

Аддукты белков с водорастворимыми полиалкиленоксидами

И.Н.Топчиева, Н.В.Ефремова, Б.И.Курганов

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

119899 Москва, Ленинские горы, факс (095) 939–0174

Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук

117071 Москва, Ленинский просп., 33, факс (095) 954–2732

Обзор посвящен методам модификации белков водорастворимыми дифильными блок-сополимерами оксидов этилена и пропилена, а также свойствам образующихся полимер-белковых аддуктов. Рассмотрено два основных класса таких аддуктов: конъюгаты, полученные путем образования ковалентных связей между белком и полимером, и нековалентные комплексы. Показано, что амфифильный характер полимерных цепей обуславливает ряд новых свойств конъюгатов с блок-сополимерами, таких как способность транслоцироваться в клетки, сольубилизовать нерастворимые биологически активные соединения и служить их переносчиками, а также взаимодействовать с поверхностно-активными веществами различной химической природы.

Библиография — 50 ссылок.

Оглавление

I. Введение	293
II. Синтез, выделение и характеристика конъюгатов	294
III. Физико-химические свойства конъюгатов	298
IV. Мембранотропные свойства конъюгатов	300
V. Сольубилизирующие свойства конъюгатов	302
VI. Нековалентные комплексы между α -химотрипсином и блок-сополимером оксидов этилена и пропилена	303
VII. Заключение	306

I. Введение

С середины 70-х годов началось бурное развитие нового направления белковой инженерии, состоящего в целенаправленном изменении свойств белковых молекул путем их химической модификации водорастворимыми полимерами. Получаемый в результате такой модификации конъюгат состоит из двух макромолекулярных фрагментов — белкового и полимерного — и сочетает в себе свойства каждого из них. Чаще всего в качестве полимерного фрагмента конъюгата используют декстран,¹ поли-*N*-винилпирролидон² и полиэтиленоксид (ПЭО).^{3–5} Из перечисленных выше полимеров наиболее широкое распространение получил ПЭО, являющийся нетоксичным, неиммуногенным синтетическим полимером, доступным в широком диапазоне молекулярных

масс.⁶ Полиэтиленоксид-белковые конъюгаты характеризуются пониженной иммуногенностью и антигенностью, увеличенным временем циркуляции в кровяном русле, а в ряде случаев повышенной стабильностью.⁷ Эти свойства в значительной мере обусловлены эффектом стерической стабилизации белковой глобулы за счет создания вокруг нее оболочки из присоединенных полимерных цепей.

Важным свойством ПЭО-белковых конъюгатов является их способность растворяться в органических растворителях. Это позволяет использовать данные конъюгаты в качестве биокатализаторов для реакций пептидного синтеза,⁸ перэтерификации,⁹ аминирования сложных эфиров.¹⁰

Следующим этапом в конструировании полимер-белковых конъюгатов является введение в полимерную цепь дополнительных фрагментов (блоков) на стадии синтеза полимерных реагентов. Такой подход привел к получению конъюгатов белков с блок-сополимерами оксидов этилена и пропилена, а именно проксанолами (Про), плурониками. Эти сополимеры являются неионогенными поверхностно-активными веществами, в которых блок ПЭО представляет собой гидрофильную, а блок полипропиленоксида (ППО) — гидрофобную часть молекулы.¹¹ По сравнению с ПЭО-белковыми конъюгатами, конъюгаты белков с блок-сополимерами характеризуются большим структурным разнообразием, проявляющемся, во-первых, в возможности присоединения сополимеров с различным числом, составом и расположением блоков, и, во-вторых, в возможности различного расположения полимерных цепей на поверхности белковой глобулы. Амфифильный характер присоединенных полимерных цепей обуславливает новые свойства конъюгатов, такие как способность транслоцироваться в клетку,^{12, 13} эффективно сольубилизовать нерастворимые биологически ак-

И.Н.Топчиева. Доктор химических наук, старший научный сотрудник кафедры высокомолекулярных соединений Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова. Область научных интересов: химические превращения полимеров, супрамолекулярная и биометрическая химия. Телефон (095) 939–3127

Н.В.Ефремова. Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории ферментных систем ИНБИ РАН. Область научных интересов: химическая модификация белков, полимераналогичные превращения, супрамолекулярная химия.

Б.И.Курганов. Доктор химических наук, профессор, заведующий той же лабораторией. Область научных интересов: физико-химическая энзимология, ферментативная кинетика.

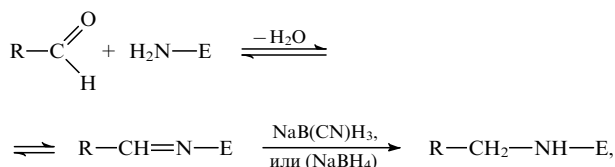
Дата поступления 23 ноября 1994 г.

тивные соединения^{14, 15} и служить их переносчиками, а также взаимодействовать с поверхностно-активными веществами различной химической природы.¹⁶ В настоящей работе мы рассмотрим методы синтеза и характеристики конъюгатов белков с Про, а также их физико-химические и биологические свойства. Наряду с традиционными методами получения полимер-белковых конъюгатов, осуществляемыми путем ковалентного взаимодействия полимера с белком, будут рассмотрены и новые подходы к синтезу структур подобного типа, основанные на образовании нековалентных комплексов между белком и Про.

II. Синтез, выделение и характеристика конъюгатов

1. Синтез конъюгатов

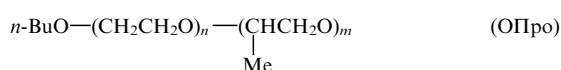
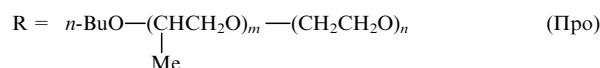
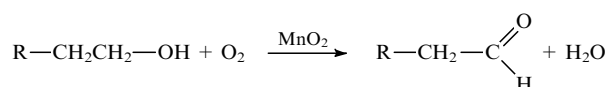
Конъюгаты белков с проксанолами синтезируют путем восстановительного алкилирования первичных поверхностных аминогрупп белка полимерными моноальдегидами.



где R — полимерная цепь, E — белковая молекула.

Подобным путем были получены конъюгаты на основе следующих белков: бычьего сывороточного альбумина (БСА),¹⁴ α -химотрипсина (ХТ),¹⁷ пируваткиназы из скелетных мышц кролика, рицина из семян клещевины, вискумина из омелы,¹⁸ классического ингибитора протеиназ типа Баумана–Бирк из соевых бобов (ББИ)¹⁹ и цитохрома *c*.¹² Конъюгаты на основе ХТ и ББИ получали в присутствии обратимых ингибиторов активных центров ферментов. Например, при синтезе конъюгатов на основе ХТ нами были использованы для этой цели *N*-бензоил- или *N*-ацетил-L-тирозин.¹⁶ Цианборгидрид натрия является более удобным восстанавливающим агентом для получения конъюгатов по сравнению с боргидридом натрия, приводящим к побочному восстановлению дисульфидных связей между полипептидными цепочками.

Моноальдегидные производные ПЭО и Про получают путем окисления соответствующих монофункциональных полимеров кислородом воздуха в растворе хлороформа в присутствии оксида марганца(IV) в качестве катализатора.²⁰



$$m = 14, n = 25$$



Видно, что единственное различие между полимерами Про и ОПро (обращенный проксанол) состоит в положении гидрофобного ППО-блока относительно концевой альдегидной группы. Использование этих полимерных реагентов позволяет синтезировать конъюгаты с различным порядком

присоединения полимерных блоков к белку. Число полимерных цепей в конъюгате можно регулировать путем изменения соотношения полимер/белок в реакционной смеси.

Молекулярные модели описываемых в данной работе конъюгатов приведены на рис. 1. Видно, что конъюгаты представляют собой звездообразные структуры с белковой глобулой в центре и ковалентно присоединенными к ней полимерными цепями. При использовании полимерных реагентов со среднечисловой молекулярной массой 2000 длина полимерных цепей составляет 20.7 нм для ПЭО (рис. 1, тип I) и 21.6 нм для Про и ОПро (рис. 1, типы II и III), что является существенно больше, чем диаметр белковой глобулы (например, для ХТ усредненное значение двух полуосей глобулы составляет 2.5 нм). Такое строение позволяет предположить, что полимерные цепи будут стерически экранировать белок, уменьшая его связывание с макромолекулярными субстратами, антителами и протеолитическими ферментами. Очевидно, что подобный эффект полимерных цепей должен зависеть от их числа и характера распределения по поверхности белка в конъюгате.

Поскольку полимерные цепи в конъюгатах присоединены лишь к части поверхностных аминогрупп белка, возникает возможность их различного взаимного расположения. Так, полимерные цепи могут быть равномерно распределены по поверхности белка (рис. 1, IIb) или быть сконцентрированы в одном месте с образованием доменов (рис. 1, IIa). Естественно, реализация структур того или иного типа задается

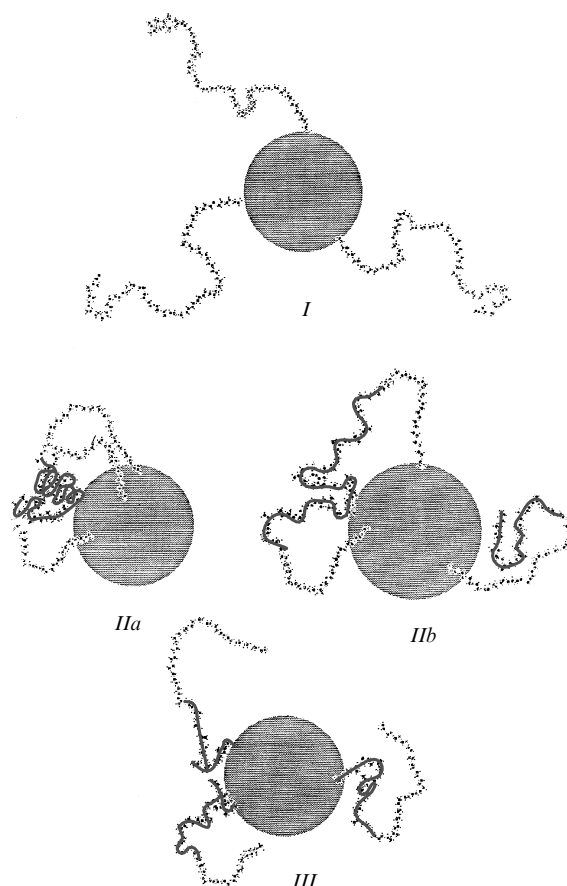


Рис. 1. Молекулярные модели конъюгатов белков: I — с ПЭО (М 2000), IIa — с Про с неравномерным распределением полимерных цепей, IIb — с Про с равномерным распределением полимерных цепей. III — с ОПро. Темным цветом выделены ППО-блоки полимерных цепей проксанолов; радиус белковой глобулы — 25 Å (усредненное значение двух полуосей глобулы ХТ)²¹

на стадии синтеза конъюгата. При проведении синтеза в водных буферных средах, где проксанолы проявляют способность к самоассоциации, обусловленную их дифильной природой,²² возникают условия для их неравномерного распределения по поверхности белковой глобулы. Полученные таким образом конъюгаты можно представить в виде своеобразных внутримолекулярных мицелл, стабилизированных гидрофобными взаимодействиями между присоединенными к белку полимерными цепями. В то же время проведение синтеза конъюгатов в водно-органических средах, где гидрофобные взаимодействия между молекулами проксанолов подавляются,²³ должно способствовать их более равномерному распределению на поверхности белковой глобулы. С учетом этих соображений были синтезированы две серии конъюгатов, обозначаемые далее как неравномерные (нерав.) и равномерные (рав.). Следует отметить, что концентрации органического растворителя в реакционной смеси при синтезе равномерных конъюгатов были много ниже пороговых концентраций, вызывающих денатурацию белков.²⁴

