ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Том (А) 34 1992 № 2

УДК 541(64+183.2)

© 1992 г. В. В. Чупов, В. В. Николайчик, С. В. Гаврилюк, Г. Н. Бычко, Н. А. Платэ

L-ЛИЗИН И ПОЛИ-*L*-ЛИЗИНСОДЕРЖАЩИЕ ПОЛИМЕРНЫЕ ГИДРОГЕЛЕВЫЕ СОРБЕНТЫ

Синтезированы низкомолекулярные ненасыщенные производные *L*-лизина, отличающиеся локализацией связи C=C на α (АЛ) или ε (ЭЛ) аминогруппе и макромономер поли-*L*-лизина с различным количеством двойных связей (ПЛ). Изучено поведение указанных соединений в реакциях радикальной сополимеризации с акриламидом и с этим же мономером в присутствии сшивателя, а также свойства получающихся продуктов. Показано, что все сшитые сополимеры проявляют свойства высокоспецифических сорбентов плазминогена, причем емкость сорбентов по белку возрастает в ряду ЭЛ, АЛ, ПЛ. Оценено сорбционное поведение гидрогелей с точки зрения их структурных особенностей и влияния внешних условий (pH среды) и показано, что основными факторами являются природа и количество иммобилизуемого лиганда: для АЛ и ЭЛ важен характер распределения звеньев в сополимере, а для ПЛ – его количество и конформационное состояние.

Полимерные биоспецифические сорбенты на основе водонабухающих полимерных гидрогелей находят свое применение в различных областях биотехнологии, химии и медицины [1].

Сформулированные ранее научные основы создания и применения таких сорбентов позволили разработать ряд высокоспецифических систем для выделения или очистки различного рода биологически активных соединений [2].

Одним из типов биоспецифических сорбентов являются нерастворимые полимерные системы, содержащие остатки *L*-лизина, придающие этим системам способность образовывать комплексные соединения с одним из плазменных белков – плазминогеном (профибринолизином) за счет специфического взаимодействия лизиновых фрагментов с макромолекулой белка. Несмотря на то, что иммобилизация *L*-лизина на нерастворимых полимерных матрицах с целью получения сорбентов плазминогена (ПГ) осуществлена ранее [3], систематического изучения взаимосвязи структуры гидрогеля и его сорбционных свойств, равно как и физико-химических характеристик выделяемого белка, до сих пор не проведено. Более того, введение в состав гидрогелей полимерного лиганда (поли-*L*-лизина) ранее не осуществлялось, механизм комплексообразования ПГ с лизинсодержащими сорбентами не устанавливался, а природа биоспецифического связывания ПГ – поли-*L*-лизин и тип конформера белка, выделяемого с помощью поли-*L*-лизинсодержащих сорбентов, неизвестны.

Цель настоящей работы – изучение особенностей процесса синтеза *L*-лизинсодержащих сшитых сополимеров на основе неионогенных гидрофильных мономеров (*L*-лизинсодержащих гидрогелей), характеристика их строения и структуры, отработка условий выделения ПГ, оценка его физиологических свойств и нахождение корреляций между структурой сорбента и свойствами ПГ с целью оптимизации параметров процесса выде-

ления этого белка, имеющего ключевое значение для гемостаза и гемокоагуляции крови.

В работе использовали N^{ε}-метакрилоил-*L*-лизин (**ЭЛ**), синтезированный согласно работе [4], N^{α}-метакрилоил-*L*-лизин (**АЛ**), полученный по аналогичной методике. Поли-*L*-лизин различной молекулярной массы (фирма «Serva», США) переводили в макромономер поли-*L*-лизина (**ПЛ**), используя реакцию ацилирования полипептида хлорангидридом акриловой кислоты [5]. Акриламид и N,N′-метилен-*бис*-акриламид (**БИС**) фирмы «Reanal» (Венгрия) трижды перекристаллизовывали из хлороформа и ацетона соответственно.

