

УДК 541(49+64):532.73

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ РАСТВОРИМЫХ ИНТЕРПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ (обзор)

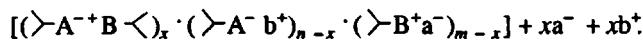
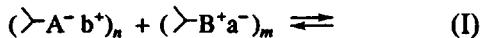
© 1994 г. В. А. Кабанов

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова  
119899 Москва, Ленинские горы*

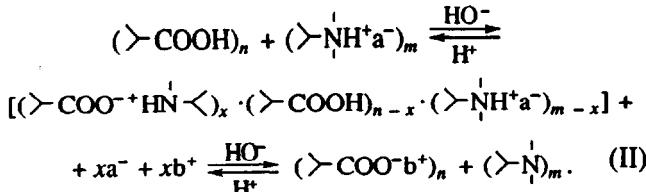
Поступила в редакцию 05.10.93 г.

Интерполиэлектролитные комплексы (ИПЭК) образуются в результате кооперативных реакций соединения противоположно заряженных полионов. Растворимые нестехиометрические ИПЭК, образованные полионами, различающимися степенью полимеризации (контурной длиной), в разбавленных растворах могут рассматриваться как своеобразные амфи菲尔ные блок-сополимеры. В обзоре рассмотрены важнейшие свойства растворимых ИПЭК, в частности их способность участвовать в реакциях полионного обмена и замещения, влияние концентрации и природы низкомолекулярных противоионов, а также степени полимеризации взаимодействующих полионов на кинетику этих интерполиэлектролитных реакций и положение равновесия. Описанные свойства и явления диспропорционирования, происходящие при изменении pH и ионной силы, могут быть использованы для конструирования систем фермент/ИПЭК, каталитическая активность которых регулируется с помощью интерполиэлектролитных реакций, для создания высокоэффективных псевдогомогенных иммунодиагностических систем, "мягких" антагонистов гепарина и других перспективных биомедицинских применений.

Интерполиэлектролитные комплексы (ИПЭК) составляют особый класс полимерных веществ [1 - 4], образующихся в результате соединения противоположно заряженных полиэлектролитов или матричной полимеризации ионизирующихся мономеров на противоположно заряженных полионах. Простейший способ получения ИПЭК – смешение водных растворов, один из которых содержит полианионный, а другой – поликатионный компонент



Степень превращения  $\theta$ , т.е. степень завершенности реакции (I), определяется как отношение текущего или равновесного числа солевых связей между полионами к их максимально возможному расчетному числу ( $\theta = x/m$ , когда  $n \geq m$ , и  $\theta = x/n$ , когда  $n < m$ ). Если один из взаимодействующих полиэлектролитов – слабая поликислота или слабое полиоснование, то  $\theta$  можно легко контролировать путем изменения pH



Поэтому в таких случаях ИПЭК могут быть получены в равновесных условиях путем постепенного подкисления (подщелачивания) реакционной системы, а текущее значение  $\theta$  с хорошим

приближением вычисляется из данных потенциометрического титрования по уравнениям [2]

$$\theta = (m_b/V + [H^+] - \sqrt{K_a c_0}/c_0) \quad (1)$$

(случай слабой поликислоты),

$$\theta = (m_a/V + [OH^-] - \sqrt{K_b c_0}/c_0) \quad (2)$$

(случай слабого полиоснования),

где  $m_a$  или  $m_b$  – количество молей добавленной кислоты или основания,  $V$  – текущий объем реакционной смеси,  $K_a$  и  $K_b$  – характеристические константы диссоциации поликислоты или полиоснования,  $c_0$  – концентрация одного из полиэлектролитов.

На рис. 1 сплошными линиями показаны типичные зависимости  $\theta$  от pH, которые рассчитываются из экспериментальных кривых титрования слабого полиэлектролита в присутствии противоположно заряженного полиона; pH – зависимости степени ионизации  $\alpha$  тех же индивидуальных полиэлектролитов представлены штриховыми линиями. Величина  $\Delta pH(\theta, \alpha)$  служит мерой свободной энергии стабилизации ИПЭК  $\Delta G_{cs}$ , обусловленной кооперативным взаимодействием тех противоположно заряженных групп, которые образуют межцепные солевые связи в ИПЭК при данном значении  $\theta$ :

$$\Delta pH(\theta, \alpha) = [\Delta G(\alpha) - \Delta G''(\theta)]/2.3RT = \Delta G_{cs}/RT. \quad (3)$$

Здесь  $\Delta G(\alpha)$  и  $\Delta G(\theta)$  – свободные энергии ионизации слабого полиэлектролита в отсутствие и в присутствии противоположно заряженного полиона при данном значении  $\alpha$  или  $\theta$  соответственно ( $\alpha = \theta$ ).

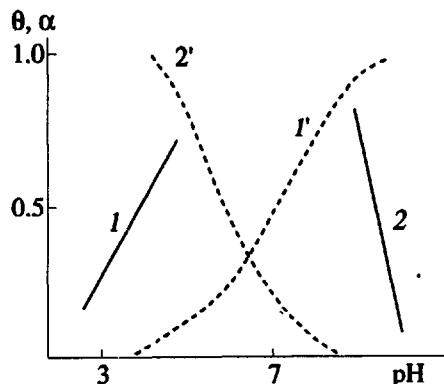


Рис. 1. Типичные зависимости степени превращения  $\theta$  в реакции соединения полионов от pH (1, 2) и  $\alpha$  от pH (1', 2'). 1 – полиакриловая кислота/гидрохлорид полидиметиламиноэтилметакрилата; 2 – полидиметиламиноэтилметакрилат/полиакрилат натрия. 1' и 2' – кривые потенциометрического титрования полиакриловой кислоты и полидиметиламиноэтилметакрилата;  $T = 20^\circ\text{C}$ .

Уравнение (3) записано в предположении, что каждая ионогенная группа титруемого полиэлектролитного компонента ИПЭК, заряжаясь, образует солевую связь с противоположно заряженным полионом. Такая ситуация близка к реальной, если отношение ионогенных групп исходных компонентов  $Z = m/n = 1$ , или при  $Z \neq 1$ , если общее число ионогенных групп титруемого слабого полиэлектролита меньше, чем общее число звеньев присутствующего в системе противоположно заряженного и полностью ионизованного полиона.

Если ИПЭК образуется путем полимеризации заряженного мономера на противоположно заряженном полионе, который в таком случае выполняет функцию матрицы [5], то общее изменение свободной энергии  $\Delta G_{ip}$  можно разбить на две составляющие

$$\Delta G_{ip} = \Delta G_p + \Delta G_{cs},$$

где  $\Delta G_p$  – свободная энергия полимеризации в отсутствие матрицы.  $\Delta G_{cs}$  служит термодинамическим фактором, способствующим превращению мономера в полимер. Этот фактор может иметь решающее значение в условиях, при которых полимеризация свободного мономера термодинамически запрещена, т.е. если  $\Delta G_p > 0$ , но  $\Delta G_{cs} < 0$  и  $|\Delta G_{cs}| > |\Delta G_p|$ , а следовательно  $\Delta G_{ip} < 0$ . Иными словами, полион как один из потенциальных компонентов ИПЭК способен сдвинуть полимеризационно-деполимеризационное равновесие в сторону сборки другого противоположно заряженного полиона – второго потенциального компонента ИПЭК. В принципе тот же фактор (т.е.  $\Delta G_{cs}$ ) ответствен за кластеризацию белковых глобул противоположно заряженными полионами с образованием полиэлектролит-белковых комплексов [6 - 8]. Он же обуславливает “прину-

дительное” мицелообразование в растворах полиэлектролитов и в полиэлектролитных гелях при добавлении в систему противоположно заряженных ионов ПАВ. В результате образуются полимер-коллоидные комплексы при концентрациях ПАВ, значительно меньших их характеристических ККМ [9 - 15]. Фактически эти процессы можно рассматривать как “полимеризацию” белковых глобул или ионов ПАВ на полимерных матрицах.

Способность ИПЭК растворяться либо ограничено набухать в воде определяется соотношением ионогенных групп  $Z$  и относительной длиной противоположно заряженных полионов, а также составом водной фазы (природой и концентрацией простых солей, величиной pH, присутствием и концентрацией органических добавок и т.п.).

Если  $Z = 1$ , то при доведении  $\theta$  до значения, близкого к единице, в системе образуются стехиометрические ИПЭК, продукты завершенной интерполиэлектролитной реакции. Такие ИПЭК всегда нерастворимы, но ограниченно набухают в воде. Нерастворимые ИПЭК известны уже многие годы, и поиски путей их практического применения ведутся по крайней мере с начала 60-х гг. В этой области достигнуты определенные успехи. Оказалось, например, что нерастворимые ИПЭК могут служить в качестве уникальных по эффективности связующих для почв и грунтов с целью предотвращения их ветровой и водной эрозии<sup>1</sup>. Благодаря этому нерастворимые ИПЭК нашли масштабные практические применения, в частности при ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС. В промышленном масштабе показана значительно более высокая по сравнению с индивидуальными полиэлектролитами эффективность нерастворимых ИПЭК как коагулянтов коллоидных дисперсий, в частности шлаковых отходов металлургических производств<sup>1</sup>. Нерастворимые ИПЭК перспективны в качестве биосовместимых покрытий для гемосорбентов и других изделий медицинского назначения, использующихся в контакте с кровью и биологическими жидкостями<sup>2</sup>. Просматривается и ряд других многообещающих перспектив.

