

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Том (A) XXXI

1989

№ 2

УДК 541.64:547.96:532.5

ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОНЬЮГАТОВ СОПОЛИМЕРА НА ОСНОВЕ N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА С БЕЛКОМ СТРЕПТОКИНАЗОЙ

Потапенко В. Е., Бартошевич С. Ф., Таратина Т. М.,
Кленин С. И., Москвичев Б. В.

Представлены результаты исследования гидродинамических свойств методами скоростной седиментации и диффузии конъюгатов белка стрептокиназы с гидрофильным линейным сополимером на основе N-винилпирролидона в зависимости от различных соотношений компонентов в реакционной среде, а также от ММ полимера-модификатора. К системам типа белок – полимер применен подход, используемый при изучении структуры синтетических привитых сополимеров, заключающийся в сравнительном исследовании молекулярных параметров конечного продукта (графт-полимера) и составляющих его компонентов.

В настоящее время значительное внимание уделяют изучению свойств водорастворимых конъюгатов белков с синтетическими и природными полимерами в связи с применением их в медицине. Свойства таких соединений в значительной мере определяются способом модификации [1, 2], химической природой модификатора [3], его ММ [4], а также соотношением компонентов в реакционной среде [5, 6]. Вопрос о структуре полимерных производных белков до сих пор мало изучен и требует всестороннего исследования, так как дает возможность прогнозировать свойства будущих препаратов.

В работе использовали активатор фибринолитической системы человека – стрептокиназу (СТК), выделенную из препарата «Авелизин» («Гермед», ГДР).

В качестве полимера-модификатора использовали сополимер N-венилпирролидона и диизопропилен ацролеина («Совиаль» производства НПО «Биолар», ТУ 6-09-23-267-83), содержащий ~10 мол.% остатков ацролеина. Методом ГПХ на сепадексе Г-200 выделяли две узкие фракции П_I и П_{III} (рис. 1).

Химическую модификацию СТК фракциями сополимера проводили аналогично [7], варьируя соотношение компонентов при связывании и сохраняя концентрацию белка постоянной ($7,5 \cdot 10^{-5}$ м).

С целью отделения непрореагировавших компонентов образцы модифицированной СТК фракционировали на сепадексе Г-150 или Г-200.

Концентрации белка и сополимера во фракциях определяли спектрофотометрически [8, 9]. На основании полученных данных определяли мольные соотношения в выделенных конъюгатах.

О количестве ковалентных связей между белком и сополимером в конъюгате судили по степени модификации α , равной доле аминогрупп белка, прореагировавших с альдегидными группами сополимера. Определение свободных NH₂-групп проводили по их взаимодействию с 2,4,6-тринитробензольсульфокислотой «Sigma» [10].

Вязкость изучали с помощью вискозиметра Уббелоде при $20,0 \pm 0,1^\circ$ со временем истечения растворителя 56 с.

Определение констант седиментации $S_{20,\omega}^0$ проводили на ультрацентрифуге МОМ 3180 (BHP) при $20,0 \pm 0,1^\circ$ и скорости вращения ротора $(50-60) \cdot 10^3$ об/мин. Коэффициенты диффузии $D_{20,\omega}^0$ находили с помощью поляризационного диффузометра [11]. Расчет проводили по методу максимальной ординаты и нулевого момента [12]. В качестве растворителя во всех исследованиях использовали 0,05 м. фосфатный буферный раствор (рН 7,5).

