

УДК 541.64:547.458

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ВИНИЛСАХАРИДОВ И ПОЛИМЕРЫ НА ИХ ОСНОВЕ¹

© 1998 г. Е. Ф. Панарин, Н. П. Иванова, Е. Е. Кевер

Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук
199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31

Поступила в редакцию 24.04.97 г.

Принята в печать 20.08.97 г.

Разработан одностадийный метод синтеза винилсахаридов с использованием протеолитических ферментов – щелочной протеазы, трипсина и террилитина. Наибольшей активностью обладает щелочная протеаза, обеспечивающая высокую региоселективность ацилирования углеводов и позволяющая получать моноэфиры сахаров и ненасыщенных карбоновых кислот (акриловой, метакриловой и кротоновой) с выходом до 93%. Проведено сопоставление реакционной способности ряда активированных эфиров ненасыщенных карбоновых кислот и показано, что эфиры 2,3-бутандион-монооксима являются наиболее реакционноспособными. Путем радикальной гомополимеризации 6-О-метакрилоилглюкозы и ее сополимеризации с винилпирролидоном получены нетоксичные, неиммуногенные водорастворимые полимеры с широким диапазоном ММ, которые могут быть использованы в качестве носителей биологически активных веществ.

Направленный транспорт лекарственного вещества в определенную клетку или орган является важной проблемой химиотерапии, которая решается с помощью нескольких подходов, заключающихся в использовании макромолекул, несущих лиганды, специфически взаимодействующие с клетками. Один подход состоит в следующем: целеузнающими векторами служат специфические антитела с присоединенными к ним лекарственными веществами [1, 2]. Такого рода конъюгаты применяются чаще всего для направленного транспорта в опухолевые клетки цитостатиков, обладающих высокой токсичностью.

Другой подход заключается в использовании белков или полипептидов в качестве носителей лекарственных веществ [3, 4]. В этом случае макромолекула, несущая углеводный фрагмент в качестве узнающего лиганда, специфически взаимодействует с поверхностными клеточными рецепторами (лектинами), настроенными на определенный углевод, связывается с клеткой и затем транспортируется внутрь клетки путем эндоцитоза.

При использовании модифицированного углеводами сывороточного альбумина [5] и полилизина [6] была продемонстрирована высокая тканевая специфичность таких гликоконъюгатов в зависимости от модифицирующего углевода и его содержания в полимере-носителе. Так, полилизин, модифицированный галактозой, лактозой и

N-ацетилгалактозамином, предпочтительно локализовался в печени; модифицированный ксилизой – в печени и легких, маннозой – в селезенке и печени, а фруктозой – в тканях мозговых костей. При этом степень кумуляции возрастает с повышением ММ полимера и содержания в нем углевода. Однако иммуногенность белков и полипептидов ограничивает возможности их использования в качестве полимеров-носителей. В связи с этим представляется перспективным использовать для направленного транспорта поливинилсахариды – водорастворимые полимеры, представляющие собой карбоцепные гибридные макромолекулы, несущие в боковых цепяхmono-, di- или олигосахаридные фрагменты, присоединенные к основной цепи посредством различных мостиковых групп и связей – амидных, сложноэфирных, простых эфирных, гидразидных и других.

Можно полагать, что макромолекулы поливинилсахаридов также будут обладать средством к лектинам, к тканям определенных органов, а, следовательно, могут быть использованы как носители, обеспечивающие направленный транспорт присоединенных к ним лекарственных веществ в нужный орган. Этому должна способствовать высокая плотность углеводных фрагментов, связанных с основной полимерной цепью.

Поливинилсахариды получают как путем полимеризации соответствующих виниловых мономеров, содержащих различные углеводы [7–11], так и взаимодействием реакционноспособного полимера с активированным производным углевода

¹ Работа представлена на Международной конференции “Фундаментальные проблемы науки о полимерах” (к 90-летию академика В.А. Каргина). Москва, 21–23 января 1997 г.

[6, 12, 13]. Присоединение углевода к полимерной цепи или селективное введение одной виниловой группы в молекулу углевода представляет собой достаточно сложную синтетическую задачу. Это обусловлено наличием в углеводах большого числа гидроксильных групп, близких по реакционной способности. Например, глюкоза содержит пять гидроксильных групп, а сахароза – восемь, причем три из них являются первичными и очень близкими по реакционной способности.

