,

полученного по реакции Манниха (титр 1:64)рис.1. В связи с этим мы остановились только на антигенах, полученных с помощью ГА, и дальнейшие исследования проводились только с этими антигенами.



e R,R = H, Cl_y, Cl_y - Cl_y, Cl_y - Cl_y - Cl_y.

Схема 3. Синтез конъюгата с помощью глутарового альдегида



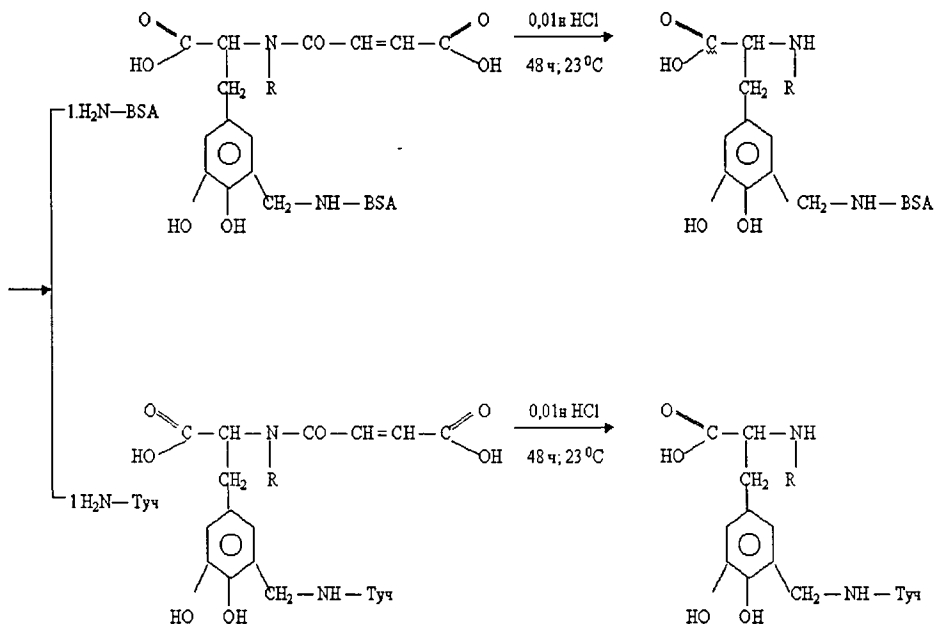


Схема 4. Синтез конъюгата по реакции Манниха

Последующие исследования по определению качественных характеристик, полученных антител, осуществлялись по истечении 12 месяцев от начала иммунизации.

Для определения специфичности применялся метод подавления связывания антисыворотками $^3\text{H-DOPhA}$ с возрастающими количествами таких сходных по структуре, ближайших родственных соединений DOPhA, как HA, A, НМН и МН.

Сыворотки, разбавленные до определенного титра, позволяющего связывать лишь 50% меченого DOPhA, использовали для оценки перекрестной реактивности. Из результатов перекрестной реактивности (таблица. 3) видно, что связывание $^3\text{H-DOPhA}$ зависит от вида добавляемых нативных катехоламинов. Приведенные результаты свидетельствуют о низкой перекрестной реактивности полученных антител при взаимодействии с A, НМН и МН (от 0,1 до 4,1 %). Вместе с тем наблюдается незначительная перекрестная реакция с HA (12%). Это говорит о том, что антитела к DOPhA способны "узнавать" структурные изменения в молекуле катехоламина, как в ароматической ее части, так и в

непосредственной близости от нее. Наряду с этим, антитела не обладают такой высокой специфичностью для заместителей при аминогруппе и α - углеродном атоме алифатической части, которые имеются в молекуле А и НА. Наибольшая перекрестная реактивность антител по отношению к НА, вероятно, вызвана большим структурным сходством DOPhA с НА (Рис.2).

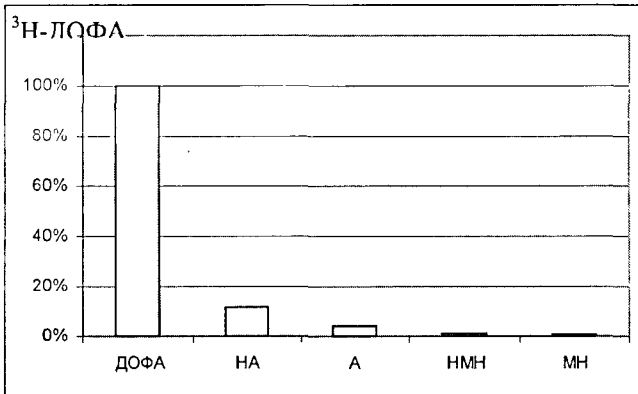


Рис.2. Перекрестная реактивность антител

Таким образом, как видно из результатов экспериментов, при сравнительном анализе специфичности антител существенных различий между антисыворотками, полученными при использовании двух разных белков-носителей не наблюдалось, в то же время отмечалось увеличение специфичности антител при увеличении длины мостика от Gly до Gly-Gly-Gly.