На основании гидродинамических данных молекулярные массы M_{SD} СТК, фракций сополимера и конъюгатов рассчитывали по формуле Свердберга [13]. В первых

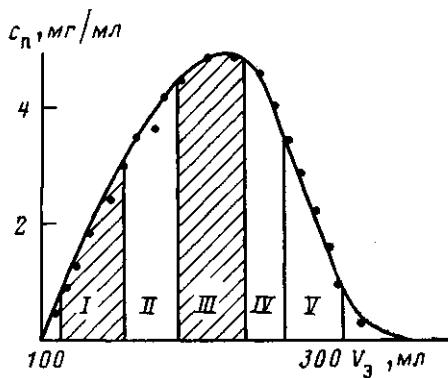


Рис. 1. Гель-хроматография сополимера N-виллипирролидона и акролеина на Сефадексе Г-200. Колонка 3,1××50 см. Элюирование 0,01 м. НСl. Защищенные фракции I и III использованы для модификации СТК

двух случаях значения удельных парциальных объемов V известны [14, 15], для конъюгатов значения V рассчитывали по аддитивному правилу.

Образцы конъюгатов СТК с фракциями сополимера различной ММ получали, изменяя соотношения реагирующих групп от близкого к эквимольному до 30-кратного избытка альдегидных групп модификатора (табл. 1). В случае сополимера с $M=60\,000$ это соотношение соответствовало изменению мольных концентраций от пятикратного избытка СТК до восьмикратного избытка сополимера. Для модификатора с $M=11\,000$ это соотношение смещено в сторону значительного преобладания сополимера в реакционной среде.

На рис. 2 и 3 приведены гель-хроматограммы полученных конъюгатов в сравнении с исходными компонентами. При недостатке сополимера, несмотря на эквимольные соотношения реагирующих групп при связывании, значительная часть белка остается немодифицированной (рис. 2, в). В случае значительного избытка сополимера профиль элюции полимерного компонента представляет собой результат наложения зон связанного с белком и свободного сополимера.

Результаты анализа конъюгатов приведены в табл. 1. Переход от образца 1 к образцу 3, обусловленный увеличением доли химически связанного сополимера в конъюгате, отражается прежде всего на степени модификации белка. Количество ковалентных связей между макромолекулой и ее полимерным окружением возрастает от 5 до 8. В табл. 1 отражено мольное соотношение белкового и полимерного компонентов в полу-

Таблица 1

Условия получения и некоторые характеристики конъюгатов стрептокиназы с фракциями сополимера Π_1 и Π_{III}

ММ фракции со- полимера	Образец конъюгата (номер конъюгата)	Состав реак- ционной смеси, моль/моль		Состав конъюгата, моль/моль СТК : Π	α^*	Количество * ко- валентных связей в конъюгате, приход- ящихся на 1 моль СТК	Расчетная ММ * конъюгата
		NH ₂ : COH	СТК : Π				
60 000 (Π_1)	СТК - Π_1 (1)	1 : 0,8	5 : 1	2,6 : 1	0,31	5	174 000
	СТК - Π_1 (2)	1 : 3,8	1 : 1	1 : 1	0,38	6	104 000
	СТК - Π_1 (3)	1 : 30	1 : 8	1 : 2	0,50	8	164 000 **
11 000 (Π_{III})	СТК - Π_{III} (4) зона I	1 : 0,7	1 : 1,1	1 : 1	0,13	3	55 000
	зона II	1 : 0,7	1 : 1,1	1 : 1	0,13	3	55 000
	СТК - Π_{III} (5)	1 : 3,8	1 : 5,6	1 : 2,7	0,38	6	74 000
	СТК - Π_{III} (6)	1 : 30	1 : 29	1 : 8,8	0,50	8	140 000

* Характеристика конъюгатов СТК - Π дана по результатам спектрофотометрического исследования образцов после гель-хроматографии.

** Мольное соотношение СТК : Π и ММ конъюгата определены с учетом количества химически связанного сополимера после математического разделения зон связанного и свободного сополимеров.

