

УДК 678.644'142

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ В БИОХИМИИ

И. Н. Топчиева

Приведен анализ литературных данных по использованию полиэтиленгликоля (ПЭГ) в биохимии и молекулярной биологии с позиций физико-химии полимеров. Рассмотрены эксклюзионные свойства ПЭГ, используемые в качестве фактора, влияющего на скорость ферментативных реакций, осуществление внутри- и межмолекулярных переходов в полимерах и на процессы осаждения и кристаллизации биополимеров. Обсуждена применимость трехкомпонентных систем ПЭГ — декстран — вода для очистки и разделения смесей биополимеров и в аналитических целях. Обсуждены возможности использования функциональных производных ПЭГ в иммунологических исследованиях и в целях иммобилизации ферментов. Специальный раздел посвящен синтезу производных ПЭГ, содержащих различные функциональные группы на концах полимерной цепи. Рассмотрены поверхностно-активные свойства ПЭГ.

Библиография — 78 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	494
II. Эксклюзионные свойства полиэтиленгликоля	495
III. Использование трехкомпонентных систем полиэтиленгликоль — декстран — вода в препаративных и аналитических целях	500
IV. Биохимические аспекты применения моно- и бифункциональных производных полиэтиленгликоля	505
V. Поверхностно-активные свойства полиэтиленгликоля	508
VI. Синтез двузамещенных производных полиэтиленгликоля	509

I. ВВЕДЕНИЕ

Интерес к полиэтиленгликолю (ПЭГ) в последнее время стимулируется успешным применением его в биохимии и молекулярной биологии, где этот полимер широко используется в различного рода исследованиях. Анализ литературных данных показывает, что накопленный биохимиками опыт использования ПЭГ (главным образом его водных растворов) с целью очистки и разделения природных веществ, а также в аналитических целях, может быть обобщен и с успехом применен для решения некоторых задач физико-химии высокомолекулярных соединений. С другой стороны, эти исследования ставят вопрос о необходимости более подробного изучения химических и физико-химических свойств ПЭГ, в частности, реакций с участием его концевых групп.

Кроме того, имеется ряд исследований по влиянию ПЭГ на некоторые процессы, протекающие в живых объектах. Это в свою очередь ставит перед химиками вопрос об изучении молекулярных механизмов таких воздействий и открывает новые перспективы в изучении физико-химических свойств ПЭГ и в возможностях его применения.

В настоящем обзоре поставлена задача познакомить химиков, главным образом специалистов в области высокомолекулярных соединений, с экспериментальными данными по применению ПЭГ в биохимических исследованиях и попытаться интерпретировать эти результаты с позиций физико-химии полимеров.

II. ЭКСКЛЮЗИОННЫЕ СВОЙСТВА ПЭГ

Наиболее широкое применение ПЭГ в биохимии связано с его использованием в качестве эксклюзионного агента. Прежде всего термин «эксклюзия» (от английского *exclusion*) был впервые введен в биохимической литературе и по существу является синонимом известного в физико-химии растворов полимеров понятия «несовместимость полимеров».

Принцип эксклюзии можно пояснить, рассмотрев вопрос о том, как влияет присутствие полимеров на свойства низко- и высокомолекулярных веществ в растворе. В растворах полимеров подвижность малых ионов и молекул определяется «микроскопической» вязкостью системы, которая становится значительной в той области концентраций полимеров, где макромолекулярные клубки заметно проникают друг в друга (критическая концентрация). При более низких концентрациях микроскопическая вязкость системы мала и, следовательно, коэффициент диффузии малых молекул меняется очень мало. С другой стороны, если в раствор, содержащий линейный полимер, ввести другое высокомолекулярное соединение, то наблюдается кажущееся увеличение истинной концентрации компонентов по сравнению с тем случаем, когда эти вещества находятся в растворе в индивидуальном состоянии. Этот эффект обычно интерпретируют как взаимное исключение макромолекул из части раствора. Гипотеза об эксклюзии основана на том наблюдении, что изменение химических потенциалов является функцией размеров исключаемых молекул¹.

Работы по изучению влияния полимеров на протекание биохимических процессов можно разделить на три группы.

1. Изучение ферментативных реакций, протекающих в растворах полимеров, т. е. в системах, моделирующих окружение внутриклеточных ферментов.

2. Изучение внутри- и межмолекулярных переходов в полимерах в присутствии эксклюзионных агентов.

3. Применение полимеров для осаждения и кристаллизации биополимеров.

Дело в том, что *in vitro* биохимические процессы в большинстве случаев изучаются в водных буферных растворах. Однако те же реакции *in vivo* протекают в присутствии значительных концентраций высокомолекулярных веществ — белков, нуклеиновых кислот и углеводов, которые влияют на различные химические равновесия.

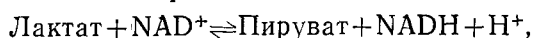
Первым шагом в исследовании ферментативных реакций в условиях, приближающихся к природным, является проведение ферментативных реакций в присутствии нейтральных линейных полимеров, не взаимодействующих специфически с компонентами ферментативной реакции. При введении полимера в систему наблюдается увеличение химической активности ферментов, субстратов и ингибиторов. Рассмотрим одно-субстратную реакцию, описываемую уравнением:



где E — фермент, S — субстрат, ES — фермент-субстратный комплекс и P — продукт реакции. Константы диссоциации фермент-субстратного комплекса можно записать следующим образом:

$$K = \frac{\gamma_E \gamma_S}{\gamma_{ES}} \cdot \frac{c_E c_S}{c_{ES}}$$

Рассмотрим, как влияют размеры компонентов реакции на величину отношения коэффициентов активности *. Если субстрат низкомолекулярен, то можно допустить, что размеры молекулы фермента и фермент-субстратного комплекса, а, следовательно, и величины их коэффициентов активности близки. Поэтому величина отношения коэффициентов активности будет зависеть от величины γ_s ; поскольку эта величина, по видимому, будет мало отличаться от 1, то и все отношение активностей будет близко к 1. Так, для реакции превращения лактата в пируват, катализируемой лактатдегидрогеназой



значение γ_s — для пирувата и лактата в 23%-ном геле декстрана равно 0,76, а величина γ_s для NAD^+ составляет 0,62¹.

С другой стороны, если субстрат является высокомолекулярным соединением, размеры молекул которого существенно превышают размеры молекулы фермента, то величина отношения коэффициентов активности будет определяться величиной коэффициента активности фермента, γ_E , которая, как правило, заметно больше 1; например, для системы гиалуроновая кислота — гиалуронатлиаза — декстран $\gamma_E = 4$, и величина константы Михаэлиса, K_M должна увеличиться примерно в четыре раза. Именно такой порядок изменения величин K_M и наблюдается для ферментативных систем в экспериментальных условиях.

Наличие полимеров в растворах наряду с увеличением химических потенциалов может вызывать уменьшение коэффициентов диффузии других компонентов системы, проявляя так называемый ситовой эффект¹. Это приводит к уменьшению частоты столкновений между реагентами и к уменьшению максимальной скорости реакции v_{\max} . Однако этот эффект не должен влиять на константы равновесия реакций.

Отметим, что в ряде работ ** высказывается точка зрения, что воздействие полимеров на ферментативные реакции связано с энергетическим обменом между полимерной средой и фермент-субстратным комплексом.

Вторая группа работ связана с изучением внутри- и межмакромолекулярных процессов, протекающих в биополимерах. Если макромолекулы могут находиться в растворе в различных конформационных состояниях, характеризующихся различными молекулярными объемами, то наличие другого полимера в системе должно привести к неодинаковой эксклюзии разных форм, причем в присутствии внесенного полимера будет стабилизироваться та конформация, которая обладает наименьшим объемом. При изучении конформационных переходов трех полинуклеотидов из упорядоченной конформации в неупорядоченную в присутствии декстрана и ПЭГ было показано², что увеличение стабильности упорядоченной конформации зависит от концентрации добавленных полимеров, причем ПЭГ обнаруживает большую эффективность в эксклюзии по сравнению с декстраном. В работе² об увеличении стабильности упорядоченной конформации судили по изменению величины гипохромного эффекта в зависимости от температуры. Были получены два семейства кривых плавления спирали поли(дезоксидениловой — тимидиловой кислоты), измеренных в присутствии ПЭГ различ-

* Значения коэффициентов активности γ находят из соотношения $K_{av} = 1/\gamma_E$, где K_{av} — коэффициент распределения вещества между гелем полимера известной концентрации и буфером.

** S. Damjanovich, B. Somogyi, Symposia Biologica Hungarica, New Trends in the Description of the General Mechanism and Regulation of Enzymes, Academiai Kiado, Budapest, 1978, p. 159—184.