Гидрогели получали радикальной сополимеризацией ЭЛ и АЛ с акриламидом и БИС в водных растворах под действием окислительно-восстановительной инициирующей системы персульфат аммония (**ПС**) – N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин (**ТМЕДА**), взятой в количестве 0,2 мас.% от массы сомономеров при 25°. Блок геля после окончания реакции сополимеризации измельчали на нейлоновых ситах до размеров частиц порядка 0,5–1,0 мм, промывали бидистиллированной водой и лиофильно высушивали. Степень набухания сорбентов в воде и других растворителях определяли гравиметрически, рассчитывая емкость гелей по растворителю известным способом [5]. Состав сополимеров акриламид – ЭЛ – БИС и акриламид – АЛ – БИС определяли с помощью метода спектрополяриметрии по величинам оптического вращения сополимеров.

Спектры кругового дихроизма снимали на спектрополяриметре «Jasco J-500» (Япония) в кюветах (1 см) при комнатной температуре. Обработку спектров и расчет степени спиральности полипептида и сополимеров проводили в соответствии с работой [6]. Емкость сорбентов по плазминогену при сорбции этого белка из модельных растворов определяли колоночной хроматографией, используя колонки размерами 1,0×10,0 см, заполненные равновесно набухшим сорбентом. Смыв белка осуществляли 0,1 м. водным раствором *L*-лизина. Белок выделяли из плазмы крови как колоночной хроматографией, так и в статических условиях, используя различное соотношение кровь : сорбент. Белок тестировали с помощью стандартных биохимических методов [7]. Активацию ПГ стрептокиназой проводили согласно методике [8], активность образующегося фермента измеряли в соответствии с работой [9].

Как было показано ранее [2], полимерные гидрогелевые сорбенты могут быть синтезированы посредством радикальной тройной сополимеризации гидрофильного мономера (в данном случае акриламида), бифункционального сомономера-сшивателя (БИС) и ненасыщенного производного, способного выступать в роли специфического лиганда, отвечающего за процессы связывания выделяемого вещества. Было показано [10], что максимальной связывающей способностью обладают такие гидрогелевые сорбенты, в которых распределение остатков мономера-лиганда в матрице гидрогеля имеет единичный характер. Следует заметить, что изученные ранее мономеры-лиганды имели неионогенную природу и обладали высокой гидрофобностью, в силу чего введение их в матрицы гидрофильных гелей осуществлялось сополимеризацией в водно-органических средах.

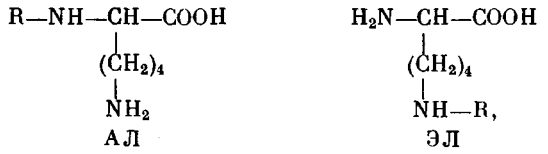
В данной работе в качестве мономеров-лигандов использованы нена-

Таблица 1

Составы мономерных смесей, составы сополимеров и константы сополимеризации ЭЛ и АЛ с акриламидом

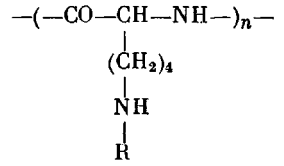
Состав мономерной смеси, мас.%			Состав сополимера, мас.%			Константы сополимеризации	
акриламид	АЛ	ЭЛ	акриламид	АЛ	ЭЛ	r_1	r_2
75	25	–	87	13	–		
80	20	–	89	11	–	0,11±0,07	8,56±0,73
90	10	–	95	5	–		
75	–	25	82	–	18		
80	–	20	90	–	10	0,68±0,09	5,23±0,87
90	–	10	96	–	4		

сыщенные производные аминокислоты — *L*-лизина, различающиеся местом локализации двойной связи C=C: в первом случае она локализована на α-аминогруппе (АЛ), во втором — на ε-аминогруппе (ЭЛ)



где R=—CO—C(CH$_3$)=CH$_2$.