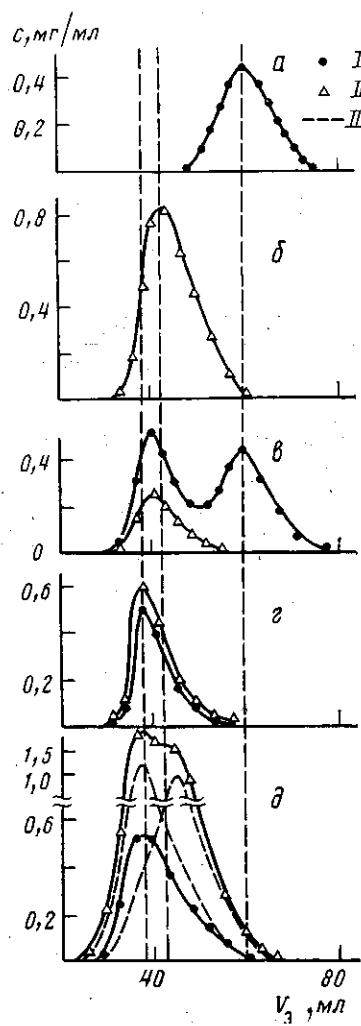


Рис. 2

Рис. 2. Гель-хроматография на Сепадексе Г-200 нативной СТК (а), и Π_1 (б) и конъюгатов 1–3 (в–д). Свободный объем колонки $V_0=38$ мл; $V_{\Pi_1}=43$ мл; $V_{\text{СТК}}=60$ мл (отмечено вертикальными линиями). I и II – распределение по белку и полимеру, III – расчетные профили элюции полимера

Рис. 3. Гель-хроматография на Сепадексе Г-150 нативной СТК (а), Π_{III} (б) и конъюгатов 4–6 (в–д). Свободный объем колонки $V_0=40$ мл; $V_{\Pi_{\text{III}}}=64$ мл; $V_{\text{СТК}}=64$ мл. I и II – распределение по белку и полимеру

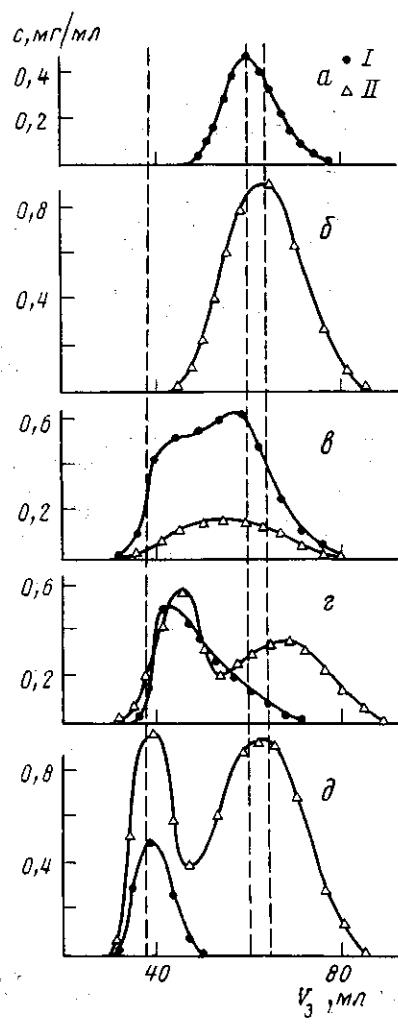


Рис. 3

ченных конъюгатах, а также минимальные ММ конъюгатов, рассчитанные на основании этого соотношения.

Сопоставим результаты анализа конъюгатов 1–3, приведенные в табл. 1 и 2. При мольном избытке СТК в реакционной смеси получается конъюгат с $M=174\,000$ (табл. 1), что хорошо коррелирует со значением $M=150\,000$, полученным на основании седиментационно-диффузионного анализа (табл. 2). Следовательно, к одной макромолекуле сополимера в среднем присоединяются две глобулы белка, причем полимерная матрица образует пять ковалентных связей с каждой молекулой белка, плотно ее оплетая.