ного молекулярного веса и различных фракций декстрана (рис. 1). Из кривых на рис. 1а видно, что изменение температуры плавления спирали существенно зависит от молекулярного веса ПЭГ для низкомолекулярных фракций и мало зависит для высокомолекулярных образцов (молекулярный вес 4000 и 6000). В случае декстрана все образцы име-

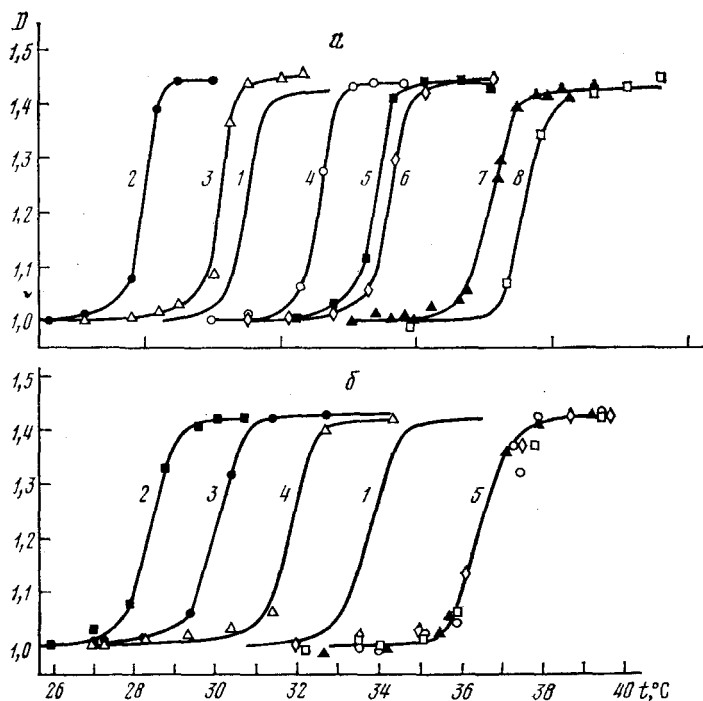


Рис. 1. Влияние ПЭГ (а) и декстрана (б) молекулярных весов на плавление спирали поли [d(A—T)·d(A—T)] в трис-салиновом буфере²; D — оптическая плотность при 260 нм. а — Концентрация ПЭГ 20,6 г/100 мл буфера: 1 — без добавления полимеров, 2 — мономер, 3 — ПЭГ 200, 4 — ПЭГ 400, 5 — ПЭГ 600, 6 — ПЭГ 1500, 7 — ПЭГ 4000, 8 — ПЭГ 6000; б — концентрация декстрана 19,3—19,9 г/100 мл буфера; 1 — без добавления полимеров, 2 — сахароза, 3 — глюкоза, 4 — рафиноза, 5 — декстран 10, декстран 40, декстран 80, декстран 500

ли высокий молекулярный вес, поэтому температуры плавления спирали полинуклеотида во всех случаях совпадали.

Хорошей иллюстрацией эксклюзионного эффекта является переход двухцепочечной молекулы ДНК в компактную форму в водно-солевых растворах при добавлении ПЭГ³. Этот процесс можно рассматривать как модель структурных переходов ДНК в клетке, происходящих под влиянием полимеров биологического происхождения.

Весьма привлекательной в этой связи казалась мысль об использовании линейных водорастворимых полимеров для воздействия на другие важные равновесные процессы, протекающие в живом организме, такие например, как процессы ассоциация \rightleftharpoons диссоциация ферментов. Впервые на такую возможность указано в работе¹. Экспериментально такая возможность реализована в работе⁴, где в систему, содержащую ассоциирующий фермент фосфорилазу Б, вводили ПЭГ молекулярного веса 40 000 в концентрации 4 г/100 мл. За процессом ассоциации фермента наблюдали, используя метод седиментации в ультрацентрифуге.

Концентрация фермента в системе, не содержащей ПЭГ, подбирается таким образом, что содержание димера и тетрамера составляет 55 и 45%. В присутствии ПЭГ происходит смещение равновесия димер \rightleftharpoons тетрамер в сторону образования тетрамера, доля которого повышается до 75%. Следует отметить, что в работе² по компактизации полинуклеотидов использовались растворы ПЭГ с концентрацией на порядок более высокой, чем в работе⁴. В последнем случае метод наблюдения не позволяет использовать столь высокие концентрации полимера из-за сильного увеличения вязкости системы; по-видимому, этим можно объяснить относительно малое влияние ПЭГ на ассоциацию димерной формы фосфорилазы Б. Кроме того, применение более высоких концентраций ПЭГ становится невозможным вследствие того, что при концентрации ПЭГ > 5 г/100 мл происходит осаждение фермента.

Еще более ярким примером важной роли полимерной среды в осуществлении биохимических процессов является обнаружение взаимодействия между разнородными белками в присутствии ПЭГ. Были изучены следующие пары ферментов: малатдегидрогеназа — глутаматдегидрогеназа* и малатдегидрогеназа — цитратсинтаза. Важно отметить, что взаимодействие этих ферментов, участвующих в цикле Кребса, не удавалось обнаружить в буферных системах *in vitro*.

Наконец, третья и наиболее практически важная область применения эксклюзионного эффекта связана со способностью линейных полимеров индуцировать фазовое разделение системы, т. е. осаждение других макромолекулярных соединений. В данном случае значительное увеличение коэффициента активности внесенного полимера приводит к достижению им предела растворимости. Наряду с декстраном ПЭГ широко используется для осаждения белков⁵.

Сравнивая способность ПЭГ и декстрана вызывать осаждение белков, можно отметить, что ПЭГ в три раза более эффективен, чем декстран, что согласуется с данными по изучению влияния этих полимеров на кинетику ферментативных реакций⁴.

Недавно появилась работа⁶, иллюстрирующая способность ПЭГ вызывать кристаллизацию белков из водных растворов. На примере изучения кристаллизации 22 белков показано, что ПЭГ является наиболее универсальным реагентом по сравнению с использованными ранее. Исследование морфологии кристаллов белков, выделенных из растворов ПЭГ, показывает, что структура кристаллов такая же, что и у полученных обычными методами препаратов.

При рассмотрении литературных данных по эксклюзионным процессам, протекающим в присутствии различных водорастворимых полимеров, видно, что наиболее эффективными эксклюзионными агентами являются ПЭГ^{1, 7-11}, декстран¹ и гиалуроновая¹²⁻¹⁴ кислота; менее эффективны поливинилпирролидон и поливиниловый спирт¹⁵.

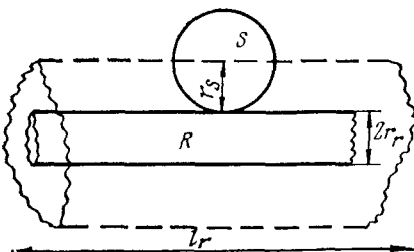
Наиболее естественным критерием для сравнения и оценки эксклюзионных свойств полимеров могут служить величины исключенных объемов в системах, содержащих различные полимеры с одним и тем же «партнером»; однако в литературе таких данных не имеется. Измерение значений исключенных объемов является сложной задачей¹⁶. Огстону** и Лауренту¹⁷ удалось значительно упростить эту задачу, рассмотрев простейшую модель взаимодействия линейного полимера, который можно представить в виде длинного тонкого стержня с глобулярными частицами, изображаемыми в виде сфер (рис. 2). Наиболь-

* L. A. Fahien, F. Kmietek, L. Smith, Arch. Biochem. Biophys., 192, 33 (1979).

** Цитируется по работе¹⁷.

ший эксклюзионный эффект, выражаемый как исключенный для S объем, отнесенный к единице массы R , наблюдается для случая асимметричных R . Центр сферической частицы S не может подойти к R ближе, чем на расстояние r_s . Объем, исключенный для центра S , равен ограниченному пунктирными линиями цилиндру, радиус которого равен сумме радиусов $r_s + r_r$ (r_r — радиус стержня). Если эффектом концевых групп можно пренебречь, то исключенный для сферы объем равен $\pi l_r (r_s + r_r)^2$, где l_r — длина стержня. Если d — плотность стержня, то

Рис. 2. Схема, поясняющая явление эксклюзии стержневой частицы



его масса равна $\pi l_r r_r^2 d$, и исключенный объем v_{excl} , отнесенный к единице массы R , составляет

$$v_{excl} = \frac{\pi l_r (r_s + r_r)^2}{\pi l_r r_r^2 d} = \frac{1}{d} \left(\frac{r_s}{r_r} + 1 \right)^2.$$

Эксклюзия увеличивается с увеличением радиуса S и уменьшением радиуса R или с увеличением асимметрии полимера.

Если ряд стержней беспорядочно расположен в пространстве, должно происходить перекрывание исключенных объемов для индивидуальных стержней. Выражение для K_{av} , общего объема, доступного для сфер радиуса r_s в пространстве, содержащем беспорядочно расположенные длинные стержни радиуса r_r , имеет вид

$$K_{av} = \exp[-\pi L (r_s + r_r)^2],$$

где L — сумма длин всех стержней в единице объема. Заметим, что концентрация стержней (т. е. L) и квадрат радиуса сферы (r_s^2) являются единственными параметрами, определяющими доступный объем при $r_r \ll r_s$.

Доля объема, доступного для вещества (K_{av}), является очень важным параметром для определения эксклюзионных свойств системы. Он связан с исключенным объемом соотношением:

$$v_{excl} = (1 - K_{av}) / c_R,$$

где c_R — концентрация стержней R , выраженная через массу, отнесенную к объему.