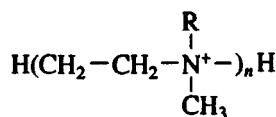
Водорастворимые ИПЭК могут быть получены из большинства пар противоположно заряженных полиэлектролитов, но при соблюдении определенных условий [2, 4, 16-18]. Например, если  $Z = 1$ , то растворимость может быть достигнута лишь при  $\theta < 1$ , т.е. для продуктов незавершенной реакции (I) [16]. При этом свободные звенья исходных полиэлектролитов, не вступившие в межцепные солевые связи, выполняют функцию

<sup>1</sup> См., например: Кабанов В.А. и др. // Успехи химии. 1991. Т. 160. № 3. С. 595.

<sup>2</sup> См., например: Зезин А.Б. и др. // Хим.-фармацевт. журн. 1987. № 7. С. 788.

лиофилизирующих (гидрофильных) фрагментов, способствуя удержанию частиц ИПЭК в растворе. При  $\theta \approx 1$  ИПЭК растворимы в воде, если молярное отношение звеньев блокирующего полиэлектролита (БПЭ) и лиофилизирующего полиэлектролита (ЛПЭ),  $\phi = [\text{БПЭ}]/[\text{ЛПЭ}] < \phi_c < 1$  (при равномерном распределении цепей БПЭ между цепями ЛПЭ  $\phi = Z$ ). Частицы таких нестехиометрических ИПЭК можно рассматривать как своеобразные блок-сополимеры, содержащие гидрофильные одноцепные сегменты ЛПЭ и относительно гидрофобные двухцепные БПЭ/ЛПЭ-домены [2, 4]. Критическое значение  $\phi_c$  определяет предельную степень заселенности ЛПЭ цепями БПЭ, выше которой гидрофильность избыточных однотяжных сегментов уже недостаточна для удержания частицы ИПЭК в растворе. Для большинства исследованных систем значения  $\phi_c$  лежат в интервале 0.5 - 0.2 и в основном зависят от химического строения полиэлектролитных компонентов. Установление факта существования растворимых ИПЭК [17] и условий их образования, справедливых для широкого круга пар противоположно заряженных полиэлектролитов [2, 4, 16, 18], означало серьезный прорыв в этой области. Оно позволило вывести исследования на качественно новый уровень благодаря открывшейся возможности привлечь арсенал современных методов изучения свойств, характеристик и поведения макромолекул в растворах. Фундаментальная информация, полученная этими методами, способствовала более глубокому пониманию структурной организации и особенностей поведения ИПЭК не только в растворе, но и в концентрированной фазе. Вместе с тем перед исследователями открылся совершенно новый спектр перспективных применений, специфичных именно для семейства растворимых ИПЭК и касающихся в первую очередь биомиметики, биотехнологии и медицины. Некоторые из них будут рассмотрены в этом аналитическом обзоре.

Кооперативный характер многоточечных связей между полионами придает ИПЭК очень высокую стабильность по отношению к диссоциации на исходные полиэлектролитные компоненты в интервале pH, ограниченном потенциометрическими кривыми 1 и 2 (рис. 1). Эффективная константа диссоциации при  $\theta$ , близком к единице, резко уменьшается с ростом длины БПЭ и уже для относительно коротких олигомеров практически обращается в нуль. Так, в случае кватернизованных олигоэтилениминов

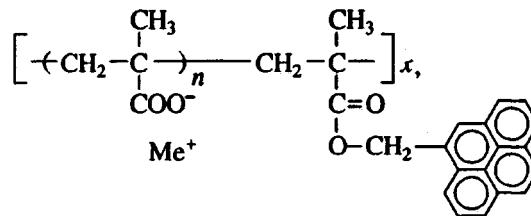


( $\text{R} = -\text{CH}_3$  или  $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ ),

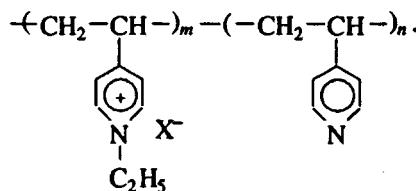
взаимодействующих с полиметакрилатанионами (ПМА), степень диссоциации ИПЭК становится

пренебрежимо малой, начиная примерно с октамера и выше [3, 19]. Аналогичные результаты были получены для ряда олигофосфатов, взаимодействующих с полидиметиламиноэтилметакрилатом [20] и олиго-2,5-ионенов, взаимодействующих с полиакрилатанионами [21]. Поэтому можно считать, что после достижения некоторой "критической" длины полионов образованные ими ИПЭК практически не диссоциируют на исходные полионные компоненты.

Одним из наиболее информативных методов изучения процессов образования и превращений растворимых ИПЭК оказался метод тушения люминесценции. Большинство измерений [22 - 29] проведены с использованием люминесцентно-меченых полиметакрилатанионов (ПМА\*) [30], содержащих одну антриальную или пиренильную метку на 350 - 1500 мономерных звеньев



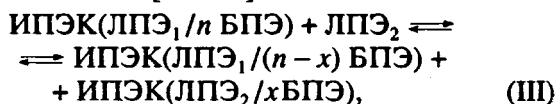
где  $n = 350 - 1500$ , и поликатионов сополимера 1-этил-4-винилпиридиния (ЭВП) с винилпиридином (ПВПК)



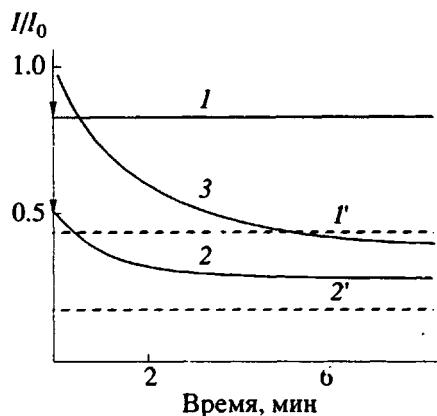
Звенья ЭВП, как известно, тушат флуоресценцию антрильных и пиренильных групп. ПВПК получали путем кватернизации фракций поли-4-винилпиридинина (ПВП) этилбромидом [31]. Содержание ЭВП-звеньев задавали степенью кватернизации,  $\beta$  (%):  $\beta = [m/(m+n)]100$ .

Процессы образования ИПЭК, описываемые схемами I и II, в терминах традиционной классификации представляют собой соответственно ионные реакции обмена и нейтрализации. Однако при рассмотрении с позиций взаимодействия между полимерными цепями их можно определить как **реакции соединения полионов**.

Одно из важнейших свойств ИПЭК заключается в их способности участвовать в реакциях переноса полионов [22 - 25]



где  $n$  или  $x$  – число цепей БПЭ в частице ИПЭК. Если ЛПЭ<sub>1</sub> и ЛПЭ<sub>2</sub> представляют собой идентичные полионы, то процесс III в плане взаимоотношений ИПЭК–полион можно определить как



**Рис. 2.** Типичные кинетические кривые реакций полионного соединения и обмена. 1 – ПМА\*Na ( $\bar{P}_w = 4.4 \times 10^3$ , 1 метка на 600 звеньев) + ПВПК ( $\bar{P}_w = 2.0 \times 10^2$ ,  $\beta = 95\%$ ) в отсутствие низкомолекулярной соли; [ПМА\*Na] =  $8.6 \times 10^{-8}$  моль/л (в расчете на полион),  $Z = [\text{ПВПК}]/[\text{ПМА*Na}] = 0.2$ ; 2 – та же реакция, но в присутствии [NaCl] = 0.03 моль/л; 3 – ИПЭК (ПМА/ПВПК) + ПМА\*Na, [ПМА\*Na] = [ИПЭК] =  $8.6 \times 10^{-8}$  моль/л,  $P_w$  (ПМА) =  $4.4 \times 10^3$ ,  $\phi = 0.2$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ , pH 10,  $\theta \rightarrow 1$ .  $I'$  – равновесный предел для кривой 1, а 2' – для кривой 2.

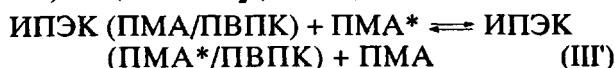
реакцию полионного обмена. Если ЛПЭ<sub>1</sub> и ЛПЭ<sub>2</sub> различаются по химическому строению или составу, то процесс III можно определить как реакцию полионного замещения. Процесс переноса цепей БПЭ может происходить и внутри отдельных частиц ИПЭК с вовлечением в него различных сегментов ЛПЭ, что фактически эквивалентно миграции БПЭ в клубке ЛПЭ. Возможность такой миграции придает частицам ИПЭК дополнительный уникальный ресурс для внутренних перестроек и адаптации в поисках термодинамического оптимума взаимодействия с окружающей средой. Реакции переноса полионов в системах ИПЭК служат основой уже осуществленных и многих перспективных практических применений ИПЭК.