В связи с этим для синтеза винилсахаридов, например акрилатов, метакрилатов, виниловых и аллиловых эфиров с высокой региоселективностью, необходимо использовать различные защитные группы [7]. Чаще всего для этих целей служат динизопропиленовые [8], ацетильные [14, 15], которые достаточно легко удаляются после проведения полимеризации. Если брать аминосахара, задача упрощается, и прямым ацилированием без использования защитных групп удается ввести остаток ненасыщенной карбоновой кислоты в молекулу углевода. Таким путем получены акрилоил- и метакрилоиламиноглюкоза [16, 17].

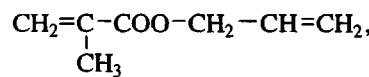
К настоящему времени с помощью классических синтетических методов синтезирован ряд винилсахаридов с амидной сложноэфирной и простой эфирной связью между виниловой группой и углеводным фрагментом и получены различные водорастворимые и сущие гомо- и сополимеры [8–11, 16, 18, 19]. Следует подчеркнуть, что снятие защитных групп в полимере в ряде случаев происходит с трудом и сопровождается частичным гидролизом сложноэфирной связи.

Трудоемкость и многостадийность традиционных способов синтеза винилсахаридов стимулировали поиск более простых методов. Последние успехи ферментативного катализа в неводных средах показали [20], что ферменты могут быть успешно применены для синтеза и модификации различных полигидроксисоединений, включая углеводы. Высокая региоселективность превращений, катализируемых липазами, протеазами, глюказидазами, дает возможность осуществлять одностадийный синтез монозамещенных сложных [21–23] и простых [24, 25] эфиров углеводов без использования защитных групп, в том числе и ненасыщенных производных сахаридов. В частности, если ацилирующим агентом служил винилакрилат, в присутствии алкалазы 2-T получена моноакрилоилсахароза [26], имеющая акриильный заместитель в 1'-положении фуранозного кольца, а при использовании липазы Р – серия 6-акрилоил-β-галактозидов [27].

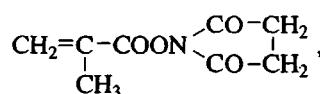
Путем реакции трансгликозирования лактозы, мальтозы и целлобиозы в воде при использовании в качестве гликозильных акцепторов пропаргилового и аллилового спиртов в присутствии

галактозидазы и глюказидазы получены аллиловые и пропаргиловые эфиры глюкозы и галактозы, способные к гомополимеризации [28]. β-Галактозидаза оказалась также эффективна при проведении реакции трансгликозирования между 2-гидроксиэтилметакрилатом и *n*-*o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозидом, что позволило с хорошим выходом получить 2-метакрилоилоксиятил-β-D-галактопиранозид [29]. Следует отметить, что успешное проведение этих реакций в значительной степени определяется активностью и специфичностью фермента, его устойчивостью в органическом растворителе, строением углевода и ацилирующего агента.

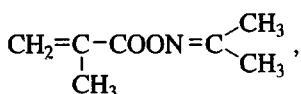
Цель настоящей работы – выяснение возможности использования доступных протеолитических ферментов трипсина, террилитина и щелочной протеазы для энзиматического синтеза акрилатов, метакрилатов и кротонатов некоторых углеводов, а также поиск реакционноспособных ацилирующих агентов в ряду активированных эфиров акриловой, метакриловой, кротоновой кислоты. Высокая гидрофильность сахаров ограничивает выбор наиболее подходящих органических растворителей. Моно- и дисахариды растворяются только в некоторых полярных растворителях, таких как ДМСО, пиридин и ДМФА, 2-пирролидон. Вместе с тем многие ферменты теряют каталитическую активность в указанных растворителях, поэтому выбор подходящего растворителя часто становится определяющим фактором при проведении энзиматической переэтерификации [23, 30]. Предварительные опыты по оценке устойчивости выбранных ферментов в данных растворителях показали преимущество пиридина, и все исследования по ацилированию углеводов были выполнены нами в этом растворителе. Наряду с подбором фермента и растворителя выбор ацилирующего агента также чрезвычайно важен, поскольку он является первым субстратом для фермента в ходе реакции, и в зависимости от его строения возможно протекание реакции гидролиза конечного продукта вследствие обратимости реакции этерификации. В качестве активированных ацильных доноров использовали аллилметакрилат (АМ)



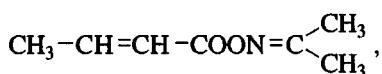
гидроксисукцинидный эфир метакриловой кислоты (ГСИМ)



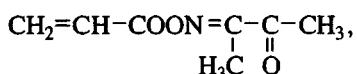
а также оксимоэфиры: 2-пропанон-О-метакрилоилоксим (2-ПМО)



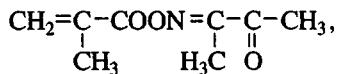
2-пропанон-О-кротоноилоксим (2-ПКО)