Эта теория, несмотря на свою простоту, оказалась вполне применимой для описания эксклюзионных свойств некоторых полисахаридов, в частности декстрана и гиалуроновой кислоты¹⁴. Она позволяет подсчитать величину K_{av} по формуле (5), исходя из значений r_s , r_r и L . Сравнение этих величин с экспериментально полученными из данных по гель-фильтрации значениями показывает прекрасное совпадение. Линейная гиалуроновая кислота в 4—5 раз эффективнее разветвленного декстрана. Специально поставленными опытами показано⁸, что 5—10%-ные растворы декстрана обладают теми же эксклюзионными свойствами, что и гели декстранов такой же концентрации. Поэтому значе-

ния $K_{ав}$, а следовательно, и коэффициент активности веществ, исключаемых полимерным гелем, далее могут быть использованы для расчета коэффициентов активности тех веществ, которые находятся в растворах соответствующих полимеров.

Величины исключенных объемов в трехкомпонентных системах, содержащих ПЭГ, глобулярный полимер и воду, Огстон и Эдмонд¹⁸ находили измерением термодинамических параметров в расслаивающихся системах.

Принимая представления Огстона — Лаурента за основу при описании эксклюзионных эффектов, следует также учитывать, что полимеры влияют на структуру воды^{19–22}. Из данных по ЯМР водных растворов ПЭГ следует, что каждый атом кислорода полимерной цепи связывает до 16 молекул воды²³. Таким образом, ПЭГ оказывает структурирующее действие на несколько молекулярных слоев воды. Возможно, структурирующее действие ПЭГ на воду и является одной из причин того, что он обладает значительными эксклюзионными свойствами.

Следует отметить, что принцип эксклюзии, реализующийся в живых организмах и широко используемых в молекулярной биологии, может быть с успехом применен и в химии высокомолекулярных соединений для решения таких задач, как повышение специфичности реакций между макромолекулярными компонентами, кристаллизации водорастворимых полимеров и т. д.

III. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРЕХКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ — ДЕКСТРАН — ВОДА В ПРЕПАРАТИВНЫХ И АНАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

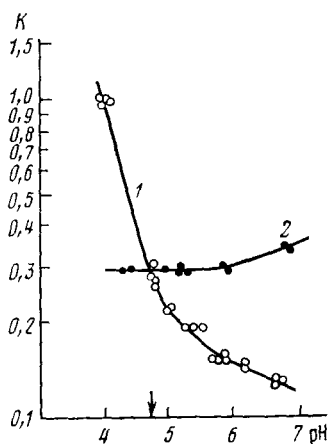
Этот же принцип эксклюзии, заключающийся во взаимном вытеснении полимеров из части раствора, отвечает за расслаивание систем, состоящих из двух полимеров в общем растворителе. В случае смешения водных растворов декстрана и ПЭГ при концентрации выше критической образуется двухфазная система, в которой ПЭГ находится в верхней фазе, а декстран в нижней. Такие системы, которые могут быть «забуферены» и сделаны изоосмотическими, широко используются для разделения биомacroмолекул, клеточных частиц, вирусов, мембран, хлоропластов и т. д. путем распределения веществ между фазами²⁴. Наряду с парой декстран — ПЭГ для разделения используются также и другие пары, включающие модифицированные производные этих полимеров, например декстран — метилцеллюлоза, декстрансульфат — декстран, декстрансульфат — карбоксиметилдекстран и т. д.

Специфика содержащих два полимерных компонента трехкомпонентных систем такова, что фазовое разделение имеет место даже для очень близких по химической структуре полимеров, находящихся в растворе в малых концентрациях. Основная область использования двухфазных систем состоит в разделении веществ методом распределения между двумя полимерными фазами. Этот метод разделения является более эффективным по сравнению с другими методами — электрофорезом и седиментацией²⁴.

Наиболее примечательным свойством системы ПЭГ — декстран, содержащей неионогенные полимеры, является влияние электролитов на распределение веществ между фазами²⁵. То обстоятельство, что вещество можно перенести из одной фазы в другую просто путем добавления, например, NaCl в избытке по отношению к фосфату натрия или замещением ионов Li^+ на ионы Na^+ , представляет интерес как с теоретической, так и с практической точек зрения. Замечено²⁶, что отрицатель-

но заряженные биомacroмолекулы имеют более высокие коэффициенты распределения в двухфазных системах, содержащих сульфат натрия, чем хлористый натрий; для положительно заряженных соединений наблюдается обратная картина. Если построить графики зависимости от pH коэффициентов распределения K для белков в фазах, содержащих Na_2SO_4 и NaCl , то получаются две кривые, пересекающиеся в точке, близкой к изоэлектрической²⁴. Такие перекрестные кривые для бычьего сывороточного альбумина²⁷ показаны на рис. 3. Используя

Рис. 3. Кривые перекрестного распределения бычьего сывороточного альбумина; приведена pH-зависимость коэффициента распределения K в двухфазной системе, содержащей NaCl (1) и в системе, содержащей Na_2SO_4 (2)



двухфазные системы при различных значениях pH, в работе²⁷ получены значения изоэлектрических точек также для ряда других белков и изучена зависимость изоэлектрических точек гемопротеинов от молекулярного веса. В работе²⁸ получены значения изоэлектрических точек для изоферментов енолазы. Несомненно, этот метод может быть с успехом использован также для определения изоэлектрических точек синтетических полиэлектролитов.

Считают²⁴, что между фазами системы ПЭГ — декстран — вода существует неравномерное распределение ионов, что приводит к возникновению разности потенциалов между фазами, определяемой соотношением

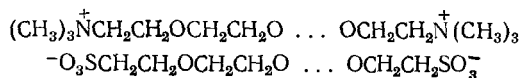
$$U_2 - U_1 = \frac{RT}{(z^+ + z^-)F} \ln \frac{K_{Bz^-}}{K_{Az^+}}. \quad (1)$$

где z^+ и z^- — число положительных и отрицательных зарядов, возникающих при распределении соли $A_{z^+}B_{z^-}$, F — константа Фарадея, K_{Bz^-} и K_{Az^+} — коэффициенты распределения аниона и катиона соответственно.

Эта разность потенциалов в свою очередь влияет на распределение полиэлектролитов или заряженных частиц, таких как белки и нуклеиновые кислоты. Благодаря большому числу приходящихся на биомacroмолекулу зарядов их поведение при распределении сильно зависит от межфазного потенциала, даже если он является относительно малой величиной. Возникает вопрос о причине неравномерного распределения различных неорганических электролитов между фазами. Считают²⁵, что катионы проявляют более высокое сродство к ПЭГ, чем к декстрану, причем сродство уменьшается в ряду $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$. В то же время отмечается увеличение сродства анионов к ПЭГ в ряду галогенидов по мере увеличения их поляризуемости $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$. С другой стороны

найденно²⁵, что SO_4^{2-} и HPO_4^{2-} имеют большое сродство к декстрану. Эти явления обусловлены различиями в тенденциях к образованию ионных пар в двух фазах.

Еще большее влияние на величину межфазного потенциала оказывает введение заряженных групп в качестве концевых групп молекулы ПЭГ. Типичными представителями заряженных ПЭГ являются бис-триметиламино-ПЭГ и бис-сульфонат-ПЭГ²⁹:



При введении этих полимеров в двухфазную систему ПЭГ — декстран они распределяются в ПЭГ-содержащую фазу, в результате чего система приобретает свойства жидкого ионообменника.

Определяющим фактором при распределении белков между фазами является их заряд. С другой стороны, добиться желаемого распределения веществ можно было бы, либо вводя заряженные группы в молекулу декстрана, используя например ДЕАЕ- или КМ-декстраны, либо вводя в систему посторонние полиэлектролиты. Однако в таком случае компоненты двухфазной системы полиэлектролитной природы имеют такую высокую плотность зарядов в молекуле, что в соответствии с уравнением (7) разность потенциалов между фазами должна уменьшаться. Кроме того, производные декстрана часто распределяются в содержащую ПЭГ фазу. Наконец, отмечено²⁴ образование трудно диссоциирующих поликомплексов между молекулами полиэлектролитов и клеточными частицами. Итак, главным преимуществом заряженных ПЭГ является то, что заряды находятся только на концах полимера, и макромолекулы сохраняют сродство к ПЭГ-содержащей фазе²⁴.

Изучая распределение белков в двухфазных системах, Альбертсон (цит. по²⁸) предложил метод, позволяющий определять поверхностный заряд белков. Он вывел следующее уравнение, которое позволяет связать величину коэффициента распределения белка K с суммарным зарядом молекулы z и межфазным потенциалом ψ :

$$\ln K = \ln K^0 + zF\psi/RT.$$

Здесь K^0 представляет собой коэффициент распределения белка, когда суммарный заряд его равен нулю.