Взаимодействие DOPhA с антителами можно оценить путем инкубации соответствующих антисывороток с ^3H -DOPhA. Метод сатурационного анализа позволяет рассчитывать константы, характеризующие сродство антител к антигенам. Расчет этих констант мы производили, основываясь на анализе Скэтчарда.

В таблице 3 приведены параметры, характеризующие связывание ^3H -DOPhA антисыворотками, полученными к соответствующим конъюогатам. Можно видеть, что ^3H -DOPhA связывается антисыворотками, с высоким сродством.

Наибольшее значение кажущейся равновесной константы ассоциации (Касс) получено в случае иммунизации антигеном BSA-Gly-Gly-Gly-DOPhA и приблизительно равно $1,13 \times 10^9 \text{ м}^{-1}$. Наряду с этим, Касс для антител, индуцированных к конъюогатам BSA-Gly-Gly-DOPhA и BSA-DOPhA несколько ниже по величине и соответствует значениям $8,73 \times 10^8$ и $4,82 \times 10^8 \text{ м}^{-1}$,

соответственно. Это говорит о том, что антигены, содержащие Gly, Gly-Gly и Gly-Gly-Gly, вызывают индукцию антител с меньшим сродством к DOPhA, по сравнению с антителами, полученными к BSA-Gly-Gly-Gly-DOPhA. Значения этих констант очень высоки, что свидетельствует о высоком сродстве связывающего сывороточного фактора к DOPhA. Аналогичная картина наблюдается в случае исследования антител, индуцированных к конъюгатам, где в качестве белка-носителя был использован Tug. Здесь также можно отметить, что наибольшим сродством к DOPhA обладают антитела, полученные при иммунизации конъюгатом Tug-Gly-Gly-Gly-DOPhA ($K_{асс} = 1,36 \times 10^8 \text{ м}^{-1}$) по сравнению с Tug-Gly-Gly-Gly-DOPhA ($K_{асс} = 5,94 \times 10^8 \text{ м}^{-1}$) и Tug-Gly-DOPhA ($K_{асс} = 2,40 \times 10^8 \text{ м}^{-1}$), а также исходным Tug-DOPhA ($K_{асс} = 1,77 \times 10^8 \text{ м}^{-1}$).

Таким образом, данные, полученные путем применения метода сатурационного анализа, позволяют заключить, что введение в антиген, содержащий DOPhA и белок, трех аминокислотных остатков Gly-Gly-Gly приводит при последующей иммунизации к индукции антител, обладающих наибольшим сродством к DOPhA по сравнению с антигеном содержащим два аминокислотных остатка Gly-Gly и один Gly.