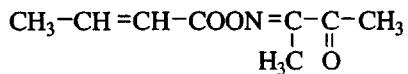
2,3-бутандион-О-акрилоилоксим (2,3-БАО)



2,3-бутандион-О-метакрилоилоксим (2,3-БМО)



2,3-бутандион-О-кротоноилоксим (2,3-БКО)

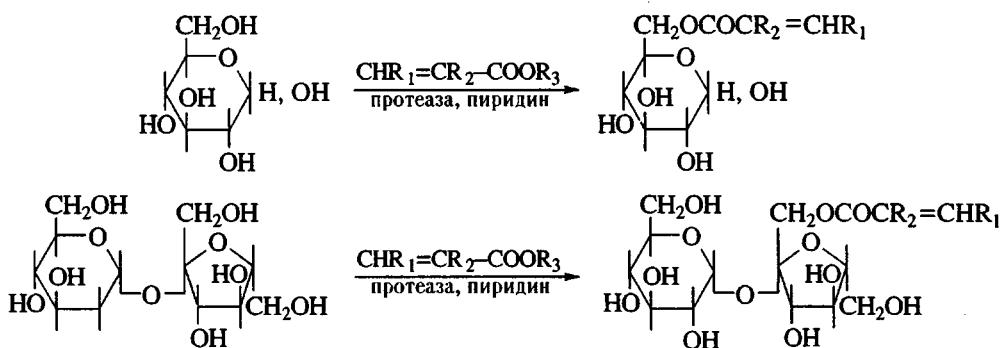


Оксимоэфиры представляют особый интерес, поскольку после взаимодействия с углеводом образующийся енол изомеризуется в кетон или альдегид, вследствие чего реакция ацилирования становится необратимой [31].

Ацилирование углеводов указанными активированными эфирами проводили в пиридине в атмосфере инертного газа в присутствии гидрохи-

иона как ингибитора полимеризации при 22 и 45°C. Поскольку фермент в пиридине не растворяется, после окончания реакции он отделялся на фильтре и мог быть повторно использован.

Если ацильным донором служит аллилметакрилат, а субстратом – глюкоза, то была оценена катализическая активность ферментов и установлено, что все протеазы катализируют этерификацию глюкозы, однако по своей активности трипсин и террилитин существенно уступают щелочной протеазе, которая и применялась во всех последующих синтезах. За реакцией этерификации глюкозы следили по появлению эфира глюкозы, тестируя его с помощью ТСХ, а глубину превращения определяли методом ВЭЖХ в системе ацетонитрил : вода = 75 : 25 [32]. Строение полученных эфиров было подтверждено методом спектроскопии ЯМР ^{13}C и ПМР. Сравнение ЯМР-спектров исходной и этерифицированной глюкозы выявило смещение сигналов двух протонов Н-6 в эфирах на 0.5 м. д. в сторону низких полей (относительно 3.7–3.9 м. д. в незамещенной глюкозе). Спектры ЯМР ^{13}C показали смещение сигнала С-6 от 61.8 до 64.1 м. д., что также свидетельствует о протекании реакции по первичной С-6 гидроксильной группе. Сравнение спектров ЯМР ^{13}C исходной и ацилированной сахарозы выявило изменение хим. сдвига для углеродных атомов, ближайших к возможным местам замещения при С-1' и С-6'. Это указывает на то, что ацилируется гидроксильная группа, находящаяся в одном из этих положений. Таким образом, под действием щелочной протеазы сахароза ацилируется по фруктозному кольцу, глюказная часть молекулы остается незамещенной, а глюкоза ацилируется по первичной гидроксильной группе:



Вместе с тем следует отметить, что данные ТСХ и ВЭЖХ продуктов реакции ацилирования глюкозы и сахарозы указывают на присутствие одного или двух побочных продуктов, которые по своей подвижности близки к основному. Вероятнее всего в случае глюкозы это эфиры, содержа-

щие ацильные остатки при С-2 и С-3 углеродном атоме, а в случае сахарозы при С-6'. Подобная высокая специфичность ацилирования глюкозы и сахарозы отмечена при использовании протеолитического фермента субтилизина [23] в безводном ДМФА.

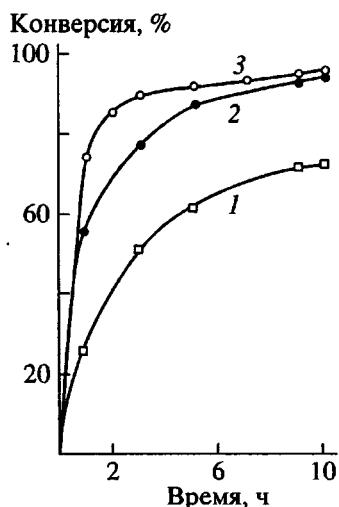


Рис. 1. Влияние концентрации фермента в реакционной смеси на скорость ацилирования глюкозы 2,3-БМО при 45°C в пиридине. 1 – 15, 2 – 30, 3 – 60 мг/мл.