Чтобы удостовериться в правильности сделанных предположений, необходимо было оценить различия в распределении полимерных цепей по поверхности белковой глобулы в конъюгатах, синтезированных в различных условиях. С этой целью была использована способность полимерных цепей полиалкиленоксидов взаимодействовать с объемистым циклическим лигандом — β -циклодекстрином (β -ЦД). Ранее нами было показано,²⁵ что β -ЦД образует комплексы включения с проксанолами, причем число «нанизанных» на полимерные цепи молекул β -ЦД определяется числом входящих в состав проксанола звеньев оксида пропилена. Естественно, что взаимодействия полимерных цепей конъюгатов с этим лигандом зависит от характера распределения полимерных цепей по поверхности белка, причем равномерное распределение полимерных цепей не должно препятствовать образованию комплексов с β -ЦД, тогда как при неравномерном распределении взаимодействия будут затруднены по стерическим причинам. Действительно, было показано, что только конъюгаты, для которых предполагалось равномерное распределение полимерных цепей (рис. 1, *Ib*), так же как и свободные проксанолы, образуют нерастворимые в воде кристаллические комплексы включения с β -ЦД. В то же время конъюгаты с предположительно неравномерным распределением цепей комплексов с β -ЦД не образуют.¹⁶ Таким образом, было подтверждено, что конъюгаты, синтезированные в водной среде, характеризуются неравномерным (до-

менным) характером распределения полимерных цепей в отличие от конъюгатов, синтезированных в водно-органической среде и характеризующихся более равномерным распределением. Различия в строении таких конъюгатов обуславливают и ряд отличий в их физико-химических свойствах и биологическом поведении.

2. Очистка конъюгатов

Очистка конъюгатов на основе проксанолов от избытка полимерного реагента представляет собой более сложную задачу, чем в случае ПЭО-белковых конъюгатов. Это обусловлено амфифильными свойствами проксанолов, способных к образованию ассоциатов с полимерными цепями, входящими в состав конъюгата. С учетом этого было предложено два метода очистки, позволяющих подавить гидрофобные взаимодействия между полимерным реагентом и полимерными цепями конъюгата: осаждение конъюгата ацетоном;¹⁷ гель-проникающая хроматография с использованием смеси этанол–вода (1:4) в качестве элюента.¹² Для доказательства отсутствия примеси свободного полимера в конъюгате использовалась тонкослойная хроматография.

3. Характеристика конъюгатов

В табл. 1 и 2 приведены характеристики полученных конъюгатов: состав, степень модификации (среднее число молекул полимера, присоединенных к одной молекуле белка) и число первичных, т.е. немодифицированных аминокрупп в белковой части конъюгата.

Содержание белка в конъюгатах определяли спектрофотометрически ($\lambda = 280$ нм), а также с помощью биуретовой реакции.²⁶ Во всех случаях в качестве стандартов использовали исходные белки. Как было показано ранее,^{3,4} присутствие полиалкиленоксида не влияет на результаты анализа белка с использованием биуретовой реакции. Для определения состава был использован метод ЯМР ^{13}C , позволяющий провести независимое измерение содержания белковой и полимерной составляющих. Такие измерения были проведены на примере двух конъюгатов БСА с Про (табл. 2). В предварительном опыте по спектрам индивидуальных компонентов были найдены области, где сигналы белка и полимера не перекрываются. Для БСА — это область углеродных атомов карбоксильных групп, соответствующая 172–180 м.д., для Про — область углеродных атомов метиленовых групп основной цепи, соответствующая 70–77 м.д.

Таблица 1. Характеристика конъюгатов α -химотрипсина с полиэтиленоксидом и проксанолами

Полимер	Тип конъюгата ^a	Обозначение	Степень модификации (<i>n</i>)	Содержание ХТ, ^b масс. %	Число незамещенных NH ₂ -групп (<i>m</i>)
ПЭО	<i>I</i>	(ПЭО) ₃ –ХТ	3	81.0 (80.5)	12
ПЭО	<i>I</i>	(ПЭО) ₉ –ХТ	9	58.1 (58.8)	5
Про	<i>IIa</i>	(Про) ₂ –ХТ(нерав.)	2	86.2 (86.1)	13
Про	<i>IIa</i>	(Про) ₃ –ХТ(нерав.)	3	82.1 (79.8)	12
Про	<i>IIa</i>	(Про) ₆ –ХТ(нерав.)	6	67.5 (66.7)	8
Про	<i>IIa</i>	(Про) ₇ –ХТ(нерав.)	7	64.0 (64.1)	—
Про	<i>IIa</i>	(Про) ₁₀ –ХТ(нерав.)	10	55.6	4
Про	<i>IIb</i>	(Про) ₃ –ХТ(рав.)	3	80.6	11
Про	<i>IIb</i>	(Про) ₅ –ХТ(рав.)	5	71.5 (71.0)	9
Про	<i>IIb</i>	(Про) ₆ –ХТ(рав.)	6	67.4 (67.5)	—
Про	<i>IIb</i>	(Про) ₁₁ –ХТ(рав.)	11	45.5 (46.0)	—
ОПро	<i>III</i>	(ОПро) ₃ –ХТ	3	80.6 (80.7)	12
ОПро	<i>III</i>	(ОПро) ₇ –ХТ	7	64.2 (64.0)	—

^a Здесь и далее обозначения *I*, *IIa*, *IIb*, *III* соответствуют структурам, представленным на рис. 1.

^b Содержание белка в конъюгатах определяли спектрофотометрически, а также с помощью биуретовой реакции (значения в скобках).

Таблица 2. Характеристика конъюгатов бычьего сывороточного альбумина с полиэтиленоксидом и проксанолами

Полимер	Тип конъюгата	Обозначения	Степень модификации	Содержание БСА, масс. %		
				биуретова реакция ^a	УФ (280 нм) ^a	ЯМР ¹³ C
ПЭО	I	(ПЭО) ₅ –БСА	5	87	87	—
ПЭО	I	(ПЭО) ₁₄ –БСА	14	70	71	—
Про	IIa	(Про) ₅ –БСА(нерав.)	5	87	87	—
Про	IIa	(Про) ₈ –БСА(нерав.)	8	81	80	78
Про	IIb	(Про) ₁₅ –БСА(рав.)	15	70	69	70
ОПро	III	(ОПро) ₆ –БСА	6	85	84	—
ОПро	III	(ОПро) ₁₁ –БСА	11	75	75	—

^a Метод определения содержания белка в конъюгате.

На основании спектров специально приготовленных растворов, содержащих смеси белка и Про в определенных массовых соотношениях, были определены интегральные интенсивности выбранных аналитических сигналов белка и полимера. Для них была построена зависимость интегральных интенсивностей от массового соотношения полимер/белок, оказавшаяся прямолинейной. Измеряя интегральные интенсивности в спектрах синтезированных конъюгатов, по полученному калибровочному графику определяли их массовый состав. Оказалось, что полученные результаты совпадают (в пределах ошибки измерения) с данными спектрофотометрического и химического методов (см. табл. 2). В дальнейшем мы считали достаточным для определения состава конъюгата использование одного только спектрофотометрического и (или) химического метода, как не требующих значительных затрат вещества. В этом случае содержание полимера ($m_{\text{П}}$, мас. %) в конъюгате принималось равным:

$$m_{\text{П}} = 100 - m_{\text{Б}} \quad (1)$$

где $m_{\text{Б}}$ — содержание белка (мол. %).

Степень модификации (n) рассчитывалась из данных по составу конъюгата как среднее число молекул полимера, присоединенных к одной молекуле белка:

$$n = \frac{m_{\text{П}}/\bar{M}_{\text{П}}}{m_{\text{Б}}/M_{\text{Б}}}$$

где $\bar{M}_{\text{П}}$ — среднечисленная молекулярная масса полимера, $M_{\text{Б}}$ — молекулярная масса белка.

Кроме того, степень модификации была независимо определена титрованием оставшихся незамещенными первичных аминогрупп белка. Для белков, для которых известно общее число первичных поверхностных аминогрупп, степень модификации n можно определить как разность

$$n = r - m \quad (2)$$

где r — общее число поверхностных NH_2 -групп, m — число незамещенных NH_2 -групп.

Нужно заметить, что обычно для определения числа незамещенных поверхностных NH_2 -групп в белках проводится титрование раствора белка 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой (ТНБС).²⁷ В нашем случае, однако, этот прием неприменим, так как в реакцию с ТНБС вступают как оставшиеся незамещенными NH_2 -группы конъюгатов, так и замещенные, вторичные аминогруппы.²⁸ Поэтому измеряемое по реакции с ТНБС число поверхностных аминогрупп в конъюгатах остается тем же, что и в исходном белке. Для определения числа аминогрупп белка, оставшихся незамещенными после проведения конъюгирования, мы обратились к методу Руффа,²⁸ основанному на взаимодействии первичных аминогрупп с *o*-фталевым диальдегидом в присутствии меркаптоантарной кислоты. Этим методом было определено число первичных NH_2 -групп для ряда конъюгатов ХТ. Степень модификации, рассчитанная по формуле (2) с учетом того, что общее число первичных поверхностных аминогрупп ХТ равно 15, оказалась близкой к величине, рассчитанной из содержания белка в конъюгате по формуле (1).

Хорошее совпадение результатов, полученных обоими методами, подтверждает тот факт, что модификация проходит только по первичным аминогруппам белка и не затрагивает другие аминокислотные остатки.

4. Каталитические свойства конъюгатов

Каталитические свойства конъюгатов на основе ХТ приведены в табл. 3, из которой видно, что:

1. Конъюгаты сохраняют высокую ферментативную активность по отношению к обоим использованным субстратам — низкомолекулярному (этиловый эфир *N*-бензоил-L-тирозина (БТЭЭ)) и высокомолекулярному (казеин).

Таблица 3. Ферментативные свойства конъюгатов α -химотрипсина с полиэтиленоксидом и проксанолами

Белок, конъюгат	Активность при ферментативном гидролизе казеина, %	Ферментативный гидролиз БТЭЭ			Содержание активных центров, %
		активность, %	k_{cat} , с ⁻¹	$K_{\text{m}} \cdot 10^5$, моль · л ⁻¹	
ХТ	100	100	31.2 ± 0.5	6.27 ± 0.94	80
(Про) ₅ –ХТ(нерав.)	102	97	42.4 ± 2.8	13.0 ± 2.9	61
(Про) ₃ –ХТ(рав.)	103	115	—	—	80
(Про) ₆ –ХТ(рав.)	96	98	32.5 ± 1.2	6.18 ± 0.82	67
(Про) ₁₁ –ХТ(рав.)	50	57	37.0 ± 0.4	21.7 ± 3.5	40
(ПЭО) ₆ –ХТ	97	98	40.4 ± 0.8	9.3 ± 1.5	80
(ОПро) ₃ –ХТ	98	100	—	—	80

2. Кинетические константы гидролиза низкомолекулярного субстрата (БТЭЭ) ферментом, входящим в состав конъюгатов, изменились незначительно по сравнению с нативным ферментом. Аналогичные результаты были получены и при исследовании гидролиза высокомолекулярного субстрата — казеина. По-видимому, это связано с тем, что активный центр α -химотрипсина на стадии синтеза конъюгата был защищен обратимо связанным с ним ингибитором, и полимерные цепи не могли присоединиться в непосредственной близости от активного центра фермента.

