

УДК 543.544.4 : 577.150

**АФФИННЫЕ АДСОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ НОСИТЕЛЕЙ,  
АКТИВИРОВАННЫХ ЭПОКСИДНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

*Кляющкий Б. А., Кузнецов П. В.*

Обзор посвящен синтезу и применению аффинных адсорбентов на основе носителей, активированных эпоксидными соединениями. Обсуждены методы введения эпоксигрупп в носители различной химической природы. Рассмотрены условия иммобилизации на носителях, содержащих эпоксигруппы, пространственных вставок и лигандов низкомолекулярной и полимерной природы. Приведены данные по свойствам и применению этого типа адсорбентов в аффинной хроматографии.

Библиография — 144 ссылки.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	1740
II. Методы активации твердых носителей эпоксидными соединениями . . . . .	1741
III. Иммобилизация лигандов на носителях, содержащих эпоксигруппы . . . . .	1745
IV. Применение адсорбентов на основе носителей, активированных эпоксидными соединениями, в аффинной хроматографии . . . . .	1756

### I. ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени накоплен обширный материал по получению и применению в практике аффинной хроматографии (АФХ) различных типов адсорбентов, который систематизирован в ряде монографий [1—4] и обзоров [5—11]. Недавно появились обзоры, посвященные конкретным проблемам, возникающим при биоспецифической очистке отдельных классов и групп биополимеров [12—14].

Развитие АФХ было бы невозможным без постоянного совершенствования химической базы этого метода, включающей способы синтеза и активации твердых носителей и иммобилизации лигандов, анализ аффинных адсорбентов, изучение их свойств и т. д. Химические аспекты метода АФХ служили предметом обсуждения в перечисленных выше монографиях, отдельных обзора [15, 16] и на конференциях, посвященных АФХ [17]. Получению и свойствам адсорбентов для ковалентной хроматографии посвящен обзор [18]. По-видимому, назрела необходимость в систематизации конкретных химических данных по способам получения аффинных адсорбентов различных типов. Настоящий обзор посвящен синтезу, свойствам и применению биоспецифических адсорбентов одного из наиболее перспективных типов, а именно адсорбентов на основе эпоксиактивированных носителей (ЭАН).

Данные по аффинным адсорбентам на основе ЭАН отражены в литературе весьма схематично и фрагментарно. Между тем применение такого рода адсорбентов органически связано с актуальной проблемой АФХ — синтезом стабильных, гидролитически устойчивых материалов, обладающих высокой биоспецифичностью и способных функционировать длительное время в различных условиях. Использование классического метода бромциановой активации полисахаридных носителей [19] не дает возможности получать адсорбенты с высокоустойчивой к гидролизу связью между матрицей и вставкой<sup>1</sup> (лигандом) [10, 20]. В связи с этим в последние годы, несмотря на ряд успешных работ [21—24] с

<sup>1</sup> Используемый в настоящей статье термин «вставка» [10] обозначает соединение (или группу атомов), отделяющее лиганд от поверхности твердого носителя. В литературе применяются также эквивалентные термины «пространственная группа», «спейсер» и «ножка». В иностранной литературе для аналогичных соединений чаще всего используется термин «spacer»; встречаются также термины «arm» и «leash».

применением полимерных вставок по принципу многоточечного присоединения, внимание исследователей все чаще привлекают адсорбенты на основе ЭАН, в том числе и сефарозы.

Помимо высокой гидролитической стабильности ЭАН обладают рядом других важных достоинств — они достаточно гидрофильны и практически лишены заряженных групп, что сводит к минимуму неспецифические взаимодействия между выделяемым биополимером и адсорбентом. Эти адсорбенты дают возможность иммобилизовать не только лиганды с первичной аминогруппой, но и (без дополнительной модификации) лиганды с другими функциональными группами, например гидроксильной, карбоксильной и тиольной. При использовании ЭАН часто отпадает необходимость введения дополнительных вставок. Немаловажным является и тот факт, что при эпоксиактивации агарозных носителей имеет место поперечная сшивка самих агарозных цепей, что придает адсорбентам типа сефарозы дополнительную жесткость, повышает механическую и химическую устойчивость носителя.

В настоящем обзоре систематизированы основные литературные данные по получению и применению адсорбентов на основе ЭАН для целей АФХ, а также иммобилизации ферментов.

## **II. МЕТОДЫ АКТИВАЦИИ ТВЕРДЫХ НОСИТЕЛЕЙ ЭПОКСИДНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

Метод активации твердых носителей эпоксидными соединениями был впервые предложен в лаборатории Пората [25–28], который внес крупный вклад в развитие методов разделения биополимеров вообще и АФХ, в частности [29].

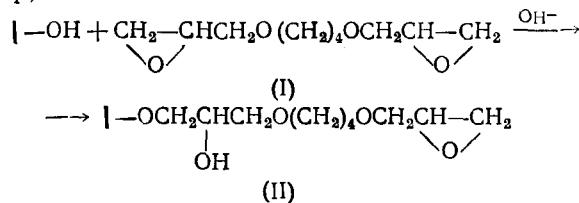
Наиболее часто при активации эпоксидами и их производными применяется сефароза различных марок (2B, 4B, 6B и CL), отвечающая большинству требований, предъявляемых к носителю для получения аффинных адсорбентов. Реже используются целлюлозы, ультрогель, сефадексы и другие полисахаридные носители. Известно применение метакрилатных, метакриламидных и оксиалкилметакрилатных полимерных носителей [30–33] и носителей кремнеземной природы [33, 34].

## 1. Активация носителей полисахаридной природы

Методы активации полисахаридных носителей эпоксидными соединениями можно условно разделить на две основные группы: методы, приводящие к появлению высокоактивных концевых эпоксигрупп на поверхности носителя (метод Сандберга — Пората, 1974 г. [27] и метод Аксена и сотр., 1975 г. [35]), и методы, позволяющие модифицировать поверхность носителя различными функциональными группами (метод Хьертена, 1974 г. [36, 37]).

а) Метод Сандберга — Пората

В основе метода лежит реакция бис-оксиранов типа диглицидилового эфира 1,4-бутандиола (I) с сефарозой в сильнощелочной среде (0,4—0,6 M едкий натр)<sup>2</sup>.



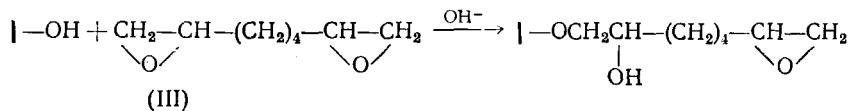
Время реакции 6—10 ч, температура — 20—30°. Оптимальная концентрация бис-оксирана (I) в реакционной смеси около 30% [27]. Кон-

<sup>2</sup> Здесь и далее в схемах жирная линия обозначает поверхность твердого носителя.

центрация эпоксигрупп на адсорбente (II) составляла примерно 800 мкмоль/г сухого геля. Стабильность эпоксиактивированных гелей, по данным Сандберга и Пората, наилучшая при хранении их в диметилсульфоксиде при 4° или в 1 M хлориде натрия при pH 6,8 и 4°. Эпоксидирование CL-сепарозы этим методом позволило применять активированную матрицу для синтезов в неводных средах [38].

Недавно авторы работы [39] сообщили о применении бис-оксирана (I) для активации целлюлозы. Активация протекает в 0,6 M едком натре с добавлением боргидрида натрия (4 мг/мл) при ~20° в течение 18 ч. Активность эпоксицеллюлозы полностью сохранялась в течение 2 недель при хранении ее в 0,1 M едком натре при 4°.

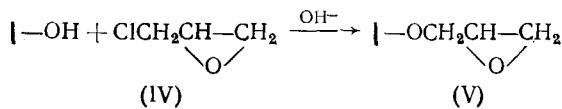
Известно также использование в качестве реагента 1,2;7,8-диэпоксиоктана (III) при активации альгиновой кислоты. Эпоксидирование проводили при ~20° в течение 3 ч в 5 M едком натре при pH 12 [40].



Метод Сандберга — Пората лежит в основе получения коммерческого препарата «эпоксиактивированная сепароза 6В» (ЭАС-6В), выпускаемого фирмой Pharmacia Fine Chemicals (Швеция).

### б) Метод Аксена

Этот метод активации впервые предложен для получения (через эпоксипроизводные) высокозамещенных тиолсодержащих гелей для ко-валентной хроматографии [35]. Эпоксидирование сепарозы эпихлоргидрином (1-хлор-2,3-эпоксипропаном) (IV) протекает довольно легко при 60° в течение нескольких часов в среде 1 M едкого натра.



При использовании 0,45 мл (IV) на 3 г геля достигнута степень замещения около 600—700 мкмоль эпоксигрупп на 1 г сухого геля (V). Оптимизация условий реакции эпоксидирования исследовалась в дальнейшем в работе [41]; были предложены следующие условия активации: 30% сепарозы — 5% эпихлоргидрина — 0,4 M едкий натр (2 ч, 40°). Интересно отметить, что попытка использовать при эпоксидировании добавки органических растворителей (25% растворы диметилсульфоксида или диоксана) не привела к заметному увеличению количества вводимых эпоксигрупп. Однако было показано, что в 25%-ном диметилсульфоксиде уже приблизительно через час достигается степень замещения около 700 мкмоль эпоксигрупп на 1 г сухого геля, хотя наибольшая степень замещения (800 мкмоль/г) наблюдается при проведении реакции в водной среде в течение 2 ч при 40°.

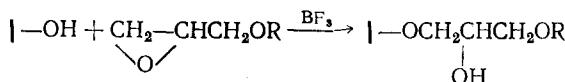
Описаны и другие модификации метода Аксена и сотр. Так, проводилась реакция эпоксидирования сепарозы 0,48 M эпихлоргидрином (IV) в 0,5 M едком натре при 30° в течение 4 ч [42]. По данным [43] применение при эпоксидировании раствора бромида trimетилцетиламмония повысило качество геля и позволило сократить время активации при 45—50° до 45 мин. Недавно [44] описана методика активации сепарозы в среде 2 M едкого натра с постепенным добавлением эпихлоргидрина в реакционную смесь в течение 8—10 ч при ~20°. Авторы не привели данные по степени замещения геля эпоксигруппами, хотя дальнейшая иммобилизация на полученных металл-хелатных носителях ряда ферментов (малатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа и щелочная фосфатаза) прошла успешно.

В настоящее время метод Аксена и сотр. применяется для эпоксидирования сепарозы при получении коммерческого препарата «тионпропил-

сефароза 6В» (Pharmacia Fine Chemicals). Кроме того, активация посредством (IV) ультрогеля типа A4R лежит в основе получения коммерческих аффинных адсорбентов фирмы «LKB» (Швеция) — «акрифлavin — ультрогель A4R» и «гепарин — ультрогель A4R».

### в) Метод Хьертена

Впервые разработан авторами в 1974 г. для синтеза нейтральных гелей, широко используемых в гидрофобной хроматографии [36, 37]. В основе метода лежит реакция сепарозы с разнообразными эпоксидными соединениями в присутствии катализатора — трифтторида бора.

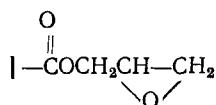


Этим методом синтезировано большое количество гидрофобных адсорбентов, содержащих в структуре концевые алкильные и арильные радикалы, в том числе со спиртовыми, карбоксильными, метоксильными, циано- и другими группами [45, 46]. Объемное соотношение гель сепарозы — диоксан в реакции — 1 : 1; на 100 мл суспензии геля используют 1 мл эфира трифттористого бора. Через 5 мин после смешения реагентов добавляют соответствующий глицидиловый эфир и реакционную смесь перемешивают 40 мин при 25°. Концентрацию лигандов на адсорбентах этого типа определяли после кислотного гидролиза методом ЯМР-спектроскопии. Емкость адсорбентов по лиганду достигала 200 мкмоль/г сухого геля.

Метод Хьертена и сотр. лежит в основе получения широко используемых стабильных гидрофобных коммерческих адсорбентов «октил-сепароза CL-4В» и «фенил-сепароза CL-4В» (Pharmacia Fine Chemicals), емкость которых по связыванию белка (альбумин сыворотки) достигает 15—20 мг/мл геля.