Более детальное изучение реакции ацилирования глюкозы активированными эфирами ненасыщенных карбоновых кислот позволило выявить влияние концентрации фермента, температурного фактора, соотношения реагентов (углевод : ацилирующий агент), строения ацилирующего эфира на скорость реакции и выход моноэфиров глюкозы. Оказалось, что скорость реакции существенно зависит от количества фермента, супензированного в реакционной смеси (рис. 1) и в меньшей степени от избытка ацилирующего эфира (табл. 1). Двукратного избытка ацилирующего агента вполне достаточно для достижения высоких степеней превращения (93–95%).

Повышение содержания фермента в реакционной смеси от 15 до 60 мг/мл способствует увеличению выхода и резкому сокращению продолжительности реакции, которая в большинстве

Таблица 1. Влияние концентрации 2,3-БМО на начальную скорость ацилирования глюкозы в присутствии щелочной протеазы при 45°C в пиридине ([глюкоза] = 0.1 моль/л; [протеаза] = 60 мг/мл)

[2,3-БМО], моли	v, ммоль/мин	Конверсия глюкозы за 5 ч
0.1	2.1	74.7
0.2	2.8	93.5
0.3	2.8	95.0
0.5	2.8	93.0

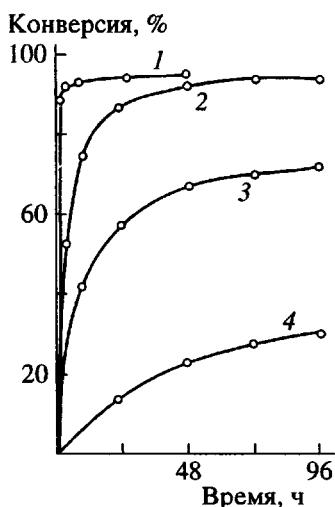


Рис. 2. Зависимость скорости ацилирования глюкозы от строения ацилирующего агента при 45°C в пиридине: 1 – 2,3-БМО, 2 – 2,3-БКО, 3 – 2,3-БАО, 4 – АМ. [глюкоза] = 0.1 моль/л, [фермент] = 60 мг/мл, [глюкоза : ацилирующий агент] = 1 : 2.

случаев [21, 23] достигает нескольких суток. Следует отметить, что для каждого конкретного фермента оптимальное его содержание в реакционной среде находится экспериментально и обычно колеблется в интервале 10–200 мг/мл. Поскольку ферменты являются лабильными катализаторами, существует температурный интервал, в котором может быть использован тот или иной фермент. Как правило ферментативное ацилирование проводят в интервале 20–60°C. Нами найдено, что щелочная протеаза выдерживает повышение температуры до 45°C в пиридине без заметного снижения своей катализитической активности в течение суток. Учитывая высокую скорость реакции (табл. 1) и стабильность фермента в этих условиях, удалось многократно использовать его после отделения от продуктов реакции фильтрованием. Сравнительный анализ ацилирования глюкозы использованными в работе активированными эфирами акриловой, метакриловой и кротоновой кислоты показал существенное влияние на реакционную способность не только спиртового, но и кислотного фрагмента молекулы эфира.

Из семи исследованных активированных эфиров ненасыщенных карбоновых кислот наибольшую ацилирующую активность проявляют оксимоэфиры 2,3-бутандионмонооксими, а наиболее низкую аллилметакрилат (рис. 2). Оксимоэфиры 2-пропанонооксими и N-гидроксисукцинимидный эфир метакриловой кислоты занимают промежуточное положение. Низкая реакционная способность аллилметакрилата связана, возможно, с

Таблица 2. Этерификация глюкозы активированными эфирами ненасыщенных карбоновых кислот $\text{CHR}_1=\text{CR}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OX}$, катализируемая щелочной протеазой

Ацилирующий агент	R_1	R_2	X	Время реакции, ч	Конверсия глюкозы	Селективность, %
2,3-БАО	H	H	$-\text{N}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COCH}_3$	48	57.2	77
2,3-БМО	H	CH_3	$-\text{N}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COCH}_3$	5	93.8	85
2,3-БКО	CH_3	H	$-\text{N}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COCH}_3$	48	82.7	81
2-ПМО	H	CH_3	$-\text{N}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	48	78.0	—
N-ГСИМ	H	CH_3	$-\text{N}(\text{COCH}_2)_2$	48	62.0	—
АМ	H	CH_3	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	48	22.5	—

обратимостью реакции, чего нет в случае использования других ацилирующих агентов. По своей ацилирующей способности оксимоэфиры 2,3-бутандионмооксима располагаются в ряд метакриловый > кротоновый > акриловый.