3. Существенная потеря ферментативной активности наблюдалась только при достижении высоких степеней модификации (11 и более присоединенных полимерных цепей). Такая же тенденция была описана в работе³⁰ для конъюгатов на основе ХТ и ПЭО. Видно, что уменьшение активности в этом случае не является следствием снижения k_{cat} , а происходит в результате уменьшения числа активных центров в конъюгатах (табл. 3, (Про)₁₁ — ХТ(рав.)).

5. Термическая инактивация конъюгатов

Важным практическим следствием модификации белков полимерами является изменение устойчивости белковой глобулы к действию повышенных температур.³¹ Для исследования термической стабильности конъюгатов белков с проксанолами применялся метод, состоящий в кинетическом изучении ферментативных свойств конъюгатов при повышенной температуре.¹⁷ Соответствующие кинетические кривые (зависимости активности от времени) представлены на рис. 2. Видно, что скорость термоинактивации ХТ существенно уменьшается уже при присоединении трех полимерных цепей (кривые 2 и 3 на рис. 2). По мере увеличения степени модификации конъюгата этот эффект становится значительнее (кривые 4–6, рис. 2), т.е. термическая стабильность конъюгатов возрастает симбатно с увеличением степени модификации. Наибольшее стабилизирующее действие оказывает модификация фермента с помощью ПЭО (кривая 6 на рис. 2, конъюгат содержит 9 полимерных цепей); образец сохраняет 80% первоначальной активности после трехчасового нагревания при 45°C.

В специально поставленном эксперименте было показано, что простое добавление полиалкиленоксидов к раствору ХТ не оказывает влияния на его термостабильность.

Обращает на себя внимание различие в форме кинетических кривых термоинактивации для конъюгата ХТ с ПЭО

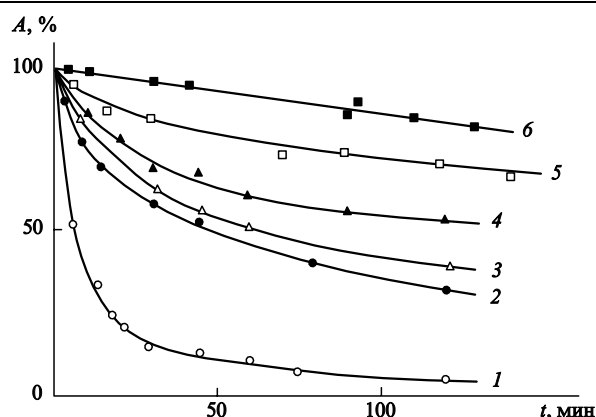


Рис. 2. Кинетические кривые термоинактивации ХТ и его конъюгатов с полиалкиленоксидом: 1 — ХТ, 2 — (ОПро)₃–ХТ, 3 — (Про)₃–ХТ(нер.), 4 — (Про)₆–ХТ(нер.), 5 — (Про)₅–ХТ(рав.), 6 — (ПЭО)₉–ХТ. Здесь и на рис. 3 и 4 условия термоинактивации: 0.2 моль · л⁻¹ трис-НСl, рН 8.0, 45°C; концентрация фермента в каждом образце составляла 0.1 мкмоль · л⁻¹

(кривая 6, рис. 2) и трех конъюгатов с блок-сополимерами (кривые 2–4). Для всех случаев была проведена математическая обработка кривых в координатах реакции первого порядка. Кинетические данные по инактивации конъюгата (ПЭО)₉–ХТ в таких координатах можно описать линейной зависимостью. Рассчитанная из этих данных константа скорости составляет: $k = (2.3 + 0.1) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$.

Эти же зависимости, построенные для остальных конъюгатов, представляют собой кривые, состоящие из двух или нескольких участков с различными углами наклона. Молекулярные причины такой гетерогенности в случае нативного ХТ обсуждались ранее.³² Наиболее вероятно, что в случае конъюгата это связано также с их структурной и композиционной неоднородностью, что может проявляться как в распределении по степеням модификации различных белковых глобул, так и в неравномерном расположении цепей на поверхности отдельной белковой глобулы. Особенно заметно такая неоднородность сказывается на свойствах конъюгатов (ОПро)₃–ХТ(нер.), (Про)₃–ХТ(нер.), (Про)₆–ХТ(нер.), синтезированных в условиях, когда полимерные реагенты находятся в мицеллярной форме, что способствует неравномерности заполнения поверхности белковой глобулы полимером (см. рис. 1, Па). Напротив, конъюгат (ПЭО)₉–ХТ, содержащий полимерные цепи, неспособные образовывать мицеллярные структуры,³³ должен характеризоваться значительно более равномерным распределением полимерных цепей. Возможно, это и является одной из причин высокой термостабильности конъюгата (ПЭО)₉–ХТ.

Что касается конъюгата (Про)₅–ХТ(рав.), синтез которого проводился в условиях, исключающих возможность мицеллообразования между молекулами блок-сополимеров, его термостабильность (кривая 5, рис. 2) приближается к термостабильности конъюгата (ПЭО)₉–ХТ. Этот эффект тем более значителен, что степень модификации в конъюгате (Про)₅–ХТ почти вдвое меньше, чем в (ПЭО)₉–ХТ.

Таким образом, термическая стабильность конъюгатов увеличивается симбатно с увеличением содержания полимерных цепей в них. При одинаковом числе полимерных цепей термостабильность конъюгатов с равномерным распределением цепей выше по сравнению с неравномерным (кривые 5 и 4, рис. 2). В то же время стабильность конъюгатов, у которых гидрофобный блок находится на периферии, выше, чем у конъюгатов с обратным порядком расположения блоков. Полученные данные можно объяснить, исходя из развиваемых в литературе представлений о том, что модификация поверхности белка гидрофильными реагентами должна приводить к стабилизации белковой молекулы, так как позволяет экранировать поверхностные гидрофобные группы белка от неблагоприятного контакта с водой.^{34,35} Действительно, как видно из рис. 1, в случае неравномерного распределения полимерных цепей в конъюгате значительная часть поверхности белка остается незащищенной, в то время как при равномерном распределении имеется больше возможностей для экранирования белковой глобулы. Это и приводит к увеличению термостабильности конъюгатов с равномерным распределением цепей по сравнению с неравномерным.

6. Взаимодействие конъюгатов с дифильными соединениями

Одним из замечательных свойств конъюгатов белков с проксанолами является их способность взаимодействовать как с синтетическими, так и с природными дифильными соединениями.^{17,36} При этом полимерные цепи выполняют роль армирующей конструкции, организуя вокруг себя ансамбли из других дифильных соединений. В подобных супрамолекулярных структурах дифильные вещества могут оказывать косвенное действие на свойства белковой глобулы, входящей в состав конъюгата. В качестве примера приведем увеличение

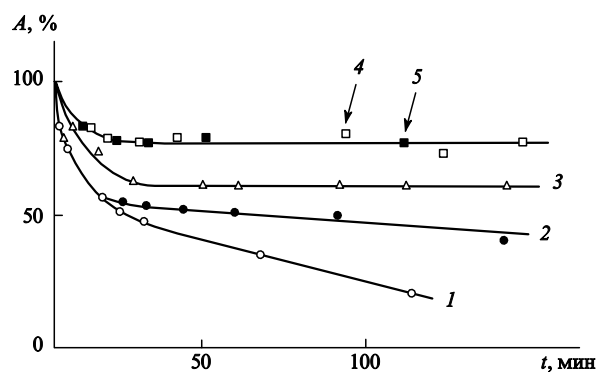


Рис. 3. Кинетические кривые термоинактивации чистого конъюгата (Про)₄-ХТ(рав.) (1) и с добавлением Про (2-5). Избыток Про по отношению к конъюгату (в моль): 2 — 50, 3 — 100, 4 — 500, 5 — 750. Условия термоинактивации см. рис. 2

термостабильности конъюгата при введении свободного проксанола (рис. 3). По-видимому, это обусловлено связыванием полимерных цепей конъюгата с дополнительно введенным полимером с образованием более плотной полимерной оболочки вокруг белка, что приводит к экранированию гидрофобных доменов на его поверхности.

Иная картина наблюдается, если в качестве дифильной добавки в систему вносят β -ЦД, способный образовывать комплексы включения с проксанолами. Как было показано ранее, в процессе взаимодействия с β -ЦД полимерные цепи проксанолов приобретают более вытянутую конформацию.³⁷ Такие цепи, по-видимому, уже не могут экранировать гидрофобные участки белка, и, как следствие, термостабильность белка в конъюгате несколько снижается (рис. 4), хотя и остается выше, чем термостабильность нативного белка. Следует отметить, что β -ЦД оказывает влияние только на термостабильность конъюгатов с равномерным характером распределения полимерных цепей по поверхности белка (IIb, рис. 1), но совершенно не влияет на термостабильность конъюгатов с неравномерным распределением цепей, с которыми по указанным ранее причинам он не взаимодействует.¹⁶

Таким образом, изучение термостабильности конъюгатов может в ряде случаев быть весьма информативным методом для выявления процессов комплексообразования между конъюгатами и дифильными веществами.

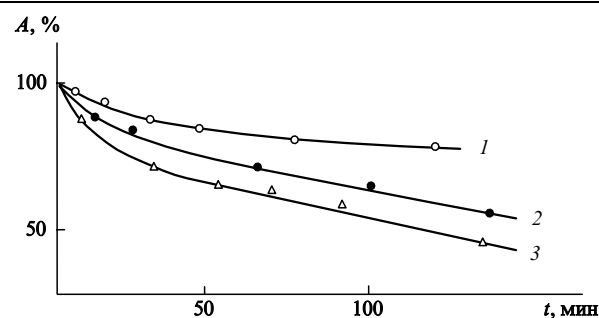


Рис. 4. Кинетические кривые термоинактивации конъюгата (Про)₃-ХТ(рав.) (1) и того же конъюгата в присутствии β -ЦД (2) и яичного лецитина (3) (молярное отношение конъюгат:добавка равно 1 : 50). Условия термоинактивации см. рис. 2

III. Физико-химические свойства конъюгатов

1. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Данные о термостабильности конъюгатов, полученные кинетическим методом, были дополнены результатами изучения тепловой денатурации конъюгатов методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). На рис. 5 представлены кривые теплопоглощения водных растворов ХТ и его конъюгатов. Видно, что для конъюгатов наблюдается существенное изменение формы пика теплопоглощения. Кроме первого максимума, расположенного в области температур 47.6–49.6°C, как и у исходного ХТ, на термограммах конъюгатов появляется второй максимум в области более высоких температур, 54.5–55.5°C, а для конъюгатов (ОПро)₃-ХТ и (Про)₇-ХТ(рав.) — плечо в той же области температур. Таким образом, для всех конъюгатов характерно появление дополнительного температурного перехода. Наиболее тривиальное объяснение этого явления состоит в том, что возникновение дополнительных переходов связано с гетерогенностью конъюгатов: фракции конъюгата с низкой степенью модификации соответствует первый максимум на кривой теплопоглощения, а фракции с высокой степенью модификации — второй. Это предположение, однако, противоречит данным ДСК для конъюгата с более высокой степенью модификации — (Про)₇-ХТ(рав.) (кривая 6, рис. 5). Как видно из рисунка, на кривой теплопоглощения данного конъюгата присутствует только один максимум ($T_{\max} = 51.2^\circ\text{C}$) и плечо в области 54.5–55.5°C.