В качестве типичного примера была изучена реакция соединения полианионов ПМА\*Na, меченных пиренильными группами, и поликатионов фракции ПВПК [26, 28]. Образование ИПЭК (ПМА\*/ПВПК) приводит к уменьшению относительной интенсивности флуоресценции  $I/I_0$  пиренильных меток в цепях ПМА\*, которую тушат связывающиеся с ними звенья ПВПК ( $I_0$  – интенсивность флуоресценции раствора исходного ПМА\* при заданной ионной силе). Реакционную смесь готовили путем быстрого введения 0.02 мл водного раствора ПВПК в ячейку, содержащую 1.5 мл ПМА\*Na при непрерывном перемешивании так, что время гомогенизации не превышало 2 - 4 с.  $I/I_0$  измеряли с помощью спектрофлуориметра

при  $\lambda_{ex} = 342$  нм,  $\lambda_{reg} = 395$  нм. Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что смешение растворов реагентов в присутствии низкомолекулярной соли сопровождается скачкообразным падением  $I/I_0$  до постоянного значения, соответствующего некоторому количеству быстро образовавшихся контактов между ПМА\* и ПВПК (прямая 1). Однако наблюдаемое падение гораздо меньше, чем следует ожидать в случае образования равновесной системы, содержащей ИПЭК (ПМА\*/ПВПК) соответствующего состава  $\phi = 0.2$  (прямая  $I'$ ). Смешение растворов тех же реагентов в 0.03 М растворе NaCl приводит к гораздо большему падению величины  $I/I_0$ , которое затем сопровождается ее постепенным понижением и приближением к равновесному уровню (ср. кривую 2 и прямую 2').

Измерения, проведенные методом остановленной струи ("stopped-flow"), показали, что быстрая стадия реакции соединения полионов, соответствующая скачкообразному падению  $I/I_0$ , на самом деле заканчивается за время, меньшее 5 мс (постоянная времени прибора), т.е. нижний предел константы скорости бимолекулярной реакции между полионами  $k_D$  составляет величину порядка  $10^9$  л/(моль с), т.е. близок к оценочной величине константы скорости диффузионных столкновений макромолекулярных клубков [26, 28]. В результате таких столкновений между противоположно заряженными полионами возникают случайные ионные связи. При этом образуются полианион/поликатионные ассоциаты, которые при ионных силах, близких к нулю, остаются "замороженными" в неравновесном состоянии (рис. 2, прямая 1). Однако в присутствии низкомолекулярной соли "замораживание" не происходит: внутримолекулярные и межмолекулярные перегруппировки взаимодействующих полионов оказываются разрешены. В результате этих перегруппировок число солевых связей между полионами возрастает, и первичные ассоциаты постепенно превращаются в равновесные частицы ИПЭК (ПМА\*/ПВПК) (рис. 2, кривая 2). По всей вероятности, указанные перегруппировки происходят путем реакции полионного обмена с участием сегментов противоположно заряженных цепей. "Чистый" случай такого обмена представлен на рис. 2 кинетической кривой 3. Пиренильные метки в цепях ПМА\* дополнительно стабилизируют ИПЭК (ПМА\*/ПВПК) по сравнению с ИПЭК (ПМА/ПВПК). Поэтому полионы ПМА\* полностью замещают полионы ПМА в ИПЭК (ПМА/ПВПК). Таким образом, качественно кинетическую кривую 2 можно рассматривать как наложение кинетических кривых 1 и 3. Иными словами, присутствие в цепи ПМА\* одной пиренильной метки на несколько сотен звеньев оказывается достаточным для того, чтобы цепь ПВПК ее "узнала" и предпочла немеченой цепи ПМА.

Для растворимых ИПЭК показано [27, 28], что если процесс полионного обмена состоит в переносе одной цепи БПЭ (ПВПК) с цепи ЛПЭ<sub>1</sub> (ПМА) на цепь ЛПЭ<sub>2</sub> (ПМА\*),

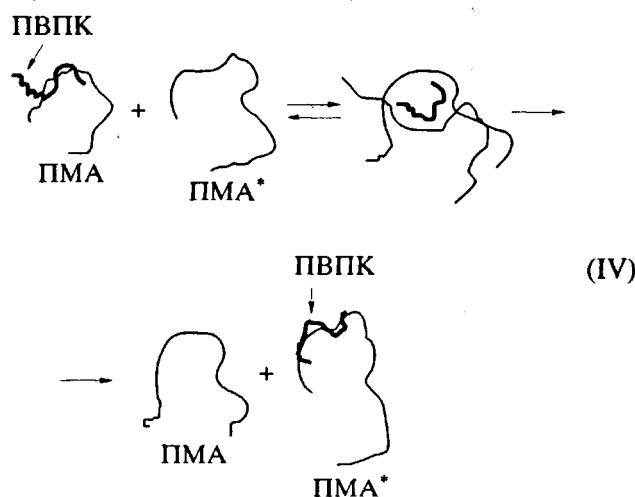


(схема III при  $n = 1$ ), то реакция имеет второй кинетический порядок по концентрациям макромолекулярных реагентов (ИПЭК и ПМА\*). Соответственно экспериментальные кинетические кривые спрямляются в координатах уравнения

$$q/(1 - q) = k_2[\text{ПМА}^*]_0 t, \quad (4)$$

где  $q$  – степень превращения,  $[\text{ПМА}]_0 = [\text{ПМА}^*]_0 = [\text{НПЭК}]_0$  – начальная концентрация реагирующих частиц в растворе. Это дает возможность количественно определять абсолютную константу скорости  $k_2$  переноса БПЭ с одной цепи ЛПЭ на другую. Соответствующие экспериментальные данные приведены в табл. 1.

Из табл. 1 следует, что в соответствии с уравнением (4) величина  $k_2$  на самом деле не зависит от концентрации реагирующих макромолекул (опыты 1 - 3, 6). Существенно также, что  $k_2$  не зависит от длины ЛПЭ (ПМА) (опыты 8, 9) и резко уменьшается с ростом длины БПЭ (ПВПК) (опыты 10 - 13). В условиях эксперимента значение  $k_2$  оказываются порядка  $10^4 - 10^6 \text{ л/(моль с)}$ , что на 3 - 5 порядков ниже, чем оцененные значения константы скорости диффузионных столкновений реагирующих макромолекулярных частиц. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что процесс протекает через образование короткоживущего промежуточного продукта – тройного комплекса (ПМА...ПВПК...ПМА\*), возникающего в результате взаимопроникновения клубков ИПЭК (ПМА/ПВПК) и ПМА\*Na при их случайных столкновениях в растворе. Этот комплекс играет роль своеобразного “переходного состояния” в бимакромолекулярной реакции полионного обмена, как показано ниже



В условиях упомянутых выше экспериментов далеко не каждое столкновение оказывается про-

Таблица 1. Константы скорости реакции полионного обмена между различными ИПЭК (ПМА/ПВПК) и ПМА\*Na (pH 10,  $\theta \rightarrow 1$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ )

Опыт, №	$[\text{ПМА}^*] \times 10^3, \text{ моль/л}$	$\bar{P}_w \times 10^{-3}$		$\beta, \%$	$[\text{NaCl}], \text{ моль/л}$	$k_2 \times 10^5, \text{ л/(моль с)}$
		ПВПК	ПМА			
1	3	0.6	3.9	95	0.08	5.1
2	7	0.6	3.9	95	0.08	5.0
3	15	0.6	3.9	95	0.08	4.7
4	40	0.6	3.9	95	0.06	1.2
5	40	0.6	3.9	95	0.07	2.6
6	40	0.6	3.9	95	0.08	5.1
7	40	0.6	3.9	95	0.09	8.7
8	33	0.1	4.4	95	0.04	2.0
9	33	0.1	1.0	95	0.04	2.0
10	28	0.6	4.4	95	0.07	1.5
11	28	0.32	4.4	95	0.07	6.0
12	28	0.2	4.4	95	0.07	11.0
13	28	0.1	4.4	95	0.07	23.0
14	23	0.2	2.8	89	0.035	0.2
15	23	0.2	2.8	80	0.035	0.7
16	23	0.2	2.8	69	0.035	2.6
17	23	0.2	2.8	62	0.035	16.2
18	23	0.2	2.8	55	0.035	36.1

Примечание. Значения  $[\text{ПМА}^*]_0 = [\text{ПМА}]_0$  приведены в расчете на полион;  $\bar{P}_w(\text{ПМА}) = \bar{P}_w(\text{ПМА}^*)$ , ПМА\* содержит 1 пириенильную метку на 350 звеньев.