## 2. Синтетические полимерные носители, содержащие эпоксигруппы

Среди группы нерастворимых матриц, полученных синтетически, большой интерес представляют глицидилметакрилатные гели (ГМГ), впервые синтезированные чехословацкими исследователями путем радиальной сополимеризации этиленметакрилата и глицидилметакрилата [32, 33, 47]. Емкость по эпоксигруппам полученных носителей составляла около 3,5 ммоль/г, а эпоксигруппа располагалась на поверхности носителя на трехатомной вставке [47]:

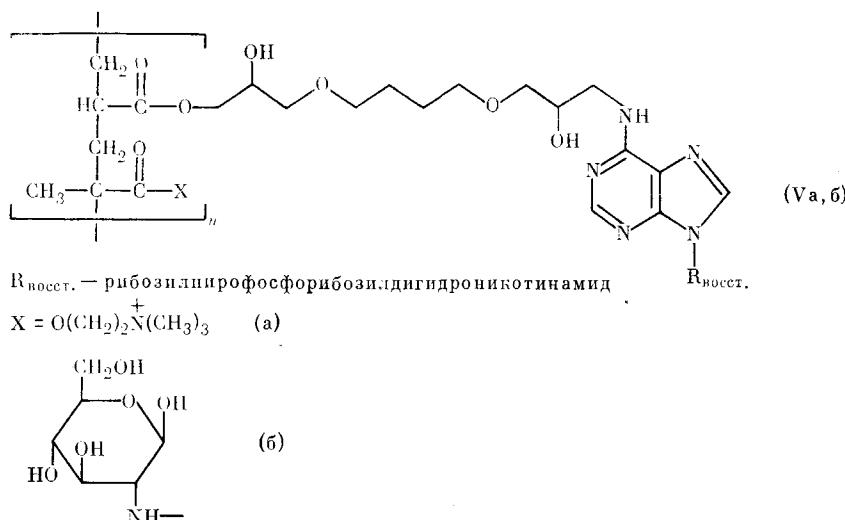


Недавно Туркова и соавт. [48] получили оксиалкилметакрилатные гели (Сепароны Н 300 и Н 1000), активированные эпихлоргидрином (IV), причем в зависимости от степени активации содержание эпоксигрупп составляло 140—1770 мкмоль/г сухого веса. Интересно отметить, что удаление непрореагировавших эпоксигрупп после присоединения лиганда, осуществляемое обычно конденсацией с этаноламином, было проведено гидролизом 0,1 M хлорной кислотой.

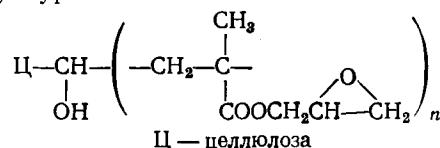
Другим примером ЭАН на основе глицидилметакрилата являются «оксиран-акриловые носители», изготавляемые фирмой «Pöhm Pharm» (ФРГ) [31]. Известно, что вторым компонентом при сополимеризации служат аллилглицидиловый эфир, метакриламид или метилен-бис-акриламид. Полученные носители обладают макропористой структурой, содержат большое количество эпоксигрупп — 800—1000 мкмоль/г сухого носителя, не меняют набухаемость в широком интервале рН (от 1 до 10),

имеют высокую механическую и гидролитическую стабильность, являются микроборезистентными. Показано успешное применение оксиран-акриловых носителей для иммобилизации белков и ферментов [31]. Например, количество связанного альбумина достигало 140 мг, а трипсина 600 единиц активности на 1 г сухого носителя. По-видимому, этот тип носителей перспективен для использования их в АФХ.

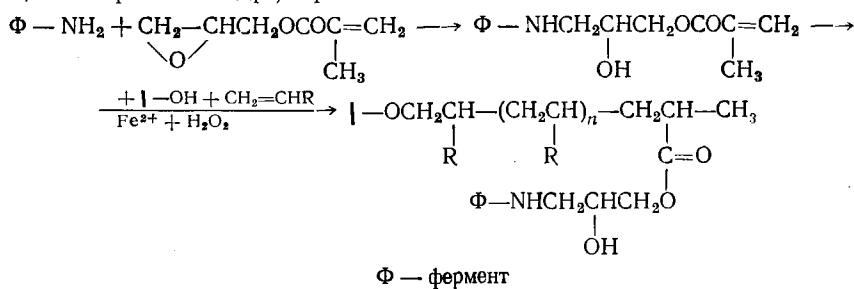
В работе [30] описан синтез двух водорастворимых полимеров, на которых затем был иммобилизован НАДН. Первый из них являлся сополимером метакрилоилхолина и 3-[4-(2,3-эпоксипропокси)бутокси]-2-оксипропилакрилата. Иммобилизацию НАДН на этот сополимер осуществляли в три стадии: алкилирование НАД при N(1), восстановление никотинамидной части дитионитом и перегруппировка Димрота алкильной связи из N(1) в экзоциклическую аминогруппу адениновой части. Второй полимер был сополимером того же эпоксид-содержащего мономера и N-метакрилоил-2-глюказамина. Присоединение НАДН к этому сополимеру через аминогруппу при C(6) осуществляли в одну стадию. В результате были получены конъюгаты (Va, б).



Получены также сополимеры целлюлозы и полиглицидилметакрилата следующей структуры:

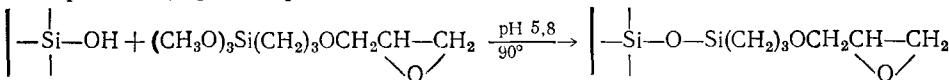


Они применялись для получения иммуносорбентов [49], иммобилизации некоторых ферментов [50]. Новый тип полимерного материала, состоящий из гидрофильной полисахаридной части и гидрофобного синтетического полимера, получен граffт-полимеризацией [51]. В качестве полисахаридной матрицы использовали сефарозу 4B, сефадексы G-10 и G-200. Процесс сополимеризации с иммобилизацией ферментов ( $\alpha$ -амилаза, химотрипсин и др.) представлен на схеме:



### 3. Активация кремнеземных носителей эпоксидными соединениями

Активация этого типа носителей изучена недостаточно, хотя именно макропористые кремнеземные носители важны для внедрения метода АФХ в технологические схемы по очистке биополимеров. Активация пористых стекол проводилась обработкой 5%-ным раствором 3-(2,3-эпоксипропокси)пропилtrimетоксисилана в ацетоне [33, 52].



Иммобилизация ряда белков на полученном носителе была успешной, емкость по белку находилась в пределах 10—80 мг белка/г носителя [33]. Этот же реагент в виде раствора в толуоле применялся для введения эпоксидных групп в кремнеземный носитель силохром [34]. Аналогично проводилась активация кремнезема марки «Fractosil-1000, Merck». Емкость по белку полученного носителя составляла 20—30 мг/г носителя [33].

### **III. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЛИГАНДОВ НА НОСИТЕЛЯХ, СОДЕРЖАЩИХ ЭПОКСИГРУППЫ**

Одним из существенных преимуществ ЭАН на основе сефарозы (ЭАС-6В) является отсутствие специальной стадии введения пространственной вставки при синтезе аффинного адсорбента. Действительно, ЭАС-6В, полученная по методу Сандберга — Пората, имеет достаточно длинную гидрофильную вставку, позволяющую сразу же проводить иммобилизацию лиганда. Это максимально упрощает синтезы адсорбентов с низкомолекулярными лигандами, делает их, в ряде случаев, одностадийными.

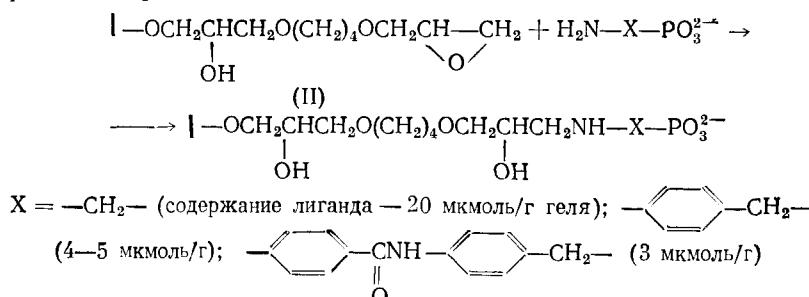
С другой стороны, применение активированной сефарозы, полученной по методу Аксена и сотр. (1,2-ЭПС), как правило, требует введения дополнительной пространственной вставки. В дальнейшем рассмотрены реакции иммобилизации лигандов применительно к упомянутым выше типам эпоксисефарозы.

## **1. Иммобилизация низкомолекулярных лигандов или пространственных вставок**

а) Адсорбенты на основе ЭАС-6В

Как правило, иммобилизация лигандов, содержащих амино-, окси- или тиоловые группы, протекает легко при значениях pH от 7 до 13 и температуре 20—45° в течение 10—65 ч. Эти общие выводы иллюстрируются конкретными примерами в табл. 1.

В аналогичных условиях ( $0,1\text{ M}$  едкий натр при  $\text{pH} 13$ ) проходило сочетание аминометилфосфоновой кислоты и производных *n*-аминобензилфосфоновой кислоты с ЭАС-6В, причем емкость адсорбента с лигандом, содержащим алифатическую аминогруппу, оказалась примерно в 4—5 раз выше [64].



Интересно, что только адсорбенты с ароматической структурой слабо связывали щелочную фосфатазу.

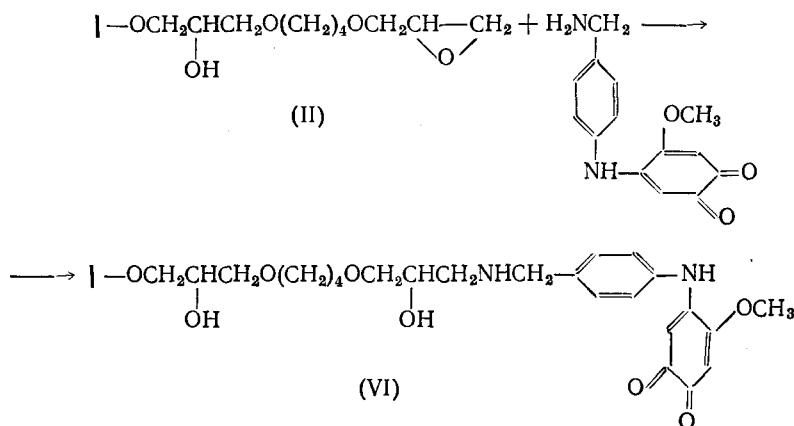
ТАБЛИЦА 1

**Условия иммобилизации низкомолекулярных лигандов с амино-, окси- и тиоловыми группами на ЭАС-6В**

Лиганд	pH	Температура, °C	Время, ч	Ссылки
<b>NH<sub>2</sub></b>				
Аналог триметоприма	9—10	—	16	[53]
Фолиевая кислота	10	30	16	[54]
8-Аминоксантин	10—11	37	20	[55]
Акрифлавин	11,5	20	8—10	[56]
S-гексилглутатион	12	30	16	[57]
Галактозамин	13	30	20	[58]
<b>OH</b>				
Рибоза-5-фосфат	8,5	33	65	[59]
N-ацетилгалактозамин	11	40	16	[60]
Аденозин	11,2	37	24	[61]
Глицерилфосфорилхолин	13	45	20	[62]
<b>SH</b>				
Глутатион восстановленный	7*	37	24	[63]

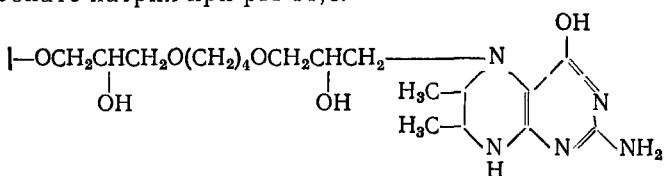
\* Иммобилизация проведена в атмосфере азота.

Применение в качестве лиганда аминопроизводных бензохинона-1,2 описано в работе [65]. Реакция проводилась при pH 10 в 0,07 M карбонатном буферном растворе в токе азота в течение 5 ч; емкость по лиганду получена вполне удовлетворительная — 5,5 мкмоль/мл упакованного объема геля.



Синтезированный адсорбент (VI) оказался высокостабильным и использовался около года для выделения менадионредуктазы.