Процесс денатурации белковой глобулы гидрофобные участки полипептидной цепи экспонируются в растворитель, становясь доступными гидрофобным блоками полимерных цепей, входящих в состав конъюгата. По-видимому, появление второго максимума на кривых теплопоглощения конъюгатов обусловлено плавлением такого полимер-белкового комплекса.

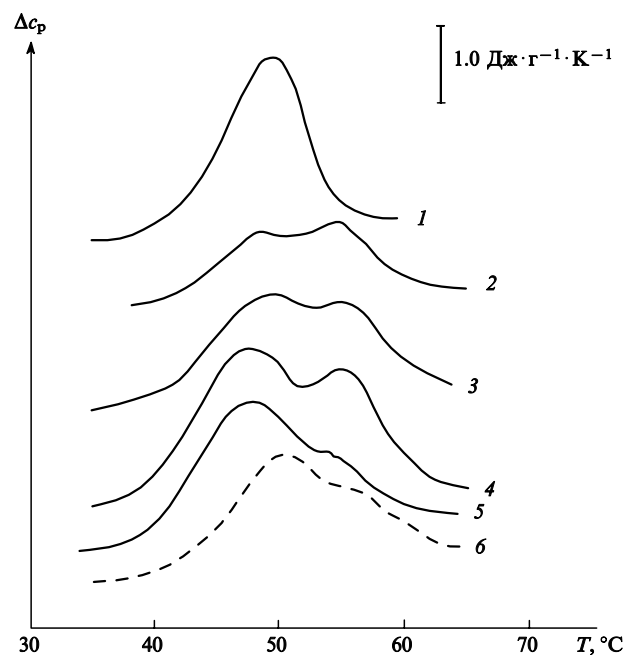


Рис. 5. Кривые теплопоглощения ХТ (1) и его конъюгатов (ПЭО)₃-ХТ (2), (Про)₃-ХТ(рав.) (3), (Про)₃-ХТ(нер.) (4), (ОПро)₃-ХТ (5) и (Про)₇-ХТ(рав.) (6). Буфер — 0.02 моль·л⁻¹ Na-фосфат, pH 7.0, концентрация препаратов — 1 мг·мл⁻¹, скорость нагрева — 1 град·мин⁻¹ (c_p — теплоемкость при постоянном давлении)

Для доказательства правильности этого предположения были проведены дополнительные исследования, подтверждающие способность проксанолов взаимодействовать с ХТ при повышенной температуре. Было показано, что:

1) при сканирующем прогреве от 20 до 60°C (1 град в минуту) раствора ХТ, содержащего Про (молярное отношение 1 : 20), не происходит агрегации белка;

2) аналогичный прогрев раствора, содержащего смесь ХТ и ПЭГ, приводит к агрегации фермента, подобно тому, как это происходит в растворе ХТ в таких же условиях;

3) продукт взаимодействия, полученный в результате прогрева смеси ХТ с Про до 60°C и отделенный от избытка свободного проксанола, содержит лишь 50% белка. Остальное, согласно данным ЯМР ^1H , составляет связанный проксанол;

4) на кривой теплопоглощения раствора, содержащего смесь ХТ—Про, наблюдается пик, близкий по положению максимуму ко второму максимуму на термограммах конъюгатов ($T_{\text{max}} = 54.5^\circ\text{C}$).

Перечисленные выше факты свидетельствуют о том, что при повышенных температурах происходит образование полимер-белкового комплекса, который имеет пик плавления, расположенный в той же области температур, что и второй максимум на кривых теплопоглощения конъюгатов.

Таким образом, изучение конъюгатов методом ДСК показало, что а) конъюгаты более термически стабильны, чем исходный белок; б) термическая стабильность конъюгатов на основе проксанолов сравнима с термической стабильностью ПЭО-белковых конъюгатов; в) возникновение второго максимума на кривых теплопоглощения конъюгатов, вероятно, связано с образованием внутримолекулярных полимер-белковых комплексов.

2. Седimentация конъюгатов

Гидродинамические свойства конъюгатов были исследованы с помощью метода скоростной седиментации. Коэффициенты седиментации конъюгатов и исходных белков приведены в табл. 4. Как видно из таблицы, модификация белков полимерами не приводит к значительным изменениям в

Таблица 4. Коэффициенты седиментации белков (s_{20}) и их конъюгатов с полиэтиленоксидом и проксанолами ($T = 20^\circ\text{C}$, 48 000 об·мин $^{-1}$, 0.02 моль·л $^{-1}$ фосфатный буфер, pH 7.0)

Белок, конъюгат	Концентрация, мг·мл $^{-1}$	s_{20} , Св
БСА	1	4.3 ± 0.2
(ПЭО) $_{15}$ —БСА	1	4.2 ± 0.2
(Про) $_8$ —БСА(нерав.)	1	4.5 ± 0.3
	2	4.0 ± 0.2
	4	4.0 ± 0.2
	6	4.2 ± 0.2
	10	4.6 ± 0.2
(ОПро) $_6$ —БСА	1	4.1 ± 0.2
ХТ	1	2.0 ± 0.15
	4	2.02 ± 0.15
	8	2.2 ± 0.17
	10	2.45 ± 0.12
(Про) $_3$ —ХТ(нерав.)	1	2.3 ± 0.1
	3	2.42 ± 0.15
	5	2.51 ± 0.16
	6	2.61 ± 0.21
	7	2.60 ± 0.18
(Про) $_3$ —ХТ(рав.)	1	1.91 ± 0.13
	3	1.99 ± 0.15
	5	2.11 ± 0.08
	10	2.25 ± 0.13

значениях коэффициентов седиментации. Это позволяет сделать вывод, что растворы конъюгатов в исследованном диапазоне концентраций не содержат агрегатов или продуктов межмолекулярного взаимодействия.

Можно было ожидать, что даже в отсутствие межмолекулярных взаимодействий ковалентное присоединение полимерных цепей к белку должно было оказать влияние на его коэффициент седиментации. Тот факт, что существенных изменений в коэффициентах седиментации конъюгатов по сравнению с коэффициентами седиментации исходных белков не было обнаружено, по-видимому, означает, что эффект увеличения молекулярной массы в модифицированном белке компенсируется флотирующим действием полимерных цепей. Следует отметить, что полиалкиленоксиды, использованные для модификации белков, обладают плотностью, близкой к плотности воды, и поэтому они не седиментируют в ультрacentрифуге.³⁸

3. Гидрофобная хроматография

Оценка гидрофобности конъюгатов проводилась с использованием обращенно-фазовой гидрофобной ВЭЖХ. На рис. 6 представлены хроматограммы нативного ББИ и конъюгата (Про) $_5$ —ББИ.¹⁸ Видно, что объем удерживания конъюгата меньше, чем нативного белка. Это указывает на его меньшее сродство к гидрофобному носителю. Такая же тенденция наблюдалась и для конъюгатов ХТ с проксанолом. На первый взгляд эти результаты могут показаться удивительными, поскольку модификация дифильными проксанолами должна сообщать белку дополнительную гидрофобность. Однако их можно объяснить, предположив, что гидрофобные блоки проксанола участвуют во внутримолекулярном взаимодействии с гидрофобными участками на поверхности белка, в то время как гидрофильные блоки полимера оказываются в основном на периферии конъюгата.

4. Конформационные модели конъюгатов Про с белками

Весь комплекс данных, полученных с помощью методов гидрофобной хроматографии, седиментации и ДСК, указывает на существование общих закономерностей в структурообразовании конъюгатов, синтезированных путем присоединения Про к белкам. Эти свойства особенно ярко проявляются для конъюгатов с гидрофобным блоком на периферии молекулы (структура II, рис. 1). Избыточная гидрофобность, привносимая проксанолами, в таких конъюгатах может компенсироваться либо путем образования

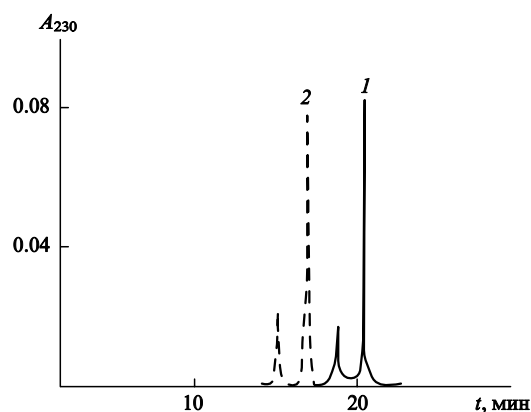


Рис. 6. Высокоэффективная жидкостная хроматография нативного ББИ (1) и его конъюгата (Про) $_5$ —ББИ(нерав.) (2). Хроматографию проводили на колонке Zorbax C-8; в качестве элюента использовали 70%-ный ацетонитрил; A_{230} — оптическая плотность при 230 нм

межмолекулярных ассоциатов, либо за счет внутримолекулярных взаимодействий. Поскольку ассоциаты в разбавленных растворах конъюгатов не были обнаружены, естественно предположить образование структур, стабилизированных за счет внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий. Это предположение подтверждается данными гидрофобной хроматографии, указывающими на то, что конъюгаты ведут себя как вещества, обладающие большей гидрофильностью, чем исходный белок. По-видимому, такие структуры устроены по типу «внутримолекулярных мицелл», в которых ППО-блоки входят в состав гидрофобного ядра, а ПЭО-блоки — в состав гидрофильного окружения.

Можно предположить также, что формирование подобных структур облегчает процесс комплексообразования между полимерными цепями проксанола и белком, протекающий при повышенных температурах.

Следует особо отметить, что предполагаемые структуры обладают определенной конформационной лабильностью. Это проявляется в присутствии гидрофобных или дифильных «партнеров», таких как липиды,³⁶ проксанолы,¹⁷ циклодекстрины,¹⁶ способных взаимодействовать с гидрофобным блоком полимерных цепей, входящих в состав конъюгатов. Вероятно, в этом случае происходит конкуренция между гидрофобными участками на поверхности белка и гидрофобными «партнерами» за возможность взаимодействовать с ППО-блоком конъюгата, в результате чего «внутримолекулярная мицелла» разрушается и происходит образование смешанных ассоциатов или комплексов.