ПЛ представляет собой полипептид, в котором связь C=C также находится вблизи ε-аминогруппы



Изучение реакционной способности АЛ и ЭЛ в реакциях радикальной сополимеризации с акриламидом и БИС показало, что все три мономера попарно вступают в реакции сополимеризации в водной среде под действием инициирующей окислительно-восстановительной системы ПС — ТМЕДА, в силу чего возможно их участие и в реакциях тройной сополимеризации с образованием сшитых сополимеров. Поскольку тройная радикальная сополимеризация в присутствии сшивающего агента практически не поддается анализу с точки зрения определения констант сополимеризации, были изучены реакционные способности указанных мономеров в реакциях сополимеризации систем акриламид — АЛ (ЭЛ) и БИС — АЛ (ЭЛ) и сравнены с известными данными для системы акриламид — БИС [11]. Данные по константам сополимеризации указанных мономеров приведены в табл. 1.

Что касается констант сополимеризации акриламида с ПЛ, то можно, используя ранее разработанный метод [12], оценить константы сополимеризации двух мономеров, различающихся по молекулярной массе на 3 порядка, однако эти константы носят эффективный характер и вряд ли могут быть использованы для оценки структуры образующихся сополимеров. Для оценки строения сополимера акрил-амид — ПЛ использован метод кругового дихроизма (**КД**) в сочетании с гель-хроматографией. На рис. 1 приведены спектры КД растворов исходного ПЛ, продукта его ацилирования, содержащего в среднем одну связь C=C на молекулу полипептида и продукта инкубирования ацилированного ПЛ с акриламидом в присутствии инициирующей системы. Как видно из рисунка, вид спектров и степень спиральности полипептида практически не изменяются при введении в его макромолекулы связей C=C (94 и 95% соответственно). В случае третьего продукта степень спиральности несколько уменьшается (до 91%), однако при этом существенно возрастает ММ продукта: с $6{,}0 \cdot 10^4$ для исходного ПЛ до $(1—1{,}5) \cdot 10^6$ (по данным гель-хроматографии). При этом продукт выходит с колонки одним пиком, тогда как модельная смесь ПАЛ — ПАА разделяется на два пика в аналогичных условиях хроматографирования (рис. 2). Это означает, что продукт является сополимером ПЛ с ПАА и содержит около 2—3 макромолекул ПЛ (определено по оптической активности).

Введение в реакционную смесь сшивающего агента во всех трех случаях приводит к образованию сшитых продуктов, которые представляют

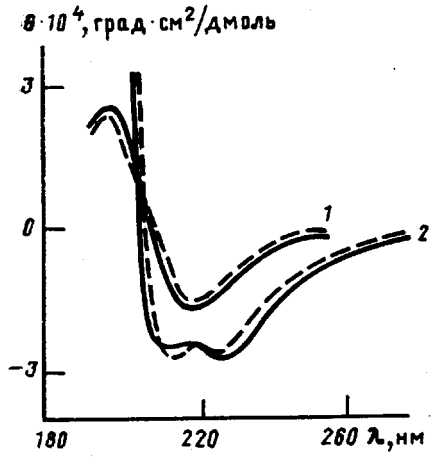


Рис. 1

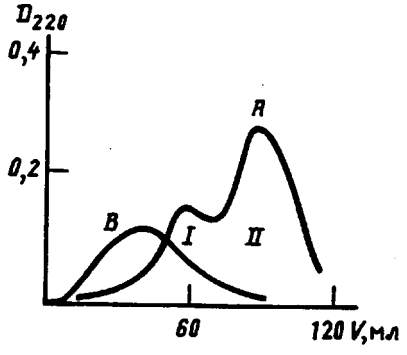


Рис. 2

Рис. 1. Спектры кругового дихроизма растворов исходного (сплошные кривые) и ацилированного (штриховые) поли-*L*-лизина при pH=7,4 (*1*) и 12,5 (*2*). Концентрации растворов составляют $0{,}52 \cdot 10^{-3}$ г/100 мл, температура 25°

Рис. 2. Гель-хроматограммы смеси полиакриламида (I) и поли-*L*-лизина (II) (*A*) и продукта инкубирования акриламида с ацилированным ПЛ, содержащим одну связь C=C, при 30° в течение 60 мин (*B*). Условия хроматографирования: колонка с сефарозой-6В (60 мл), элюент фосфатно-солевой буфер, скорость элюции 0,8 мл/мин