Следует подчеркнуть, что природа ацилирующего агента влияет не только на скорость реакции, но, что немаловажно, на ее селективность. Применяя специальную систему растворителей, методом ВЭЖХ удалось отделить побочные продукты от основного при ацилировании глюкозы и оценить степень селективности ацилирования при использовании различных ацилирующих агентов. Оказалось, что наибольшая селективность достигается при синтезе метакрилового и кротонового эфиров глюкозы (табл. 2).

Сравнение скорости ацилирования исследованных углеводов 2,3-бутандион-О-метакрилоилоксимом выявило их различную чувствительность к данному ацилирующему агенту. Хотя различие в скорости ацилирования углеводов не очень большое, однако их можно расположить в следующий ряд: сахароза > глюкоза > фруктоза (рис. 3). Большая реакционная способность сахарозы, возможно, связана с большей стабильностью фермент-субстратного комплекса, образованного за счет большего числа водородных связей.

В ферментативном катализе в неводных органических растворителях важную роль играет вода, которая практически всегда ассоциирована с ферментом. Полное освобождение фермента от ассоциированной воды приводит иногда к изменению его специфичности и активности [20]. При ацилировании сахаров в присутствии липаз, наиболее часто используемых для этих целей, содержание воды не превышает 0.01–0.02% [23]. Как правило оптимальное количество воды для каждого фермента находится экспериментальным путем. Оказалось, что щелочная протеаза, ис-

пользуемая нами при ацилировании сахаров, в отличие от липаз не требует жестких ограничений по содержанию влаги (табл. 3). Реакция прекращается только в случае полного отсутствия воды. Добавление небольшого количества воды в реакционную смесь даже повышало начальную скорость реакции. При этом выявлена экстремальная зависимость скорости реакции от содержания воды. Оптимальным для проведения ацилирования глюкозы оказалось 3–4% воды в реакционной смеси.

Высокий выход и селективность при ацилировании глюкозы позволили в препаративном масштабе синтезировать C-6 акрилоильный, метакрилоильный и кротоноильный моноэфиры глюкозы (табл. 4), которые оказались активными виниловыми мономерами, способными к гомо- и

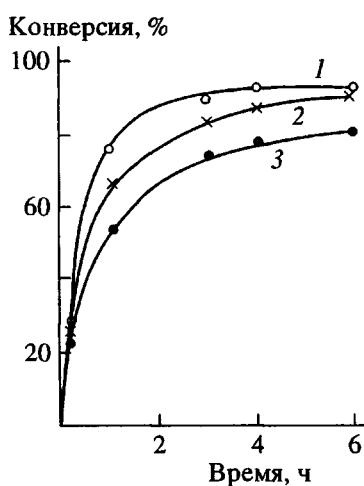
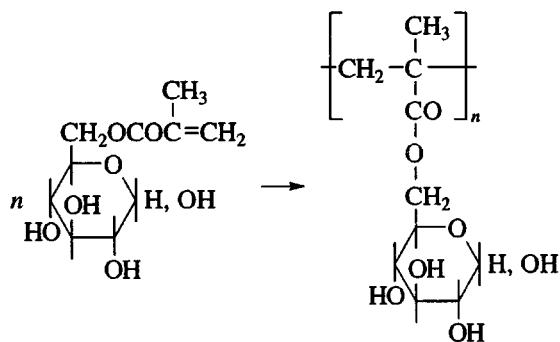


Рис. 3. Ацилирование 2,3-БМО (0.2 моль/л) сахарозы (1), глюкозы (2) и фруктозы (3) (концентрация углеводов 0.1 моль/л) в пиридине при 45°C в присутствии щелочной протеазы (60 мг/мл).

Таблица 3. Зависимость начальной скорости ацилирования глюкозы 2,3-БМО, катализируемого щелочной протеазой в пиридине от содержания воды при 45°C ([2,3-БМО] : [глюкоза] = 2 : 1)

Концентрация воды, об. %	Начальная скорость реакции v , ммоль/мин
0	0
2.2	0.40
3.6	0.85
6.2	0.55
9.3	0.50

сополимеризации в присутствии инициаторов радикального типа.