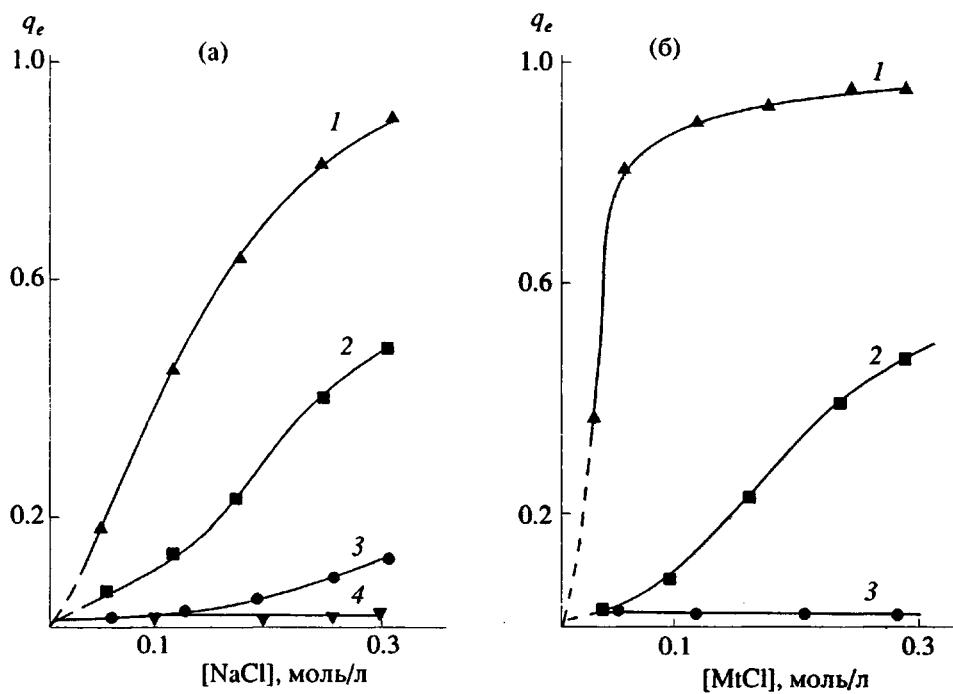
дуктивным. На один акт переноса ПВПК с ПМА на ПМА\* требуется в среднем порядка  $10^3 - 10^5$  столкновений. Сильная зависимость  $k_2$  от ионной силы (опыты 4 - 7) и линейной плотности заряда на цепях ПВПК (опыты 14 - 18) согласуется с предложенным механизмом реакции.

Реакции полионного обмена, в которых участвуют частицы ИПЭК, несущие более одной цепи БПЭ, описываются более сложной полихронной кинетикой. Однако они характеризуются качественно сходными закономерностями [24]. Так, например, их скорость существенно зависит от концентрации низкомолекулярных солей в реакционном растворе, что можно проиллюстрировать следующими данными:

$[\text{NaCl}] \times 10^3, \text{ моль/л}$  0 35 70 100

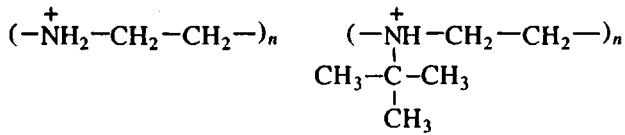
Время полупревращения, с 240 6 <1.5

$(P_w(\text{ПМА}^*\text{Na}) = P_w(\text{ПМА-Na}) = 3 \times 10^3, P_w(\text{ПВПК}) = 2 \times 10^2, [\text{ПМА}^*\text{Na}] = [\text{ПМА-Na}] = [\text{ИПЭК}] = 4 \times 10^{-3} \text{ осново-моль, } \phi = 0.33, \text{ pH } 10, T = 20^\circ\text{C}.$



**Рис. 3.** Зависимость равновесной степени превращения в реакции полионного замещения между ИПЭК (ПМА\*/ПВПК) и ПФ от концентрации NaCl (а) и других хлоридов (б).  $[ПМА^*] = [ПФ] = 1.5 \times 10^{-3}$  моль/л (в расчете на звено полимера),  $\phi = [ПВПК]/[ПМА^*] = 0.33$ , pH 10,  $T = 25^\circ\text{C}$ . а:  $\bar{P}$  (ПФ) = 230 (1), 70 (2), 50 (3), 20 (4); б:  $\bar{P}$  (ПФ) = 70; 1 – LiCl, 2 – NaCl, 3 – KCl.

Наряду с этим следует отметить, что реакции обмена и замещения полионов в ИПЭК могут быть полностью заторможены даже в присутствии низкомолекулярных солей, если электростатическое взаимодействие между противоположно заряженными макромолекулами существенно модулировано взаимодействием иного рода, например гидрофобным. Ярким примером служат результаты сравнения поведения двух ИПЭК – одного, образованного поликарлатанионом (или ПМА) и линейным полиэтиленимином (ПЭИ), другого – поликарлатанионом (или ПМА) и поли-*трет*-бутилазиридином (ПТБА) в водных растворах [32]. Оба поликатионных компонента



характеризуются одинаковой линейной плотностью заряда. Однако в отличие от цепей ПЭИ, которые охотно участвуют в реакциях переноса, цепи ПТБА при повышенных температурах ( $40 - 60^\circ\text{C}$ ) оказываются фиксированы в исходных частицах ИПЭК даже при относительно высокой ионной силе, вероятно, благодаря внут-

рикомплексному взаимодействию объемных гидрофобных групп.

Показано также, что в случае реакций полионного замещения не только кинетика, но и положение равновесия существенно зависит от строения и длины участвующих в образовании ИПЭК полионных партнеров, а также от природы и концентрации присутствующих в системе низкомолекулярных противоионов [20, 21, 25, 29, 33, 34]. В частности, поликатионы, содержащие сульфонатные или сульфатные группы (такие, как полиэтиленсульфат, полиэтиленсульфонат, полистиролсульфонат, гепарин), обычно замещают карбоксилатные полианионы, вытесняя их из их ИПЭК с различными поликатионами [21]. Скорость реакции полионного замещения между ИПЭК (ПМА\*/ПВПК) и поливинилсульфатом калия (ПВСК) сильнейшим образом зависит от концентрации низкомолекулярных солей в реакционном растворе:

$[NaCl] \times 10^3$ , моль/л	0	2	4	6	8	10
Время полупревращения, с	600	60	13	5	<1.5	не идет

$(P_w(\text{ПМА}^*\text{Na}) = 3 \times 10^3; P_w(\text{ПВСК}) = 1.3 \times 10^3; P_w(\text{ПВПК}) = 2 \times 10^2; [\text{ИПЭК}(\text{ПМА}^*/\text{ПВПК})] = 4 \times 10^{-3}$  осново-моль;  $\phi = 0.2$ ;  $[\text{ПВСК}] = [\text{ПВПК}]$ ; pH 10;  $T = 20^\circ\text{C}$ )

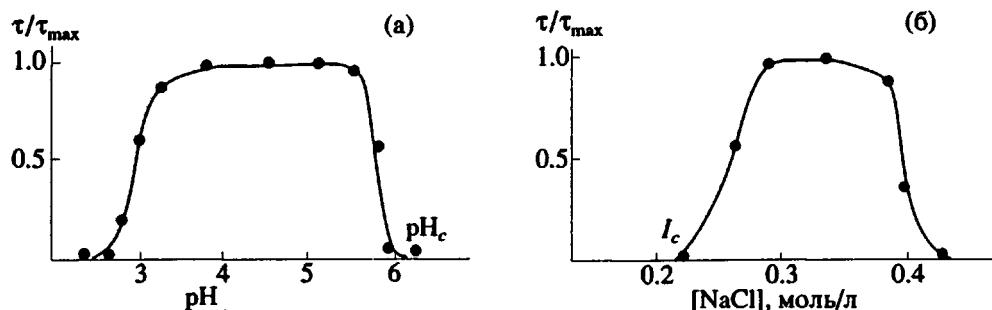
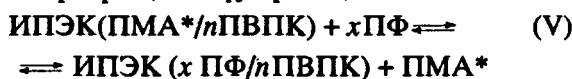


Рис. 4. Зависимость относительной мутности раствора ИПЭК (ПМА/ПВПК) от pH (а) и от концентрации NaCl (б).  $\bar{P}_w$ (ПМА) = 4100,  $\bar{P}_w$ (ПВПК) = 200, [ПВПК] =  $2 \times 10^{-3}$  моль/л (в расчете на звено полимера),  $\phi = [\text{ПВПК}]/[\text{ПМА}] = 0.33$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ . (Просветление раствора при  $\text{pH} < 2.5$  (а) и при  $[\text{NaCl}] > 0.4$  моль/л (б) вызвано диссоциацией ИПЭК на исходные полиэлектролитные компоненты). а –  $[\text{NaCl}] = 0.02$  моль/л; б –  $\text{pH} 7.5$ .

Влияние длины цепи конкурирующих полиэлектролитов и природы низкомолекулярных противоионов на направление реакций полионного замещения было обнаружено в работе [29]. На рис. 3 представлены зависимости равновесной степени превращения  $q_e$  в реакции



от концентрации низкомолекулярных солей в растворе (ПФ – полифосфаты различной степени полимеризации, ПМА\* – полиметакрилат-анионы, меченные антристильными группами). Поскольку в исследованном интервале ионной силы оба ИПЭК, участвующие в реакции V, практически не диссоциируют на исходные компоненты, превращение, описываемое схемой V, не изменяет суммарного числа неблокированных заряженных групп на цепях полианионов, а следовательно, и концентрацию противоионов в системе. При движении в направлениях, указанных стрелками, меняется лишь соотношение между числом карбоксильных и фосфатных групп, свободных от контакта с пиридиниевыми звеньями поликатиона. Поэтому сам факт чувствительности равновесия V к концентрации низкомолекулярной соли свидетельствует о неодинаковом влиянии концентрации низкомолекулярных катионов на кажущиеся константы их связывания с ПМА и ПФ.