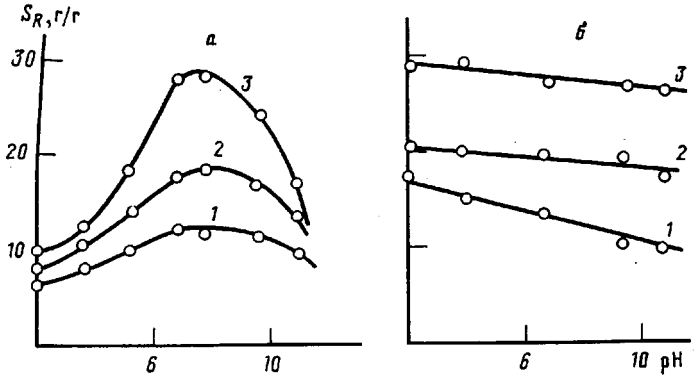
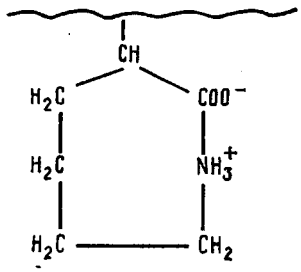


Рис. 3. Зависимость степени набухания гидрогелей, содержащих 0,1 (*1*); 0,5 (*2*) и 1,0 мас.% АЛ (*3*) (*а*) и ЭЛ (*б*) от pH при 36°. Содержание акриламида и БИС в сшитых сополимерах составляет 10 и 0,5 мас.% соответственно

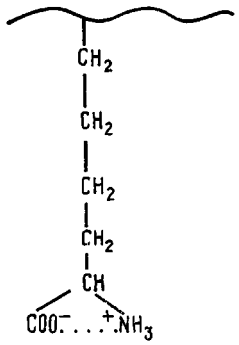
собой типичные гидрогели, обладающие высокой степенью набухания в воде и физиологических растворах, причем равновесная степень набухания *Sr* зависит как от природы используемого производного лизина и его количества в сшитом сополимере, так и от pH среды.

На рис. 3 приведены зависимости величин *Sr* от pH для гелей, содержащих различное количество иммобилизованных АЛ (рис. 3, *а*) и ЭЛ (рис. 3, *б*). Как видно, в обоих случаях равновесная степень набухания гелей изменяются с ростом количества введенного в гель лиганда, однако в области pH=3—9 характер pH-зависимости для АЛ и ЭЛ различен: в первом случае кривые имеют максимум, локализующийся в области pH=7,0—7,5, во втором наблюдается монотонное незначительное падение величины *Sr* с повышением pH. Рост величины *Sr* с увеличением количества ПЛ или ЭЛ в геле является вполне закономерным и определяется

возрастанием количества введенного в гель ионогенного сомономера [13]. Характер pH зависимостей можно объяснить, учитывая, что АЛ и ЭЛ являются амфолитами; в силу этого набухаемость гелей с данными иммобилизованными аминокислотами должна возрастать при значениях pH, близких как к pK α-аминогруппы АЛ, равных 8,9, так и к pK группы COOH, составляющих 2,2. Наблюдаемая максимальная степень набухания гелей с АЛ реализуется в нейтральной среде, что может быть связано с образованием цвиттер-ионных структур, способствующих более полному разворачиванию участков ПАА-цепей между узлами сетки геля при нейтральных pH. Схематически такой тип цвиттер-ионной структуры можно представить следующим образом:



Для гелей с иммобилизованным ЭЛ вид цвиттер-ионной структуры выглядит несколько иначе



Ионогенные группы в данном случае более удалены от основной цепи ПАА, менее чувствительны к изменению pH и, как следствие этого, меньше влияют на набухаемость гидрогелей. Таким образом, сополимеры акриламида с АЛ и ЭЛ являются высоконабухающими в области физиологических значений pH гидрогелями, обладают высокой проницаемостью по высокомолекулярным соединениям (значения коэффициента диффузии декстрана с $M=7{,}0\cdot10^4$ в этих гидрогелях составляют $7{,}11\cdot10^{-11}$ и $6{,}95\cdot10^{-12}$ м^2/с соответственно) и хорошими механическими свойствами (модули упругости гелей равны $1{,}3\cdot10^4$ и $1{,}5\cdot10^4$ Н/м^2), что при наличии сорбционной активности позволяет рассматривать их как гидрогелевые сорбенты.