IV. Мембранотропные свойства конъюгатов

Принципиально новым свойством конъюгатов белков с проксанолами является их способность взаимодействовать с биологическими мембранами. Поскольку входящие в их состав гидрофильные белки не являются мембраноактивными, можно предположить, что это свойство обусловлено присутствием дифильных полимерных цепей проксанолов. Как было показано ранее, проксанолы обладают способностью встраиваться в биологическую мембрану и транслоцироваться через нее.³⁶

Для изучения транслокации конъюгатов через биологическую мембрану был использован подход, заключающийся в изучении влияния этих соединений на скорость потребления кислорода митохондриями печени и лимфоцитами тимуса.¹² Известно, что дифильные вещества, способные к транслокации через клеточную мембрану, могут достигать расположенного в митохондриях НАД·Н-дегидрогеназного комплекса, ответственного за клеточное дыхание, и ингибиро-

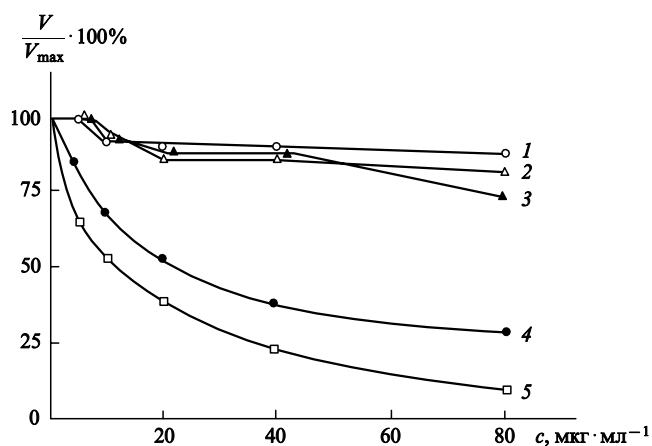


Рис. 7. Влияние конъюгатов белков с различными полимерами на скорость потребления кислорода (V) лимфоцитами тимуса. 1 — исходный ХТ, 2 — (ПЭО)₉-ХТ, 3 — (ОПро)₇-ХТ, 4 — (Про)₈-БСА(нерав.), 5 — (Про)₁₀-ХТ(нерав.). Среда инкубации лимфоцитов содержала (в ммоль·л⁻¹) NaCl (145), KCl (3.6), KH₂PO₄ (2), морфолино-пропансульфоновой кислоты (8), пирувата (10), pH 7.4, T = 37°C; конъюгаты добавляли после олигомицина (0.2 мкг·мл⁻¹) и динитрофенола (60 мкмоль·л⁻¹); в контрольной пробе вместо конъюгатов к лимфоцитам добавляли среду инкубации; концентрация лимфоцитов в ячейке — 10⁸ клеток в 1 мл

вать НАД·Н-дегидрогеназную активность, что проявляется в снижении скорости потребления кислорода. При проведении подобных экспериментов с конъюгатами оказалось, что некоторые из них способны подавлять клеточное дыхание Т-лимфоцитов. Это свидетельствует об их транслокации в клетку. Нами была изучена зависимость транслокации конъюгатов от природы присоединенных цепей и характера их распределения относительно белковой глобулы.¹³

Для выяснения вопроса о влиянии характера расположения гидрофильных и гидрофобных блоков в цепях проксанола по отношению к белку в конъюгате на его способность подавлять дыхание Т-лимфоцитов было проведено сравнение действия конъюгатов типа II и III на основе ХТ и БСА (см. рис. 1). Как видно из рис. 7, только конъюгаты типа II, в которых гидрофобный блок находится на периферии молекулы, обладают способностью подавлять дыхание лимфоцитов. В то же время ни ПЭО-белковый конъюгат, ни конъюгат с гидрофильным блоком на периферии молекулы (тип III), ни исходный ХТ не влияют на дыхание лимфоцитов. Влияние

Таблица 5. Эффективность подавления разобщенного дыхания лимфоцитов и митохондрий полимером Про и его конъюгатами с ХТ цитохромом c и БСА — (Про)₆-ХТ(нерав.), (Про)₈-ЦИТ(нерав.) и (Про)₇-БСА(нерав.)

Объект исследования	Про	(Про) ₆ -ХТ(нерав.)	(Про) ₈ -ЦИТ(нерав.)	(Про) ₇ -БСА(нерав.)
А. Концентрация Про и конъюгатов, мкмоль·л ⁻¹ (мкг·мл ⁻¹)				
Лимфоциты	4.9 ± 1.2 (9.8 ± 2.4)	0.66 ± 0.1 (30.6 ± 6.2)	1.1 ± 0.1 (33.0 ± 3.4)	0.75 ± 0.1 (61.0 ± 6.2)
Митохондрии	4.7 ± 1.2 (9.3 ± 2.4)	0.48 ± 0.06 (21.6 ± 4.7)	— —	— —
В. Концентрация свободного Про и Про в конъюгатах, мкмоль				
Лимфоциты	4.9 ± 1.2	6.6 ± 1.9	3.3 ± 0.3	5.3 ± 0.5
Митохондрии	4.7 ± 1.2	4.8 ± 1.5	—	—

Примечание. Поглощение кислорода регистрировалось в присутствии 50–60 мкмоль·л⁻¹ ДНФ, 4 мкмоль·л⁻¹ глутамата и 1 мкмоль·л⁻¹ малата. Результат вычислялся как среднее арифметическое из 5–6 экспериментов. В таблице приведены концентрации Про и конъюгатов, вызывающие 50%-ное подавление потребления кислорода. Сравнение эффективности свободного Про и Про, входящего в состав конъюгата, приводится в части В таблицы.

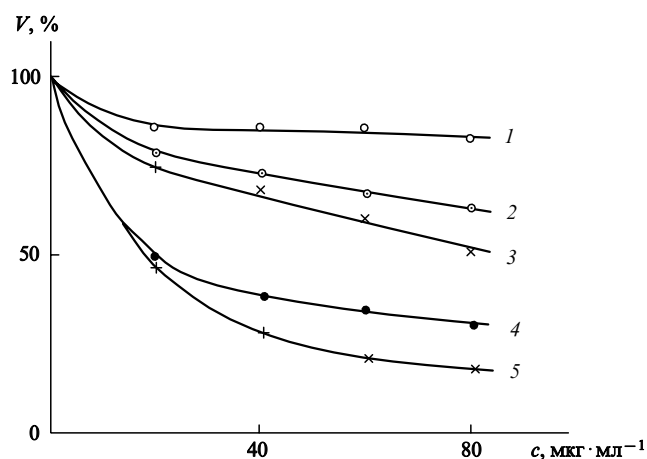


Рис. 8. Влияние конъюгатов ХТ, содержащих различное число цепей Про, на скорость потребления кислорода лимфоцитами тимуса. 1 — (Про)₂—ХТ(нер.), 2 — (Про)₃—ХТ(нер.), 3 — (Про)₆—ХТ(нер.), 4 — (Про)₁₀—ХТ(нер.), 5 — (Про)₁₅—ХТ(нер.). Условия опыта см. рис. 7

конъюгата II на дыхание сравнимо по эффективности с действием чистого проксанола. Концентрации, которые вызывают 50%-ное подавление дыхания, составляли 9.8 ± 2.4 мкг·мл⁻¹ для проксанола и 30.0 ± 6.2 мкг·мл⁻¹ для конъюгата (табл. 5, А). Сопоставление соответствующих концентраций свободного Про и Про, включенного в состав конъюгатов, показало, что они близки между собой (табл. 5, В). Аналогичные результаты были получены и для конъюгатов на основе БСА и цитохрома с. Это означает, что способность к транслокации определяется полимерными цепями и мало зависит от природы белка.

Конъюгаты трех изученных белков оказывали сходное действие и на дыхание изолированных митохондрий (табл. 5).

Зависимость эффекта подавления дыхания от числа полимерных цепей, присоединенных к белку и необходимых для осуществления его транслокации, была исследована на примере изучения ингибирующего действия ряда конъюгатов ХТ с различным содержанием полимерных цепей. Как видно из рис. 8, эффект подавления клеточного дыхания под действием конъюгатов начинает проявляться в заметной степени при содержании не менее трех полимерных цепей на молекулу белка.

На рис. 9 представлены результаты сравнительного изучения ингибирующего действия конъюгатов на основе БСА,

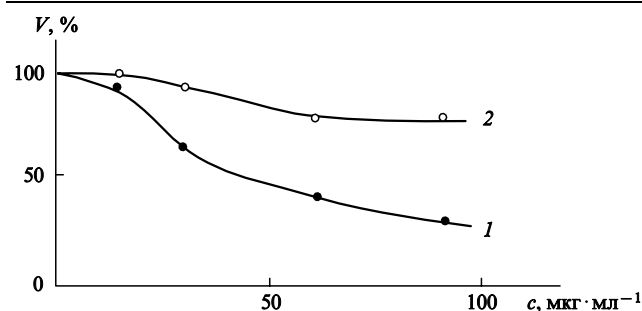


Рис. 9. Влияние конъюгатов БСА с неравномерным (1) и равномерным (2) расположением цепей Про на скорость потребления кислорода лимфоцитами тимуса. 1 — (Про)₈—БСА(нер.), 2 — (Про)₁₅—БСА(рав.). Условия опыта см. рис. 7

различающихся типом распределения полимерных цепей на поверхности белковой глобулы, на потребление кислорода Т-лимфоцитами. Видно, что существенное ингибирование дыхания происходит лишь при действии конъюгата с неравномерным распределением цепей. Такой же эффект оказывали конъюгаты ХТ соответствующего строения.

Что касается механизма действия конъюгатов на клеточное дыхание, то можно рассмотреть несколько альтернативных вариантов: 1) конъюгаты взаимодействуют с рецепторами, расположенными на внешней поверхности клеточной мембраны, а эти рецепторы затем передают сигнал в клетку; 2) конъюгаты разрушают клетки; 3) полимерные цепи отщепляются от белка в процессе инкубации конъюгатов с лимфоцитами и затем проникают через клеточную мембрану; 4) конъюгаты проникают через плазматическую мембрану внутрь клетки и достигают митохондриальной мембраны.

Первое предположение противоречит тому факту, что конъюгаты в практически одинаковых концентрациях ингибируют разобщенное дыхание и клетки в целом, и изолированной митохондрии. Вещества, способные воздействовать на дыхание лимфоцитов путем взаимодействия с рецепторами на внешней поверхности плазматической мембраны, в частности с конканавалином А, увеличивают скорость их дыхания только на 20% и не действуют на дыхание изолированных митохондрий.³⁹

В специальных экспериментах было показано, что подавление дыхания лимфоцитов проксанолами и их конъюгатами является обратимым процессом, и дыхание полностью восстанавливается после отмывания клеток. Следовательно, ингибирующие эффекты не связаны с нарушением целостности плазматической мембраны Т-лимфоцитов.

Отщепление полимерных цепей от белка также вряд ли может быть причиной мембранной активности конъюгатов. Действительно, если основываться на представлениях о гидролитической устойчивости связей NH—CH₂, образующихся при синтезе конъюгатов, и об их малой доступности действию гидролитических ферментов, такое отщепление представляется очень маловероятным. Тем не менее для окончательного вывода об отсутствии отщепления полимерных цепей при инкубации конъюгатов с Т-лимфоцитами в работе¹³ был дополнительно проведен биологический тест на способность клеток расщеплять конъюгаты, который с высокой надежностью подтвердил отсутствие свободного проксанола в супернатанте после отделения клеток. Таким образом, можно заключить, что влияние конъюгатов на дыхание Т-лимфоцитов является результатом их проникновения через плазматическую мембрану внутрь клетки. Известно, что гидрофильные вещества, такие как использованные для синтеза конъюгатов белки, не способны проникать в клетку непосредственно через клеточную мембрану. Однако эти же белки приобретают способность к транслокации в результате их гидрофобизации жирными кислотами.⁴⁰ Полученные данные позволяют предположить, что модификация белков синтетическими полимерами, проксанолами, способными проникать через клеточную мембрану,¹² действует аналогично присоединению жирных кислот. Следует подчеркнуть, что необходимыми условиями транслокации таких конъюгатов является расположение гидрофобных блоков проксанолов на периферии молекулы конъюгата, а также неравномерное распределение полимерных цепей (структура IIa, рис. 1). Конъюгаты белков с проксанолами типа IIb и III и конъюгаты с ПЭО не влияют на дыхание клеток. В некоторых случаях ПЭО-белковые конъюгаты могут проникать в клетки по механизму эндоцитоза,⁴¹ однако скорость этого процесса на несколько порядков ниже, чем диффузия конъюгатов с мембранотропными свойствами. Кроме того, эндоцитоз не может происходить в митохондриях.

Таким образом, было показано, что ковалентное присоединение проксанола к гидрофильным белкам может служить способом придания им мембранотропных свойств.