Замечательно, однако, что ход кривых рис. 3 при прочих равных условиях различен в системах, отличающихся степенью полимеризации ПФ (рис. 3а) или природой низкомолекулярных катионов (рис. 3б). Эти различия приводят к качественно значимым эффектам. Так, в 0.3 М водном растворе NaCl равновесие V полностью сдвинуто вправо в случае самых длинных (230 звеньев) и влево – в случае самых коротких (20 звеньев) полифосфатных цепей (при фиксированной основомольной концентрации всех полимерных компонентов). Для полифосфатов промежуточных степеней полимеризации равновесная степень

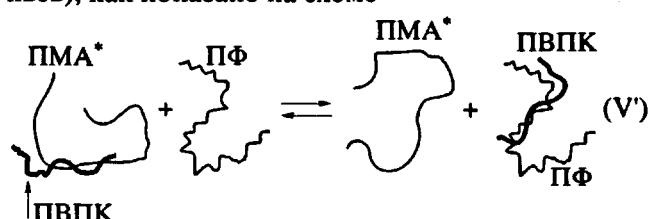
превращения в реакции V имеет промежуточные значения. При фиксированной длине цепей ПФ (70 звеньев) равновесие в реакции V полностью сдвинуто вправо в 0.3 М растворе LiCl и полностью сдвинуто влево в 0.3 М растворе KCl. В 0.3 М растворе NaCl система характеризуется промежуточными значениями  $q_e$ . Описанные явления не имеют аналогий в неполимерных системах и, вероятно, имеют сходство с важными регуляторными процессами в клетках, происходящими с участием природных полиэлектролитов. Недавно автор и сотр. [33, 34] наблюдали аналогичные явления для ИПЭК, включающих в качестве полианионов цепи ДНК.

Термодинамическое объяснение этим на первый взгляд поразительным эффектам было дано в работе [29]. Существо его сводится к следующему. Представим общее изменение свободной энергии  $\Delta G$ , в реакции V в виде суммы двух слагаемых

$$\Delta G_r = \Delta G_p + \Delta G_{ci}. \quad (5)$$

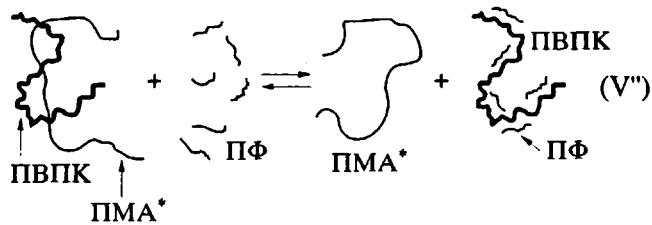
Здесь член  $\Delta G_p$  относится к замене контактного взаимодействия между ПВПК и ПМА\* на контактное взаимодействие между ПВПК и ПФ, а член  $\Delta G_{ci}$  представляет собой разность свободных энергий взаимодействия низкомолекулярных противоионов с сегментами ПМА\* и ПФ, участвующими в реакции замещения.

Рассмотрим вначале случай реакции V, когда длина обоих полианионов (4100 и 230 звеньев) больше, чем длина поликатиона ПВПК (170 звеньев), как показано на схеме



Тогда общее число полимерных частиц в системе не зависит от положения равновесия и при движении в направлениях, указанных стрелками, остается

постоянным. Как следует из упомянутых выше экспериментальных данных, равновесие, показанное на схеме V', в растворе NaCl сдвинуто вправо. Это означает, что общее изменение свободной энергии  $\Delta G'$ , в варианте V' реакции V отрицательно ( $\Delta G' = \Delta G'_p + \Delta G'_{ci} < 0$ ). Однако, как следует из тех же экспериментальных данных, уменьшение длины цепи ПФ приводит к сдвигу равновесия в противоположную сторону



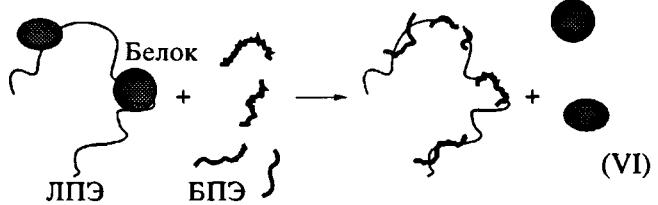
Это означает, что член  $\Delta G_p$  меняет знак. Иными словами, общее изменение свободной энергии в варианте реакции V" становится положительным ( $\Delta G'' = \Delta G''_p + \Delta G''_{ci} > 0$ ). Поскольку суммарное число электростатических контактов между противоположно заряженными полиэлектролитами остается неизменным (в условиях эксперимента величина  $\theta$  для обоих ИПЭК близка к единице),  $\Delta G_{ci}$  не зависит от длины участвующих в реакции цепей, т.е.  $\Delta G'_{ci} = \Delta G''_{ci}$ . Следовательно, наблюдаемый эффект надо отнести за счет возрастания  $\Delta G_p$ , т.е.  $\Delta G''_p > \Delta G'_p$ . В самом деле, из качественных соображений ясно, что переход слева направо в случае V" энтропийно менее выгоден, чем в случае V', поскольку первый в отличие от последнего приводит к уменьшению числа полимерных частиц в системе.

Теперь рассмотрим случай, когда длина участвующих в реакции полационов фиксирована, но варьируется природа противоионов щелочных металлов. Тогда член  $\Delta G_p$  остается постоянным, а изменение знака  $\Delta G$ , при замене  $\text{Li}^+$  на  $\text{K}^+$  вызвано изменением  $\Delta G_{ci}$ , которое обусловлено различиями в величинах свободных энергий взаимодействия между полационами и катионами ряда использованных хлоридов щелочных металлов. Понятно, что эти различия обусловлены вкладами специфических взаимодействий (донорно-акцепторного типа), которые накладываются на универсальное кулоновское притяжение противоположных зарядов. В самом деле, показано, что критическая концентрация солей, при которой ИПЭК (ПМА/ПВПК) диссоциирует на исходные полиэлектролитные компоненты, возрастает в ряду  $\text{LiCl} < \text{NaCl} < \text{KCl}$ , тогда как для ИПЭК (ПФ/ПВПК) этот ряд обращен [35].

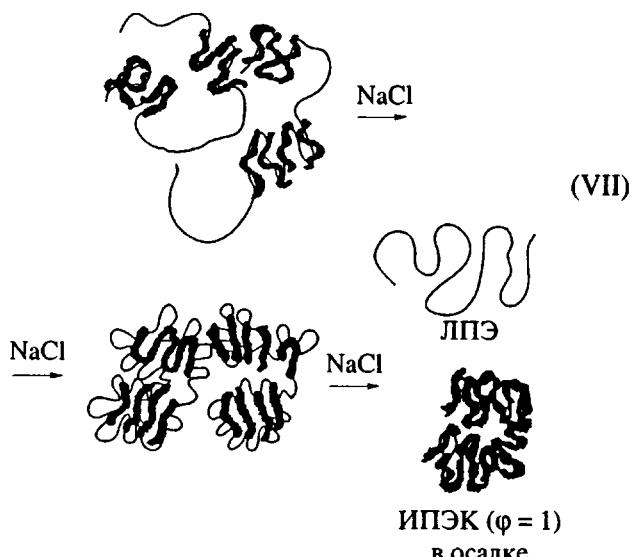
Таким образом, равновесием в реакциях полационного замещения типа V можно управлять путем замены одних низкомолекулярных противоионов на другие, а также путем изменения степени

полимеризации участвующих полиэлектролитных цепей.

Роль БПЭ в ИПЭК могут играть не только линейные полиэлектролиты, но и заряженные гибкие частицы, например молекулы белков [6, 7]. Существенно отметить, что линейные полиэлектролиты, характеризующиеся относительно высокой плотностью зарядов, обычно замещают белковые БПЭ, вытесняя их из исходных ИПЭК [7, 36]



Если частицы растворимых ИПЭК образованы с участием ЛПЭ, представляющих собой слабую поликислоту или слабое полиоснование, то их компактизацию, агрегацию и осаждение можно вызвать, подавляя ионизацию однотяжных блоков путем изменения pH [2, 4, 35]. Например, ИПЭК, образованные ПМА-На (ЛПЭ) и ПВПК (БПЭ), растворимы при  $\text{pH} > 6$ , но резко сегрегируются при меньших значениях (рис. 4а). Фазовое разделение в системе ИПЭК (ПМА/ПВПК)- $\text{H}_2\text{O}$  можно также вызвать путем добавления низкомолекулярной соли [2, 4, 37 - 39] (рис. 4б). И в этом случае фазовое разделение наступает очень резко. Последнее явление, механизм которого был детально изучен, иллюстрирует следующая схема:



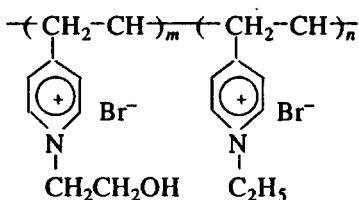
На первой стадии однотяжные блоки ЛПЭ "съеживаются" из-за экранирования их зарядов низкомолекулярными противоионами. На второй стадии при превышении определенного критического значения ионной силы  $I_c$  происходит диспропорционирование, т.е. перераспределение цепей БПЭ. В результате образуются компактные нерастворимые частицы стехиометрического ( $\phi = 1$ ) комплекса, которые количественно выпадают

в осадок, а в растворе остаются практически свободные цепи ЛПЭ. Диспропорционирование осуществляется по описанному выше механизму полимерного обмена.