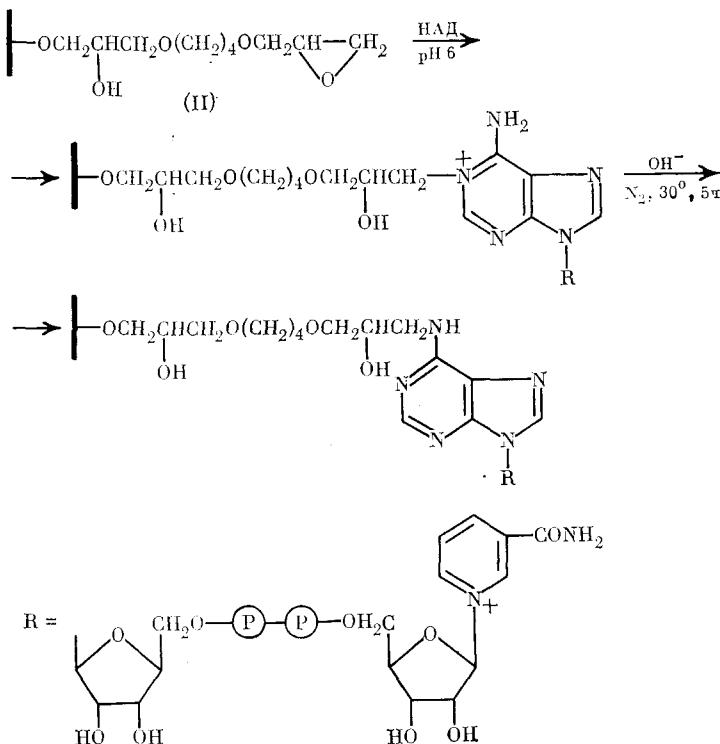
Высокая емкость по лиганду — около 280 мкмоль/г геля — получена при иммобилизации по положению 5 диметилпроизводного 2-амино-4-окситетрагидроптеридина [66]. Реакцию проводили в деаэрированном 0,5 M карбонате натрия при pH 11,4.



При наличии в лиганде карбоксильных групп возможна его иммобилизация на адсорбенте за счет образования сложноэфирных связей [33, 67]. Лиганды, содержащие фенольный гидроксил, также хорошо

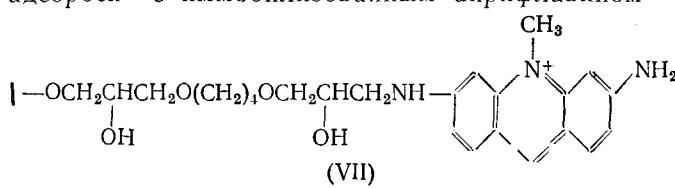
присоединяются к ЭАС-6В в кислотной среде. Однако при наличии у лиганда обеих функциональных групп точное место связывания не всегда удается установить. Так, не доказана точная структура адсорбентов, полученных на основе производных ауксина (5-оксииндолилуксусная кислота, 2-, 3- и 4- оксифенилуксусные кислоты и др.) и антиауксина (2-окси-3,5-диiodбензойная кислота) [68]. По данным авторов, адсорбенты с индолилуксусной кислотой в качестве лиганда оказались стабильными лишь две недели.

Для АФХ дегидрогеназ [69] синтезирован НАД-содержащий адсорбент с применением на одной из стадий перегруппировки Димрота — из положения N(1) пуринового кольца по экзоциклической аминогруппе.

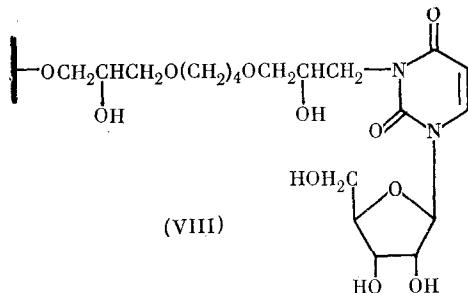


Таким образом, следует считать установленным факт достаточно легкого алкилирования пуринов по N(1) положению при взаимодействии с ЭАС-6В в слабокислотных средах (рН 5—6); последующая перегруппировка Димрота приводит к иммобилизации лиганда по экзоциклической аминогруппе аденинового кольца.

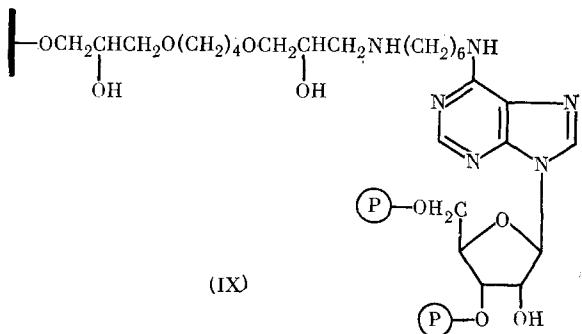
Однако, в ряде случаев, особенно при проведении реакции в сильнощелочной среде, точное положение в молекуле полифункционального лиганда, по которому он присоединен к ЭАС-6В, определить довольно трудно. Так, при очистке дезаминазы высокоеффективным оказался адсорбент с иммобилизованным на ЭАС-6В аденоzinом [61]. Связывание лиганда проводили при рН 11,2 в 0,1 М бикарбонате натрия при 37° в течение 24 ч, причем авторы считают наиболее вероятной иммобилизацию лиганда по гидроксильным группам рибозы, а не по мало-реакционноспособной аминогруппе аденина. Между тем, по-видимому, в этих условиях вполне возможна иммобилизация и по экзоциклической аминогруппе лиганда — в близких условиях (см. табл. 1) удалось получить адсорбент с иммобилизованным акрифлавином (VII) [56]:



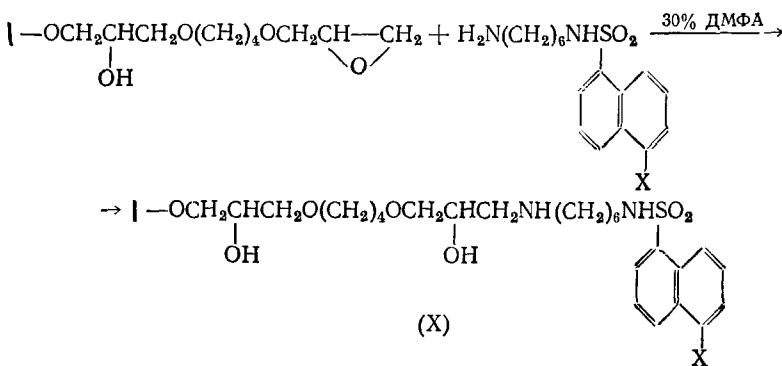
Вероятно, в подобных случаях, при наличии нескольких типов реакционноспособных групп в молекуле лиганда, предполагаемые структуры адсорбентов нельзя считать окончательно установленными. Так, авторы работ [70, 71], доказав ковалентное связывание уридуна с ЭАС-6В при 37° в 0,1 M едком натре в течение 16 ч, привели лишь предполагаемую структуру полученного адсорбента (VIII):



Более определенные результаты получены, если перед иммобилизацией молекула лиганда предварительно направленно модифицировалась. Например, ц-АМФ сначала превращали в С(8)-оксиэтилтиопроизводное, которое затем легко сочетало с ЭАС-6В при pH 11 [72]. Аналогично N(6)-e-аминогексил-3,5-АДФ иммобилизовали при pH 10 и 28° в течение 20 ч [73] и получили адсорбент (IX).



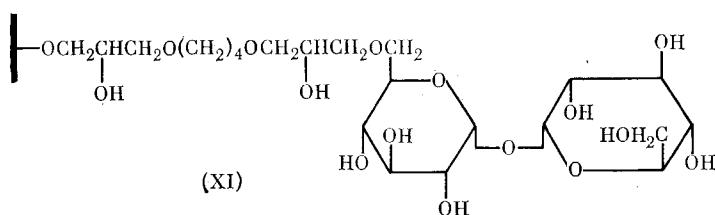
Антагонисты кальмодулина, производные 1-сульфонафталина, иммобилизовали при pH 9,8 в 30%-ном диметилформамиде в течение ~16 ч при 40° по аминогруппе гексаметилендиаминовой вставки, которая была предварительно введена в молекулу лиганда [74]. Синтезированный адсорбент (X) содержал около 20 мкмоль лиганда на 1 мл геля.



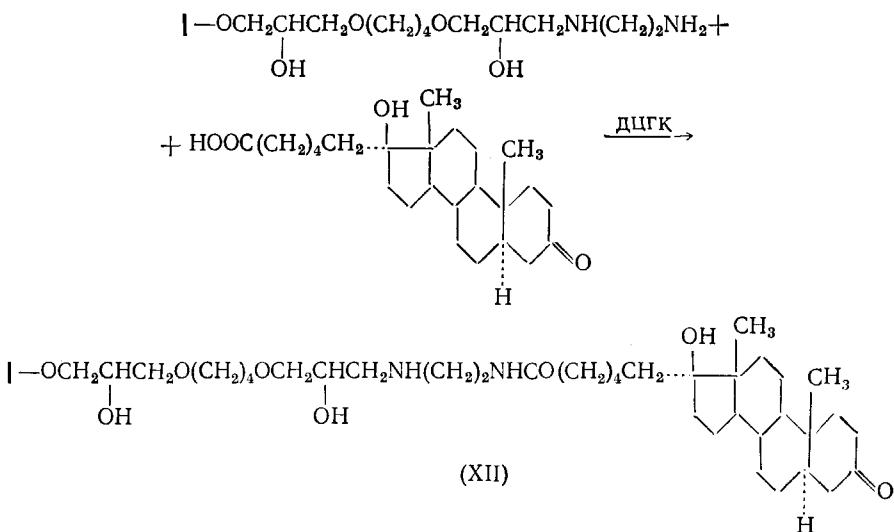
X = H, Cl

В этом синтезе хотелось бы отметить применение органического растворителя — диметилформамида, что позволило получить адсорбент с высокой емкостью по лиганду.

Как указывалось выше, углеводные лиганды могут быть иммобилизованы на ЭАС-6В без предварительной модификации [75, 76]. В работе [77] проведено подробное химическое изучение иммобилизации углеводов на ЭАС-6В. Показано, что реакция протекает главным образом по первичной гидроксильной группе, а в случае аминосахаров оказалось, что аминогруппа в шесть раз более реакционноспособна в реакции с эпоксигруппой, чем первичная оксигруппа. Получение устойчивого и эффективного адсорбента (XI) для биоспецифической очистки белков, имеющих высокое сродство к невосстановливающим глюкопиранозильным остаткам, присоединением незащищенной  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -треагалозы к ЭАС-6В, описано в работе [78].



Применение короткой этилендиаминовой вставки, иммобилизованной на ЭАС-6В, для последующего сочетания носителя с карбоксилсодержащим стероидным лигандом карбодиimidным способом описано в работе [38]. Полученный адсорбент (XII) использовался для выделения стероид-связывающих белков сыворотки.



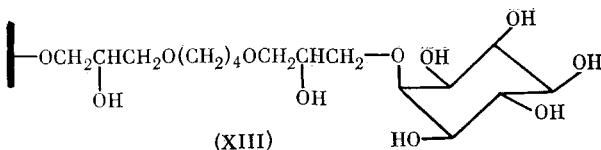
Важной особенностью данного синтеза явилось использование CL-сефарозы, устойчивой в неводных средах, поскольку иммобилизацию лиганда проводили в смеси диоксан — диметилформамид (1 : 1) с помощью дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК).

Известно применение ЭАС-6В для синтеза металл-хелатных адсорбентов [79, 80]. Присоединение динатриевой соли иминодиуксусной кислоты осуществляли в 2 М карбонате натрия при 65° в течение 24 ч. Полученный адсорбент использовали при очистке нуклеозиддифосфатазы [80].

Интересным адсорбентом на основе ЭАС-6В оказалась S-гексилглутатион — эпоксисефароза, в которой лиганд был иммобилизован по аминогруппе глутатиона (рН 12, 30°). Блокирование непрореагировавших эпоксигрупп проводилось 1 М этаноламином в течение 16 ч. На этом адсорбенте удалось провести очистку нескольких ферментов — глутатион-S-арилтрансферазы [81] и глиоксалазы [57], причем в по-

леднем случае выход фермента был выше, чем на адсорбенте, полученным активацией сефарозы бромцианом.

По данным [82] оказалось возможным использовать ЭАС-6В для иммобилизации лиганда в среде органического растворителя — диметилсульфоксида, правда в течение ограниченного времени (1 ч при  $\sim 20^\circ$ ). Полученный адсорбент (XIII) применялся при очистке мионизитоксигеназы.