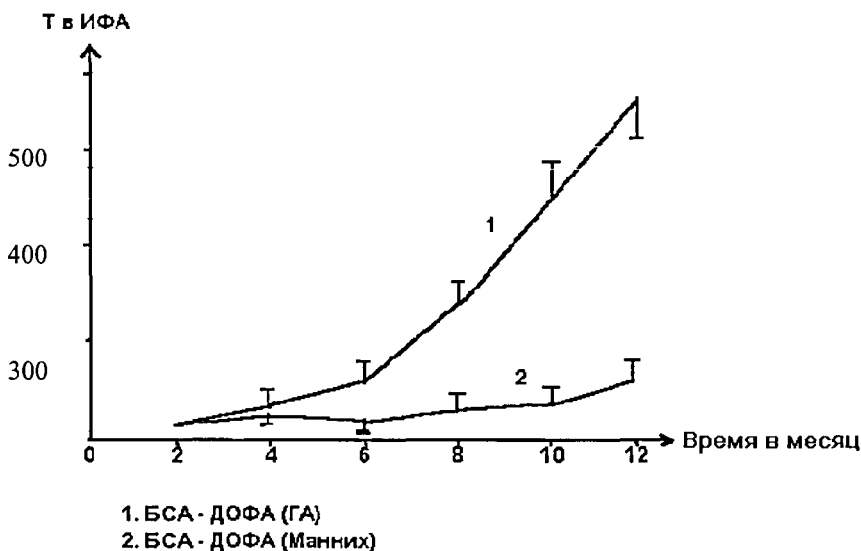


Рис. 1. Динамика образования антител

ВЫВОДЫ

1. Разработаны способы синтеза аминокислотных производных 3,4-диоксифенилаланина и норадреналина методом активированных эфиров, позволяющих получать конечные продукты с выходом 63.5-83.3%. Показано, что проведение реакции конденсации в атмосфере азота позволяет предохранить гидроксильные группы ароматического кольца от окисления.
2. Установлено, что применение метода смешанных ангидридов для конденсации ди и трипептидов с катехоламинами позволяет получать конечные продукты с выходом 72.6-88.3%, при использовании карбодимидного метода выход продукта 50.5-63.5%.
3. Изучены различные способы конъюгации катехоламинов, их аминокислотных и пептидных производных с белковыми носителями и определено, что наибольшая степень конъюгации достигается при использовании в качестве носителя бычьего сывороточного альбумина и производного с тремя остатками глицина.
4. Показано, что лучшими антигенными свойствами обладают конъюгаты 3,4-диоксифенилаланина и его моно-, ди –и триглициновых производных с BSA, полученные с помощью глутарового альдегида. Титр специфических антител при этом достигает уровня 1:512-1:8192.
5. Установлено, что специфичность антител к 3,4 – диоксифенилаланину зависит от длины глицинового мостика и повышается с удлинением мостика от Gly до Gly-Gly-Gly.
5. Высокая специфичность антител, вырабатываемых организмом животных при иммунизации полученными конъюгатами, позволяет использовать последние для определения содержания катехоламинов в организме.

Основное содержание диссертационной работы изложено в следующих публикациях:

1. Мирзорохимов К.К. Синтез некоторых производных норадреналина : аминокислотами. //Республиканская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов. Часть 1.- Душанбе:-1985.-С.112.
2. Мирзорохимов К.К. Синтез аланин-содержащих пептидов производных норадреналина. //Республиканская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов секции химических наук.- Душанбе: –1987.-С.53
3. Мирзорохимов К.К. Синтез модифицированных ДОФА. //Республиканская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов секции химических наук. – Душанбе:-1989. – С.67.
4. Мирзорохимов К.К.,Зегельман А.Б.,Смотров С.П. Биологически активные производные катехоламина. //Третье региональное совещание республик Средней Азии и Казахстана по химическим реактивам. –Ташкент: - 1990.-С.105.

5. Мирзорохимов К.К., Зегльман А.Б. Синтез аминокислотных и пептидных производных норадреналина деп.2.02.90 № 15 (650) 76-90 — Душанбе- 1990. 11С.
6. Мирзорохимов К.К., Шарипова И.Н., Смотров С.П., Юсупов Т. Ю. Получение антител к дигидрооксифенилаланину и изучение их иммунохимических свойств.//Труды первой научной конференции биохимического общества РТ. Проблемы биохимии. – Душанбе:-1990.-С.79
7. Мирзорохимов К.К., Юсупов Т.Ю., Зельгман А.Б., Смотров С.П. Синтез аминокислотных и пептидных производных норадреналина. //Вестник Таджикского Государственного Университета №4 серия химия, биология.- Душанбе:- 1991.-С.71-76
8. Мирзорохимов К.К., Юсупов Т.Ю. Синтез пептидов на основе катехоламинов. //Апрельская научно-теоретическая конференция профессорско-преподавательского состава ТГНУ. Серия естественных наук.-Душанбе:-1994–С.95.
9. Мирзорохимов К.К., Рахимов И.Ф., Юсупов Т.Ю., Смотров С.П. Пептидные производные 3,4-диоксиденилаланина и их фармакологические свойства. //Труды Республиканской конференции, посвященной 50-летию Таджикского Национального Университета «Физиолого-Биохимические основы продуктивности растений» - Душанбе: - 1998. С.46-47.
10. Мирзорохимов К.К., Юсупов Т.Ю., Смотров С.П. Синтез и изучение трипептидов, включающих норадреналин и 3,4-диоксифенилаланина. //Материалы научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава Технологического Университета Таджикистана. – Душанбе: -1996. С.55-63.
11. Мирзорохимов К.К., Юсупов Т.Ю., Смотров С.П. Синтез ди- и трипептидов, включающих остатки катехоламина. //Материалы научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава Технологического Университета Таджикистана. – Душанбе: - 1996. С.63-68.
12. Мирзорохимов К.К., Юсупов Т.Ю., Смотров С.П. //Материалы Юбилейной научно-теоретической конференции посвященной 50-летию Университета. – Душанбе: - 1998. С.84.
13. Мирзорохимов К.К., Юсупов Т.Ю., Смотров С.П. Получение специфических антител к глицил-глицил 3,4-диоксифенилаланину. //Материалы научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава Технологического Университета. – Душанбе; - 1999. С.-59-61.
14. Мирзорохимов К.К., Юсупов Т.Ю., Смотров С.П., Рахимов И.Ф. Аденолитические исследования глицил-глицил 3,4-диоксифенилаланина. //Материалы научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава Технологического Университета Таджикистана. – Душанбе;-1999. С.58-59.