Использование двухфазных систем позволило также найти новый способ оценки гидрофобности макромолекул и малых молекул³⁰. Для этого концевые группы ПЭГ модифицировали гидрофобными лигандами, в частности, этерифицировали остатками жирных кислот. Модифицированный таким образом ПЭГ распределяется в ту же фазу, что и незамещенный полимер, и делает ее более неполярной. Изучая распределение большого числа соединений в одной и той же системе, содержащей 80—95% воды, можно сравнить их гидрофобность. Используя такой метод, естественно считать мерой гидрофобности вещества разность свободных энергий переноса одного моля вещества из верхней фазы системы, содержащей незамещенной ПЭГ, в верхнюю фазу другой системы, содержащей связанный с полимером гидрофобный лиганд:

$$\Delta G'' - \Delta G' = -2,3 RT \Delta \lg K, \quad (2)$$

где $\Delta G''$ — свободная энергия переноса одного моля вещества из одной фазы в другую в системе, содержащей гидрофобный полимерный лиганд, $\Delta G'$ — то же самое для стандартной двухфазной системы, содер-

жащей незамещенный ПЭГ³⁰. Величина $\Delta \lg K$ в уравнении (2) определяется следующим образом:

$$\Delta \lg K = \lg K_0'' - \lg K_0',$$

где K_0'' и K_0' — константы распределения вещества в системе, содержащей гидрофобный лиганд, и в стандартной системе.

Данный метод определения гидрофобности веществ позволяет исключить эффекты, обусловленные электростатическими взаимодействиями между молекулами полимерного лиганда и белка. Другое преимущество этого метода заключается в том, что гидрофобные взаимодействия могут быть изучены в воде, в отсутствие органических растворителей.

Использование ковалентно связанных с ПЭГ гидрофобных лигандов является одним из примеров введения афинных меток в ПЭГ для повышения специфичности процесса разделения природных веществ. Этот же принцип использован для специфической экстракции ряда белков³¹. Например, для выделения S-23 миеломного белка из смеси использовали динитрофенилированное производное ПЭГ³². Для очистки стероид-связывающих белков, таких как транспортные белки плазмы, в качестве обладающего высоким сродством к белку лиганда синтезирован ПЭГ, содержащий в качестве концевых фрагментов остатки эстрадиола³³.

Афинное распределение может быть использовано как аналитический метод для измерения констант связывания и числа связывающих центров белковых молекул с различными лигандами³⁴. С этой целью синтезирован ряд сложных эфиров ПЭГ с карбоновыми кислотами, как одноосновными, так и двухосновными с различным числом атомов углерода, а также с кислотами, содержащими двойную связь, гидроксильные группы и т. д. (см. табл. 1).

Известно, что сывороточный альбумин (СА) обладает высоким сродством к жирным кислотам. Этим объясняется существенное влияние на распределение СА, добавок ПЭГ-эфиров высших жирных кислот в двухфазную систему. В стандартной системе СА вытесняется преимущественно в декстран-содержащую фазу. В присутствии эфиров ПЭГ, которые распределяются в ту же фазу, что и ПЭГ, остатки жирных кислот сорбируются на поверхности СА.

Известно, что СА имеет семь центров, сильно сорбирующих длинноцепные жирные кислоты ($K_{acc} = 10^6 - 10^8 M^{-1}$) и 20 центров, обладающих гораздо меньшим сродством ($K_{acc} = 10^2 - 10^3 M^{-1}$)³⁴. Если рассматривать только сильное связывание, то можно видеть, что белок способен связать семь молекул ПЭГ-эфиров. Образующийся комплекс имеет сродство к верхней, ПЭГ-содержащей фазе.

В³⁵ получено уравнение, устанавливающее зависимость между коэффициентом распределения и химической структурой распределяемого вещества; согласно этому уравнению введение каждой новой химической группировки данного типа в молекулу комплекса изменяет $\lg K$ на постоянную величину³⁵:

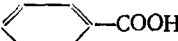
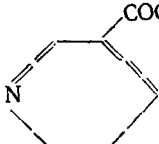
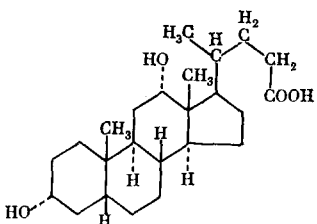
$$\lg K = \lg K^* + n \alpha,$$

где K — константа распределения комплекса СА — ПЭГ-эфир; K^* — константа распределения свободного СА; n — число молекул ПЭГ-эфира, входящих в состав комплекса; α — инкремент, характеризующий прирост $\lg K$ при вхождении каждой новой молекулы эфира.

В работе³⁴ показано, что это уравнение выполняется для случая комплексов СА — ПЭГ-эфир. При использовании различных эфиров

ТАБЛИЦА 1

Полиэтиленгликолевые эфиры различных кислот

Кислота, используемая для этерификации ПЭГ	Число атомов углерода в кислотном остатке	Степень замещения, %
Уксусная CH_3COOH	2	17
Масляная $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	4	12
Капроновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	6	9
Каприловая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	8	12
Каприновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	10	9
Лауриновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12	7
Миристиновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14	8
Пальмитиновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16	9
Стеариновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18	11
Олеиновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18	11
Линолевая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18	6
Линоленовая $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2=\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18	6,5
Малоновая $\text{HOOCCH}_2\text{COOH}$	3	15
Янтарная $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	4	16
Яблочная $\text{HOOCCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{COOH}$	4	11
Винная $\text{HOOCCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$	4	6
Фумаровая $\text{HOOCCH}=\text{CHCOOH}$	4	4
Бензойная  $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$	7	4
Никотиновая 	6	4
Трихлоруксусная CCl_3COOH	2	1
Бромуксусная BrCH_2COOH	2	36
Иодуксусная ICH_2COOH	2	5
Дезоксихоловая 	24	8

ПЭГ определена величина инкремента α и подсчитаны значения n . При выполнении расчетов не учитывался эффект уменьшения доступной поверхности белка с увеличением числа связанных молекул лиганда. Если этот эффект не очень сильный, распределение в двухфазных системах, содержащих ПЭГ-эфиры, может служить удобным методом определения числа связывающих центров в молекуле белка. Кривые связывания (зависимость $\lg K$ от концентрации эфира) могут быть использованы для расчета констант связывания.

Этот метод изучения связывания белков с лигандами особенно удобен при необходимости работать с малыми количествами белка. (В этих случаях для обнаружения белков в растворе используются радиоактивные метки.) В этом отношении метод изучения связывания с

использованием двухфазных систем имеет преимущества перед методом равновесного диализа. Другая возможность использования «афинного распределения» — определение типа связывающих центров, присутствующих в биополимерах, мембранах и клетках.

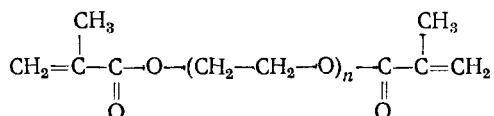
Таким образом, метод распределения веществ в двухфазных системах позволяет проводить не только очистку и разделение биомакромолекул, но и дает богатую информацию об их различных свойствах, о димеризации и агрегации, денатурации в определенных условиях, об изменении заряда белков как функции pH. Метод может быть использован для определения поверхностного заряда молекул, их изоэлектрических точек, для измерения относительной гидрофобности, процесса связывания с различными лигандами и т. д.

IV. БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МОНО- И БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

При описании свойств двухфазных систем выше упомянуто об использовании двузамещенных ПЭГ^{29, 32, 33, 67}, хотя в явном виде необходимость применения именно бифункциональных производных не была рассмотрена.

Одним из перспективных применений дизамещенных производных ПЭГ является использование их в качестве сшивающих агентов при иммобилизации ферментов³⁶.

В настоящее время имеется единственная работа по использованию бифункциональности ПЭГ с целью иммобилизации ферментов³⁷. В этой работе концевые группы ПЭГ этерифицировали метакриловой кислотой, в результате чего был получен диметакрилат-ПЭГ:



При использовании ПЭГ различного молекулярного веса были получены полимеры, содержащие на концах фоточувствительные функциональные группы, расположенные на желаемом расстоянии друг от друга. Далее готовилась смесь, содержащая данный полимер, фермент или микробные клетки, которую облучали в течение нескольких минут УФ-светом. В результате были получены сшитые по концам матрицы, содержащие включенные в них биоматериалы. Таким образом был иммобилизован фермент инвертаза дрожжей. Фоточувствительные полимеры на основе ПЭГ имеют следующие преимущества: они образуют механически прочные сетки, обладают химической инертностью и являются достаточно проницаемыми для субстрата и продуктов ферментативной реакции. Этот пример далеко не исчерпывает возможностей использования ПЭГ как сшивающего агента.

В связи с развитием работ по созданию лекарственных полимерных соединений (ЛПС) нам представляется весьма перспективным синтез и изучение свойств таких соединений на основе ПЭГ. По-видимому, вопрос об установлении корреляции между структурой ЛПС и его физиологическим действием, являющийся фундаментальным, может быть наиболее строго решен в том случае, когда в полимерную цепь вводится точно контролируемое число фармакологически активных фрагментов. Такой подход можно реализовать путем химической модификации концевых групп макромолекул с заранее известным типом функциональ-

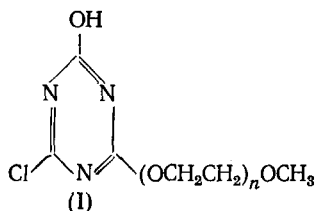
ности. Этим требованиям вполне удовлетворяет ПЭГ, имеющий на концах цепи гидроксильные группы.