Гомополимеризацию 6-О-метакрилоилглюкозы (6-О-МГ) проводили в воде или ДМФА, полимеры выделяли осаждением в метанол. Условия полимеризации и некоторые свойства поли-6-О-МГ представлены в табл. 5. В зависимости от условий полимеризации получаются полимеры с широким диапазоном ММ.

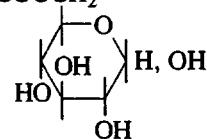
Поли-6-О-МГ – водорастворимый полимер, обладает значительной устойчивостью к гидролизу.

При хранении его водных растворов наблюдается незначительное отщепление глюкозных остатков, что удается тестировать лишь методом ТСХ. Степень гидролиза невелика, но появление свободных карбоксильных групп в полимере обуславливает полиэлектролитное набухание в воде. Поли-6-О-МГ – биосовместимый полимер, обладает низкой токсичностью и проявляет иммуностимулирующую активность, что позволяет рассматривать его как потенциальный полимер-носитель биологически активных веществ.

6-О-МГ и 6-О-кетоноилглюкоза (6-О-КГ) хорошо сополимеризуются с винилпирролидоном, образуя сополимеры различного состава и ММ; таким образом, в ПВП, который широко используется для модификации биологически активных и лекарственных веществ, были введены лиганда, способные к специальному взаимодействию с клетками. Условия сополимеризации 6-О-МГ и 6-О-КГ с винилпирролидоном и некоторые свойства полученных сополимеров представлены в табл. 6. При сополимеризации винилпирролидона с 6-О-МГ и 6-О-КГ наблюдается тенденция снижения ММ с увеличением содержания винилсахарида в исходной смеси. Полученные сополимеры содержали до 20 мол. % винилсахарида, хорошо растворялись в воде, имели ММ, приемлемую для полимера-носителя. Как и гомополимеры 6-О-МГ, они обладали низкой токсичностью при внутрибрюшинном введении их водных растворов белым мышам.

Таким образом, показана перспективность применения ферментативного катализа с использованием щелочной протеазы для синтезаmonoзамещенных винилсахаридов – эфиров ненасыщенных карбоновых кислот. Установлено, что эффективность и селективность реакции зависят от углевода и строения ненасыщенного ацилирующего агента. Получены водорастворимые гомо- и сополимеры на основе 6-О-МГ и 6-О-КГ,

Таблица 4. Некоторые характеристики ненасыщенных эфиров глюкозы $\text{CHR}_1=\text{CR}_2\text{COOCH}_2$



R_1	R_2	$[\alpha]_D^{20}$ (концентрация растворителя)	R_f^*	Найдено, %		Вычислено, %	
				C	H	C	H
H	H	44.94 (0.9 ДМФА)	0.75	45.96	6.13	46.16	6.03
CH_3	H	52.64 (1.0 H_2O)	0.74	48.53	6.15	48.39	6.50
H	CH_3	36.42 (1.0 H_2O)	0.74	48.20	6.02	48.39	6.50

* Элюент – этилацетат : 2-пропанол : вода = 5 : 3.2 : 1.6.

Таблица 5. Условия полимеризации 6-О-МГ и свойства поли-6-О-МГ

Опыт	[6-О-МГ], моль/л	Растворитель	Инициатор	[I], мас. %	Выход, мас. %	[η] (ДМФА, 25°C), дл/г	$M_{SD} \times 10^{-3}$
			I				
1	0.48	ДМФА	ДАК	1.0	65.7	0.17	56
2	0.96	»	»	2.0	81.2	0.15	—
3	1.20	H ₂ O	ДАГ	1.0	77.5	1.19	785
4	0.63	»	»	1.0	60.2	0.57	126
5	0.48	»	УФ-облучение (3ч)	—	56.0	0.50	—

Примечание. В опытах 1–4 $T = 60^\circ\text{C}$, ДАГ – 2,2-азо-бис-(2-метилпропандиамин)дигидрохлорид.

Таблица 6. Сополимеризация ВП(M_1) с винилсахаридами (M_2) в ДМФА при 60°C (инициатор ДАК, 1 мас. %)

M_2	Состав исходной смеси, мол. %		Выход за 24 ч, мас. %	Содержание m_2	[η] (ДМФА, 25°C), дл/г	$\bar{M}_v \times 10^{-3}$
	M_1	M_2				
6-О-МГ	95	5	62.1	6.1	0.21	44
	90	10		9.4	0.25	50
	85	15		13.9	0.18	38
	75	25		21.5	0.14	26
	90	10		8.5	0.19	41
6-О-КГ	85	15	71.4	14.1	0.15	27
	80	20	72.6	18.4	0.08	9

обладающие низкой токсичностью, перспективные для биомедицинского применения в качестве полимеров-носителей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ферментные препараты протеаз: террилитина ("Феррейн", Россия), трипсина ("Скофа", Чехия), щелочной протеазы II (ПО "Энзим", Украина). Препарат протеазы очищали путем супензирования в 0.1 М фосфатном буфере (рН 8.0), центрифугирования для отделения примесей и последующей лиофильной сушки. Применили глюкозу, фруктозу, сахарозу квалификации ч. д. а. Аллилметакрилат очищали перегонкой в вакууме.