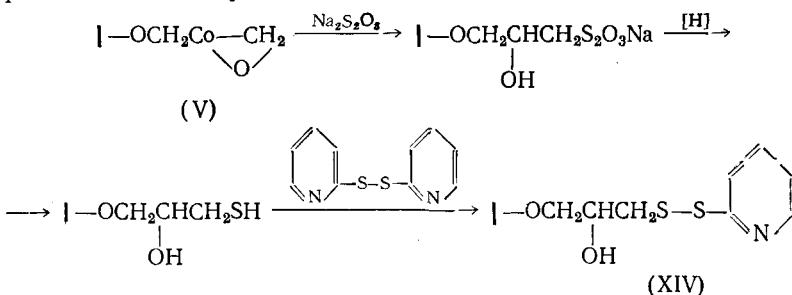


Удобным носителем оказалась ЭАС-6В для иммобилизации *m*-аминофенилборной кислоты [83]. Синтезированный адсорбент прочно связывал нуклеотиды, вероятно, путем образования комплекса с  $\alpha$ -гликольной группировкой рибозы и в таком виде исследовался авторами с целью очистки некоторых дегидрогеназ.

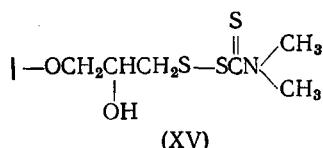
Описано также ковалентное присоединение к ЭАС-6В других низкомолекулярных лигандов, таких как производные углеводов — N-ацетил-D-галактозамина [60], N-ацетил- $\beta$ -D-глюказамина [41], три-N-ацетилхитотриозы [41], циклогептапамилозы [84],  $\beta$ -L-фукозиламина [85], аминоспирта холина [86] и др.

### б) Адсорбенты на основе 1,2-ЭПС

Этот тип эпоксицефарозы [35], как правило, требует введения дополнительной пространственной вставки при иммобилизации лиганда. Впервые 1,2-ЭПС применили для синтеза адсорбента для ковалентной хроматографии — «тиопропил-сефарозы» (XIV) [35], получение которой проводили по следующей схеме:

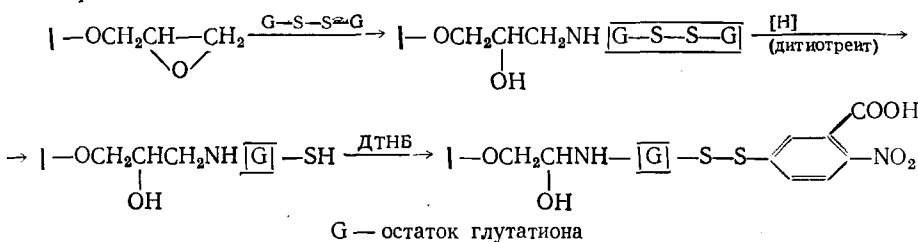


Интересно отметить, что в качестве лигандов исследовались также производные 2,2'-дипиридилидисульфида с нитро- и карбоксигруппами [87]. Как и ожидалось, эти производные тиопропил-сефарозы оказались несколько более активными в реакциях тиол-дисульфидного обмена и могут использоваться в ковалентной хроматографии наряду с коммерческим адсорбентом. В этой же работе получен адсорбент (XV) с остатком диметилдитиокарбамата в качестве лиганда:



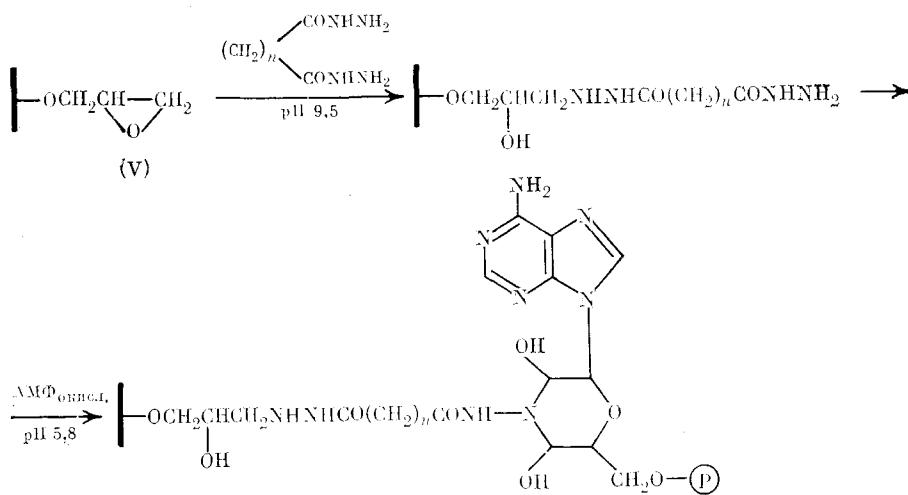
Синтезированы также эпоксианалоги «активированной тиол-сефарозы», второго коммерчески доступного адсорбента для ковалентной хроматографии. В качестве вставок использовали остатки цистамина, цистеина и глутамина, лигандом являлся остаток 5,5'-дитио-бис-(2-нит-

робензойной) кислоты (ДГНБ) [43]. Схема синтеза указанного адсорбента приведена ниже:



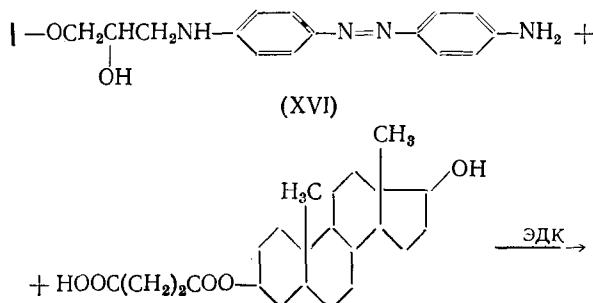
Применение адсорбентов для выделения и очистки SH-содержащих пептидов и белков подробно рассмотрено в обзоре [18].

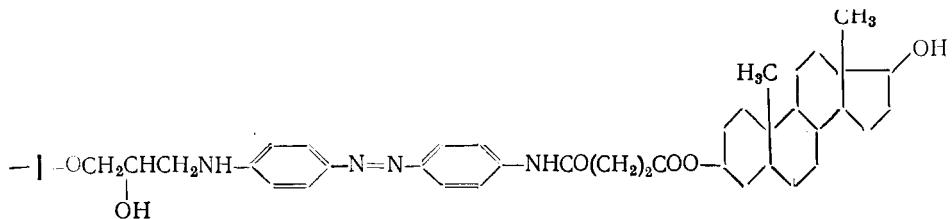
С использованием в качестве вставки гидразидов дикарбоновых кислот получен ряд производных гидразидооксипропил-сефарозы, к которым гладко присоединяли окисленные периодатом [88] нуклеотиды, например, адениновые и гуаниновые нуклеотиды [89], НАДФ [43, 90, 91]. Иммобилизация дигидразидов на 1,2-ЭПС протекает при рН 9,5 в течение 10—16 ч при  $\sim 20^\circ$  [89]. Последующее присоединение окисленных нуклеотидов проходит по рибозному кольцу.



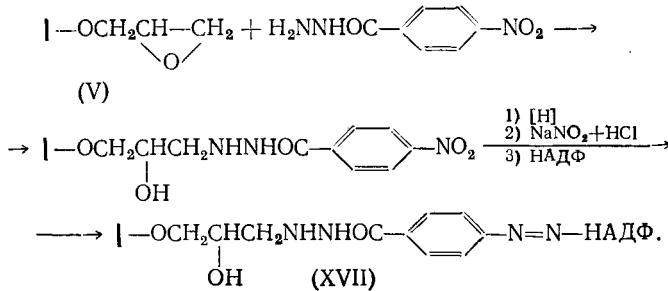
Гексаметилендиаминовая вставка использовалась для иммобилизации на 1,2-ЭПС некоторых аминокислот [92] в виде N-оксисукциниimidных эфиров. По данным [93] для очистки фосфолипазы D наиболее эффективной оказалась ионилоксипропилсепароза.

Представляет интерес использование в качестве пространственной вставки 4,4'-азодианилина [94], присоединение которого к 1,2-ЭПС проводили в 50%-ном диметилформамиде в течение 2 ч. Полученный окрашенный продукт (XVI) сочетали с сукцинилированным производным андростандиола в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида (ЭДК):



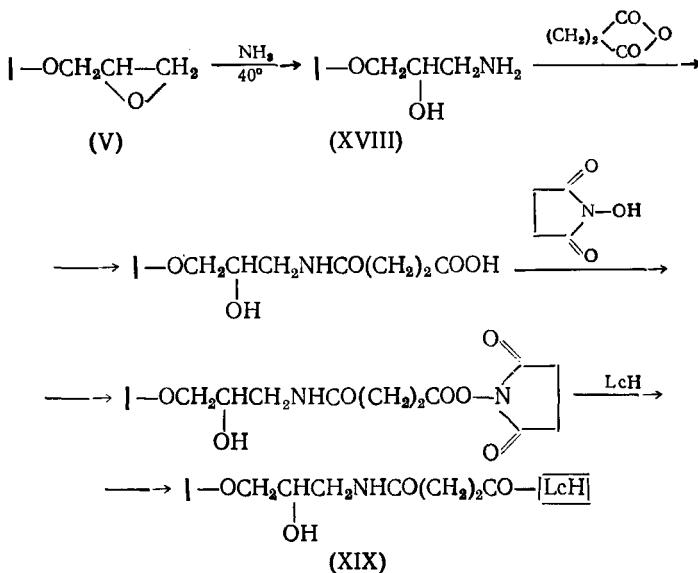


Описан синтез ряда адсорбентов с азо-связью на основе 1,2-ЭПС. Один из примеров такого рода — получение НАДФ-азобензгидразидо-оксипропил-сефарозы (XVII) по следующей схеме [95]:



Реакцию иммобилизации вставки — *n*-нитробензгидразида — на 1,2-ЭПС проводили в водном диметилсульфоксиде.

Недавно [96] осуществлено аминирование 1,2-ЭПС и ЭАС-6В в концентрированном амиаке при 40° за 2 ч и впервые получена амино-сефароза (XVIII) и некоторые ее производные. Так, через стадию сукцинилирования [97] удалось получить высокостабильный аффинный адсорбент (XIX) с гемагглютинином (LcH) в качестве лиганда.



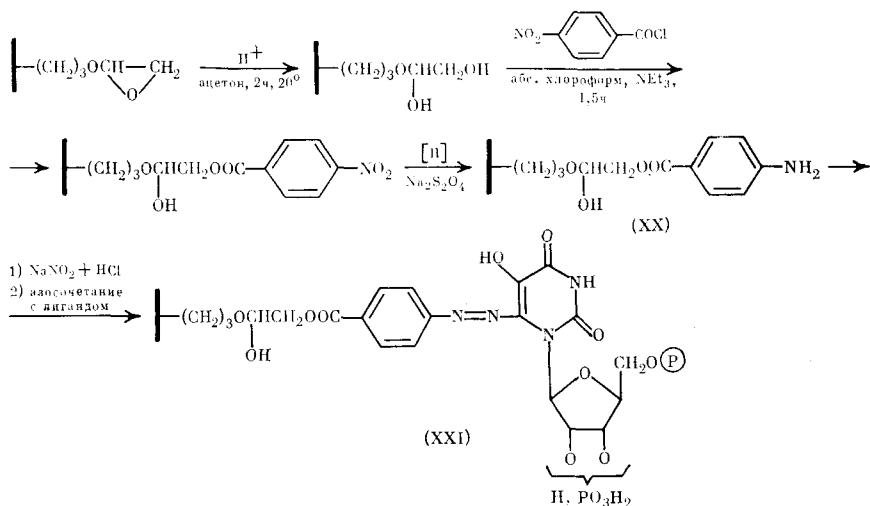
Амидная и сложноэфирная связи адсорбента (XIX) были устойчивы при pH 9,8 (боратный буферный раствор). Не разрушаются они и при использовании в качестве элюента растворов детергента. По аналогичной схеме получена глюкозамин—сукцинилоксипропил-сефароза [98].