V. Солюбилизирующие свойства конъюгатов

1. Солюбилизация бензафлавина конъюгатами БСА с полиалкиленоксидами

Одной из важных функций сывороточных альбуминов является их способность транспортировать неполярные соединения различной химической природы — жирные кислоты, гормоны, витамины.⁴² Учитывая описанные выше дифильные свойства проксанолов, можно было ожидать, что их присоединение к сывороточным альбуминам позволит создать системы, обладающие повышенной солюбилизирующей способностью по отношению к нерастворимым в воде биологически активным веществам. К числу таких соединений относится эфир дигидрорибофлавина — 2',3',4',5'-тетрабензоил-5-ацетил-1,5-дигидрорибофлавин (бензафлавин, БФ). Эфиры дигидрорибофлавина обладают широким спектром биологического действия и представляют интерес не только как препараты витамина В₂ пролонгированного действия, но и как лекарственные средства метаболической терапии.⁴³

Солюбилизацию БФ в водных растворах БСА и его конъюгатов с полиалкиленоксидами наблюдали с помощью УФ-спектров при длине волны 306 нм, соответствующей максимуму поглощения БФ. Из зависимостей оптической плотности от концентрации солюбилизованного БФ были определены его коэффициенты экстинкции в растворе чистого БСА и конъюгатов (ПЭО)₁₄–БСА и (Про)₅–БСА(нер.).

Белок, конъюгат	БСА	(ПЭО) ₁₄ –БСА	(Про) ₅ –БСА(нер.)
$\varepsilon \cdot 10^{-3},$ $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	4.9	4.7	3.5

Предел солюбилизации (p), равный числу молекул солюбилизованного вещества, приходящемуся на одну молекулу солюбилизирующего агента, определяли методом скоростной седиментации в аналитической ультрацентрифуге с оптической системой регистрации. Использование седиментационного метода основано на том, что связанный БФ седиментирует вместе с белком или конъюгатом.¹³ То

обстоятельство, что поглощение БФ соответствует более длинноволновой области спектра по сравнению с БСА и конъюгатами, позволяет выбрать длину волны, при которой поглощает только связанный лиганд, и определить его концентрацию.

Для сравнения солюбилизирующей способности БСА и конъюгатов была проведена серия экспериментов, в которых при постоянном содержании белка или конъюгата менялась концентрация БФ. Из полученных данных видно, что БСА обладает значительной солюбилизирующей способностью по отношению к БФ (табл. 6). Специальными опытами было показано, что проксанолы не солюбилизируют БФ. В то же время во всех системах, содержащих конъюгаты, предел солюбилизации БФ оказался выше, чем для БСА, причем наибольшее значение соответствует конъюгату (Про)₅–БСА(нер.), в котором гидрофобные блоки расположены на периферии конъюгата.

Увеличение числа полимерных цепей, приходящихся на молекулу белка в конъюгате, приводит к уменьшению предела солюбилизации. По-видимому, это происходит за счет большего экранирования областей, ответственных за солюбилизацию БФ. В работе были использованы два способа солюбилизации БФ — путем суспендирования и внесением в эти системы БФ из спиртового раствора. Второй способ позволяет включать большее количество БФ, что, вероятно, обусловлено кинетическими причинами. Исследование систем, полученных обоими способами, методом неупругого светорассеяния показало, что при внесении БФ из спиртового раствора наряду с частицами, соответствующими по размеру конъюгатам, присутствующим в растворе (менее 30 нм), обнаружены большие частицы с радиусом от 200 до 3000 нм (возможно, агрегаты БФ). При солюбилизации путем суспендирования образуются только частицы с радиусом менее 30 нм.

Для получения систем с оптимальным содержанием БФ была изучена зависимость солюбилизирующей способности БСА и конъюгата (Про)₅–БСА(нер.) от pH среды (рис. 10). Как видно из рисунка, эта зависимость носит колоколообразный характер. Максимальная солюбилизация наблюдается в области pH 7.6–9.0. Изучение зависимости предела солюбилизации от концентрации фосфатного буфера (pH 6.2 и 7.2) показало, что увеличение концентрации буфера приводит к ухудшению солюбилизирующей способности как

Таблица 6. Солюбилизирующие свойства БСА и его конъюгатов с полиалкиленоксидами по отношению к БФ (0.02 моль · л⁻¹ фосфатный буфер, pH 7.2; БФ вносили из спиртового раствора)

Солюбилизирующий агент	$T, ^\circ\text{C}$	p	$s_{20}, \text{Св}$ (солюбилизирующий агент)	$s_{20}, \text{Св}$ (комплекс с БФ)	Доля различных форм, %
БСА	20	17	4.2	6.3	100
	40	17	6.7	11.0	47
				6.2	53
(Про) ₅ –БСА(нерав.)	20	40	4.4	10.1	100
	40	40	6.8	14.2	21
				7.3	79
(ОПро) ₁₁ –БСА	20	19	4.2	6.8	100
	40	19	6.6	13.2	47
				5.9	53
(ПЭГ) ₁₄ –БСА	20	21	4.2	6.6	100
	40	21	6.5	10.5	49
				6.8	51
(Про) ₁₀₀ –БСА ^a	20	18	2.9	6.2	100
	40	18	5.8	12.0	80
				6.6	20

^a Солюбилизирующий агент получен из конъюгата (Про)₅–БСА(нерав.) путем добавления свободного проксанола.

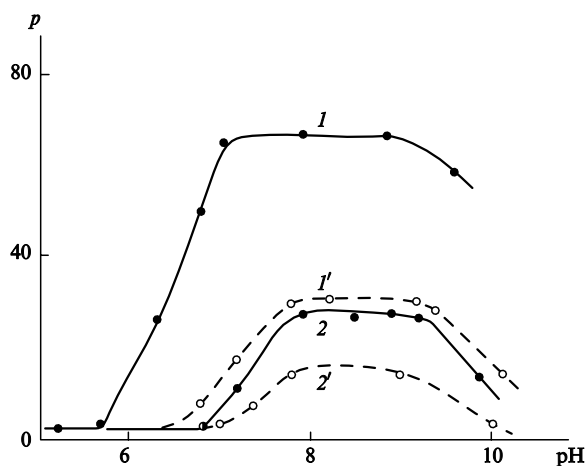


Рис. 10. Зависимость пределов солюбилизации БФ от pH среды. 1 — визуальный метод, 2 — седиментационный метод; БСА — штриховая линия, конъюгат (Про)₅ — БСА(пер.) — сплошная линия

белка, так и конъюгата. Таким образом, для достижения максимального солюбилизирующего эффекта необходимо использовать растворы в интервале pH 7.6–9.0 с наименьшей ионной силой.

Эксперименты, в которых изучалась солюбилизация БФ в растворах БСА и конъюгатов при повышенной температуре (40°C), позволили обнаружить значительную гетерогенность таких систем в отличие от систем, содержащих чистый солюбилизирующий агент (см. табл. 6). Определенная доля седментирующего вещества в таких системах характеризуется коэффициентом седиментации примерно в два раза превышающим соответствующие коэффициенты седиментации для белка и конъюгатов. Возможно, в таких системах БФ способствует образованию «мостиков» между молекулами белка.

Полученные данные позволяют высказать предположение о том, что в изученных конъюгатах молекулы БФ локализуются в гидрофобных областях белковой глобулы БСА. Этот факт подтверждается также и тем, что присоединение проксанола к другим белкам, например, к иммуноглобулинам класса G или к ХТ, не обладающим способностью связывать этот лиганд, не оказывает влияния на их солюбилизирующие свойства.

2. Перенос бензафлавина в митохондриях с помощью конъюгатов БСА

Приведенные в предыдущем разделе данные предполагают возможность использования конъюгатов белков с полиалкиленоксидами в качестве транспортных средств для переноса нерастворимых в воде биологически активных веществ к клеткам-мишеням. С целью проверки этого предположения был изучен перенос бензафлавина в митохондриях сердца крыс.¹⁵ За этим явлением наблюдали, изучая соотношение между количеством связанного митохондриями БФ и количеством БФ, присутствующим в растворе в солюбилизированной форме. Количество связанного митохондриями БФ определяли по разности между общим содержанием БФ в растворе и его содержанием в супернатанте после инкубации с митохондриями. Эта величина достигает максимального значения через 1 мин и остается постоянной при дальнейшей инкубации с митохондриями.

Было обнаружено, что БФ, солюбилизованный БСА и конъюгатами БСА с ПЭО и Про, способен переноситься в митохондриальные мембраны. Количественные данные по переносу БФ представлены в виде изотерм связывания на

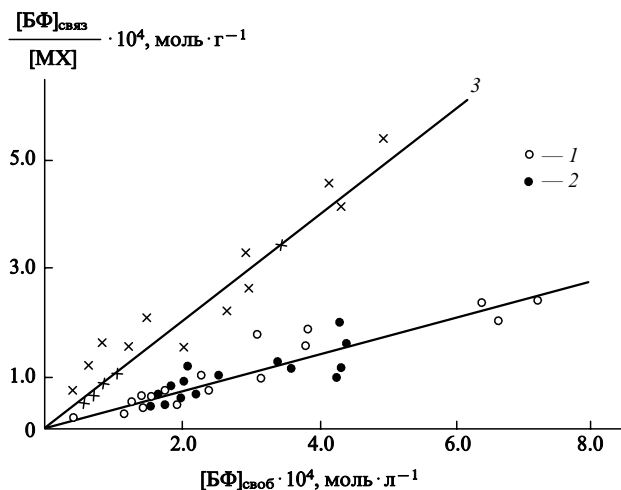


Рис. 11. Зависимость количества связанного БФ (в молях на 1 г митохондриального белка (MX)) от концентрации свободного БФ. Солюбилизирующий агент: 1 — БСА, 2 — (ПЭО)₁₄ — БСА, 3 — (Про)₅ — БСА(пер.)

рис. 11. В изученном интервале концентраций БФ (до $8 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$) зависимости количества связанного БФ от концентрации свободного БФ являются линейными

$$\frac{[\text{БФ}]_{\text{связ}}}{[\text{MX}]} = K[\text{БФ}]_{\text{своб}} \quad (3)$$

где K — коэффициент пропорциональности, зависящий от природы солюбилизирующего агента, $[\text{MX}]$ — концентрация митохондриального белка. Линейность этих зависимостей указывает на то, что экспериментальные данные соответствуют начальным участкам изотерм связывания. Важно подчеркнуть, что экспериментальные точки, полученные с различными концентрациями солюбилизирующего агента, ложатся на одну и ту же изотерму, характерную для данного солюбилизирующего агента. Таким образом, коэффициент пропорциональности в уравнении (3) не зависит от концентрации солюбилизирующего агента.

Интересно, что БСА и конъюгат БСА с ПЭО оказались идентичными по способности переносить БФ. Оба солюбилизирующих агента могут быть охарактеризованы одним и тем же значением коэффициента пропорциональности K , равным 0.31 ± 0.01 (г митохондриального белка) $^{-1}$ л. В случае конъюгата БСА с проксанолом величина K составляет 0.96 ± 0.01 (г митохондриального белка) $^{-1}$ л. Более высокая способность конъюгата БСА с проксанолом к переносу БФ объясняется, по-видимому, образованием менее прочного комплекса БФ с этим конъюгатом, нежели с БСА и конъюгатом БСА с ПЭО.

Таким образом, конъюгаты БСА с проксанолом имеют определенные преимущества перед другими изученными системами как в солюбилизирующей, так и в транспортной способности, что создает предпосылки для их использования при разработке новых лекарственных форм.