Критические значения  $\text{pH}$  ( $\text{pH}_c$ , рис. 4а) и  $I_c$  (рис. 4б) зависят от состава исходного растворимого ИПЭК: чем выше  $\phi$ , тем ниже  $\text{pH}_c$  (если ЛПЭ – поликарбоксилат) и  $I_c$ . Однако зависимости, представленные на рис. 4, качественно сходны при всех  $\phi < \Phi_c$ . Существенно, что фазовое разделение, наблюдаемое при изменении  $\text{pH}$  и увеличении концентрации низкомолекулярной соли, полностью обратимо.

Описанные выше фундаментальные свойства ИПЭК могут быть использованы, например, для создания систем фермент/ИПЭК, катализическая активность которых поддается регулированию с помощью описанных выше интерполиэлектролитных реакций. Некоторые обнадеживающие результаты такого подхода недавно описаны в обзоре [40].

Предложенная стратегия состоит в присоединении молекулы фермента к цепочке БПЭ или ЛПЭ ковалентной связью и последующем включении полученного конъюгата в ИПЭК путем образования комплекса с подходящим ЛПЭ или БПЭ соответственно. Например, типичная процедура с использованием БПЭ на основе ПВП включает кватернизацию определенной доли звеньев ПВП 2-бромэтанолом, а оставшихся – этилбромидом [41]. В результате получают сополимер (ПВПК') следующего строения:



Затем фермент пришивают к гидроксильным группам сополимера, используя в качестве реагента симметричный трихлортриазин [41]. Другие приемы основаны на использовании карбоксилатодержащих полимеров или сополимеров, к которым ферменты пришивают с помощью водорастворимых карбодиимидов [42].

Упомянутые методы были применены для получения конъюгатов пенициллинамида (ПА'за),  $\alpha$ -химотрипсина (ХТ), алкогольдегидрогеназы (АДГ'за) и уреазы с поликатионами на основе ПВП [42, 43], а также конъюгатов ПА'зы и ХТ с ПМА-На [43]. Затем путем образования комплексов этих конъюгатов с электростатически комплементарными партнерами был получен ряд ИПЭК, содержащих иммобилизованные ферменты. Среди них ИПЭК (ПМА/ПА'за-ПВПК') [44], ИПЭК (ПМА/АДГ'за-ПВПК') [41, 44] ИПЭК (ПМА/уреаза-ПВПК') [43], ИПЭК (ПА'за-

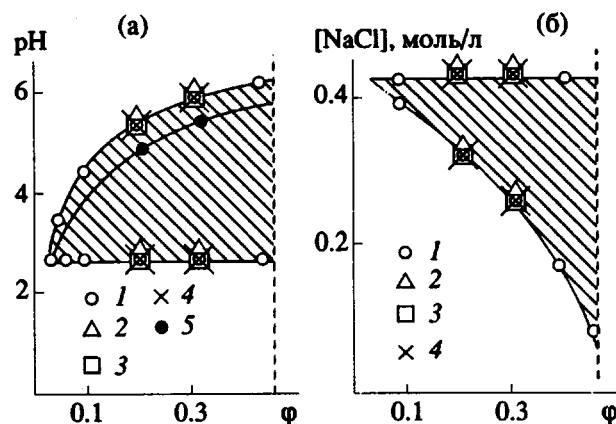


Рис. 5. Диаграммы фазового разделения  $\phi$ - $\text{pH}$  и  $\phi$ - $[\text{NaCl}]$  систем ИПЭК (ПМА/ПВПК) и (ПМА/фермент-ПВПК).  $\bar{P}_w$  (ПМА) = 4000,  $\bar{P}_w$  (ПВПК) = 200,  $[\text{ПМА}]$  = 0,01 моль/л (в расчете на звено полимера),  $T$  = 25°C; а –  $[\text{NaCl}]$  = 0,05 моль/л, б –  $\text{pH}$  7,5. 1 – ИПЭК (ПМА/ПВПК'), 2 – ИПЭК (ПМА/ПА'аза-ПВПК'), 3 – ИПЭК (ПМА/ХТ-ПВПК'), 4 – ИПЭК (ПМА/АДГ'за-ПВПК'), 5 – ИПЭК (ПМА/уреаза-ПВПК'). (В среднем 1 молекула фермента на 3 полимера).

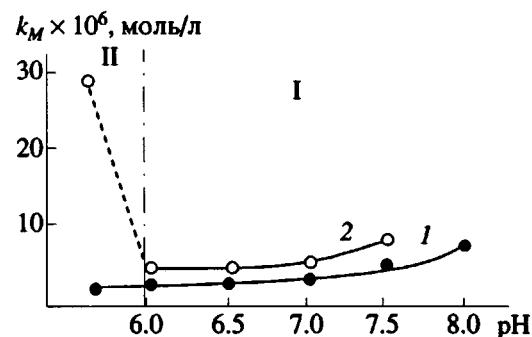


Рис. 6. Зависимость константы Михаэлиса от  $\text{pH}$  в реакции гидролиза бензилпенициллина нативной ПА'азой (1) и ИПЭК (ПМА/ПА'аза-ПВПК') (2);  $[\text{ПВПК}]/[\text{ПМА}^*] = 0,33$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ .

ПМА/ПВПК') [42], ИПЭК (ХТ-ПМА/ПВПК') [45], ИПЭК (уреаза-ПМА/ПВПК') [43].

Некоторые характеристики ферментов, включенных в ИПЭК, в частности  $\text{pH}$ -профили каталитической активности, меняются по сравнению с таковыми для нативных ферментов главным образом из-за влияния заряженных однотяжных блоков ЛПЭ. Например,  $\text{pH}$ -оптимумы ПА'зы, ХТ и АДГ'зы, конъюгированных с ПВПК' и связанных в комплекс с ПМА-На, сдвигаются в щелочную область на 0,2–0,4 единиц  $\text{pH}$ . Сдвиг тем сильнее, чем меньше значение  $\phi$ , т.е. чем ниже в ИПЭК доля звеньев ЛПЭ, блокированных звеньями БПЭ. В то же время характеристические константы ферментов, такие как каталитическая константа скорости первого порядка  $k_{cat}$  и константа

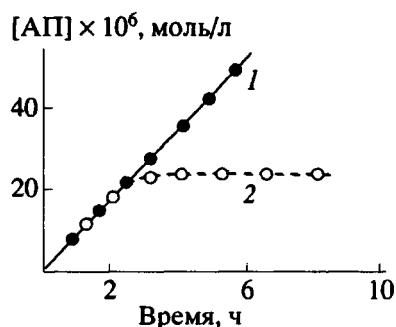


Рис. 7. Кинетические кривые гидролиза бензилпенициллина, катализируемого ИПЭК (ПМА/ПА'аза-ПВПК');  $\varphi = [\text{ПВПК}]/[\text{ПМА}^*] = 0.33$ , 0.1 М фосфатный буфер, pH 7.5,  $T = 25^\circ\text{C}$ ;  $I_0 = 0.2$  (1) и 0.25 моль/л (2).

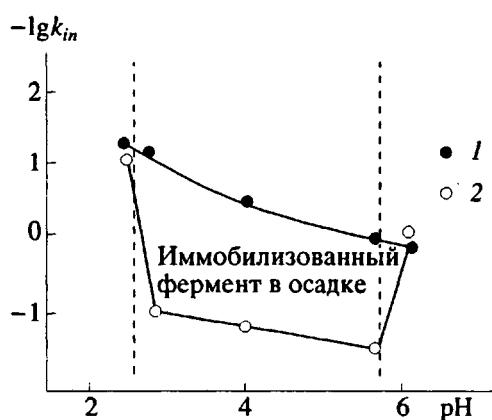


Рис. 8. Зависимость константы скорости первого порядка инактивации  $k_{in}$  нативной ПА'азы (1) и ПА'азы, включенной в ИПЭК (ПМА/ПА'аза-ПВПК') (2), от pH;  $T = 60^\circ\text{C}$ . Штриховыми линиями обозначен интервал pH, в котором фермент, иммобилизованный в ИПЭК, находится в осадке.

Михаэлиса  $k_M$ , характеризующая способность фермента связывать субстрат (чем ниже величина  $k_M$ , тем сильнее связывание), существенно не меняются (табл. 2 [46]).

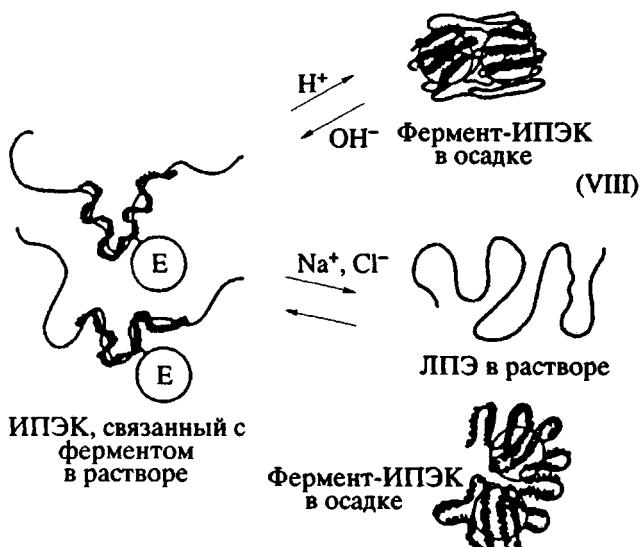
Скорость реакций, катализируемых ферментами, включенными в растворимые ИПЭК, как и в случае нативных ферментов в растворе, не контролируется скоростью диффузии низкомолекулярного субстрата к активному центру фермента [46].

