

8. Корчинский Н. А. Рукопись деп. в ВИНИТИ. Деп. № 1602-83. Опубл. в РЖХим, 1983, № 13, С124.
 9. Тагер А. А. Физикохимия полимеров. М.: Химия, 1978, с. 346.

Институт химической физики
АН СССР

Поступила в редакцию
20.XII.1984

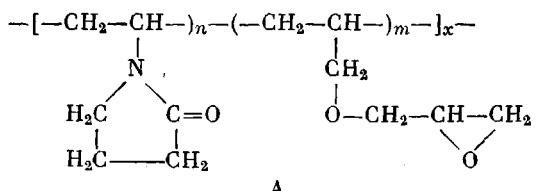
УДК 541.64:547.96

О РЕАКЦИИ БЕЛКОВ С ВОДРАСТВОРНЫМИ ЭПОКСИДСОДЕРЖАЩИМИ ПОЛИМЕРАМИ

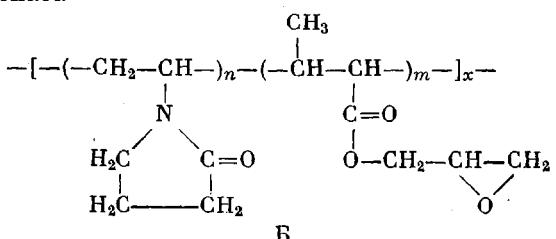
*Торчилин В. П., Штильман М. И., Козлов А. А.,
Ильина Е. В., Брудэз С. П., Лившиц А. Б.*

В ряду других методов модификации и иммобилизации белков в последнее время все более широкое внимание привлекают эпоксидсодержащие полимеры [1–3], причем отмечается, что такие полимеры отличаются достаточно высокой реакционной способностью, стабильностью и отсутствием необходимости активирования функциональной (в данном случае оксирановой) группы. При этом большинство работ касалось получения стабилизованных гетерогенных биокатализаторов с использованием твердых эпоксидсодержащих носителей и различных ферментов. В то же время работ, касающихся взаимодействия белков с водорастворимыми эпоксидсодержащими полимерами, сопровождающегося получением систем, сохраняющих растворимость в водных средах, значительно меньше [4–6].

С целью сравнения реакционной способности в реакции с белками водорастворимых эпоксидсодержащих полимеров различного строения в данной работе было исследовано взаимодействие с α -химотрипсином и гемоглобином двух полимерных эпоксидов — сополимеров с N-винилпирролидоном аллилглицидилового эфира

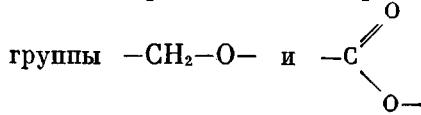


и глицидилкрутоната



При этом были выбраны сополимеры, содержащие близкое количество эпоксидных групп (соответственно 11,5 и 10,2 мол. %), имеющие близкую ММ ($M_w=28 \cdot 10^3$ и $35 \cdot 10^3$) при высоких значениях параметра блочности по Харвуду (23,9 и 20,9), рассчитанных по константам сополимеризации и свидетельствующих о том, что эпоксидсодержащие звенья в основной цепи разделены звеном или последовательностью звеньев N-винилпирролидона.

Длина бокового ответвления между основной цепью и функциональной группой у обоих сополимеров была приблизительно одинакова ($\sim 6 \text{ \AA}$). Все это позволяло рассматривать выбранные сополимеры как полимерные реагенты близкого строения, основное отличие которых определялось различной полярностью боковых ответвлений, содержащих



Следует отметить, что индукционное

влияние отличающихся сополимеры групп $-\text{CH}_2-$ и $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ нивелируется тем, что оно осуществляется через плохо передающую индукционный эффект группировку $-\text{O}-\text{CH}_2-$.

Реакция эпоксидсодержащих сополимеров N-винилпирролидона с *n*-бутиламином, α -химотрипсином и гемоглобином

Сополимер	$T, \text{ K}$	Константы скорости $k \cdot 10^3, \text{ л}/\text{моль} \cdot \text{с}$	Связанный фермент, %	Количество связанного фермента на 1 г полимера, мг	Свойства полимерных производных		Время достижения приведенной вязкости реакционной среды, ч ($\eta^*_{\text{пр}} = 0,15$)	Содержание Метформы гемоглобина, %
					$K_M \cdot 10^3$	сохранение ферментной активности после инкубации при $37^\circ \text{C}, 5 \text{ ч}$, %		
реакция с <i>n</i> -бутиламином						связывание сополимеров с α -химотрипсином		
A	307 ± 1	$0,62 \pm 0,03$	59 ± 2	$118,0 \pm 4,0$	2,5	70 ± 3	$26,0 \pm 0,1$	1 ± 3
B	307 ± 1	$3,20 \pm 0,08$	100	200,0	4,8 1,0**	25 ± 1 10^{**}	$2,8^{***} \pm 0,1$	6 ± 0 3^{**}
связывание сополимеров с гемоглобином						связывание сополимеров с гемоглобином		

* Для содержание гемоглобина $\sim 0,4 \%$.