Отметим, что для гелей с ПЛ наблюдается линейная зависимость Sr от количества введенного полипептида и резкое изменение этого параметра при варьировании pH (рис. 4). Это связано с протеканием кооперативного конформационного перехода поли-*L*-лизина при pH=10 [14]. Тем не менее при pH=7,4 указанные гидрогели также обладают всеми свойствами, необходимыми для гидрогелевых сорбентов.

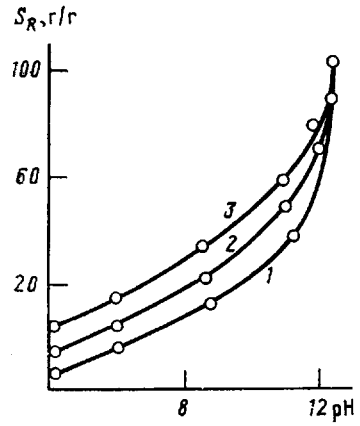


Рис. 4

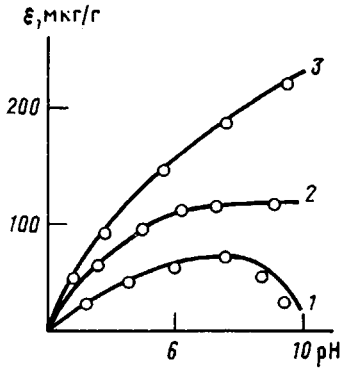
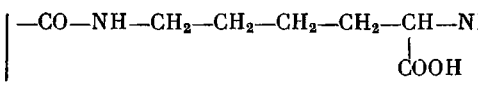


Рис. 5

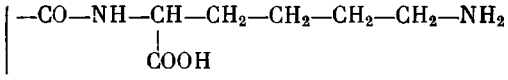
Рис. 4. Зависимость степени набухания гидрогелей, содержащих 0,1 (*1*); 0,5 (*2*) и 1,0 мас.% ПЛ (*3*) от pH при 36°. Содержание акриламида и БИС 10 и 0,5 мас.%

Рис. 5. Зависимость емкости гелей, содержащих 0,5 мас.% ЭЛ (*1*), АЛ (*2*) и ПЛ (*3*), по плазминогену при сорбции из модельных растворов белка от pH при 36°

Модельные исследования с раствором ПГ показывают, что все три геля (с АЛ, ЭЛ и ПЛ) сорбируют этот белок при физиологическом значении pH=7,4, причем характер сорбции и емкости гелей по ПГ различен. Так, из рис. 5 следует, что гели с ЭЛ обладают невысокой (порядка 40–45 мкг/г геля) емкостью по ПГ, гели с АЛ имеют значение емкости выше (до 100 мкг/г геля), а максимальные значения емкости (150–180 мкг/г геля) реализуются для гелей с ПЛ. При этом увеличение емкости гелей с АЛ по отношению к гелям с ЭЛ связано с изменением химического строения белоксвязывающего участка лиганда. Для ЭЛ этот участок имеет вид



тогда как для АЛ его можно представить следующим образом:



Поскольку комплексообразование ПГ с остатками лизина происходит для основных аминокислот с участием главным образом остатков алифатических аминов [15], то удаление группы COOH от связывающего центра повышает емкость геля по белку. В то же время наблюдаемые экстремальные зависимости емкости гелей по белку для гелей с АЛ и ЭЛ определяются единичным характером распределения звеньев аминокислоты в гелях, оцененным из значений констант сополимеризации по известной методике [2], а монотонная зависимость емкости от количества остатков лизина в ПЛ-содержащих гелях в рамках этого подхода объяснена быть не может. Можно полагать, что для гелей с ПЛ характер распределения остатков полипептида в сополимере не принципиален, поскольку связывание белка с гелем в данном случае происходит за счет комплексообразования остатков *L*-лизина с циклическими участками макромолекулы ПГ, имеющими одинаковые последовательности аминокислот («крин-