Диаграммы фазового разделения ферментсодержащих ИПЭК в большинстве изученных случаев практически совпадают с диаграммами соответствующих ИПЭК (рис. 5). Только в случае ИПЭК, несущих объемистые глобулы уреазы, составленные из нескольких белковых субъединиц, на диаграмме фазового разделения, построенной в координатах  $\Phi$ -pH, наблюдается сдвиг верхней ветви в кислую область на  $\sim 0.5$  единицы pH [43]. Из данных, приведенных на рис. 6, видно,

что экспериментальное значение  $k_M$  ПА'азы в ИПЭК (ПМА/ПА'аза-ПВПК') остается практически постоянным во всем интервале pH, в котором ИПЭК растворим, и лишь незначительно отличается от  $k_M$  нативной ПА'азы. Однако при переходе в область pH ниже 6, в которой частицы комплекса компактизируются, утрачивают растворимость и выпадают в осадок (ср. рис. 4а и б), величина  $k_M$  резко возрастает. Соответственно столь же резко уменьшается и скорость ферментативной реакции. Увеличение  $k_M$  в данном случае, конечно, не означает, что фазовое разделение подавляет способность фермента связывать субстрат, а лишь отражает резкое уменьшение локальной концентрации субстрата в зоне активных центров.

Из приведенных данных следует, что ферменты, включенные в состав ИПЭК, могут быть легко выделены из реакционной смеси, т.е. отделены от продуктов реакции и непрореагировавших субстратов путем надлежащего изменения pH или ионной силы. Компактизация и переход частиц фермент/ИПЭК в нерастворимое состояние немедленно останавливают или резко затормаживают катализическую реакцию. Схема VIII иллюстрирует молекулярный механизм таких переходов, которые полностью обратимы и могут быть многократно воспроизведены без разрушения или какого-либо повреждения фермента.

Повторное растворение ферментсодержащего ИПЭК каждый раз сопровождается количественным восстановлением каталитической активности фермента, что служит преимуществом по сравнению с другими обратимо растворяющимися системами иммобилизованных ферментов, ранее описанными в литературе [47 - 50].



Ферментативные реакции, в ходе которых происходит накопление растворимых ионных солей, т.е. увеличение ионной силы  $I$  (такие, например, как гидролиз сложных эфиров), могут протекать в режиме обратимого самоингибирования,

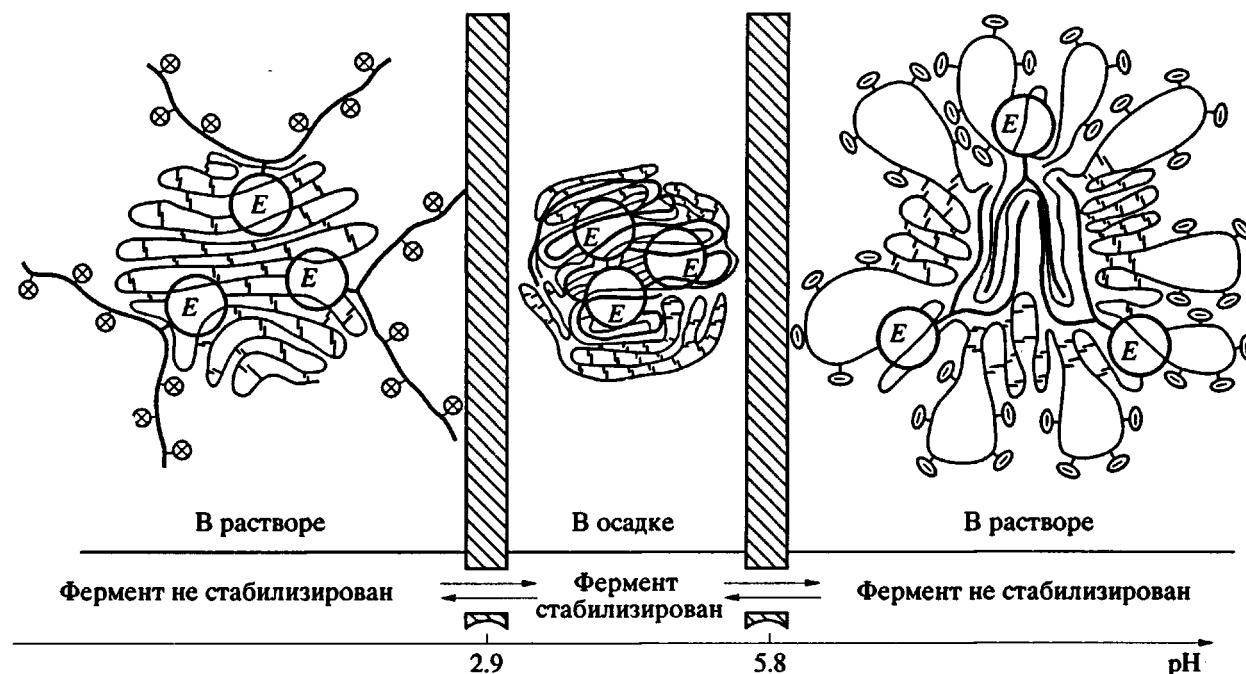


Рис. 9. Схематическое изображение конформационного перехода в системе ИПЭК (ЛПЭ/фермент-БПЭ).

если  $I$  достигает критического значения  $I_c$ , достаточного для компактизации и осаждения частиц ИПЭК. Применительно к каждой данной системе справедливо соотношение

$$I_c = I_0 + \Delta I_c = \text{const}, \quad (6)$$

где  $I_0$  – ионная сила исходного реакционного раствора,  $\Delta I_c$  – приращение ионной силы за счет протекания ферментативной реакции, при котором наступает самоингибиция. Иными словами, желаемая степень превращения субстрата в продукты реакции может быть запрограммирована просто путем вариации  $I_0$  или других параметров ( $\phi$ , pH), влияющих на величину  $I_c$ . Хорошим примером служит гидролиз натриевой соли бензилпенициллина, катализируемый растворимым ИПЭК (ПМА/ПА'за-ПВПК') (рис. 7) [46]. В результате гидролиза образуются натриевая соль б-аминопенициллинанта (АП) и фенилацетат натрия, т.е. на 1 моль расщепленного солью субстрата приходится 2 моля продуктов реакции. По достижении степени превращения, при которой  $I$  становится равной  $I_c$ , ферментативная реакция прекращается. Однако она может быть возобновлена после полного или частичного удаления из системы солевых продуктов (например, путем диялиза), когда фермент содержащий ИПЭК вновь переходит в растворимое состояние, т.е. при  $I < I_c$ . Описанное явление в известной мере моделирует обратные связи, в результате которых осуществляется саморегулирование ферментативных процессов в клетках.

Обратимый коллапс частиц фермент-ИПЭК может быть также использован для регулирова-

ния стабильности ферментов по отношению к процессам денатурации. Так, термическая стабильность ПА'зы в растворимом ИПЭК (ПМА/ПА'за-ПВПК') при pH > 6 практически не отличается от таковой для нативной ПА'зы. Однако компактизация частиц комплекса при pH < 6 (см. рис. 4а и 5а) приводит к более чем 10-кратному уменьшению константы скорости инактивации  $k_{in}$ , т.е. к значительному повышению термостабильности фермента (рис. 8). При этом, однако, происходит и резкое падение кажущейся катализической активности ( $v/k_M$ , где  $v$  – скорость реакции) (рис. 6, кривая 2). Стабилизация фермента, по всей вероятности, происходит благодаря цементации и экранированию белковых глобул в плотном ядре нерастворимого ИПЭК, которое сшито системой многочисленных водородных

Таблица 2. Кинетические параметры гидролиза бензилпенициллина различными препаратами пеницилламида (pH 7.5,  $T = 25^\circ\text{C}$ )

№ Опыт	Препарат ПА'зы	$k_{cat}, \text{с}^{-1}$	$k_M \times 10^6,$ моль/л
1	Нативный фермент	50	9
2	ПА'за-ПВПК'	33	9
3	ИПЭК (ПМА/ПА'за-ПВПК')	20	8
4	ПА'за, иммобилизованная в волокнах триацетата целлюлозы	–	430
5	ПА'за, иммобилизованная в поликариламидном геле	–	530

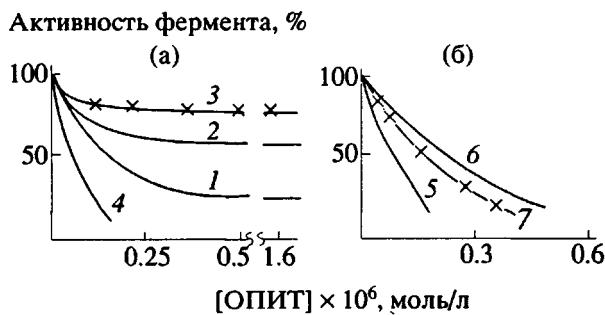


Рис. 10. Зависимость остаточной активности различных препаратов  $\alpha$ -химотрипсина от концентрации основного панкреатического ингибитора трипсина (ОПИТ). а - ИПЭК (ПМА/ХТ-ПВПК'): 1, 2 - в растворе при pH 7.5 (1) и 6.0 (2), 3 - в осадке при pH 5.7, 4 - нативный фермент при pH 6.0. б - ИПЭК (ХТ-ПМА/ПВПК'): 5 - в растворе при pH 6.0, 6 - в осадке при pH 5.7, 7 - значения, полученные в присутствии добавленной соли  $\text{Ca}^{+2}$ .