Промоделируем строение этого конъюгата следующим образом (рис. 4, а). Предположим, что конъюгат 1 представляет собой частицу, состоящую из двух глобул белка, оплетенных полимерной макромолекулой настолько плотно, что можно пренебречь увеличением размеров конъюгата (но не массы) за счет Π_1 . Известно, что $D_{20,\omega}^0$ обратно пропорционален коэффициенту трения f_D диффундирующей частицы $D_{20,\omega}^0 \sim 1/f_D$, а $S_{20,\omega}^0$

Таблица 2

**Гидродинамические свойства СТК, фракций сополимера винилпирролидона
с акролеином – Π_1 и Π_{III} и конъюгатов СТК с этими фракциями**

Образец конъюгата (номер конъюгата)	$[\eta]$, дл/г	$S_{20,\omega}^0 \cdot 10^{13}$, с^{-1}	$D_{20,\omega}^0 \cdot 10^7$, $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	\overline{V} , $\text{см}^3/\text{г}$	M_{SD}	Наиболее вероятное со- отношение СТК : Π в конъюгате
СТК	0,120	2,8	6,0	0,74	45 000	–
Π_1	0,175	1,8	4,7	0,84	60 000	–
СТК – Π_1 (1)	–	4,0	2,9	0,77	150 000	2 : 1
СТК – Π_1 (2)	–	3,4	3,3	0,80	127 000	1 : 1
СТК – Π_1 (3)	–	3,0	3,0	0,82	140 000	1 : 2
Π_{III}	0,067	0,7	10,0	0,84	11 000	–
СТК – Π_{III} (4)	–	4,0	2,5	0,76	150 000	(1 : 1) · 3
первый пик	–	2,3	4,5	0,76	53 000	1 : 1
второй пик	–	2,9	5,7	0,78	60 000	1 : 2
СТК – Π_{III} (5)	–	4,5	4,1	0,81	130 000	1 : 8
СТК – Π_{III} (6)	–	–	–	–	–	–

пропорционален ММ и обратно пропорционален коэффициенту трения f_s частицы, помещенной в центробежное поле. Тогда в соответствии с нашей моделью коэффициент диффузии конъюгата $D_{20,\omega}^0(k)$ должен быть в 2 раза меньше по сравнению с коэффициентом диффузии отдельной глобулы $D_{20,\omega}^0(\text{г})$

$$\frac{D_{20,\omega}^0(\text{г})}{D_{20,\omega}^0(k)} = \frac{1}{f_D} : \frac{1}{2f_D} = 2,$$

в то время как $S_{20,\omega}^0(k)$ и $S_{20,\omega}^0(\text{г})$ должны отличаться в $\sim 1,5$ раза

$$\frac{S_{20,\omega}^0(k)}{S_{20,\omega}^0(\text{г})} = \frac{M(k)}{f_S(k)} : \frac{M(\text{г})}{f_S(\text{г})} = \frac{(2M(\text{г}) + M_{\Pi_1})}{2f_S(\text{г})} : \frac{M(\text{г})}{f_S(\text{г})} \cong 1,5$$

Сравнение $D_{20,\omega}^0$, $S_{20,\omega}^0$, M_{SD} для конъюгата 1 и СТК позволяет сделать вывод о том, что предложенная модель удовлетворительно описывает гидродинамические свойства этого конъюгата.

При эквимольном соотношении компонентов в реакционной среде (образец 2) происходит полное связывание белка и сополимера в том же соотношении (рис. 2, *г*).