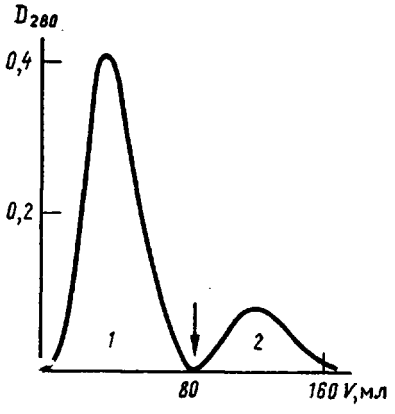


Рис. 6

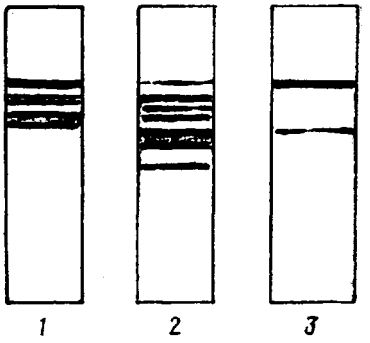


Рис. 7

Рис. 6. Кривая элюции плазмы крови человека на колонке размерами 1×10 см, заполненной сорбентом, содержащим 0,5 мас.% ПЛ, физиологическим раствором (*1*) и 0,1 м. раствором ε-аминокапроновой кислоты (*2*). Стрелкой показан момент смены элюента

Рис. 7. Электрофореграммы образцов плазминогена фирмы «Serva» (*1*), полученного методом осаждения (*2*) и выделенного на ПЛ-содержащем сорбенте (*3*)

глами») [16], расположение которых стерически комплементарно с расположением остатков *L*-лизина на полипептидной цепи поли-*L*-лизина, имеющего конформацию β-формы при pH=7,4 [15]. Поэтому для гелей с ПЛ рост емкости с увеличением концентрации полипептида в геле определяется только количеством последнего. Приведенные результаты показывают, что оптимальным сорбентом для выделения ПГ из плазмы крови могут быть гидрогели, содержащие ПЛ.

Выделение ПГ из плазмы крови, осуществленное динамическим методом (колоночная хроматография) на гелях с иммобилизованным ПЛ, показало (рис. 6), что этот сорбент действительно позволяет выделять этот белок непосредственно из плазмы крови; причем, как следует из приведенных на рис. 7 электрофореграмм, является высокоспецифическим сорбентом, позволяющим выделять наиболее активный конформер ПГ, имеющий Gly в качестве N-концевой аминокислоты (установлено карбоксипептидазным методом [7]) и легко активирующийся стрептокиназой в активный фермент — плазмин (табл. 2). Выделение этого конформера достигается использованием в качестве конкурентного элюента водного раствора *L*-лизина, в то время как рекомендуемый для смывания ПГ с лизинсодержащих сорбентов водный раствор уксусной кислоты [3] при-

Таблица 2

Емкостные и фибринолитические свойства плазминогена, выделенного из плазмы крови с помощью ПЛ-содержащего сорбента

Состав сорбента, мас.%			Емкость по плазминогену, мкг/г геля	Фибринолитическая активность, мкг тирозина/мин на 1 мл геля
акриламид	БИС	ПЛ		
98,8	0,9	0,3	150	65,7±3,5
92,6	7,3	0,1	166	68,7±3,7
90,8	8,8	0,4	175	116,0±13,5
82,8	16,8	0,4	180	20,5±12,0

Таблица 3

Количество и характеристика плазминогена, выделенного с помощью лизинсодержащих сорбентов

Лиганд	Количество в геле, мас.%	Емкость по белку, мкг/г геля	Фибринолитическая активность, мкг тирозина/мин на 1 мл геля
АЛ	0,05	87,5	74,6±2,7
	0,30	97,5	86,7±6,7
ЭЛ	0,05	39,7	28,7±12,0
	0,30	45,0	37,6±30,0
ПЛ	0,05	160,0	132,7±31,1
	0,30	180,0	167,3±46,0

водит к полной потере растворимости белка после лиофилизации и потере стабильности при хранении. Из представленных в табл. 3 данных видно, что из всех трех сорбентов гели с ПЛ позволяют получить максимальное количество белка с наибольшей активностью.

