

**ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ АЦИЛИРОВАНИЯ АМИНОСОДЕРЖАЩИХ
СОЕДИНЕНИЙ ХЛОРАНГИДРИДАМИ НЕНАСЫЩЕННЫХ
КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПОЛИМЕРАМИ**

*Бурдыгина И.Ф., Валуев Л.И., Чупов В.В.,
Платэ Н.А.*

Существует большое количество методов иммобилизации физиологически активных веществ (ФАВ) на поверхности полимеров [1]. Одним из таких методов является введение двойных связей в молекулы ФАВ и их последующая сополимеризация с полимерным носителем. Двойную связь в молекулы можно вводить, например, путем ацилирования

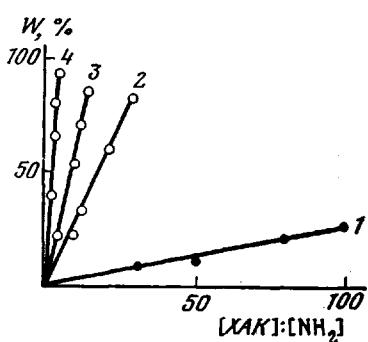


Рис. 1

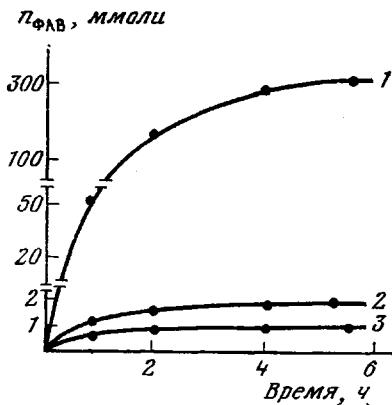


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость эффективности ацилирования W аланина (1), трипсина (2), альбумина (3) [2] и фибриногена (4) низкомолекулярным ХАК в растворах от мольного отношения $[ХАК] : [NH_2]_0$

Рис. 2. Зависимость количества иммобилизованного ФАВ от времени инкубирования привитого сополимера ХАК – ПЭ с водными растворами трипсина (1), трипсина (2) и альбумина (3) при 20°

Рис. 3. Кривые гель-фильтрации смеси трипсина и альбумина до (сплошная линия) и после инкубирования (штриховая) с привитым сополимером ХАК – ПЭ

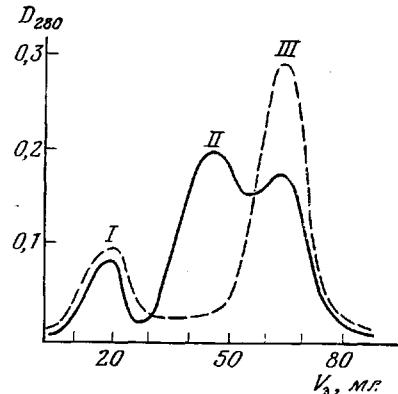
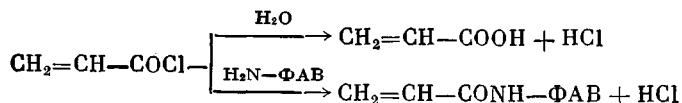


Рис. 3

H_2N -группы, если они имеются в ФАВ, хлорангидридами α -, β -ненасыщенных кислот. Поскольку хлорангидриды карбоновых кислот легко реагируют с водой, при их реакции с водными растворами ФАВ параллельно протекают гидролиз и взаимодействие с аминогруппами ФАВ [2]



Можно предположить, что отношение констант скоростей этих реакций, определяющее эффективность ацилирования ФАВ (и в конечном счете свойства получаемых модифицированных полимеров), должно существенно зависеть как от природы ацилируемого ФАВ, так и от того,

находится ли ацилирующий агент в растворе или является частью полимерной цепи.

Цель данной работы – исследование общих закономерностей реакции ацилирования высокомолекулярных ФАВ и их низкомолекулярных аналогов хлорангидридом акриловой кислоты (ХАК) в мономерной форме или привитым на поверхность ПЭ.

В работе использовали трипсин ($M=20\ 000$) и α -химотрипсин ($M=22\ 000$) фирмы «Реахим», а также фибриноген ($M=340\ 000$), альбумин ($M=69\ 000$), триптофан ($M=194$), тирозин ($M=181$) и аланин ($M=89$) фирмы «Реанал». Количество аминогрупп в молекуле белка определяли титрованием тринитробензолсульфокислотой по методике [3]. Гель-фильтрацию смеси белков проводили на сефадексе G-50 при комнатной температуре, используя в качестве элюирующего агента фосфатный буфер с рН 7,2 и ионной силой 0,13. Прививку ХАК на ПЭ осуществляли радиационным методом из газовой фазы в вакуумированных ампулах [4]. Протеолитическую активность определяли модифицированным методом Айсона [5], используя в качестве субстрата казеин и выражая активность в мкг тирозина/мин·мг белка. Эффективность ацилирования ФАВ W оценивали по отношению концентрации ацилированных и исходных аминогрупп и выражали в процентах.