При мольном избытке Π_1 в реакционной среде образуется конъюгат 3 с соотношением компонентов СТК : Π_1 = 1 : 2, что коррелирует с полученной величиной $M_{SD} = 140 000$. В этом случае конъюгат представляет собой молекулу СТК, к которой присоединены две цепи полимера Π_1 . Учитывая равновесную гибкость цепи сополимера и тот факт, что глобула белка образует с каждой цепью сополимера четыре связи, можно предположить, что между точками связывания образуются петли сополимера (рис. 4, *в*). Поведение такого конъюгата в растворе будет максимально приближаться к поведению сополимера той же ММ. Так, для сополимера с $M = 140 000$ рассчитанный $D_{20,\omega}^0 = 3,2 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, в то время как для конъюгата 3 $D_{20,\omega}^0 = 3,0 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. То же наблюдается для констант седиментации: $S_{20,\omega}^0 = 2,9 \cdot 10^{-13} \text{ с}^{-1}$ для сополимера с $M = 140 000$ и $S_{20,\omega}^0 = 3,0 \cdot 10^{-13} \text{ с}^{-1}$ для конъюгата 3.

Рассмотрим, что происходит, если СТК модифицировать сополимером с $M = 11 000$ в тех же условиях и при таких же мольных соотношениях реагирующих групп. Гель-хроматограммы исходных компонентов и конъюгатов представлены на рис. 3, *а–д*. При эквимольном соотношении компонентов распределение по белку выражается двумя плохо разделен-

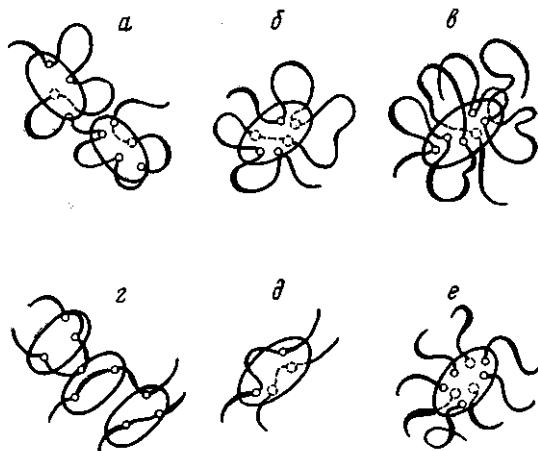


Рис. 4. Схематическое строение конъюгатов СТК с сополимером N-винилпирролидона и акролеина в зависимости от ММ сополимера и соотношений компонентов

ными зонами, одна из которых элюируется со свободным объемом колонки, другая близка к объему элюции нативной СТК. Сополимер равномерно распределен по всем фракциям. Вторая зона конъюгата 4 представляет собой конъюгат с эквимольным соотношением компонентов и $M=53\,000$, что соответствует сумме ММ компонентов СТК и Π_{III} .

Высокомолекулярный продукт в зоне I характеризуется ММ, в 3 раза большей, чем в зоне II: $M=150\,000$. Можно полагать, что в этом случае реализуется в среднем структура типа $(\text{СТК} : \Pi_{III}) \cdot K$, где $K=3$ (рис. 4, г).

При мольном избытке Π_{III} практически весь белок вступает во взаимодействие с сополимером, и полученный конъюгат элюируется одной зоной. В распределении полимерного компонента наблюдаются зоны свободного сополимера и связанного с белком (рис. 3, г–д). По мере увеличения мольного избытка модификатора увеличивается доля NH_2 -групп СТК, вступивших во взаимодействие, увеличивается также содержание сополимера в конъюгате. Так, при возрастании мольного избытка Π_{III} в реакционной среде от 5,5 до 29 соотношение СТК : Π_{III} в конъюгате меняется от 1 : 2,7 (5) до 1 : 8,8 (6), по спектрофотометрическим данным (табл. 1), или от 1 : 2 до 1 : 8, по данным седиментационно-диффузионного анализа (табл. 2). При этом количество связей молекулы белка с одной цепью полимера уменьшается от 3 до 1. Таким образом, при выбранных условиях модификации в случае значительного мольного избытка сополимера реализуются структуры конъюгатов типа $(\text{СТК}_i - (\Pi_{III})_n)$, где $1 \leq n \leq 8$. Вероятно, при дальнейшем увеличении избытка сополимера Π_{III} в реакционной среде содержание полимерного компонента в конъюгате увеличиваться не будет, так как при выбранных условиях не происходило модификации более восьми NH_2 -групп одной молекулы белка.