Таким образом, лизинсодержащие гидрогели представляют собой активные сорбенты ПГ, структурные и сорбционные свойства которых определяются природой и количеством иммобилизуемого производного *L*-лизина и условиями выделения белка. При этом если для АЛ- и ЭЛ-содержащих гелей сорбционные характеристики определяются характером распределения остатков лизина в гелях, то для гелей с макромолекулярным лигандом (ПЛ) основным является его количество и конформационное состояние.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Туркова Я.* Аффинная хроматография. М., 1980. С. 145.
2. *Plate N. A., Valuev L. I., Chupov V. V.* // Pure and Appl. Chem. 1984. V. 56. № 10. P. 1351.
3. *Deutsch D. C., Mertz E. T.* // Science. 1970. V. 170. P. 1095.
4. *Morawetz H., Sammak W.* // J. Phys. Chem. 1957. V. 61. P. 1375.
5. *Платэ Н. А.. Валуев Л. И., Егоров Н. С., Аль-Нури М. А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1977. Т. 13. С. 673.
6. *Yee-Ysing J., Jang J. T.* // Biochemistry. 1972. V. 11. P. 4120.
7. *Дэвени Т., Гергей Я.* Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1976. 175 с.
8. *Christensen U., Mullert S.* // Biochem. Biophys. Acta. 1977. V. 480. P. 275.
9. *Christensen U.* // Biochem. Biophys. Acta. 1977. V. 481. P. 638.
10. *Ужинова Л. Д., Грачева Н. А., Платэ Н. А.* // Биоорган. химия. 1979. Т. 6. С. 1171.
11. *Baselga J., Liorente M. A., Nieto J. L., Hernandes-Fuentes J., Pierola I. F.* // Europ. Polymer J. 1988. V. 24. P. 161.
12. *Платэ Н. А., Малых А. В., Ужинова Л. Д., Панов В. А., Розенфельд М. А.* // Высокомолек. соед. А. 1989. Т. 31. № 1. С. 198.
13 *Стародубцев С. Г., Бойко О. К., Павлова Н. Р., Рябина В. Р.* // Высокомолек. соед. А. 1981. Т. 23. № 4. С. 830.
14. *Davidson B., Tooney N., Fasman G. D.* // Biophys. Biochem. Res. Commun. 1966. V. 23. P. 156.
15. *Hatton M. W. C., Regoeczi E.* // Biochem. Biophys. Acta. 1957. V. 379. P. 504.
16. *Lerch P. G., Rickli E. F.* // Biochem. Biophys. Acta. 1980. V. 625. P. 379.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Белорусский научно-исследовательский институт
гематологии и переливания крови,
Минск

Поступила в редакцию
29.07.91

V. V. Chupov, V. V. Nikolaichik, S. V. Gavrilyuk,
G. N. Bychko, N. A. Platé

L-LYSIN- AND POLY-*L*-LYSIN-CONTAINING POLYMER HYDROGEL SORBENTS

Summary

Low-molecular unsaturated derivatives of *L*-lysin with different localization of the C=C bond on α (AL) or ε (EL) amine groups and poly-*L*-lysin macromonomershaving various amounts of double bonds (PL) have been synthesized. The behavior of such compounds in radical copolymerization with acrylamide or with the same monomer in the presence of a crosslinking agent and properties of the formed products have been studied. All crosslinked copolymers are shown to be high-specific sorbents of plasminogen with capacity towards protein increasing in the EL, AL, PL range. The sorptional behavior of hydrogels is evaluated from the viewpoint of their structural features and influence of external conditions (pH of the medium). The main factors are shown to be the nature and amount of the immobilized ligand: for AL and EL the character of the units distribution in copolymer is important, while for PL its amount and conformational state plays the main role.