Зависимость эффективности иммобилизации от молекулярной массы ФАВ

ФАВ	M	$W \pm 5\%$
Аланин	89	63
Трипсин	20 000	48
Альбумин	69 000	35
Фибриноген	340 000	17

На рис. 1 приведена зависимость W ФАВ при ацилировании мономерным ХАК от мольного отношения $[ХАК] : [NH_2]_0$. Видно, что, несмотря на большой избыток воды (мольное отношение $[H_2O] : [ФАВ] = 10^5$), реакция ацилирования все-таки протекает, причем скорость взаимодействия ХАК с аминогруппами ФАВ существенно зависит от химической природы ФАВ и повышается с ростом их молекулярной массы. Причина этого явления, вероятно, заключается не в повышении истинной реакционной способности участвующих в реакции аминогрупп, а связана с эффектом солюбилизации ХАК макромолекулами белка. Этот эффект определяется природой ацилируемого белка, его конформацией и значением рК ионизации участвующих в реакции аминогрупп. Это предположение хорошо согласуется с данными по изучению солюбилизации различных углеводородов глобулярными белками, в частности трипсином и альбумином [6], и подтверждается наличием зависимости между гидрофобностью ацилирующего агента и степенью ацилирования. Так, в работе [2] было показано, что малорастворимый в водных растворах ХАК является более эффективным ацилирующим агентом, чем хорошо растворимый в воде ацетилхлорид. В результате солюбилизации существенно снижается скорость гидролиза ХАК, что приводит к увеличению доли ХАК, участвующего в реакции ацилирования, и, естественно, к повышению эффективности ацилирования. При замене белков их низкомолекулярными аналогами, не обладающими солюбилизирующим эффектом, значение W должно снижаться, что и наблюдается в действительности (рис. 1, правая 1). Дополнительный вклад в повышение W при переходе от низкомолекулярных ФАВ к высокомолекулярным вносит, по-видимому, и некоторое увеличение скорости реакции ацилирования за счет повышения локальной концентрации ХАК в непосредственной близости от макромолекулы белка и ее аминогрупп.

В таблице приведены результаты исследования взаимодействия тех же ФАВ, но теперь уже с ХАК, привитым на поверхность ПЭ (степень прививки ХАК к ПЭ во всех случаях была одинакова и составляла

$60 \pm 5\%$). Видно, что и в этом случае W зависит от природы ацилируемого ФАВ, причем чем выше его ММ, тем ниже значение W , а следовательно, и степень его иммобилизации на поверхности полимера. Причина этого заключается, вероятно, в уменьшении доступности хлорангидридных групп для больших молекул ФАВ за счет возрастания диффузионных ограничений для последних по сравнению с их низкомолекулярными аналогами, а также по сравнению с ФАВ, имеющими невысокие ММ.

Факт уменьшения W ФАВ с ростом их ММ в этом случае подтверждается результатами определения количества иммобилизованных на привитом сополимере ФАВ различной ММ (тирофиллина, трипсина и альбумина) в зависимости от времени инкубирования растворов этих соединений с привитым сополимером ХАК-ПЭ. Из рис. 2 видно, что чем меньше ММ, тем выше скорость взаимодействия ФАВ с хлорангидридными группами. Об этом же свидетельствуют и данные по гель-фильтрации смеси трипсина и альбумина до и после инкубирования с привитым сополимером (рис. 3). До инкубирования смесь белков характеризовалась тремя пиками, причем только одна фракция (II) обладала высокой протеолитической активностью ($0,688 \text{ мкг тирозина}/\text{мин}\cdot\text{мг белка}$). После инкубирования с привитым сополимером этот пик полностью исчезает, в то время как неактивный пик (I), относящийся к альбумину, практически не изменяется. Это означает, что за один и тот же промежуток времени трипсин, имеющий меньшую ММ, в отличие от альбумина успевает прореагировать полностью.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что ацилирование ФАВ низкомолекулярным ХАК и его макромолекулярным «аналогом», т. е. этим же реагентом, привитым на полимерную поверхность, протекает по-разному и в каждом конкретном случае приводит к необходимости изучения закономерностей этой реакции. Только на этой основе возможно точное определение эффективности ацилирования и (как следствие этого) выбор условий целенаправленной иммобилизации ФАВ или их смесей из растворов на поверхность или в объем полимерной матрицы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Applied Biochemistry and Bioengineering. Immobilized Enzyme Principles / Ed. Wingard L. B., Katchalski-Katzir E., Goldstein L. N. Y.: Acad. Press, 1976, v. 1, p. 44.
2. Платэ Н. А., Вакула А. В., Валуев Л. И., Лыс Я. И., Федосеев В. М. Прикл. биохимия и микробиол., 1982, т. 18, № 1, с. 29.
3. Snyder S. L., Sobociński P. Z. Anal. Biochem., 1975, v. 64, № 2, p. 284.
4. Бурдыгина И. Ф., Чупов В. В., Валуев Л. И., Александрова Л. В., Голубев В. Б., Платэ Н. А. Высокомолек. соед. А, 1982, т. 24, № 2, с. 372.
5. Anson M. L. J. Gen. Physiol., 1938, v. 22, p. 79.
6. Измайлова В. Н., Ребиндер П. А. Структурообразование в белковых системах. М.: Наука, 1974, т. 35.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
23.VIII.1981