С другой стороны, необходимым требованием, предъявляемым к полимерным носителям, является иммуностимулирующее действие самого полимера. Этому требованию также удовлетворяет ПЭГ, проявляющий свойства иммуностимулятора *.

Имеющиеся в настоящее время в литературе данные по ЛПС на основе ПЭГ затрагивают только одну область применения — иммунологию. В работе ³⁸ была изучена возможность применения моно- и бифункциональных производных ПЭГ в качестве антигенов для изучения механизма взаимодействия антиген — антитело. Методами тушения флуоресценции ³⁹ и светорассеяния ⁴⁰ было изучено взаимодействие антител, выделенных из иммунизированных животных, с моно- и дизамещенными производными 2,4-динитрофенил-ПЭГ. Экспериментальные данные, полученные в этих работах ³⁸⁻⁴⁰, позволили обнаружить структурные различия связывающих центров иммуноглобулинов, а также оценить расстояния между связывающими центрами для двух типов антител и классов IgG и IgG(T), их конформации в растворе.

Важным этапом исследования производных ПЭГ, содержащих антигенные детерминанты, является изучение их действия *in vivo*. В этих целях был синтезирован 2,4,6-тринитрофенилэтиловый эфир ПЭГ молекулярного веса 40 000, который обнаружил высокую антигенную активность *.

Большой интерес представляют работы, посвященные химической модификации белков производными ПЭГ, в результате чего меняются иммунологические свойства белков ⁴¹⁻⁴³. В качестве реагента был использован ПЭГ молекулярного веса 2000, в котором одна концевая группа содержала 2-хлор-4-окси-триазиновую группировку, способную взаимодействовать с аминок группой белка, а другая концевая гидроксильная группа переведена в метокси-производное:



При обработке каталазы этим реагентом может быть замещено до 60% аминок групп при сохранении ферментативной активности белка ⁴⁴. Более высокая степень замещения аминок групп белка реагентом приводит к уменьшению ферментативной активности каталазы. Препарат каталазы с 75%-ной степенью замещения (ПЭГ-каталаза) оказался неактивным по отношению к антисыворотке для нативной каталазы, что было установлено методами диффузии в геле и фиксации комплемента. Введение ПЭГ-каталазы в кровь мышей не привело к выработке антител по отношению как к ПЭГ-каталазе, так и к нативной каталазе. Таким образом, в результате химической модификации каталазы ПЭГ-реагентом получили модифицированный фермент, не обладающий иммунными свойствами. Эти работы являются первым шагом на пути решения проб-

* И. Н. Топчиева, Н. Ю. Алексеева, В. П. Евдаков, Р. В. Петров, И. В. Савинова, Е. Д. Филатова, Л. И. Хаустова, Р. М. Хаштов, М. Б. Темченко, Тезисы доклада на IV Всесоюзном научном симпозиуме «Синтетические полимерные материалы медицинского назначения», г. Дзержинск, 1979, стр. 5.

ТАБЛИЦА 2

Свойства производных антигена-Е, модифицированных по аминогруппе лизина ⁴³

Производное антигена-Е	Молекулярный вес	Число модифицированных остатков лизина	Молекулярный вес введенной группы	Суммарный заряд модифицированного антигена	Относительная аллергенная активность
Нативный белок	38 000	0	0	—9	1
ПЭГ-производное	53 000	7	2 100	—16	0,024
N - карбоксиметил-производное	39 000	16	58	—31	0,56
Бутиримидат-производное	39 000	16	72	—9	1
Декстран-производное	140 000	4	25 000	—9	0,15

лемы уменьшения иммуногенности белков, что позволит существенно расширить терапевтическое применение экзогенных ферментов.

Продолжением этой работы является запатентованный метод восстановительного алкилирования NH_2 -группы ферментов с использованием альдегидного производного метоксизамещенного ПЭГ и боргидрида натрия ⁴². Этот метод позволяет получить препараты ферментов, обладающие большей активностью и стабильностью, по сравнению с полученными ранее.

Реагент (I) был использован в ⁴³ для химической модификации антигена Е, главного белкового аллергена пыльцы амброзии. Цель такой модификации — получение производного антигена с уменьшенной аллергенной активностью, но сохраняющего иммуногенные свойства нативной молекулы. Согласно общепринятой концепции, аллергическое действие заключается в том, что при взаимодействии поливалентных антигенов с иммуноглобулинами класса IgE в клетке происходит выделение химических медиаторов аллергических симптомов. Химическая модификация антигенов, приводящая к уменьшению числа доступных антигенных детерминант или к уменьшению сродства к специфическим антителам, должна привести к снижению их аллергической активности. Контролируя степень и тип химической модификации, можно получать смеси производных, частично (если не полностью) сохраняющих иммуногенные свойства нативного белка.

При взаимодействии ПЭГ-реагента с антигеном-Е, содержащим 18 аминокислот лизина, в реакцию вступило в среднем 11 остатков лизина. Изучение иммунологических свойств ПЭГ-производного антигена-Е показало ⁴³, что он стимулирует выработку специфических антител, хотя и является более слабым иммуногеном по сравнению с нативным белком. В то же время ПЭГ-антиген обнаруживает очень сильное снижение аллергенной активности по сравнению с нативным антигеном. В работе ⁴³ проводится сравнение свойств нескольких модифицированных по аминокислотам производных антигена-Е — ПЭГ- и декстран-производных, а также двух других производных, полученных в результате введения в молекулу белка низкомолекулярных групп — N-карбоксиметильной и бутиримидатной (табл. 2). Видно, что ПЭГ-производное обнаруживает наибольшее снижение аллергенной активности по сравнению с производными декстрана несмотря на то, что молекулярный вес декстрана существенно превышает молекулярный вес фрагмента полиоксиэтиленовой цепи. Интересно отметить, что оба эти производные имеют одинаковые молекулярные объемы, что следует ⁴³ из идентично-

сти объемов элюции этих производных при гель-хроматографировании на сефарозе 6 В.

Этот факт, по-видимому, можно объяснить, исходя из различия в степени компактности макромолекул ПЭГ и декстрана в водных растворах. Более компактные молекулы декстрана являются менее эффективными в смысле пространственной блокировки антигенных детерминант по сравнению с менее компактными группами ПЭГ. Вероятно, в данном случае мы также имеем дело с эксклюзивными эффектами, создаваемыми различными полимерами, теперь уже ковалентно связанными с молекулами белка-антигена по отношению к белкам-антителам. Если рассматривать механизм действия ПЭГ-содержащих белков с этой точки зрения, то становится ясным, почему модификация белка ПЭГ-реагентом не влияет на его взаимодействие с низкомолекулярными субстратами (каталазная активность), но существенно затрудняет белок-белковые взаимодействия (иммунная и аллергенная активность).

V. ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

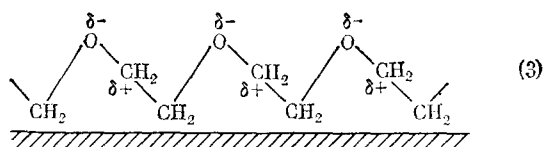
Целесообразность использования ПЭГ для иммобилизации различных физиологически активных соединений связана также с его способностью оказывать специфическое воздействие на липидный слой мембран⁴⁴. Идея о влиянии ПЭГ на структуру липидов возникла благодаря наблюдениям, что ПЭГ индуцирует слияние растительных протопластов⁴⁵, эритроцитов курицы, эритроцитов курицы с протопластами дрожжей⁴⁶ и клеток млекопитающих⁴⁷.

С целью изучения молекулярного механизма действия ПЭГ на клетки в⁴⁴ исследовано влияние ПЭГ на монослой фосфолипидов, моделирующих клеточные мембраны. Авторы рассмотрели, как меняются зависимости типа поверхностное давление — площадь и поверхностный потенциал — площадь для монослоев фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина при введении в водную фазу добавок различных низкомолекулярных органических соединений (глицерина, сорбитола, диметилсульфоксида) и образцов ПЭГ различного молекулярного веса. Оказалось, что все испытанные соединения вызывают большие изменения величины поверхностного потенциала фосфолипидного слоя, находящегося в состоянии плотной молекулярной упаковки. Однако порядок оптимальной концентрации добавки, вызывающей максимальное снижение поверхностного потенциала для случая низкомолекулярных соединений и ПЭГ, существенно различен. Так, для случая монослоев дипальметилглицерилфосфорилхолина оптимальные концентрации глицерина равны 3,8 М; диметилсульфоксида — 3 М; сахарозы — 1,5 М и сорбитола — 2 М. В то же время соответствующие концентрации различных фракций ПЭГ соответственно равны: для ПЭГ 6000— $4,2 \cdot 10^{-3}$ М; ПЭГ 15 000— $1,5 \cdot 10^{-3}$ М; ПЭГ 300 000— $2,5 \cdot 10^{-7}$ М и для ПЭГ 5 000 000— $1 \cdot 10^{-9}$ М. Таким образом, наряду с гораздо большей специфичностью действия ПЭГ можно отметить существенную зависимость его влияния от молекулярного веса полимера.