Следует отметить, что присоединение небольшого количества полимерных цепей с $M=11\,000$ к глобуле белка ($n=2$), когда каждая цепь связана несколькими ковалентными связями с молекулой СТК, не сопровождается значительным увеличением размеров конъюгата пять по сравнению с размерами нативного белка. Действительно, их коэффициенты диффузии очень близки (табл. 2). Известно, что $D_{20,0}^0 \sim \frac{1}{(\bar{R}^2)^{\frac{1}{2}}}$, где $(\bar{R}^2)^{\frac{1}{2}}$ – среднеквадратичный радиус инерции частицы. Следовательно, можно полагать, что полимерная цепь оплетает молекулу СТК. Схематическое изображение строения такого конъюгата представлено на рис. 4, д. В другом крайнем случае, когда присоединение полимера-модификатора Π_{III} к молекуле белка происходит одноточечно ($n=8$), фиксируется увеличение размеров частицы (табл. 2; рис. 4, е).

Экспериментальные данные свидетельствуют о большом разнообразии полученных конъюгатов белка с сополимером в зависимости от условий модификации белка и ММ полимера-модификатора. Это необходимо учитывать при разработке конкретных препаратов медицинского назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коршак В. В., Штильман М. И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М., 1984. 262 с.
2. Введение в прикладную энзимологию/Под ред. Березина И. В., Мартинека К. М., 1982. 384 с.
3. Тарасова Г. В., Тихомирова В. П., Самарцев М. А. // Высокомолек. соед. А. 1984. Т. 26. № 3. С. 496.
4. Newmark J., Abuchowski A., Murano G. // J. Appl. Biochem. 1982. V. 4. P. 185.
5. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 12. С. 2611.
6. Таратина Т. М., Москвичев Б. В. // Хим.-фармацевт. журн. 1985. № 1. С. 31.
7. Теникова Т. Б., Панарин Е. Ф., Миргородская О. А., Самсонов Г. В., Москвичев Б. В. // Хим.-фармацевт. журн. 1977. № 7. С. 86.
8. Kirshenbaum D. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 68. P. 465.
9. Иванова Г. П., Миргородская О. А., Москвичев Б. В. // Высокомолек. соед. А. 1979. Т. 24. № 10. С. 738.
10. Fields R. // Biochem. J. 1971. V. 124. P. 581.
11. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. Структура макромолекул в растворах. М., 1964. С. 355.
12. Цветков В. Н. Жесткоцепные полимерные молекулы. Л., 1986. С. 67.
13. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. Структура макромолекул в растворах. М., 1964. С. 370.
14. Taylor B., Botts J. // Biochem. 1968. V. 7. № 1. P. 232.
15. Теникова Т. Б., Москвичев Б. В., Самсонов Г. В. // Биохимия. 1980. Т. 45. № 3. С. 438.

Всесоюзный научно-исследовательский
технологический институт антибиотиков
и ферментов медицинского назначения

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
13.VII.1987

HYDRODYNAMIC PROPERTIES OF HIGH-MOLECULAR CONJUGATES OF N-VINYLPYRROLIDONE COPOLYMERS WITH STREPTOKINASA PROTEIN

Potapenko V. Ye., Bartoshevich S. F., Taratina T. M.,
Klenin S. I., Moskvichev B. V.

Summary

Hydrodynamic properties of conjugates of streptokinase protein with hydrophilic linear copolymer on the basis of N-vinylpyrrolidone have been studied by velocity sedimentation and diffusion methods for various components ratios in the reaction medium and varion MM of the polymer-modifier. An approach used for the study of the structure of synthetic grafted copolymers and consisting in the comparative study of molecular parameters of the final product (graft polymer) and its components was applied to the protein - polymer systems.