Применение 3-амино-2-оксипропил-сефарозы, полученной эпоксидированием агарозного носителя эпихлоргидрином по модифицированно-

му методу [42] ( $25^\circ$ , 4 ч) с последующей обработкой 2M раствором аммиака в течение 16 ч, для иммобилизации стероидного лиганда — 3-оксо- $17\beta$ -окси- $5\alpha$ -андростан- $17\alpha$ -(6-гексановой кислоты) — описано в работе [99]. Лицанд сочетали с аминосефарозой в 70%-ном водном диоксане в присутствии ЭДК.

### в) Адсорбенты на основе носителей кремнеземной природы

Систематических исследований этой группы ЭАН для иммобилизации низкомолекулярных лигандов не проводилось. Значительный интерес представляет работа [34], посвященная иммобилизации на алюсиле 5-оксиуридин-2'(3'),5'-дифосфата с целью получения аффинного адсорбента для выделения эндонуклеазы А5. Синтез азоадсорбента на основе эпоксидированного алюсила проводился по следующей схеме:



Содержание аминогрупп на аминоарилпроизводном (XX) составило 133 мкмоль/г, а емкость азоадсорбента (XXI) по нуклеотиду — 36,5 мкмоль/г. По данным авторов синтезированный адсорбент практически не обладал неспецифической сорбцией и был весьма стабильным: после шести циклов выделения сохранялось до  $\sim 98,3\%$  от первоначального количества иммобилизованного на носителе лиганда. Следует подчеркнуть возможность использования в синтезах азоадсорбентов на основе кремнеземов других описанных вставок — *n*-нитробензидразидной [95] и вставок, полученных на основе гидразидов *N*-(*n*-нитробензоил)-*ε*-аминокапроновой кислоты и -глицилглицина [100].

## 2. Иммобилизация лигандов полимерной природы

Иммобилизация полимеров и биополимеров различных классов на ЭАН подробно не изучалась, хотя необходимость таких исследований очевидна. Имеющиеся литературные данные по этому вопросу скучны и разрознены. Чаще всего для указанной цели использовали ЭАС-6В. Это объясняется наличием на носителе данного типа длинной пространственной вставки, что обеспечивает достаточно высокую реакционную способность носителя в реакциях с биополимерами и обеспечивает необходимую стерическую доступность иммобилизованного лиганда.

В качестве лигандов было осуществлено ковалентное присоединение к ЭАН липополисахаридов [101, 102], антител к человеческому лейкоцитарному интерферону [103], гликопротеинов [96], клеточного материала [104], ингибиторов трипсина и трипсиноподобных ферментов [27], полисахаридов [76], полинуклеотидов [105, 106]. В работе [107]

овому коид предварительно модифицировали по активному центру цитраконовым ангидридом, а затем присоединяли к ЭАС-6В при pH 10 в течение 16 ч при 40°. Процент связывания трипсиноподобного фермента этим эпоксиадсорбентом оказался равным 92% по сравнению с 30% для сефарозы, активированной бромистым цианом.

По данным [105] окисленная периодатом т-РНК с успехом была иммобилизована на гидразидоадипоил-ЭАС-6В.

Простой и эффективный метод присоединения ДНК к эпоксицеллюлозе предложен в работе [39]. Иммобилизацию биополимера проводили в 0,1 M едком натре при 20° в течение 2 ч. Содержание ДНК в полученным адсорбенте составляло около 40 мг/мл геля. Сорбент отличался высокой стабильностью по отношению к органическим растворителям — этанолу, диметилформамиду, диоксану, толуолу и др., а также 2M хлориду натрия или 0,1 M едкому натру в течение 24 ч при ~20°. Эффективность связывания полинуклеотидов изменялась следующим образом —  $\text{poly(dT)} > \text{poly(dC)} = \text{poly(dA)} > \text{poly(dG)}$ .

Определенный интерес вызывают работы, посвященные условиям иммобилизации на ЭАН пептидов и белков. Так, в работе [27] изучены оптимальные условия для присоединения глициллейцина к ЭАС-6В (pH 11, 50° в течение 15 ч). Для ингибитора трипсина из соевых бобов оптимум связывания — 0,5 M карбонатный буферный раствор, pH 9,5, 25° в течение 24 ч. В близких условиях проводили иммобилизацию на ЭАС-6В белков клеточной мембранны при получении иммуноадсорбентов [104] — 0,05 M боратный буферный раствор, pH 9, в течение 16 ч при ~20°.

Приведенные выше данные позволяют считать, что иммобилизация биополимеров на ЭАН протекает примерно в тех же условиях (щелочная среда, температура 20—30°), что и сочетание с низкомолекулярными лигандами. Полученные адсорбенты, как правило, высокостабильны.

Более детальное исследование процессов присоединения к ЭАН, в частности ГМГ, пептидов и белков было предпринято в работах [33, 47]. Авторы показали, что пептид типа глициллейцина преимущественно связывается с ГМГ по  $\alpha$ -аминогруппе, причем максимальное связывание наблюдается через 72—96 ч при 25—37°. Этот процесс оказался сильно зависимым от значения pH, с оптимумом при pH 9,7. Емкость по лиганду составила около 20 мкмоль/г. Связь между матрицей и лигандом оказалась чрезвычайно прочной: даже жесткий кислотный гидролиз привел к появлению лишь следовых количеств глицина. С другой стороны связывание эпоксигрупп носителя с карбоксильными группами лиганда было независимым от значения pH. Гидролиз образованной сложноЭфирной связи протекал обычным образом.

При иммобилизации на ГМГ сывороточного альбумина и трипсина максимум связывания этих белков оказался в кислотной среде при pH 3, что позволило предположить важную роль карбоксильных групп в процессах конъюгации. Участие  $\epsilon$ -аминогрупп лизина исследуемых белков в процессах связывания проявилось в области pH 7—11. По мнению авторов, иммобилизация по  $\epsilon$ -аминогруппе независима от pH. Емкость по лиганду для адсорбентов, полученных при pH 8—11, была в 3—4 раза ниже, чем у адсорбентов, синтезированных при кислотных pH. Кроме трипсина и альбумина удалось иммобилизовать на ГМГ в кислотной среде и аминоглюказидазу [106]. В дальнейшем было показано, что в кислотной среде эффективно связывались полимеры с индолевой и фенольной группами [67]. Оптимальное связывание индолсодержащих производных наблюдалось при pH 3,85, причем с увеличением pH эффективность связывания уменьшается. Имидазолсодержащие производные имели оптимум связывания при pH 8,15 [33]. Для производных, содержащих первичную аминогруппу, оптимум связывания зафиксирован при pH 9,55.

Значительный интерес представляют данные [33] по изучению влияния природы белков на их иммобилизацию на ЭАН. Оказалось, что при иммобилизации белков важны не только условия связывания и природа

ТАБЛИЦА 2

Оптимальные значения рН для иммобилизации некоторых белков на различных типах ЭАН [33]

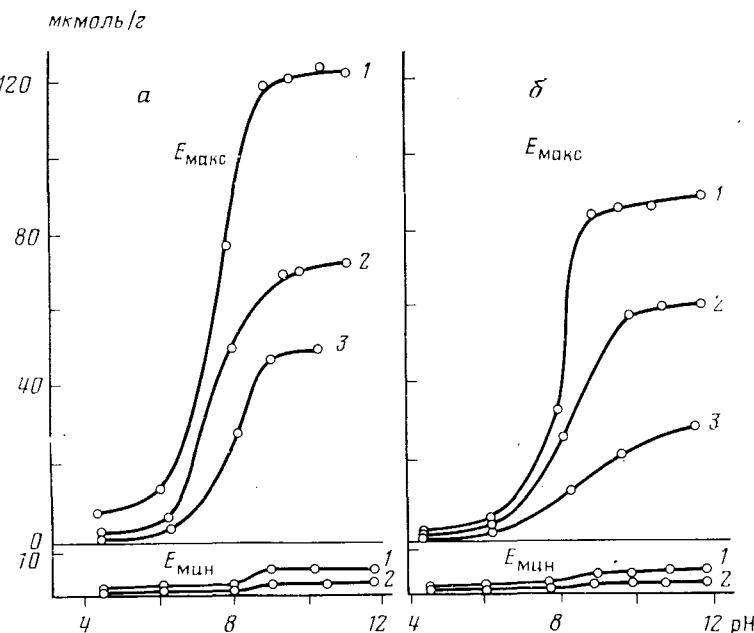
Иммобилизованный белок *	Тип ЭАН **				
	пористое стекло	кремнеземный носитель	ЭАС-6В	ГМГ	оксиран-акриловый носитель
Альбумин сыворотки (4,9)	4 (45), 8,5 (20)	5 (50)	8 (300)	5 (20), 8 (10)	4—10 (50)
Папаин (8,7)	8,5 (60)	8 (40)	9 (300)	7 (25)	—
Антилизин (10)	10 (80)	10 (20)	10 (300)	10 (15)	9,5 (100)
Трипсин (10,1)	8,5 (10)	3 (20)	11 (20)	3 (5)	10 (20)
Химотрипсин	7—8 (50)	7—8 (20)	11 (40)	3 (10), 10 (5)	—

\* В скобках приведена изоэлектрическая точка.

\*\* В скобках приведено количество иммобилизованного белка в мг/г носителя.

белкового лиганда, но и тип полимерной матрицы. Результаты этих исследований приведены в табл. 2.

Из табл. 2 следует, что максимальную емкость по лиганду показала ЭАС-6В, причем только для этой матрицы значение рН иммобилизации всегда находится в щелочной среде (рН 8—11). Такую неселективность к природе иммобилизируемого белка, по-видимому, следует отнести к эффекту вставки, которая для этого типа ЭАН имеет максимальную длину — 12 углеродных и кислородных атомов. Близкие результаты получены и для оксиран-акрилового носителя. Напротив, ГМГ и адсорбент на основе кремнезема наиболее чувствительны к природе иммобилизируемого



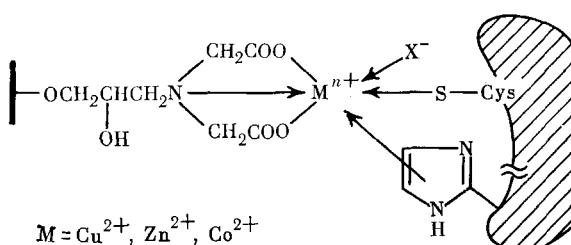
Зависимость присоединения глицил-D-фенилаланина к Сепарону Н 300 (а) и Сепарону Н 1000 (б), активированным эпихлоргидрином, от рН и времени реакции;  $E_{\max}$  — максимально активированные носители (1550 мкмоль/г для Сепарона Н 300; 1700 мкмоль/г для Сепарона Н 1000);  $E_{\min}$  — минимально активированные носители (240 мкмоль/г для Сепарона Н 300; 140 мкмоль/г для Сепарона Н 1000); 1 — 48 ч; 2 — 24 ч; 3 — 12 ч

белка, а емкость по лиганду для них невысока — для ГМГ она наименьшая из всех изученных ЭАН. Для некоторых белков наблюдается четкая взаимосвязь между изоэлектрической точкой и оптимальным значением рН иммобилизации (например, антилизин и, в меньшей степени, папаин и альбумин). Результаты для антилизина, по мнению авторов, можно объ-

яснить отсутствием в этом белке триптофана, склонного к связыванию в кислотной среде.

Аналогичное исследование проведено на активированных эпихлоргидрином (IV) оксиалкилметакрилатных гелях [48]. Было изучено присоединение различных аминопроизводных как функция pH, времени реакции, концентрации лиганда, степени эпоксидирования носителя и химической структуры лиганда. На рисунке отражена зависимость присоединения глицил-D-фенилаланина на различных типах эпоксиактивированных Сепаронов от pH среды и времени реакции [48].

Ковалентная иммобилизация альбумина и НАД-пироfosфорилазы на ЭАС-6В протекала при 4° в течение 28 ч [109]. Ряд ферментов (пероксидаза,  $\alpha$ -амилаза,  $\alpha$ -химотрипсин, глюкоизомераза) иммобилизован недавно с использованием графт-полимеризации [51]. Определенный интерес представляет метод нековалентной иммобилизации на эпоксиактивированном металл-хелатном носителе некоторых ферментов, содержащих имидазольные и тиогруппы [44]. Авторы предлагают следующую структуру комплекса носитель — фермент:



Этим способом иммобилизованы щелочная фосфатаза, малат- и лактатдегидрогеназы.