VI. Нековалентные комплексы между α -химотрипсином и блок-сополимером оксидов этилена и пропилена

Комплексообразование между белками и водорастворимыми полимерами является одним из эффективных методов белковой инженерии. Так, многие синтетические линейные полиэлектролиты образуют комплексы с белками.^{44, 45} Свя-

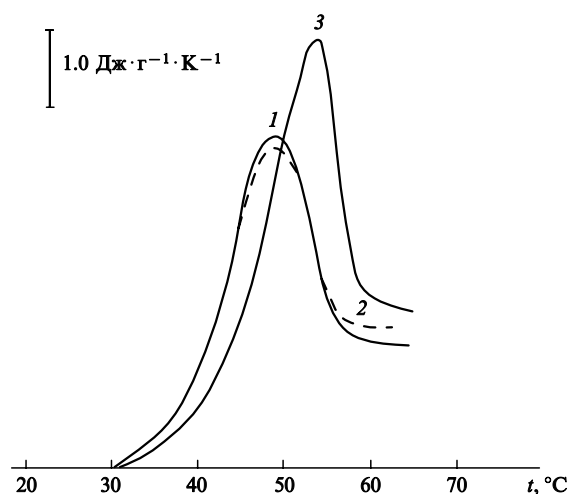


Рис. 12. Кривые теплопоглощения ХТ (концентрация $2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, кривая 1), смеси ХТ и ПЭО ($2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ и $0.48 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, кривая 2), и смеси ХТ и Про ($2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ и $0.48 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, кривая 3). Буфер — $0.02 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ Na-фосфат, pH 7.0; скорость нагрева — $1 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$

зывание молекул белка с полиионами происходит благодаря электростатическому взаимодействию, которому может сопутствовать образование водородных связей и гидрофобных контактов. В отличие от этого водорастворимые полимеры, не содержащие ионогенных групп, например ПЭО, не образуют комплексов с белками.⁴⁶ Смешивание растворов БСА или ХТ с растворами проксанолов при комнатной температуре также не приводит к образованию комплексов.²¹

Как уже упоминалось выше, на примере ХТ нами было показано, что стабильные комплексы белка с проксанолом все же можно получить, если их растворы нагреть до темпе-

ратур, соответствующих началу термической денатурации белка (более подробно этот вопрос рассмотрен в работе⁴⁶).

С помощью визуального метода наблюдения за мутностью растворов белка и полиалкиленоксида были получены первые результаты, указывающие на образование смешанных частиц ХТ–Про. Об образовании таких частиц свидетельствуют также данные, полученные методом ДСК для водных растворов ХТ, ХТ–ПЭГ и ХТ–Про. На рис. 12 представлены термограммы плавления ХТ (кривая 1), ХТ в присутствии ПЭО (кривая 2) и ХТ в присутствии Про (кривая 3). Видно, что ПЭО не влияет на процесс плавления белковых глобул: кривые плавления 1 и 2 практически совпадают (теплота плавления составляет $1090 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ в первом случае и $1080 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ во втором). В отличие от этого в присутствии Про наблюдается смещение пика плавления в область более высоких температур и увеличение его высоты (теплота плавления $1250 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$). Отсюда следует, что в процессе нагревания ХТ и Про каким-то образом связываются друг с другом, давая новый продукт, в котором белковая составляющая приобретает несколько более высокую термостабильность. Термически индуцированное связывание ХТ и Про оказывается необратимым в условиях эксперимента. После охлаждения таких растворов в них сохраняется смешанный продукт взаимодействия, о чем свидетельствуют данные по определению содержания белка в выделенных продуктах (табл. 7) (способ выделения этих продуктов из реакционной смеси обеспечивал полную очистку от избытка свободного полимера, что контролировалось методом ТСХ).

Принципиальное значение имеет вопрос о природе взаимодействий между Про и белком. Наиболее естественным представляется предположение об образовании нековалентного комплекса. С целью установления природы связей между Про и ХТ нами была изучена диссоциация комплексов в присутствии мочевины с помощью метода ТСХ. Метод основан на различии хроматографической подвижности продуктов диссоциации и исходного комплекса. Скорость диссоциации комплексов в водных растворах невелика, и диссо-

Таблица 7. Характеристики комплексов ХТ–Про (скорость нагрева $1 \text{ град} \cdot \text{мин}^{-1}$, исходная температура раствора — 20°C , время инкубации в термостате по достижении верхнего предела нагревания — 5 мин)

Комплекс	Условия получения		Содержание полимера в комплексе (моль $\cdot$ (моль ХТ) ⁻¹)	Активность, % от исходного белка		Содержание активных центров, %	$K_m \cdot 10^5$, моль $\cdot \text{л}^{-1}$ (см. ^а)	k_{cat} , с ⁻¹
	верхний предел нагревания, °C	мольное отношение ХТ:Про		до выделения	после выделения			
ХТ–(Про) _{3,5}	44	1:2.5	3.5	—	50	—	—	—
ХТ–(Про) ₅	44	1:10	5	82	120	—	—	—
ХТ–(Про) ₅	44	1:20	5	87	125	82	7.1 ± 0.8	25 ± 3
ХТ–(Про) ₅ ^б	44	1:20	5	76	118	83	9.5 ± 0.7	27 ± 1
ХТ–(Про) ₆	48	1:20	6	50	97	74	13.2 ± 0.8	30 ± 2
ХТ–(Про) ₇	48	1:20	7	45	92	57	16.7 ± 0.8	32 ± 2
ХТ–(Про) ₁₀ ^б	48	1:20	10	34	79	—	—	—
ХТ–(Про) ₁₀	52	1:20	10	22	74	32	13.9 ± 0.6	48 ± 4
ХТ–(Про) ₁₃	52	1:20	13	26	51	14	18 ± 2	166 ± 19
ХТ–(Про) ₁₁	60	1:20	11	0	0	—	—	—
Нативный ХТ		0	—	100		92	5.6 ± 0.4	24 ± 2

^а Кинетические константы получали, исследуя ферментативный гидролиз БТЭЭ (pH 8.0; 25°C). Погрешности определены с доверительной вероятностью 0.95. ^б Комплексы охлаждались и выделялись сразу после достижения верхнего температурного предела нагревания, без последующей инкубации в термостате.

циация становится заметной лишь через сутки. Процесс существенно ускоряется в присутствии $8 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ мочевины. Эти данные свидетельствуют о том, что продукты взаимодействия представляют собой нековалентные комплексы между ХТ и Про.

Исходя из представлений о комплексообразовании, можно предположить, что состав комплексов можно регулировать двумя путями: изменением соотношения полимер/ХТ при фиксированной температуре прогрева и варьированием температуры прогрева при фиксированном соотношении реагентов. Действительно, как видно из табл. 7, при фиксированном избытке Про в системе число полимерных цепей, входящих в состав комплекса, увеличивается симбатно с повышением максимальной температуры нагрева. Так, например, в системе с 20-кратным молярным избытком Про число полимерных цепей, входящих в состав комплекса, увеличивается от 5 до 11 при повышении верхнего температурного предела нагревания от 44 до 60°C . Такая же тенденция к росту числа полимерных цепей, входящих в состав комплекса, наблюдается и при увеличении молярного избытка полимерного компонента при фиксированном верхнем температурном пределе нагревания.

Заметим, что белковая фракция, выделенная из смеси ХТ с ПЭГ после прогрева до 60°C , представляет собой чистый белок, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия между компонентами. Этот вывод хорошо согласуется с данными дифференциальной сканирующей калориметрии.

На рис. 13 представлены спектры ЯМР ^1H чистого ХТ и двух его комплексов с Про, полученных нагреванием до 44 и 48°C , соответственно. Видно, что по мере возрастания температуры получения комплексов денатурационные изменения в молекуле белка становятся более значительными, хотя полного разрушения нативной структуры не наблюдается. В

то же время положение и ширина сигналов полимерной компоненты комплекса свидетельствуют о достаточно высокой молекулярной подвижности большинства звеньев полимерных цепей в комплексе.

Замечательной особенностью изучаемых комплексов является то, что они сохраняют ферментативные свойства. Представляло интерес выяснить, как зависит удельная ферментативная активность комплексов от условий их получения и выделения. В табл. 7 приведены данные по ферментативной активности комплексов непосредственно после завершения нагревания, до их выделения из реакционной смеси. Они отражают свойства комплексов, максимально приближенные к их свойствам в момент образования. Ферментативная активность комплексов была измерена также и после их выделения из реакционной смеси. Сравнение активности комплексов до и после их выделения показывает, что для всех изученных систем активность выделенных комплексов оказалась выше. Возможно, это связано с тем, что молекулы свободного Про, присутствующие в избытке, образуют мицеллярные структуры, включающие ХТ. В результате этого активный центр фермента становится менее доступным по отношению к субстрату. В процессе выделения комплекса из раствора происходит разрушение мицеллярных структур, приводящее к большей доступности активного центра фермента по отношению к субстрату. Важно отметить, что в некоторых случаях обнаружено даже повышение ферментативной активности выделенных комплексов по сравнению с исходным ХТ. Подобные явления суперактивности наблюдались ранее при изучении процессов ферментативного гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-L-тирозина, катализируемого ХТ в обращенных мицеллах.^{48–50}

В этой связи представляло интерес определить кинетические константы гидролиза БТЭЭ, катализируемого ком-

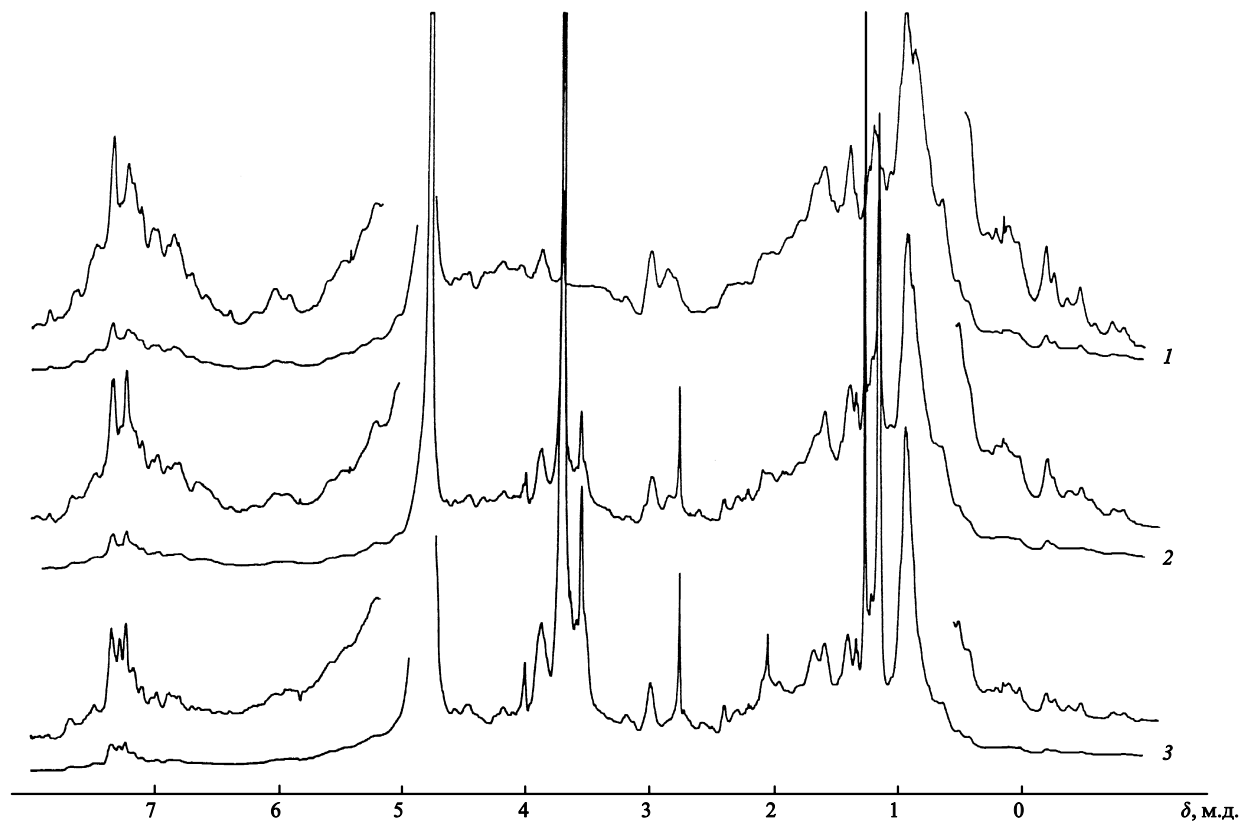


Рис. 13. Спектры ЯМР ^1H растворов ХТ (1), комплекса ХТ–(Про)₅, полученного нагреванием до 44°C (2) и комплекса ХТ–(Про)₇, полученного нагреванием до 48°C (3) в D_2O ; концентрация белка в образце — $2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$