В работе⁴⁴ авторы не делают определенного заключения относительно молекулярного механизма действия ПЭГ на мембраны. По-видимому, для объяснения его роли следует обратиться к свойствам ПЭГ на границе раздела фаз, и прежде всего на границе раздела вода — воздух. Этому вопросу посвящено детальное исследование⁴⁸, в котором показано, что ПЭГ обладает способностью образовывать мономолекулярные пленки на поверхности воды. В зависимости от давления сжатия, полимер может находиться в двух конформациях — более рыхлой, занимающей

площадь 28 \AA^2 в расчете на мономерное звено, и компактную, занимающую площадь $< 16 \text{ \AA}^2$ на звено.

При изучении поведения ПЭГ в полярнографических условиях⁴⁹ показано, что ПЭГ сорбируется на отрицательно заряженных поверхностях так, что заряженные отрицательно полярные атомы эфирного кислорода направлены к воде, а неполярные $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ группы — к отрицательно заряженной поверхности ртути:



Согласно расчетам авторов⁴⁹, площадь, занимаемая мономерным звеном ПЭГ, который сорбирован на такой поверхности, составляет 13 \AA^2 .

Эти данные позволяют предположить, что в случае взаимодействия ПЭГ с монослоями липидов также имеют место дипольные взаимодействия звеньев ПЭГ с диполями полярной головки липида по типу (3). Если это действительно так, то круг взаимодействующих с ПЭГ соединений, способных образовывать комплексы, которые по типу напоминают поликомплексы, образованные ПЭГ и поликислотами⁵⁰, может быть значительно расширен; в него следует включить большое число поверхностно-активных соединений, которые могут образовывать монослои на поверхности воды.

С другой стороны, способность ПЭГ воздействовать на мембраны позволяет предполагать, что это свойство должно проявляться не только в явлении клеточного слияния, но и в других субклеточных процессах, таких как эндоцитоз, экзоцитоз и т. д.; что очень важно для функционирования физиологически активных соединений, включающих фрагменты ПЭГ.

Вероятно, взаимодействия диполь-дипольного типа лежат в основе молекулярного механизма действия ПЭГ как стабилизатора гидрофобных зольей²³. Характерно, что в этом случае также отмечается ярко выраженная зависимость стабилизирующего действия ПЭГ от его молекулярного веса.

VI. СИНТЕЗ ДВУЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

Большое практическое значение ПЭГ и широкое использование ПЭГ и его производных в различных областях молекулярной биологии стимулирует развитие исследований по химической модификации концевых гидроксильных групп ПЭГ. Отметим, что хорошо изученные реакции оксиэтилирования, используемые для синтеза неионных детергентов⁵¹, позволяют получать лишь монозамещенные производные ПЭГ. Наиболее рациональный способ получения бифункциональных производных ПЭГ заключается в проведении реакций химической модификации концевых групп ПЭГ^{51, 52}. Эти реакции, несмотря на кажущуюся простоту и тривиальность, на самом деле имеют ряд особенностей и заслуживают более подробного рассмотрения.

Имеющие молекулярный вес до 20 000 образцы ПЭГ получают главным образом методом оксиалкилирования; они содержат на концах цепи гидроксильные группы. Полимеры окиси этилена более высокого молекулярного веса получают другими методами; как правило, они не содержат на конце функциональных групп⁵².

ТАБЛИЦА 3

Производные полиэтиленгликоля

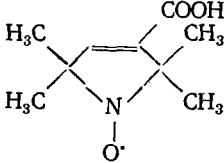
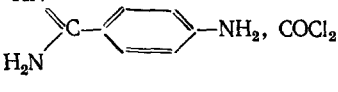
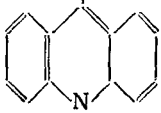
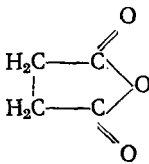
Концевая группа производного ПЭГ	Формула реагента	Выход, %	Ссылки
Br	PBr ₃	количественный	29
Cl	SOCl ₂	количественный	54
CH ₃ O	CH ₃ ONa, из ПЭГ-хлорида	количественный	55
C ₆ H ₅ O	C ₆ H ₅ ONa, из ПЭГ-хлорида	количественный	56
C ₆ H ₅ S	C ₆ H ₅ SNa, из ПЭГ-хлорида	количественный	56, 57, 58
	(CH ₃ CO) ₂ O	количественный	59
	CCl ₃ COC ₂ H ₅	количественный	53
	C ₆ H ₅ COC ₂ H ₅	количественный	60
	 , SOCl ₂	количественный	61, 62
(CH ₃) ₃ N ⁺ Br ⁻	(CH ₃) ₃ N, из ПЭГ-бромиды	количественный	29
	 , SOCl ₂	количественный	66
H ₂ N(CH ₂) ₂ NH	NH ₂ (CH ₂) ₂ NH ₂ , из ПЭГ-бромиды	количественный	33
H ₂ N(CH ₂) ₃ NH	H ₂ N(CH ₂) ₃ NH ₂ , из ПЭГ-бромиды	количественный	33
	 из ПЭГ-производного цианурхлорида	количественный	67
SO ₃ Na	Na ₂ SO ₃ , из ПЭГ-бромиды	количественный	29
		количественный	68

ТАБЛИЦА 3 (продолжение)

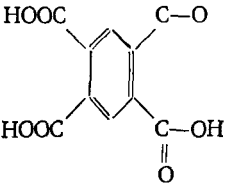
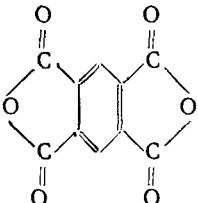
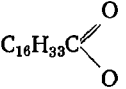
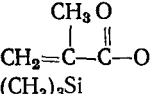
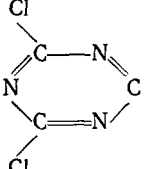
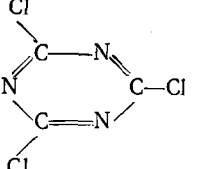
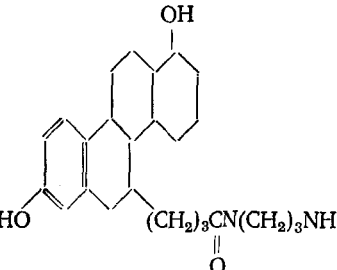
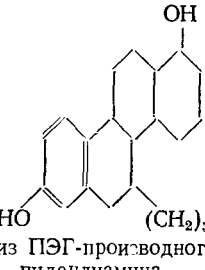
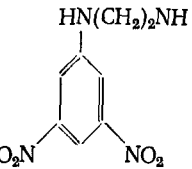
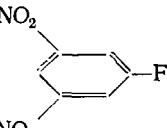
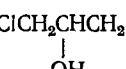
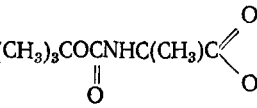
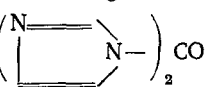
Концевая группа производного ПЭГ	Формула реагента	Выход, %	Ссылки
		количественный	68
	$C_{16}H_{33}COCl$	количественный	34,63
	$CH_2=C(CH_3)COOH$ $(CH_3)_3Si-Si(CH_3)_3, (CH_3)_3SiCl$	*	37
		количественный	54
	 из ПЭГ-производного 1,3-пропилендиамин	60	33
	 из ПЭГ-производного 1,2-этилендиамин	количественный	32,38,41
	$H_2C-CH(OH)-CH_2Cl, BF_3$	*	65
	$(CH_3)_3COCNHC(CH_3)COOH,$ 	80	70

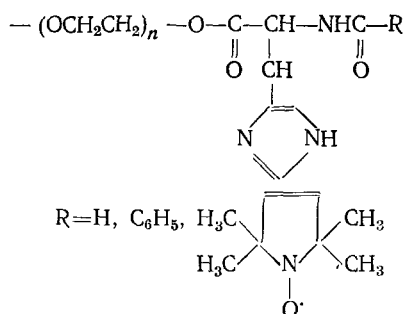
ТАБЛИЦА 3 (окончание)

Концевая группа производного ПЭГ	Формула реагента	Выход, %	Ссылки
		2	6
		37,5	71
		27	72
		8	73
SH	KSH, из ПЭГ-бромиды	8	74
$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$	 из монометоксипроизводного ПЭГ	*	39
	Реагент не указан, из монометоксипроизводного ПЭГ	*	41
$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$	MnO_2 , из монометоксипроизводного ПЭГ	*	42

* Выход в работе не указан.