#### IV. ПРИМЕНЕНИЕ АДСОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ НОСИТЕЛЕЙ, АКТИВИРОВАННЫХ ЭПОКСИДНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ, В АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Одно из главных достоинств ЭАН — простота, в ряде случаев одностадийность, получения аффинных адсорбентов на их основе. Синтезированные биоспецифические адсорбенты исключительно стабильны, практически не гидролизуются в щелочной среде. Так, адсорбент с ц-АМФ, иммобилизованный на ЭАС-6В по спиртовому гидроксилу, за шесть месяцев хранения в боратном буферном растворе при 4° потерял лишь около 0,04% лиганда [72]. Имуноадсорбенты на основе ЭАС-6В теряли радиоактивный лиганд только на 0,04—0,02%, в то время как процент потери радиоактивности для аналога на основе сефарозы, активированной бромцианом, составил в тех же условиях 0,6—1,1% [103]. Полное отсутствие отщепления кофермента при хранении НАД-содержащих эпоксиадсорбентов по сравнению с бромциан- и азопроизводными показано в работе [69].

Второе важное преимущество адсорбентов на основе ЭАН заключается в их большей биоспецифичности, что обусловлено гидрофильностью вставки и отсутствием дополнительных ионогенных групп. Следствием этого является возможность использования такого рода адсорбентов на более ранних этапах выделения и очистки биополимеров. Например, при выделении тироксин-связывающего глобулина успешным оказалось применение на ранних этапах очистки тироксин-эпоксисефарозы [110] непосредственно для АФХ сыворотки. Была достигнута 1000-кратная очистка исследуемого белка с выходом около 70%. Достаточно высокая очистка на стадии АФХ (600 раз) сохранилась и после предварительной хроматографии сыворотки на гидроксилапатите.

для АФХ пепсина и протеина из коровиной сыворотки использовался эпоксиактивированный Сепарон Н 1000 с присоединенным в качестве лиганда метиловым эфиром *L*-фенилаланил-*D*-фенилаланина [48]. Высокая механическая стабильность адсорбента дала возможность проведения аналитической АФХ пепсина при высоком давлении.

Высокую селективность показала при выделении в одну стадию фермента уратоксидазы 8-аминокантин—эпоксисефароза [55]. Степень очистки составила 88 раз, выход фермента достигал 93 %, элюентом служил 5 мМ раствор мочевой кислоты.

Максимальная очистка холинфосфат-цитидилтрансферазы на адсорбенте на основе ЭАС-6В составила на стадии АФХ около 250 раз с общим выходом 59 % [62]. Близкая степень очистки (в 200 раз) наблюдалась при выделении глутатионредуктазы на НАДФ—гидразидоадипоил-оксипропил-сефарозе [111]. Важно отметить, что использованный в этой работе адсорбент оказался высокоселективным к глутатионредуктазе (мышьякрезистентная фракция) и практически не связывал тиолдисульфидные ферменты мышьякчувствительной фракции. С помощью этого адсорбента разработан эффективный экспресс-метод получения практически гомогенной глутатионредуктазы [111]. Примечательно, что в обоих случаях АФХ проводилась непосредственно с супернатантом, выделенным после фракционирования сульфатом аммония. Простой и быстрый трехэтапный метод очистки  $\alpha$ -амилазы из тритикали включал на последней стадии АФХ на циклогептапамилозе—эпоксисефарозе [84]. Он дал конечную очистку фермента в 143 раза с общим выходом около 33 %.

В ряде работ АФХ на эпоксисорбентах применялась на заключительных стадиях очистки. Так, при выделении фенилаланингидроксилазы из печени крысы применение на последнем пятом этапе птеридин—эпоксисефарозы позволило получить очистку фермента на стадии АФХ около 30 раз [66]. Общая степень очистки составила 510 раз, выход — 98 %. Конечный препарат фенилаланингидроксилазы содержал примесь катализной активности. На одной из стадий очистки глиоксалазы использовалась АФХ на S-гексилглутатион—эпоксисефарозе [57], причем хроматография на этом адсорбенте приводила к ферменту с более высокой удельной активностью, чем очистка на адсорбенте на основе бромциан-активированной сефарозы.

Использование металл-хелатных адсорбентов на основе эпоксисефарозы описано в работах [80, 112—114]. На этих адсорбентах удалось провести очистку нуклеозиддифосфатазы с выходом около 16 % и степенью очистки 194 раза [80]. Элюентом служил 15 мМ раствор *L*-гистидина в 10 мМ малеатном буферном растворе.

Известно, что адсорбенты на основе ЭАН широко применяются и в гидрофобной хроматографии. Определенный интерес вызывают работы по исследованию связи химической структуры адсорбентов с особенностями адсорбции различных белков. В работах [45, 46], посвященных изучению белков крови, установлены следующие общие закономерности. Адсорбенты с длиной алкильной цепи от  $C_1$  до  $C_5$  показали относительно низкую адсорбцию белков крови, а увеличение гидрофильности и полярности лиганда введением гидроксильных, метоксильных или цианогрупп значительно снижало адсорбцию. Максимальное снижение наблюдалось при введении нитрильной группы. С другой стороны, наличие в молекуле лиганда положительного заряда (четвертичная аммониевая группа) увеличивало адсорбцию всех исследованных белков. Следует подчеркнуть, что оптимальная длина углеводородной цепи лиганда различна для разных белков. Фибриноген, тромбин и глобулины имеют оптимум связывания на лиганде с длиной цепи  $C_7$ , в то время как для альбумина и иммуноглобулина G оптимум адсорбции —  $C_8$ . Наличие разветвлений в лиганде приводит к уменьшению адсорбции.

Выделение префенатдегидратазы удалось осуществить, применяя адсорбенты с гексаметилендиаминовой вставкой с некоторыми аминокислотами в качестве лигандов [92]. N-Ацетилированные производные этих адсорбентов теряли способность связывать фермент. Вместе с тем лишь с

исследование в гексаметилендиаминогексилового аналогов 1,2-ЭГС удалось десорбировать фермент ( $0,5\text{ M}$  хлорид натрия или  $140\text{ mM}$  раствор гексаметилендиамина).

В работе [115], посвященной скринингу аффинных адсорбентов для выделения неорганической пирофосфатазы, показано, что гексил-эпоксицефароза с высокой концентрацией лиганда ( $40\text{ мкмоль/мл}$ ) прочно связывала фермент с полным сохранением его пирофосфатазной активности. Элюировать белок не удалось ( $1\text{ M}$  хлорид натрия, субстрат). В то же время бромциановые аналоги сорбента (правда с концентрацией лиганда меньше в 4—7 раз) значительно слабее связывали фермент. Он легко элюировался с этих адсорбентов  $0,05$ — $0,1\text{ M}$  раствором хлорида натрия.

В последнее время опубликован ряд работ по использованию коммерческих октил-сефарозы и фенил-сефарозы для гидрофобной хроматографии многих биополимеров, например, холин-ацетилтрансферазы [116], специфических эндонуклеаз [117], щелочной фосфатазы и 5'-АМФ-нуклеозидазы [118], рестриктирующей эндонуклеазы RECoCK [119], а также для разделения фосфолипидного и белкового компонентов комплекса III дыхательной цепи митохондрий [120], иммобилизации трипсина с предварительной модификацией фермента [121], выделения микросомального цитохрома Р-450 [122], исследования кобаламинсвязывающих белков [123], очистки кальмодулина [124] и т. д.

Отмечено, что в некоторых случаях при использовании адсорбентов на основе сефарозы, активированной бромистым цианом, имеет место значительная биоинактивация лиганда, в то время как аналогичный эпоксиадсорбент сохраняет хорошее сродство к выделяемому биополимеру [107]. Так, при АФХ трипсиноподобного фермента наибольший процент связывания получен для адсорбента на основе ЭАС-6В (92%).

Один из широко используемых адсорбентов в ковалентной хроматографии — тиопропил-сефароза [35]. Спектр ее применения довольно широк — выделение тиолсодержащих белков [125, 126], тиолсодержащих пептидов [127], меркурированных полинуклеотидов [128]. Показана возможность разделения ковалентной хроматографией на тиопропил-сефарозе двух близких тиол-дисульфид-оксидоредуктаз — протеин-дисульфидизомеразы и глутатион-инсулин-трансгидрогеназы [129]. Предварительно супернатант очищали фракционированием сульфатом аммония, гель-фильтрацией на сефадексе G-200 и ионообменной хроматографией. Элюентами при ковалентной хроматографии служили тиолы с увеличивающейся восстановительной способностью —  $20\text{ mM/L}$ -цистеин,  $50\text{ mM}$  восстановленный глутатион и  $20\text{ mM}$  дитиотреит. Использование тиопропил-сефарозы позволило [130] отделить высокореактивные тиолы, например цистеиновую протеиназу из *Actinidia chinensis* от остальных тиолсодержащих компонентов. Описано применение восстановленной тиопропилсифарозы для очистки цитоплазматической альдегиддегидрогеназы от примеси митохондриальных белков [131]. Известно использование того же адсорбента, модифицированного 2-окси-5-нитробензил-бромидом, для иммобилизации  $\alpha$ -химотрипсина и  $\beta$ -амилазы [132]. Специальное рассмотрение вопросов применения ковалентных адсорбентов представлено в обзоре [18].

Основные работы по применению адсорбентов на основе ЭАН в АФХ отражены в табл. 3.

\* \* \*

Изложенный выше материал свидетельствует о том, что биоспецифические адсорбенты на основе ЭАН представляют собой один из наиболее распространенных типов адсорбентов, используемых в настоящее время в АФХ и примыкающих к ней методах. Иногда приходится слышать мнения о том, что АФХ в чистом виде вообще не существует, и что биоспецифическое взаимодействие выделяемого биополимера с сорбентом при АФХ неизбежно сопровождается сложным комплексом взаимодействий,

## Применение адсорбентов на основе ЭАН для выделения и очистки биополимеров

Лиганд (вставка)	Выделяемый биополимер (источник)	Ссылки
ЭАС-6В		
Ингибитор трипсина из бобов сои Овомуконид	трипсин (комерческий препарат) трипсиноподобный фермент (из <i>Streptomyces erythreus</i> )	[27] [107]
Миоинозит	миоинозитоксигеназа (из почек крысы), миоинозиткиназа из ( <i>Lemna gibba</i> )	[82]
Аденозин-3',5'-дифосфат (гексаметилен-диамин)	сукиннаттиокиназа (из сердца свиньи)	[73]
Холин	холин- и этанодаминкиназы (из печени крысы)	[86]
8-Оксигидро-АМФ	регуляторная субъединица протеинкиназы	[72]
S-Гексилглутатион	глутатион-S-трансфераза (из плаценты человека)	[81]
Восстановленный глутатион	глутатион-S-трансфераза (из печени человека)	[63]
Глицерилфосфорилхолин	холинфосфат-цитидилтрансфераза (из печени крысы)	[62]
Рибоза-5-фосфат, неопиритиамин, тиаминпирофосфат, окситиамин	транскетолаза (из <i>Candida utilis</i> и пекарских дрожжей)	[59]
Аденозин	аденоциндеаминаза (из эритроцитов человека)	[61]
S-Гексилглутатион	глиоксалаза I (из печени кролика)	[57]
2-Амино-4-окси-6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптеридин	фенилаланингидроксилаза (из печени крысы)	[66]
Триметоприм, его аналоги	дигидрофолатредуктаза (из <i>E. coli</i> )	[53]
Аминометил-4-анилино-5-метокси-1,2-бензохинон	менадионредуктаза (из печени крысы)	[65]
8-Аминокантин	уратоксидазы (из почек быка, печени крысы и дрожжей)	[55]
Фолиевая кислота	рибонуклеаза А (из поджелудочной железы быка)	[54]
То же	эндонуклеазы EcoRI (из <i>E. coli</i> ) и Bgl II (из <i>Bacillus globigii</i> )	[117]
НАД <sup>+</sup> или НАДН	алкоголь- и лактатдегидрогеназы	[69]
3-Аминофенилборная кислота + нуклеотиды и коферменты	дегидрогеназы	[83]
Циклогептапамилоза	$\alpha$ -амилаза (из гибрида пшеницы и ржи)	[84]
Аминометил-, 4-аминобензил- и N-(4-аминобензоил)-4-аминобензилфосфоновые кислоты)	щелочная фосфатаза (из тонкой кишечни быка)	[64]
Арабинан	$\alpha$ -L-арабинофуранозидаза (из <i>Aspergillus niger</i> )	[76]
Иминодиуксусная кислота + Cu <sup>2+</sup>	нуклеозиддифосфатаза (из печени крысы)	[80]
То же	лактоферрин (из молока человека)	[112]
Иминодиуксусная кислота + Zn <sup>2+</sup>	альфа <sub>2</sub> -SH-гликопротеин (из плазмы человека)	[113]
D-Галактозамин	$\beta$ -галактозид-связывающий лектин (триадкин) (из <i>Tridacna maxima</i> )	[58]
Трагалоза	конканавалин A (из <i>Canavalia ensiformis</i> )	[78]
N-Ацетил-D-галактозамин, N-ацетил-D-глюказамин	лектины (из бобов сои, из проростков пшеницы)	[60]
Три-N-ацетилхитотриоза, метил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюказаминид	агглютинин (из <i>Solanum tuberosum</i> )	[41]
3-Оксо-17 $\beta$ -окси-5 $\alpha$ -андростан-17 $\beta$ -(6-гексановая кислота (диаминоэтил)	стериоидсвязывающий белок (из сыворотки человека)	[38]
Аналоги ауксина	ауксин-рецепторные белки	[68]
Тироксин <sub>1</sub>	тирооксингенсвязывающий белок (из сыворотки человека)	[110]
N-(6-Аминогексил)-5-хлор-1-нафталинсульфонамид	кальмодулин и кальций-связывающий белок S-100 (из мозга быка)	[74]
Агглютинин из <i>Ricinus communis</i>	тирглобулин	[41]
т-RНК (гидразидоадипоил)	рибосомальные белки	[105]
Иминодиуксусная кислота + Zn <sup>2+</sup>	интерферон (из фибропластов человека)	[114]
Интерферон из лейкоцитов человека	соответствующие антитела	[103]
$\beta$ -Экзидон	белки соответствующей антисыворотки	[133]