N-Гидроксисукцинимидный эфир метакриловой кислоты синтезировали по известному методу [33].

2-Пропанон-О-метакрилоилоксим, 2-пропанон-О-крутоноил-оксим, 2,3-бутандион-О-акрилоилоксим, 2,3-бутандион-О-метакрилоилоксим и 2,3-бутандион-О-крутоноилоксим синтезировали взаимодействием 2-пропаноноксима и 2,3-бутандионмонооксима с хлорангидридами соответствую-

щих карбоновых кислот в ТГФ в присутствии триэтиламина [32, 34]. 2,3-Бутандионмонооксим получали из метилэтилкетона и изобутиронитрила по методу [35]. Пиридин (ч. д. а.) сушили и перегоняли над KOH.

ТСХ проводили на пластинах АТСХ фирмы "Ленхром", использовали элюентную смесь этилацетат : изопропиловый спирт : вода = 5.0 : 3.2 : 1.6, проявление проводили смесью анилина с дифениламином [36].

Скорость этерификации и степень превращения оценивали методом ВЭЖХ по убыли соответствующих сахаров. ВЭЖХ осуществляли на хроматографе ХЖ-1309 с лазерным рефрактометрическим детектором [37] на микроколонке, заполненной "Lichosorb-NH₂" с элюентом ацетонитрил : вода = 75 : 25, хроматограммы обрабатывали методом внутренней нормализации.

Для колоночной хроматографии использовали силикагель 100–250 мкм (Чехия), элюентом служила смесь этилацетат : метанол : вода = 18 : 1.25 : 1.

Оптическое вращение измеряли на ультраспектрополяриметре "Pepol-60" (Англия) при 589 нм (линия натрия) и 20°C.

Спектры ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C записывали на приборе "Bruker AC-200" (ФРГ) с рабочими частотами 200 (^1H) и 50 МГц (^{13}C) в ДМФА- d_7 или D_2O , при комнатной температуре. Внутренний стандарт – тетраметилсилан.

Реакцию ацилирования осуществляли в термостатируемом сосуде в атмосфере аргона при перемешивании магнитной мешалкой в присутствии гидрохинона 0.002 мг/мл, за ходом реакции следили, отбирая реакционную смесь и анализируя ее после отделения фермента на фильтре на наличие углеводов методом ТСХ.

Полимеризацию проводили в запаянных ампулах при 60°C, полимер выделяли осаждением в метанол и очищали переосаждением из воды в метанол.

Сополимеризацию с винилпирролидоном осуществляли в растворе ДМФА, и сополимеры выделяли осаждением в ацетон. Характеристическую вязкость определяли в вискозиметре Уббелоде.