плексами, и сравнить их с соответствующими константами для исходного ХТ. Параллельно было определено содержание активных центров в комплексах. Соответствующие данные представлены в табл. 7. Видно, что по мере увеличения верхнего температурного предела нагревания смеси ХТ с Про, равно как и времени инкубации при фиксированном верхнем температурном пределе нагревания, содержание активных центров в комплексе уменьшается. Значения K_m в этом же ряду закономерно увеличиваются, что свидетельствует об уменьшении сродства между комплексом и субстратом. В то же время рост k_{cat} в этом ряду катализаторов указывает на увеличение каталитической эффективности активных центров ХТ, входящих в состав комплекса.

На основании всей суммы полученных результатов механизм образования комплексов между Про и ХТ можно представить следующим образом. При нагревании происходит разворачивание белковой глобулы, в результате которого остатки гидрофобных аминокислот оказываются на поверхности белка. Одновременно с этим происходит дегидратация гидрофобных блоков Про, что способствует образованию совместных полимер-белковых структур. В процессе охлаждения и выделения комплекса из раствора участки гидрофобного блока Про фиксируются вблизи белковой глобулы благодаря многоточечному взаимодействию с гидрофобными и полярными группами, расположенными на поверхности белка. Тот факт, что диссоциация комплекса усиливается в присутствии денатурирующего агента (мочевины), не исключает возможности того, что наряду с гидрофобными взаимодействиями существенный вклад в стабилизацию комплекса вносят водородные связи между Про и белковой глобулой.

Таким образом, термоиндуцированное взаимодействие Про с ХТ приводит к образованию нового типа супрамолекулярных структур — стабильных, каталитически активных комплексов. Простота метода получения таких структур и сохранение ими функциональных свойств позволяет отнести этот способ модификации белков к числу перспективных методов белковой инженерии.

VII. Заключение

Разработанные способы получения конъюгатов на основе белков и проксанолов позволяют не только варьировать в широких пределах структуру и физико-химические свойства получаемых продуктов, но и имитировать с их помощью биологические функции мембранотропных белков. Описанные выше свойства конъюгатов позволяют использовать их в ферментной терапии, при создании новых лекарственных форм, а также при производстве органорастворимых биокатализаторов для биотехнологии. Кроме того, эти соединения могут найти применение в биохимических исследованиях водонерастворимых биологически активных соединений. Предложенный альтернативный способ модификации белков проксанололами, основанный на образовании невалентных комплексов между ними, является новым подходом к получению белков, модифицированных полимерами. Совокупность ковалентных и нековалентных методов модификации белков открывает широкие возможности получения полимер-белковых аддуктов с заданными свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 93-03-18161), а также Международного Научного Фонда (ISF), грант МРЕ000.

Литература

1. J.J.Marshall, M.L.Rabinovitz. *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 777 (1975)
2. B.U.Von Specht, W.Brendel. *Biochim. Biophys. Acta*, **484**, 109 (1977)
3. A.Abuchowski, J.R.McCoy, N.C.Palczuk, T.van Es, F.F.Davis. *J. Biol. Chem.*, **252**, 3582 (1977)
4. A.Abuchowski, T.van Es, N.C.Palczuk, F.F.Davis. *J. Biol. Chem.*, **252**, 3578 (1977)
5. *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. (Ed. J.M.Harris). Plenum Press, New York, 1992
6. Б.И.Курганов, И.Н.Топчиева. *Успехи биол. химии*, **32**, 63 (1991)
7. F.M.Veronese, P.Caliceti, A.Pastorino, O.Schiavon, L.Sartore. *J. Control. Rel.*, **10**, 145 (1989)
8. A.Matsushima, M.Okada, Y.Inada. *FEBS Lett.*, **178**, 275 (1984)
9. T.Yoshimoto, K.Takahashi, H.Nishimura, A.Ajima, Y.Tamura, Y.Inada. *Biotechnol. Lett.*, **6**, 337 (1984)
10. K.Takahashi, Y.Kodera, T.Yoshimoto, A.Ajima, A.Matsushima, Y.Inada. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 532 (1985)
11. L.G.Lundsted, I.R.Schmolka. In *Block and Graft Copolymerization*. (Ed.R.J.Ceresa). Wiley, New York, 1976. P. 174
12. G.P.Kirillova, E.N.Mokhova, V.L.Dedukhova, A.N.Tarakanova, V.P.Ivanova, N.V.Efremova, I.N.Topchieva. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **18**, 329 (1993)
13. И.Н.Топчиева, Е.Н.Мохова, Г.П.Кириллова, Н.В.Ефремова. *Биохимия*, **59**, 16 (1994)
14. И.Н.Топчиева, И.Г.Момот, Б.И.Курганов, Н.А.Чеботарева. *Докл. АН СССР*, **316**, 242 (1991)
15. И.А.Горская, М.В.Бушуева, Б.И.Курганов, И.Н.Топчиева, В.П.Иванова, И.Г.Панова, И.П.Рудакова. *Докл. АН СССР*, **319**, 1008 (1991)
16. Н.В.Ефремова, И.Н.Топчиева. *Биохимия*, **58**, 1071 (1993)
17. Н.В.Ефремова, В.В.Можаев, И.Н.Топчиева. *Биохимия*, **57**, 342 (1992)
18. М.В.Теплова, Б.И.Курганов, И.А.Горская, И.Н.Топчиева, Н.В.Ефремова, Т.Л.Бушуева. *Биохимия*, **58**, 1929 (1993)
19. Н.И.Ларионова, И.П.Гладышева, И.Н.Топчиева, Н.Ф.Казанская. *Биохимия*, **58**, 1658 (1993)
20. E.Boccu, R.Largajolli, F.M.Veronese. *Z. Naturforsch., C Biosci.*, **38**, 94 (1983)
21. W.R.Krigbaum, R.W.Godwin. *Biochemistry*, **7**, 3126 (1968)
22. С.В.Осипова, И.Н.Топчиева, В.А.Касаикин. *Высокомолекулярное соединение*, **32Б**, 240 (1990)
23. С.В.Осипова. Дис. канд. хим. наук. МГУ, Москва, 1990
24. Yu.L.Khmelnitsky, A.B.Belova, A.V.Levashov, V.V.Mozhaev. *FEBS Lett.*, **284**, 267 (1991)
25. И.Н.Топчиева, Е.Л.Коломникова, М.И.Банацкая, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярное соединение*, **35А**, 395 (1993)
26. Г.А.Кочетов. В кн. *Практическое руководство по энзимологии*. Высшая школа, Москва, 1980. С.222
27. R.Fields. *Biochem. J.*, **124**, 581 (1971)
28. S.Zalipsky, C.Lee. In *Poly(Ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. (Ed. J.M.Harris). Plenum Press, New York, 1992. P.347
29. M.Roth. *Anal. Chem.*, **43**, 880 (1971)
30. H.-C.Chiu, S.Zalipsky, P.Копецкова, J.Копецек. *Bioconjugate Chem.*, **4**, 290 (1993)
31. F.M.Veronese, P.Caliceti, A.Pastorino, O.Schiavon, L.Sartore. *J. Control. Rel.*, **10**, 145 (1989)
32. Н.С.Мелик-Нубаров, В.А.Шишкис, В.И.Слепнев, А.А.Щеголев, В.В.Можаев. *Мол. биология*, **24**, 346 (1990)
33. W.F.Polik, W.Burchard. *Macromolecules*, **16**, 978 (1983)
34. V.V.Mozhaev, K.Martinek. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **6**, 50 (1984)
35. V.V.Mozhaev, K.Martinek, I.V.Berezin. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **23**, 235 (1988)
36. И.Н.Топчиева, С.В.Осипова, М.И.Банацкая, И.А.Валькова. *Докл. АН СССР*, **308**, 910 (1989)
37. I.N.Topchieva, A.L.Blumenfeld, A.A.Klyamkin, V.A.Polyakov, V.A.Kabanov. *Polym. Sci.*, **36**, 221 (1994)
38. F.E.Bailey, Jr, J.V.Koleske. In *Nonionic Surfactants*. (Ed. M.J.Schick). Marcel Dekker, New York, 1966. P.794

39. P.L.Lakin-Thomas, M.D.Brand. *Biochem. J.*, **256**, 167 (1988)
40. I.-S.Hu, I.Olson, E.N.Olson. *Biofactors*, **1**, 219 (1986)
41. J.S.Beckman, R.L.Minor, C.W.White, J.E.Repine, G.M.Rosen, B.A.Freeman. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6884 (1988)
42. В.К.Кухта, Э.Н.Олецкий, А.И.Стожаров. В кн. *Белки плазмы крови*. Беларусь, Минск, 1986. С.9
43. В.М.Авакумов, М.А.Ковлер, Р.П.Кругликова-Львова. *Вопр. мед. химии*, **38(4)**, 14 (1992)
44. Н.А.Платэ, А.Е.Васильев. В кн. *Физиологически активные полимеры*. Химия, Москва, 1986. С.159
45. А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Успехи химии*, **51**, 1447 (1982)
46. К.С.Ingham. *Methods Enzymol.*, **104**, 351 (1984)
47. И.Н.Топчиева, Я.Э.Снитко, Н.В.Ефремова, Е.М.Сорокина. *Биохимия*, 1995, в печати
48. H.Ishikawa, K.Noda, T.Oka. *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 381 (1990)
49. H.Ishikawa, K.Noda, T.Oka. *An. Enzyme Eng.*, **613**, 529 (1990)
50. К.Мартинек, А.В.Левашов, Н.А.Клячко, Ю.Л.Хмельницкий, И.В.Березин. *Биол. мембраны*, **2**, 669 (1985)

PROTEIN ADDUCTS WITH WATER-SOLUBLE POLY(ALKYLENE OXIDES)

I.N.Topchieva, N.V.Efremova, B.I.Kurganov

M.V.Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, 119899 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939-0174

A.N.Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences

33, Leninskii Prosp., 117071 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)954-2732

The review deals with methods of protein modification by amphiphilic water-soluble block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide and also with characterization and properties of the resulting adducts. Two main classes of such adducts are considered — conjugates, which are the products of covalent coupling of polymers to protein globule, and non-covalent complexes. It is shown that conjugates of hydrophilic proteins with amphiphilic block copolymers gain a number of new properties such as a capability of penetrating the plasma membrane of thymus-derived lymphocytes, effective solubilization and transport of water-insoluble biologically active compounds, and an ability of interaction with various surface-active compounds.

Bibliography — 50 references.

Received 23th November 1994