Лиганд (вставка)	Выделяемый биополимер (источник)	Ссылки
ЭАС-6В		
Липополисахариды из <i>Shigella sonnei</i>	гомологичная антисыворотка, бактериофаг SKVI	[101]
Мембранный материал лимфобластоидных клеток человека	соответствующие антитела	[104]
ЭАС-6В и 1,2-ЭПС		
Гемагглютинин (сукцинил)	гликопротеины	[96]
1,2-ЭПС		
2-Тио-4-(нитро, карбокси)пиридин; остаток тетраметилтиурамдисульфида	цистеиновые пептиды, меркапталбумин, папаин, уреаза, альбумин бычьей сыворотки, панкреатические рибонуклеазы	[87, 127]
2-Нитро-5-тиобензойная кислота (аминоэтил, глутатион, цистеин)	глутатионредуктаза (из печени крысы)	[43]
НАДФ ( <i>n</i> -азобензогидразид)	то же	[95]
То же или НАДФН (гидразидосукцинил, гидразидоадипонил)	»	[90, 91, 111]
Аминокислоты (гексаметилендиамин, сукцинил)	префенатдегидратаза	[92]
3-Гемисукцинат 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -диола (4,4'-азодианилин)	тестостерон-эстрадиол-связывающий глобулин (из плазмы человека)	[94]
Кортизол, 5 $\alpha$ -дигидротестостерон	стериоидсвязывающие белки	[134]
Адениновые и гуаниновые нуклеотиды (гидразидоадипонил)	фактор элонгации Tu (из <i>E. coli</i> MRE 600)	[89]
Алкилы, окси(алкокси)алкилы, их циан- и карбоксипроизводные	альбумин, глобулин, фибриноген, протромбин	[45, 46]
Тиопропил	протеин-дисульфид-изомераза (из печени быка), глутатион-инсулин-трансгидрогеназа (из печени быка)	[126, 129]
То же	актинидин (из <i>Actinidia chinensis</i> )	[130]
»	белки из печени человека, связывающие медь	[125]
Амино-1,2-ЭПС		
Лактоза, мелибиоза, мальтоза, N-ацилтилглюкоза; глюказамин, галактозамин (сукцинил)	агглютинины (из сои, <i>Arachis hypogaea</i> , проростков пшеницы и др.)	[98]
3-Оксо-17 $\beta$ -окси-5 $\alpha$ -андростан-17 $\alpha$ -(6-гексановая кислота)	андrogen-связывающий белок (из эпидидимиса крысы)	[99]
Эпоксицеллюлоза		
Дезоксирибонуклеиновая кислота	полинуклеотиды, комплементарная м-RНК (из печени птицы)	[39]
ГМГ		
Трипсин	ингибиторы трипсина	[47]
Эпокси-Сепарон Н 1000		
Метиловый эфир L-фенилаланил-D-фенилаланина ( $\epsilon$ -аминокапронил)	пепсин и протеиназы (из <i>Aspergillus oryzae</i> )	[48]
Кремнезем (алиосил)		
5-Оксиуридин-2'(3'),5'-дифосфат ( <i>n</i> -азобензоил)	эндонуклеаза A5 (из актиномицетов)	[34]

включающим не специфические электростатические, гидрофобные и другие эффекты. В связи с этим в одну группу методов включают как АФХ, так и сопутствующие методы, такие как гидрофобная, ковалентная, металл-хелатная хроматография. Эта тенденция таит в себе опасность как формального, так и чисто научного характера, связанную с ошибочной

и интерпретации результатов применения метода АФХ для изучения механизма биохимических реакций, определения констант ассоциации биополимеров с низкомолекулярными лигандами и т. д. Произвольное смешение указанных выше методов выделения и очистки биополимеров не в последнюю очередь вызвано применением в АФХ, особенно в препартивных целях, таких носителей, как пористое стекло, силохромы и ряда других, которые по самой своей природе могут привносить в процесс очистки неспецифические взаимодействия, не препятствующие, однако, в ряде случаев достижению достаточно высокой степени очистки биополимера.

Усилия исследователей по дальнейшему развитию метода АФХ, несомненно, будут направлены на исключение или сведение к минимуму неспецифических эффектов при хроматографическом процессе, поскольку это позволит в полной мере продемонстрировать уникальные возможности метода АФХ. Для четкого формального разделения метода АФХ от других методов очистки был предложен термин «биоаффинная хроматография» [10, 135, 136]. Появляющиеся в последнее время новые методы активации полисахаридных матриц призваны обойти недостатки все еще наиболее широко применяемого метода бромциановой активации. Это и модификация (на основе изучения механизма реакции) самого бромцианового метода [137, 138], использование реакционноспособных сульфохлоридов [139, 140], карбонилирующих реагентов [141, 142], О-сукцинилирование [143], применение активированных хлорформиатов [144] и ряд других. Среди этих методов активация эпоксидными соединениями занимает достойное место. Ее очевидные преимущества — простота, химическая устойчивость образующейся связи, гидрофильность получаемых адсорбентов, исключение или сведение к минимуму заряженных групп на адсорбенте — способствуют максимальному приближению взаимодействия выделяемого биополимера с иммобилизованным лигандом к процессам, протекающим в физиологических условиях, т. е. осуществлению в чистом виде идеи метода АФХ. Можно ожидать и дальнейшего широкого использования адсорбентов на основе ЭАН для эффективной очистки биополимеров и в качестве тонкого инструмента биохимического исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lowe C. R., Dean P. D. G. *Affinity Chromatography*. London: Wiley, 1974, p. 272.
2. Methods in Enzymology/Ed. by W. B. Jakoby, M. Wilchek. New York: Academic Press, 1974, p. 810.
3. Безвершенко И. А. Аффинная хроматография. Киев: Наукова Думка, 1978, с. 126.
4. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980, с. 471.
5. May S. W., Zaborsky O. R. Separation and Purification Methods. 1974, v. 3, p. 1.
6. Wilchek M. In: *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*/Ed. by R. R. Dunlap. New York: Plenum Press, 1974, p. 15.
7. Porath J., Kristiansen T. In: *The Proteins*/Ed. by H. Neurath, R. L. Hill. New York: Academic Press, 1975, v. 1, p. 95.
8. Porath J. J. *Macromol. Sci., Chem.*, 1976, v. 10A, p. 1.
9. Nishikawa A. H., Bailon P., Ramel A. H. *Ibid.*, 1976, v. 10A, p. 149.
10. Кляющиккий Б. А., Шапот В. С. Успехи биол. химии, 1976, т. 17, с. 234.
11. Porath J., Caldwell K. D. In: *Biotechnological Application of Proteins and Enzymes*/Ed. by Z. Bohak, N. Sharon. New York: Academic Press, 1977, p. 83.
12. Кляющиккий Б. А. Биоорган. химия, 1980, т. 6, с. 485.
13. Веса В. С. Прикл. биохимия микробиол., 1980, т. 16, с. 629.
14. Lis H., Sharon N. J. *Chromatogr.*, 1981, v. 215, p. 361.
15. Guilford H. *Chem. Soc. Rev.*, 1973, v. 2, p. 249.
16. Miron T., Wilchek M. J. *Chromatogr.*, 1981, v. 215, p. 55.
17. Кляющиккий Б. А. Тезисы Всесоюзн. конференций по перспективам использования биоспецифической хроматографии в технологии производства высокоочищенных ферментов. Вильнюс, 1982, с. 10.
18. Лозинский В. И., Рогожин С. В. Успехи химии, 1980, т. 49, с. 879.
19. Axen R., Porath J., Ernback S. *Nature*, 1967, v. 214, p. 1302.
20. Turkova J. J. *Chromatogr.*, 1974, v. 91, p. 267.
21. Wilchek M. *FEBS Letters*, 1973, v. 33, p. 70.
22. Sica V., Parikh I., Puca G. A., Cuatrecasas P. J. *Biol. Chem.*, 1973, v. 248, p. 6543.
23. Klyashchitsky B. A., Mitina V. Kh. *J. Chromatogr.*, 1981, v. 210, p. 55.
24. Klyashchitsky B. A., Mitina V. Kh., Morozovich G. E., Yakubovskaya R. I. *Ibid.*, 1981, v. 210, p. 67.