** Для нативного белка.

*** В конце реакции наблюдается гелеобразование.

Известно, что в определенных областях pH с эпоксидными группами реагируют разнообразные группы белков с различными скоростями [7], однако в области физиологических значений pH наибольшей реакционной способностью обладают аминогруппы белковых макромолекул.

Для сравнения реакционной способности сополимеров в модельных условиях была исследована кинетика их реакции с *n*-бутиламином, соответствующим боковой группе звена *L*-лизина ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$). Реакцию проводили в водной среде (фосфатный буфер, pH 8,25).

Как видно из таблицы, сополимер глицидилквасцоната реагирует с *n*-бутиламином с константой скорости, в 5 раз более высокой, чем у сополимера аллилглицидилового эфира, что, вероятно, объясняется большей стерической доступностью в водной среде более полярных боковых ответвлений сополимера Б. Это соотношение активностей сополимеров в модельной реакции сохраняется и при переходе к их взаимодействию с белками. Так, в случае взаимодействия с α -химотрипсином сополимер глицидилквасцоната связывает 200 мг фермента на 1 г полимера (при 100%-ном связывании введенного в реакцию белка) по сравнению с 118 мг (59% связывания) в случае сополимера аллилглицидилового эфира.

Такая же картина наблюдается и для реакции сополимеров с гемоглобином. Нарастание вязкости реакционной смеси идет значительно быстрее в случае сополимера глицидилквасцоната. Причем в этом случае возможно гелеобразование в реакционной системе. При введении в реакцию сополимера аллилглицидилового эфира нарастание вязкости системы происходит в ~ 10 раз медленнее. Таким образом, в условиях модельной реакции и при взаимодействии с белками различного строе-

ния активней вступает в реакцию в водной среде сополимер, содержащий реакционноспособную группу, расположенную на более полярном боковом ответвлении (при прочих близких особенностях строения сополимеров).

В то же время функциональные характеристики полученных продуктов взаимодействия белков с сополимерами заметно лучше для случая, когда в реакцию вводится менее реакционноспособный сополимер А, содержащий звенья аллилглицидилового эфира. Так, продукт реакции с гемоглобином сополимера глицидилкетоната (Б) содержал ~6% функционально неактивной формы гемоглобина (Met-формы), тогда как реакция с сополимером аллилглицидилового эфира (А) не приводит к возрастанию количества Met-формы по сравнению с нативным гемоглобином.

Продукт реакции α -химотрипсина с сополимером аллилглицидилового эфира (А) сохранял ферментативную активность в реакции гидролиза N-ацетил-L-тирофина после выдерживания в течение 5 ч при 310 К на 70% (против 25% для продукта реакции с сополимером Б и 10% для нативного фермента).

Причиной более низких функциональных характеристик продуктов реакции белков с сополимером глицидилкетоната, по-видимому, является большее в этом случае искажение активной конформации α -химотрипсина и гемоглобина, что подтверждается и заметным возрастанием константы Михаэлиса K_m для реакции гидролиза, катализируемой α -химотрипсином ($4,8 \cdot 10^{-3}$), по сравнению с $2,5 \cdot 10^{-3}$ — для продукта реакции с сополимером А.

Можно предположить, что в случае более реакционноспособного сополимера глицидилкетоната, содержащего доступные реакционноспособные группы, происходит более активное многоточечное взаимодействие модифицирующего сополимера и белковых глобул, приводящее к достаточно сильному искажению последних. Наблюдающееся в этом случае явление, очевидно, той же природы, что и отмечавшееся в работе [8] снижение активности фермента трипсина при увеличении количества реакционноспособных групп в полимере-носителе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коршак В. В., Штильман М. И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М.: Наука, 1984, 261 с.
2. Kalal J. J. Polymer Sci. Polymer Symp., 1977, v. 60, p. 251.
3. Штильман М. И. Успехи химии, 1979, т. 48, № 11, с. 2016.
4. Коршак В. В., Торчилин В. П., Штильман М. И., Ильина Е. В., Брудзь С. П. Докл. АН СССР, 1983, т. 273, № 3, с. 626.
5. Козлов А. А., Лившиц А. Б., Шлимак В. М., Штыкова Э. В., Штильман М. И., Иванов Ю. Г., Крылова В. Е., Верковский А. Л. В кн.: Тез. докл. I Биофиз. съезда. М.: Ин-т биофизики АН СССР, 1982. с. 1980.
6. Таджиев М. Х., Ибрагимов Ф. И., Джанбаева Н. Р., Рахимов М. М. Прикл. биохимия и микробиология, 1978, т. 14, № 5, с. 703.
7. Zemanova I., Turkova J., Capka M., Nakhapetyan L. A., Svec F., Kalal J. Microbiol. Technol., 1981, v. 3, № 3, p. 229.
8. Manecke G., Vogf H. G., Polakowski D. In: IUPAK Makro. 26-th Intern. Symp. Macromolec. Mainz, 1979, v. 3, p. 107.

Московский химико-технологический
институт им. Д. И. Менделеева

Поступила в редакцию
20.1.1985