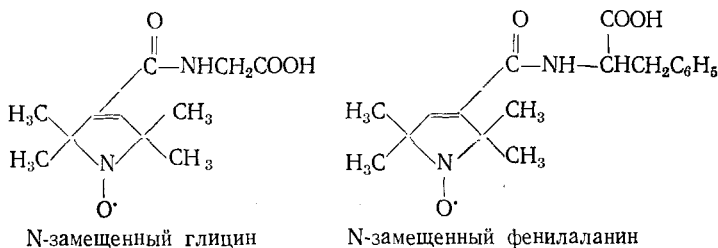
Гидроксильные группы ПЭГ вступают в обычные для спиртов реакции. Известно большое число производных ПЭГ типа $R-O-(CH_2-CH_2-O)_n-R$, где $R=Me, Ph, CH_3CO, C_6H_5CO$, и типа $R-(CH_2-CH_2-O)_nR$, где $R=Cl, Br, PhS$ и т. д. Реакции между ПЭГ и соответствующими низкомолекулярными реагентами во многих случаях идут количественно и поэтому могут быть использованы для определения среднечислового молекулярного веса и молекулярно-весового распределения⁵³. В табл. 3 приведен перечень замещенных по концевым группам производных ПЭГ.

Впервые специфические особенности реакции этерификации гидроксильных групп ПЭГ обнаружены при синтезе полимерных производных гистидинов общей формулы ⁷¹:

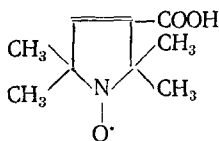


Оказалось, что во всех этих случаях не удастся достичь полного замещения концевых групп ПЭГ. Специально поставленные опыты, преследующие цель повысить выход полиоксэтиленовых эфиров путем модификации конденсирующего агента, изменения природы растворителя и порядка смешения реагентов, не привели к существенному изменению степени замещения. Все это, по-видимому, говорит о каких-то внутренних закономерностях, свойственных цепочке ПЭГ и об определенных структурных изменениях, происходящих в макромолекуле при модификации ее данными заместителями. Вероятно введение в конец полимерной цепи полярной группы, например, такой, как имидазольная или амидная, приводит к структурированию, затрудняющему полную модификацию всех концевых групп.

Для того чтобы разобраться в этом вопросе, необходимо последовательно менять природу заместителя и следить за изменением выхода и структурными особенностями образующихся полимеров. В⁷³ предпринята попытка систематически изучать реакцию этерификации, используя ряд кислот RCOOH, где R — остатки аминокислот, содержащие иминокислородный радикал в качестве N-защитной группировки:

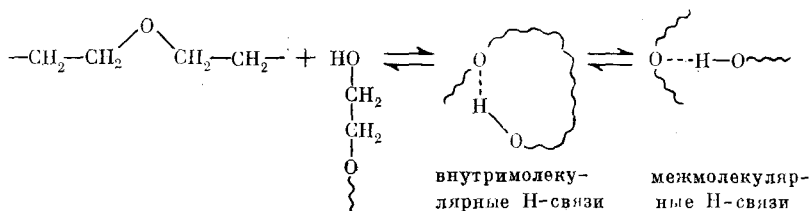


В качестве первого члена ряда была использована простейшая спинмеченная кислота N-(2,2,5,5-тетраметил-3-карбоксипирролин-1-оксил):



В ⁷³ показано, что для первого члена ряда реакция протекает практически нацело, что согласуется с литературными данными ⁶¹. При переходе к следующему члену ряда наблюдалось падение степени замещения до 35—40%, а в случае ПЭГ-производного фенилаланина степень замещения упала до 8%. Таким образом, можно констатировать, что введение амидной группы в молекулу ПЭГ существенно снижает выход реакции и тем в большей степени, чем более объемистый заместитель входит в состав кислотного остатка.

Для того, чтобы объяснить особенности описанных в работе ⁷³ реакций, рассмотрим вначале реакцию модификации ПЭГ карбоновыми кислотами, не содержащими полярных групп. Как правило, такие реакции проводятся в неполярных средах, в которых концевые гидроксильные группы исходного ПЭГ образуют внутри- или межмолекулярные водородные связи с эфирными атомами кислорода основной цепи:

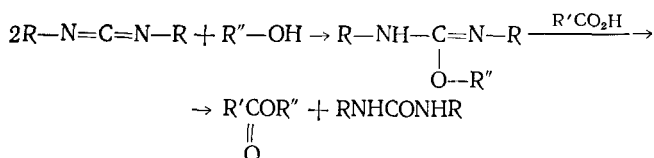


Было показано ⁶⁰, что в зависимости от концентрации ПЭГ преобладает тот или другой тип водородных связей. Естественно предположить, что в реакции этерификации принимают участие свободные гидроксильные группы, и по мере протекания этой реакции происходит сдвиг равновесия в сторону неассоциированных гидроксильных групп.

С другой стороны, если полярная группа заместителя находится на конце макромолекулы, то она, так же как и гидроксильная, будет стремиться образовать водородную связь (внутри- или межмолекулярного типа) с атомами кислорода основной цепи. Падение степени замещения при переходе к заместителю, включающему полярные группы, указывает на уменьшение доступности гидроксильных групп непрореагировавшего ПЭГ. Можно полагать, что гидроксильные группы ПЭГ, образующие водородные связи с ассоциированными молекулами полимера, становятся стерически мало доступными для реагентов.

Эта гипотеза позволяет объяснить наблюдаемое экспериментально ⁷³ падение степени замещения при введении на конец цепи, содержащих полярные группы заместителей, с одной стороны, и зависимость степени замещения от размеров концевой заместителя — с другой. Действительно, чем больше объем заместителя, тем более рыхлыми становятся ассоциаты и тем больше свободных гидроксильных групп могут оказаться «запутанными» внутри ассоциированных макромолекул.

В этой связи интересно проанализировать данные работы³⁴, по синтезу ряда полиоксипропиленовых эфиров карбодиимидным методом. Авторы³⁴ получали активированное производное ПЭГ обработкой его дициклогексилкарбодиимидом, а затем это производное вводили в реакцию с карбоновой кислотой:



Выходы полимерных эфиров оказались очень низкими (см. табл. 1). В то же время, если для синтеза полиэтиленгликолевого эфира пальмитиновой кислоты использовать пальмитилхлорид, то получаются эфиры со степенью замещения $\sim 80\%$. По-видимому, предварительная активация ПЭГ дициклогексилкарбодиимидом приводит к образованию производных ПЭГ, содержащих группировку $R-NH-\underset{\substack{| \\ O-R'}}{C=}$ очень

близкую по структуре к амидной, которая также может образовывать водородные связи, приводящие к образованию ассоциатов макромолекул. Обращает на себя внимание корреляция между увеличением размера заместителей и уменьшением степени замещения эфиров. По-видимому, количественного замещения можно было бы добиться, если бы дициклогексилкарбодиимид использовали для активации карбоксильного компонента с последующим введением гликоля.

Значительный шаг вперед в плане развития исследований по химической модификации ПЭГ сделан в работах⁷⁷⁻⁷⁸, посвященных синтезу полиоксипропиленовых эфиров аминокислот и пептидов⁷⁵⁻⁷⁸. Прежде всего, используя большие избытки низкомолекулярных реагентов, авторам этих работ удалось получить с высокими выходами (80—99%) эфиры N-защищенных аминокислот при проведении реакции в водных или органических растворителях («жидкофазный метод синтеза»)^{77, 78}. Далее, благодаря разработанному ими так называемому кристаллизационному методу⁷⁹, авторам удалось значительно сократить время синтеза за счет повышения эффективности очистки продуктов реакции от непрореагировавших веществ и примесей. Наконец, следующим преимуществом использования ПЭГ в качестве C-концевой защитной группы заключается в том, что он облегчает растворение труднорастворимых пептидов в растворителях различной химической природы, что позволяет изучать их конформационное состояние в растворах методом кругового дихроизма⁷⁹. Заметим, что возможность использования этого метода в применении к ПЭГ-пептидам обусловлена оптической прозрачностью ПЭГ в видимой и ультрафиолетовой областях до 190 нм.

Таким методом⁷⁹ исследован гидрофобный октапептид миоглобиновой последовательности 66—73 и обнаружено влияние защищенной или свободной N-концевой аминогруппы на конформацию пептида. Показано, что заблокированный октапептид имеет более высокую степень спиральности, чем соответствующий пептид с незащищенной аминогруппой. В этой же работе изучено конформационное состояние ПЭГ-эфиров нона- и декааланинов в двух растворителях — трифторэтанол и в воде и показано, что пептид со свободной аминогруппой имеет в обоих растворителях β -конформацию. Соответствующий пептид, содержащий N-защитную группировку, имеет спиральную конформацию. Отсюда

авторы⁷⁷ делают вывод о решающем влиянии концевой аминокислотной группы на формирование β -структуры пептида. Обращает на себя внимание тот факт, что при введении концевых пептидных фрагментов, способных образовывать стабильные конформационные изомеры, эффекты взаимодействия этих групп с основной цепью ПЭГ в органических растворителях становятся минимальными. Однако в водных растворах ПЭГ-реагентов, содержащих гидрофобные концевые группы, возможны гидрофобные взаимодействия между неполярными группами пептидного фрагмента, приводящие к образованию структур мицеллярного типа, в которых гидрофобным ядром мицеллы являются неполярные концевые группы, а роль гидрофильного обрамления выполняют полимерные цепи ПЭГ. Ассоциация подобного типа обнаружена в⁷⁴ для случая полиоксиэтиленовых эфиров N-защищенных бензоилгистидинов.