Авторы выражают благодарность за помощь в работе Г.А. Казаниной и В.И. Денисову.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 94-03-082252).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pieters G.A., McKenzie J.F.C. // Immunol. Rev. 1992. V. 129. P. 57.
2. Umemoto N., Kato Y., Hara T. // J. Bioactive and Compat. Polym. 1992. V. 17. P. 191.
3. Fiume L., Bassi B., Busi C., Mattioli A., Spinoza G. // Biochem. Pharmacol. 1986. V. 35. P. 967.
4. Monsigni M., Roche A.-C., Mayer R., Midoux P., Negre E., Bongils E. // NATO ASI Series VH62. Endocytosis / Ed. by Courtoy P.I. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1992. P. 489.
5. Abraham A., Nair M.G., Kislink R.L., Guamont Y., Gatlivan I. // J. Med. Chem. 1990. V. 33. P. 711.
6. Gonsho A., Irie K., Iwasawa H., Okuno S., Sugawara T. // Biol. Pharm. Bull. 1994. V. 17. № 2. P. 275.
7. Haines A.H. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1981. V. 39. P. 13.
8. Kimura S., Imoto M. // Makromol. Chem. 1961. B. 50. S. 155.
9. Klein J., Blumberg K. // Makromol. Chem. 1988. B. 189. № 4. S. 805.
10. Carpino L.A., Ringsdorf H., Ritter H. // Makromol. Chem. 1976. B. 177. № 5. S. 1631.
11. Pavlov G.M., Ivanova N.P., Korneeva E.V., Michailova N.A., Panarin E.F. // J. Carbohydrate Chem. 1996. V. 15. № 4. P. 4191.
12. Jonas G., Stadler R. // Makromol. Chem., Rapid. Commun. 1991. V. 12. № 11. P. 625.
13. Kobayashi K., Sumitomo H., Ina Y. // Polym. J. 1983. V. 15. № 5. P. 667.
14. Park W.K.C., Aravind S., Romanovska A., Renand J., Roy Rene // Methods in Enzymology. New York: Acad. Press, 1994. V. 242. P. 294.
15. Пленис Э.Б., Перникис Р.Я. // Химия древесины. 1993. № 5. С. 25.
16. Klein J., Herzog D. // Makromol. Chem. 1987. B. 188. № 6. S. 1217.
17. Iwakura I., Imai Y., Gagi K. // J. Polym. Sci. A-1. 1968. V. 6. № 6. P. 1625.
18. Klein J., Kovalczyk J., Engelke S., Kunz M., Puke H. // Makromol. Chem., Rapid. Commun. 1990. V. 11. № 10. P. 477.
19. Roy R., Laferriere C.A. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1990. № 23. P. 1709.
20. Druckhammer D.G., Hennen W.I., Pederson R.L., Barbas C.F., Gantheron Ch.M., Krach T., Wong Ch.-H. // Synthesis. 1991. № 7. P. 499.
21. Pulido R., Ortiz F.J., Gotor V. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. I. 1992. № 21. P. 2891.
22. Therisod M., Klibanov A.M. // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 18. P. 5638.
23. Riva S., Chopineau J., Kieboom P.G., Klibanov A.M. // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110. № 2. P. 584.
24. Björkling F., Godtfredson S.E. // Tetrahedron. 1988. V. 44. № 10. P. 2957.
25. Gals H.-J., Zeissler A., Maidonis P. // Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 45. P. 5743.
26. Dordick J.S. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992. V. 672. P. 352.
27. Martin B.D., Ampofo S.A., Linhardt R.J., Dordick J.S. // Macromolecules. 1992. V. 25. № 26. P. 7081.
28. Blinkovsky A.M., Dordick J.S. // Tetrahedron : Assymetry. 1993. V. 4. № 6. P. 1221.
29. Ohno K., Sohda K., Kosaka A., Kitano H. // Bioconjugate Chem. 1995. № 6. P. 361.
30. Valivety R.K., Johnston G.A., Suckling C.J., Halling P.J. // Biotechnol. / Bioeng. 1991. V. 38. № 10. P. 1137.
31. Ghogare A., Kumar G.S. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1989. № 20. P. 1533.

32. Иванова Н.П., Панарин Е.Ф., Казанина Г.А., Кевер Е.Е., Малахова И.И., Денисов В.М. // Журн. общ. химии. 1995. Т. 65. № 11. С. 1885.
33. Nazarova O.V., Solovskiy M.V., Panarin E.F. // Eur. Polym. J. 1992. V. 28. № 1. P. 57.
34. Владимирова И.Л., Мельникова Н.И. // Журн. общ. химии. 1961. Т. 31. № 3. С. 851.
35. Дыханов Н.И., Егунова Л.М. // Методы получения химических реагентов и препаратов. М.: ИРЕА. 1964. Вып. 10. С. 62.
36. Полюдек-Фабини Р., Бейрих Т. Органический анализ. Л.: Химия, 1981. С. 510.
37. Беленький Б.Г., Кевер Е.Е. // Науч. приборостр. 1991. Т. 1. С. 9.

Enzymatic Synthesis of Vinyl Saccharide and Related Polymers

E. F. Panarin, N. P. Ivanova, and E. E. Kever

*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia*

Abstract—A one-step method for the synthesis of vinyl saccharides using proteolytic enzymes—alkaline protease, trypsin, and terrilytin—was developed. Alkaline protease, which shows the highest activity, provides high regioselectivity in the acylation of carbohydrates and allows preparation of monoesters of sugars and unsaturated carboxylic acids (acrylic, methacrylic, and crotonic) with a yield of up to 93%. The reactivities of a series of activated esters of unsaturated carboxylic acids were compared, and it was shown that the esters of 2,3-butanedione monoxime are most reactive. Free-radical homopolymerization of 6-O-methacryloyl glucose and its copolymerization with vinylpyrrolidone yielded nontoxic, nonimmunogenic water-soluble polymers having a wide range of molecular masses, which offer promise as carriers for biologically active compounds.