25. Johnson J., Johnson J.-C., Laas I. Ibid., 1971, v. 60, p. 167.
26. Porath J., Sundberg L. Nature (New Biol.), 1972, v. 238, p. 261.
27. Sundberg L., Porath J. J. Chromatogr., 1974, v. 90, p. 87.
28. Carlsson J., Axen R., Unge T. Europ. J. Biochem., 1975, v. 59, p. 567.
29. J. Chromatogr., 1981, v. 215, p. 13, 19.
30. Fuller C. W., Rubin J. R., Bright H. J. Europ. J. Biochem., 1980, v. 103, p. 421.
31. Krämer D. M., Lehmann K., Pennewiss H., Plainer H. Prepar. Short Communis. IUPAC, 1979, № 3, p. 1559.
32. Coupek J., Gemeiner P., Jirkov V., Kalal J., Kubanek V., Kuniak L., Peska J., Rexova L., Stemberg J., Svec F., Turkova J., Veruovic B., Lemek J. Chem. Listy, 1981, v. 75, p. 512.
33. Lemanova I., Turkova J., Capka M., Nakhapetyan L. A., Svec F., Kalal J. Enzyme Microb. Technol., 1981, v. 3, p. 229.
34. Банникова Г. Е., Варламов В. П., Самсонова О. Л., Рогожин С. В. Биоорган. химия, 1982, т. 8, с. 212.
35. Axen R., Drevin H., Carlsson J. Acta Chem. Scand., 1975, v. 29B, p. 471.
36. Hjerten S., Rosengren J., Pahlmann S. J. Chromatogr., 1974, v. 101, p. 281.
37. Rosengren J., Pahlmann S., Glad M., Hjerten S. Biochim. Biophys. Acta, 1975, v. 412, p. 51.
38. Pétra P. H., Lewis J. Anal. Biochem., 1980, v. 105, p. 168.
39. Moss L. G., Moore J. P., Chan L. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, p. 12655.
40. Coughlin R. W., Aizawa M., Charles M. Biotechnol. Bioeng., 1976, v. 18, p. 199.
41. Matsumoto I., Mizuno Y., Seno N. J. Biochem., 1979, v. 85, p. 1091.
42. Nishikawa A. H., Bailon P. J. Solid-Phase Biochem., 1976, v. 1, p. 33.
43. Кузнецов П. В., Бондарь В. С., Лихачева Л. А. Тезисы Всесоюзн. конференции по перспективам использования биоспецифической хроматографии в технологии производства высокочищенных ферментов. Вильнюс, 1982, с. 73.
44. Coulet P. R., Carlsson J., Porath J. Biotechnol. Bioeng., 1981, v. 23, p. 663.
45. Kissing W., Reiner R. H. Chromatographia, 1978, v. 11, p. 83.
46. Kissing W., Reiner R. H. J. Solid-Phase Biochem., 1979, v. 4, p. 221.
47. Turkova J., Blaha K., Malanikova M., Vancurova D., Svec F., Kalal J. Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 524, p. 162.
48. Turkova J., Blaha K., Horacek J., Vajcner J., Frydrychova A., Coupek J. J. Chromatogr., 1981, v. 215, p. 165.
49. Орлов Г. Е., Яглом Д. Л., Гуревич А. Е., Вирник А. Д., Роговин З. А. Вопросы мед. химии, 1969, т. 15, с. 287.
50. Вирник А. Д., Фесенко Р. И., Артемова Ю. В., Роговин З. А., Яковлев В. А. Тезисы I Всесоюзн. симпоз. по иммобилизованным ферментам. Таллин, 1974, с. 85.
51. D'Angiuro L., Cremonesi P., Mazzola G., Focher B., Vecchio G. Biotechnol. Bioeng., 1980, v. 22, p. 2251.
52. Chang S. H., Gooding K. N., Regnier F. E. J. Chromatogr., 1976, v. 120, p. 321.
53. Then R. L. Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 614, p. 25.
54. Sawada F. Anal. Biochem., 1979, v. 98, p. 184.
55. Watanabe T., Suga T. Ibid., 1978, v. 86, p. 357.
56. Mansson M. O., Mattiasson B., Gestrelus S., Mosbach K. Biotechnol. Bioeng., 1976, v. 18, p. 1145.
57. Elango N., Janaki S., Rao A. R. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, v. 83, p. 1388.
58. Baldo B. A., Sawyer W. H., Stick R. V., Uhlenbruck G. Biochem. J., 1978, v. 175, p. 467.
59. Wood T., Fletcher S. Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 527, p. 249.
60. Vretblad P. Ibid., 1976, v. 434, p. 169.
61. Schrader W. P., Stacy A. S., Pollara B. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 4026.
62. Choy P. C., Vance D. E. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, v. 72, p. 714.
63. Simons P. S., Van der Jagt D. L. Anal. Biochem., 1977, v. 82, p. 334.
64. Landt M., Boltz S. C., Butler L. G. Biochemistry, 1978, v. 17, p. 915.
65. Титовец Э. П. Биохимия, 1982, т. 47, с. 276.
66. Webber S., Harzer G., Whiteley J. M. Anal. Biochem., 1980, v. 106, p. 63.
67. Drobnik J., Vlasak J., Pilar J., Svec F., Kalal J. Enzyme Microb. Technol., 1979, v. 1, p. 107.
68. Tappeser B., Wellnitz D., Klamst D. Z. Pflanzenphysiol., 1981, B. 101, S. 295.
69. Schmidt H.-L., Grenner G. Europ. J. Biochem., 1976, v. 67, p. 295.
70. Митина В. Х., Клящицкий Б. А., Дубинина И. Г., Ворновицкая Г. И. Химия природн. соедин., 1980, № 1, с. 134.
71. Митина В. Х., Кляшицкий Б. А., Дубинина И. Г., Ворновицкая Г. И. Ж. общ. химии, 1981, т. 51, с. 217.
72. Weber W., Vogel C.-W., Hiltz H. FEBS Letters, 1979, v. 99, p. 62.
73. Barry S., Brodelius P., Mosbach K. Ibid., 1976, v. 70, p. 261.
74. Endo T., Tanaka T., Isobe T., Kasai H., Okuyama T., Hidaka H. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, p. 12485.
75. Vretblad P. FEBS Letters, 1974, v. 47, p. 86.
76. Waibel R., Amado R., Neukom H. J. Chromatogr., 1980, v. 197, p. 86.
77. Uy R., Wold F. Ibid., 1977, v. 81, p. 98.
78. Кляшицкий Б. А. Химия природн. соедин., 1979, т. 5, с. 709.
79. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfroge G. Nature, 1975, v. 258, p. 598.
80. Ohkubo I., Kondo T., Taniguchi N. Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 616, p. 89.
81. Guthenberg C., Akerfeldt K., Mannervik B. Acta Chem. Scand., 1979, v. B33, p. 595.

82. Гаспарян Н., Веневитинов М. Монатсн. Спец., 1979, в. 110, с. 823.
83. Bouriotis V., Galpin I. J., Dean P. D. G. J. Chromatogr., 1981, в. 210, р. 267.
84. Silvanovich M. P., Hill R. D. Anal. Biochem., 1976, в. 73, р. 430.
85. Бейер Е. М., Клящицкий Б. А., Видершайн Г. Я. Биоорган. химия, 1979, т. 5, с. 268.
86. Brophy P. J., Vance D. E. FEBS Letters, 1976, в. 62, р. 123.
87. Carlsson J. Hindustan Antibiot. Bull., 1978, в. 20, р. 105.
88. Wilchek M., Lamed R. In: Methods in Enzymology/Ed. by W. B. Jakoby, M. Wilchek, New York: Academic Press, 1974, в. 34, р. 475.
89. Усташ М. Б., Ремме Я.-А., Линд А. Я. Биоорган. химия, 1979, т. 5, с. 365.
90. Кузнецов П. В., Бондарь В. С. Тезисы докл. V Всесоюзн. симпоз. по физике и химии белков и пептидов. Баку, 1980, с. 82.
91. Бондарь В. С., Кузнецов П. В., Колесниченко Л. С. В сб.: Регуляторные эффекты и обмен моноаминов и циклонуклеотидов. Красноярск, 1981, вып. 3, с. 71.
92. Campbell P., Glover G. I. J. Solid-Phase Biochem., 1978, в. 3, р. 107.
93. Стрейкувена И. К., Некрашайте Г. И., Кулеш В. В. Тезисы Всесоюзн. конференции по перспективам использования биоспецифической хроматографии в технологии производства высокоочищенных ферментов. Вильнюс, 1982, с. 60.
94. Rosner W., Smith R. N. Biochemistry, 1975, в. 14, р. 4813.
95. Бондарь В. С., Кузнецов П. В., Межевикин В. В. Тр. III Всесоюзн. международной конференции по физико-химической биологии. Тбилиси: Изд. Тбилисского ун-та, 1982, с. 62.
96. Matsumoto I., Seno N., Golovtchenko-Matsumoto A. M., Osawa T. J. Biochem., 1980, в. 87, р. 535.
97. Cuatrecasas P., Parikh I. Biochemistry, 1972, в. 11, р. 2291.
98. Matsumoto I., Kitagaki H., Akai Y., Ito Y., Seno N. Anal. Biochem., 1981, в. 116, р. 103.
99. Larrea F., Musto N. A., Gunsalus G. L., Mather J. P., Bardin C. W. J. Biol. Chem., 1981, в. 256, р. 12566.
100. Клящицкий Б. А., Позднев В. Ф., Митина В. Х., Воскобоеv А. И., Черникевич И. П. Биоорган. химия, 1980, т. 6, с. 572.
101. Romanowska E., Lugowski C., Mulczyk M. FEBS Letters, 1976, в. 66, р. 82.
102. Fox J., Hechemy K. Infect. Immunol., 1978, в. 20, р. 867.
103. Berg K., Heron I., Hamilton R. Scand. J. Immunol., 1978, в. 8, р. 429.
104. Zola H. J. Immunol. Methods, 1978, в. 21, р. 51.
105. Ustasz M., Villems R., Lind A. FEBS Letters, 1977, в. 82, р. 259.
106. Усташ М. Б., Линд А. Я., Саарма М. Ю., Виллемс Р. Л.-Э. Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 1699.
107. Nagata K., Yoshida N. J. Biochem., 1981, в. 89, р. 1121.
108. Svec F., Kalal J., Menyailova I. I., Nakhapetyan L. A. Biotechnol. Bioeng., 1978, в. 20, р. 1319.
109. Ting H.-H., Whish W. J. D. Biochem. Soc. Trans., 1980, в. 8, р. 635.
110. Kagedal B., Kallberg M. Clin. Chim. Acta, 1977, в. 78, р. 103.
111. Бондарь В. С., Кузнецов П. В., Лихачева Л. А., Колесниченко Л. С. Тезисы Всесоюзн. конференции по перспективам использования биоспецифической хроматографии в технологии производства высокоочищенных ферментов. Вильнюс, 1982, с. 74.
112. Lonnerdal B., Carlsson J., Porath J. FEBS Letters, 1977, в. 75, р. 89.
113. Lebreton J. P. Ibid., 1977, в. 80, р. 351.
114. Edy V. G., Billiau S., De Somer P. J. Biol. Chem., 1977, в. 252, р. 5934.
115. Плаксина Е. А., Коломийченко Г. В., Склянкина В. А., Мевх А. Т., Аваева С. М. Биохимия, 1982, т. 47, с. 1483.
116. Slemon J. R., Salvaterra P. M., Crawford G. D., Roberts E. J. Biol. Chem., 1982, в. 257, р. 3847.
117. Мирошниченко О. И., Народицкий Б. С., Хилько С. Н., Платонова Т. Н., Грубер И. М., Тихоненко Т. И. Биохимия, 1982, т. 47, с. 686.
118. Armant D. R., Rutherford C. L. J. Biol. Chem., 1981, в. 256, р. 12710.
119. Упорова Т. М., Хилько С. Н., Никольская И. И., Дебов С. С. Вопросы мед. химии, 1982, т. 28, с. 78.
120. Shimomura Y., Ozawa T. Biochem. Intern., 1980, в. 1, р. 283.
121. Wu H.-L., Means G. E. Biotechnol. Bioeng., 1981, в. 23, р. 855.
122. Pasanen M., Pelkonen O. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1981, в. 103, р. 1310.
123. Begley J. A., Heckman S. M., Hall C. A. Ibid., 1981, в. 103, р. 434.
124. Gopalakrishna R., Anderson W. B. Ibid., 1982, в. 104, р. 830.
125. Ryden L., Deutsch H. F. J. Biol. Chem., 1978, в. 253, р. 519.
126. Hillson D. A., Freedman R. B. Biochem. Soc. Trans., 1979, в. 7, р. 573.
127. Svenson A., Carlsson J., Eaker D. FEBS Letters, 1977, в. 73, р. 171.
128. Dale R. M. K., Ward D. S. Biochemistry, 1975, в. 14, р. 2458.
129. Hillson D. A., Freedman R. B. Biochem. J., 1980, в. 191, р. 389.
130. Brocklehurst K., Baines B. B., Malthouse J. P. G. Ibid., 1981, в. 197, р. 739.
131. Kitson T. M. J. Chromatogr., 1982, в. 234, р. 181.
132. Колдвелл К., Аксен Р., Мевх А. Т. Биоорган. химия, 1978, т. 4, с. 707.
133. Sage B. A., O'Connor J. D. Anal. Biochem., 1976, в. 73, р. 240.
134. Предко А. Г., Свиридов О. В. Тезисы докл. VII конференции молодых ученых «Синтез и исследование биологически активных соединений». Рига: Зинатне, 1981, с. 105.

- M. Wilchek. New York: Academic Press, 1974, v. 34, p. 108.
136. Porath J. Biochimie, 1973, v. 55, p. 943.
137. Kohn J., Wilchek M. Enzyme Microb. Technol., 1982, v. 4, p. 161.
138. Kohn J., Wilchek M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, v. 107, p. 878.
139. Nilsson K., Mosbach K. Europ. J. Biochem., 1980, v. 112, p. 397.
140. Nilsson K., Mosbach K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1981, v. 102, p. 449.
141. Bethell G. S., Ayers J. S., Hancock W. S., Hearn M. T. W. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 2574.
142. Bethell G. S., Ayers J. S., Hearn M. T. W., Hancock W. S. J. Chromatogr., 1981, v. 219, p. 353.
143. Groff J. L., Cherniak R., Jones R. G. Carbohydr. Res., 1982, v. 101, p. 168.
144. Wilchek M., Miron T. Biochem. Intern., 1982, v. 4, p. 629.

Институт биологической и медицинской  
химии АМН СССР, Москва;  
Кемеровский государственный  
медицинский институт