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что изучение взаимодействия полимера с биомакромолекулами *in vitro* или с организмом *in vivo* должно развиваться параллельно с изучением его физико-химических свойств. Можно надеяться, что именно такой подход приведет к взаимному обогащению этих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. T. C. Laurent, Europ. J. Biochem., 21, 498 (1971).
2. T. C. Laurent, B. N. Preston, B. Carlsson, Там же, 43, 231 (1974).
3. Ю. М. Евдокимов, Н. М. Акименко, Н. Е. Глухова, А. С. Тихоненко, Я. М. Варшавский, Молек. биол., 7, 151 (1974).
4. Б. И. Курганов, И. Н. Топчиева, Н. П. Лисовская, Н. А. Чеботарева, О. Я. Нотариус, Биохимия, 44, 629 (1979).
5. P. H. Iverius, T. C. Laurent, Biochim. Biophys. Acta, 133, 371 (1967).
6. A. McPherson, J. Biol. Chem., 251, 6300 (1976).
7. M. Ceska, Experientia, 28, 146 (1972).
8. M. Ceska, Там же, 27, 767 (1971).
9. F. W. Janssen, H. W. Ruelius, Biochim. Biophys. Acta, 151, 330 (1968).
10. A. Polson, G. M. Potgieter, J. F. Largier, G. E. F. Mears, E. J. Jourhert, Там же, 82, 463 (1964).
11. P. W. Chun, M. Fried, E. F. Ellis, Anal. Biochem., 19, 481 (1967).
12. T. C. Laurent, A. G. Ogston, Biochem. J., 89, 249 (1963).
13. T. C. Laurent, B. N. Preston, H. Pertoft, B. Gustafsson, M. McCabe, Europ. J. Biochem., 53, 129 (1975).
14. T. C. Laurent, Biochem. J., 93, 106 (1964).
15. V. Jancsik, T. Keleti, J. Molec. Catal., 1, 137 (1975/1976).
16. В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель, Структура макромолекул в растворах, «Наука», М., 1964, стр. 55.
17. T. C. Laurent, The Chemical Physiology of Mucopolysaccharides, Little, Brown and Co., 1967, p. 153.
18. E. Edmond, A. G. Ogston, Biochem. J., 109, 569 (1968).
19. F. E. Bailey, R. W. Callard, J. Appl. Polym. Sci., 1, 373 (1959).
20. G. G. Hammes, P. B. Roberts, J. Am. Chem. Soc., 90, 7119 (1968).
21. K. H. Ebert, Monatsch. Chem., 98, 1128 (1967).
22. J. Goldfarb, S. Rodriguez, Makromol. Chem., 116, 96 (1968).
23. А. А. Баран, И. М. Соломенцева, В. В. Ман, О. Д. Куриленко, ДАН СССР, 207, 363 (1972).
24. P.-A. Albertsson, Partition of Cell Particles and Macromolecules, Almqvist and Wiksell, Stockholm, 1971.
25. G. Johansson, Biochim. Biophys. Acta, 221, 387 (1970).
26. P.-A. Albertsson, Adv. Protein Chem., 24, 309 (1970).
27. S. Sasakawa, H. Walter, Biochemistry, 11, 2760 (1972).
28. G. Blomquist, Biochim. Biophys. Acta, 420, 81 (1976).
29. G. Johansson, Methodological Developments in Biochemistry, 2, 155 (1973).
30. V. P. Shandhag, C.-G. Axelsson, Europ. J. Biochem., 60, 17 (1975).
31. C.-G. Axelsson, V. P. Shandhag, Там же, 71, 419 (1976).
32. S. D. Flanagan, S. H. Barodes, J. Biolog. Chem., 250, 1484 (1975).
33. P. Hubert, E. Dellacherie, J. Neel, E.-E. Baulieu, FEBS Letters, 65, 169 (1976).
34. G. Johansson, Biochim. Biophys. Acta, 451, 517 (1976).
35. A. J. P. Martin, Biochem. Soc. Symp., 3, 4 (1949).

36. Иммобилизованные ферменты, т. 1, ред. И. В. Березин, Изд. МГУ, М., 1976, стр. 116.
37. S. Fukui, A. Tanaka, T. Iida, E. Hasegawa, FEBS Letters, **66**, 179 (1976).
38. M. P. Cooke, B. G. Archer, H. Krakauer, Biochem. Biophys. Res. Commun., **57**, 1032 (1974).
39. B. G. Archer, H. Krakauer, Biochemistry, **16**, 615 (1977).
40. B. G. Archer, H. Krakauer, Там же, **16**, 618 (1977).
41. A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Palczuk, F. F. Davis, Fed. Proc., **33**, 1317 (1974).
42. G. P. Royer, Пат. США 4002531 (1977); С. А., **87**, 129550 (1977).
43. T. P. King, L. Kochoumian, L. M. Lichtenstein, Arch. Biochem. Biophys., **178**, 442 (1977).
44. B. Maggio, Q. F. Ahkong, J. A. Lucy, Biochem. J., **158**, 647 (1976).
45. K. N. Kao, M. R. Michayluk, Planta, **115**, 355 (1974).
46. Q. F. Ahkong, W. Tampion, J. A. Lucy, Nature (London), **256**, 208 (1975).
47. G. Pontecorvo, Somatic Cell Genet., **1**, 397 (1975).
48. R. L. Schuler, W. A. Zisman, J. Phys. Chem., **74**, 1523 (1970).
49. P. J. Hillson, J. Photogr. Sci., **11**, 225 (1963).
50. И. М. Паписов, В. Ю. Барановский, В. Я. Черняк, А. Д. Антипина, В. А. Кабанов, ДАН СССР, **199**, 1364 (1971).
51. Nonionic Surfactants, ed. M. J. Schick, Marcel Dekker, N. Y., 1966.
52. Encyclopedia of Polymer Science and Technology, v. 6, 1967, p. 103.
53. J.-C. Galin, M. Galin, P. Calme, Makromol. Chem., **134**, 273 (1970).
54. L. Favretto, G. P. Marletta, L. F. Gabrielli, J. Chromatogr., **50**, 304 (1970).
55. Y.-K. Leung, Polymer, **17**, 374 (1976).
56. L. Favretto, G. P. Marletta, L. F. Gabrielli, J. Chromatogr., **46**, 255 (1970).
57. C. Calzolari, L. Favretto, B. Stancher, Там же, **54**, 373 (1971).
58. C. Calzolari, L. Favretto, B. Stancher, Там же, **47**, 209 (1970).
59. L. Gildenberg, J. R. Troworidge, J. Am. Oil. Chem. Soc., **42**, 69 (1965).
60. A. M. Afji-Ejjat, J. N. Hay, Polymer Letters, **9**, 651 (1971).
61. P. Törmälä, J. Martinmaa, K. Silvennoinen, K. Vaantera, Acta Chem. Scand., **24**, 3066 (1970).
62. А. Б. Шапиро, К. Баймагамбетов, М. Г. Гольдфельд, Э. Г. Розанцев, Ж. орг. химии, **8**, 2263 (1972).
63. V. P. Shanbhag, G. Johansson, Biochem. Biophys. Res. Commun., **61**, 1141 (1974).
64. L. Monnerie, J. Neel, Compt. rend., **256**, 1528 (1963).
65. D. V. Emerson, W. K. Laugudon, J. Niu, Macromolecules, **9**, 667 (1976).
66. G. Takerkart, E. Segard, M. Monsigny, FEBS Letters, **42**, 214 (1974).
67. L. Monnerie, J. Neel, Comp. rend., **258**, 4986 (1964).
68. H. Inagaki, M. Tanaka, Makromol. Chem., **74**, 145 (1964).
69. H. Tanaka, T. Janagida, A. Feramoto, H. Fujita, J. Phys. Chem., **71**, 2415 (1967).
70. M. Mutter, H. Mutter, R. Uhmman, E. Bayer, Biopolymers, **15**, 917 (1976).
71. И. Н. Топчиева, А. Б. Соловьева, Б. И. Курганов, В. А. Кабанов, Высокомолек. соед., **A14**, 825 (1972).
72. И. Н. Топчиева, А. Б. Соловьева, В. А. Кабанов, ДАН СССР, **199**, 1084 (1971).
73. И. Н. Топчиева, Г. Ф. Пекер, Г. Б. Постникова, Б. И. Курганов, В. А. Кабанов, Высокомолек. соед., **A15**, 2153 (1973).
74. И. Н. Топчиева, В. А. Кабанов, Там же, **12**, 542 (1970).
75. M. Mutter, H. Hagenmaier, Angew. Chem., **83**, 883 (1971).
76. E. Bayer, M. Mutter, Nature, **237**, 512 (1972).
77. E. Bayer, M. Mutter, Chem. Ber., **107**, 1344 (1974).
78. M. Mutter, E. Bayer, Angew. Chem., **86**, 101 (1974).

Московский государственный университет,
химический факультет