и ионных связей. В образовании этих связей участвуют все полимерные компоненты комплекса. Растворение ферментсодержащего ИПЭК при  $\text{pH} < 2.9$  сопровождается немедленным исчезновением эффекта дополнительной термостабилизации, и  $k_{in}$  вновь принимает значение, характерное для нативного фермента [51] (рис. 8, ср. кривые 1 и 2). Конформационные превращения частиц фермент-ИПЭК, происходящие при изменении  $\text{pH}$ , схематически представлены на рис. 9. Обратимое повышение стабильности включенного в ИПЭК фермента против денатурации, сопряженное с обратимой потерей им катализической активности, может служить моделью образования спор [52 - 54], предохраняющих некоторые живые клетки в случае неблагоприятного изменения условий в окружающей среде.

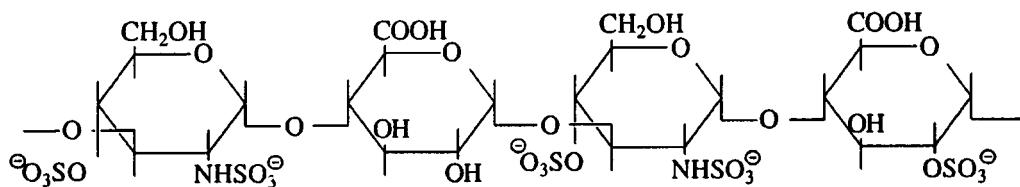
Существенно подчеркнуть, что описанные выше явления типичны только для ИПЭК, в которых фермент ковалентно связан с цепями БПЭ. При использовании конъюгатов фермент-ЛПЭ частицы фермент-ИПЭК ведут себя несколько по-иному. Так для ИПЭК (ПА'за-ПМА/ПВПК') наблюдали лишь двукратное понижение  $k_{in}$  вместо 10-кратного для ИПЭК (ПМА/ПА'за-ПВПК'). Причина, обусловливающая это различие, вероятно, состоит в том, что при компактизации частиц ИПЭК (ПА'за-ПМА/ПВПК') молекула фермента локализуется не в ее плотном ядре, а в относительно рыхлой опушке, образованной избыточными по отношению к БПЭ участками ЛПЭ [43].

Включение ферментов в ИПЭК позволяет регулировать степень доступности их катализических центров для молекул ингибиторов, в особенности высокомолекулярных. В последнем случае активные центры фермента могут быть защищены от ингибитора не только в осадке, но и в рас-

творе. Это иллюстрируют результаты, полученные при изучении взаимодействия ХТ, включенного в ИПЭК, с основным панкреатическим ингибитором трипсина (ОПИТ) ( $M = 6500$ ) [55]. Из данных, приведенных на рис. 10а, видно, что ХТ, конъюгированный с БПЭ (ПВПК') и иммобилизованный в ИПЭК с ЛПЭ (ПМА-На), частично защищен от ингибиции ОПИТ уже при  $\text{pH} 7.5$ , т.е. еще достаточно далеко от величины  $\text{pH} (< 6)$ , соответствующей фазовому разделению (рис. 10а, кривая 1). При  $\text{pH} 6$  ХТ, включенный в ИПЭК, все еще оставаясь в растворе, уже значительно защищен (рис. 10а, кривая 2). Он полностью защищен в осадке при  $\text{pH} 5.7$  (рис. 10а, кривая 3). В случае ИПЭК, образованного конъюгатом ХТ-ПМА-На (ЛПЭ) и ПВПК' (БПЭ), защита от высокомолекулярного ингибитора оказывается гораздо менее эффективной как в растворе, так и в осадке (рис. 10б). По-видимому, последнее означает, что молекулы фермента, конъюгированные с ЛПЭ, в среднем локализуются ближе к периферии частиц ИПЭК, нежели в случае, когда они конъюгированы с БПЭ.

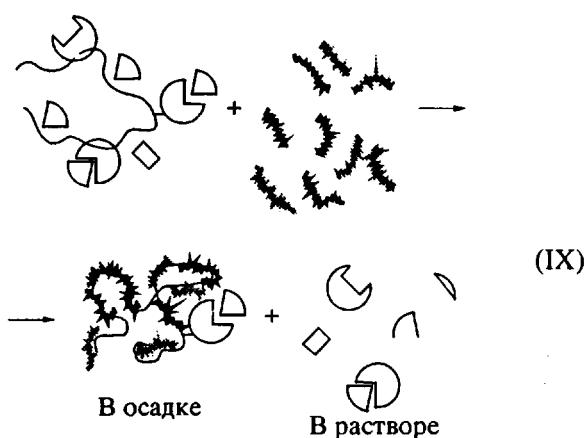
Другой перспективный подход может состоять в использовании конъюгатов различных ферментов с полионами для самосборки полиферментных систем на основе ИПЭК. Описан, по крайней мере, один пример [56] такой системы, содержащей уреазу и глутамат-дегидрогеназу (ГДГ'за). Уреаза и ГДГ'за были ковалентно присоединены соответственно к ПМА-На (ЛПЭ) и к ПВПК' (БПЭ). При смешении водных растворов указанных конъюгатов происходит электростатическое связывание противоположно заряженных полионов. В результате образуется растворимый ИПЭК (уреаза-ПМА/ГДГ'за-ПВПК'), включающий оба фермента. Было показано, что индукционный период реакционного цикла превращения 2-оксиглутаровой кислоты в глутаминовую кислоту, катализируемый двухферментным ИПЭК, резко уменьшается по сравнению с наблюдаемым в растворе, который содержит те же количества свободных нативных ферментов. К сожалению, упомянутое исследование пока не получило дальнейшего продолжения и развития.

Отмеченная выше способность линейных полионов количественно замещать молекулы белков в ИПЭК (ЛПЭ/белок) (схема (VI)) может быть использована для усовершенствования некоторых аналитических процедур, в частности для конструирования эффективных иммуно-химических реагентов нового типа. Антитело, ковалентно присоединенное к линейному полиону (например, к полианиону), служит центром специфического связывания соответствующего белкового антигена. Наряду с этим другие молекулы антигенов могут неспецифически связываться на свободных участках полииона. Однако при взаимодействии такого ассоциата с эквимолярным количеством противоположно заряженного



Схема

линейного полииона (например, поликатиона) происходит вытеснение всех неспецифически сорбированных белков и образование нерастворимого ИПЭК который теперь содержит только антиген, удерживаемый комплементарным ему антителом



Этот принцип был использован для разработки высокоэффективных псевдогомогенных иммунодиагностических систем [57 - 60].

Надо сказать, что синтез растворимых конъюгатов линейных полиэлектролитов с белками, которые необходимы для получения растворимых ИПЭК, содержащих заданное число молекул белка, несмотря на кажущуюся простоту, на самом деле встречает определенные трудности. Конечно, не составляет труда в каждом случае подобрать для этой цели подходящий органический реагент из числа используемых при сшивании макромолекулярных фрагментов в белковом синтезе или при химической модификации белков. Проблема возникает из-за особенностей невалентного взаимодействия линейных полионов с белками в водных растворах. Если в условиях проведения реакции заряд полииона и суммарный заряд белковой глобулы совпадают по знаку, то в разбавленных растворах сшиванию препятствует электростатическое отталкивание полимерных партнеров, а при их концентрировании вместо растворимого конъюгата часто образуется трехмерно сшитый нерастворимый продукт. Разномименно заряженные полион и белок, наоборот, притягиваются друг к другу и, как отмечено выше, образуют ИПЭК, в котором белковые глобулы выполняют функцию БПЭ. Однако при этом заселение полионов молекулами белка во многих случаях происходит неравномерно. Из-за

кооперативности взаимодействия белок сорбируется на полионах ЛПЭ по принципу "все или ничего" [6], что делает невозможным получение конъюгатов заданного состава.

Недавно [61] предложен новый подход для контролируемого синтеза белковополиэлектролитных конъюгатов, основанный на использовании обращенных мицелл в качестве микрореакторов. Размер мицеллярных микрореакторов можно регулировать так, чтобы каждый из них вместил лишь одну макромолекулу полиэлектролита и желаемое число глобул белка (например, одну или две). Тогда реакция сшивания проходит с очень высоким выходом целевого продукта. Этот подход может стимулировать дальнейшие усилия по изучению и разработке областей применения систем белок-ИПЭК.

Наконец, заслуживает упоминания выдвинутая некоторое время назад идея [62] использовать растворимые ИПЭК в качестве депо антигепариновых веществ. Антигепариновые препараты представляют собой растворимые катионные полиэлектролиты, образующие нерастворимые ИПЭК с полианионами гепарина (см. схему). Их вводят в организм внутривенно в тех случаях, когда необходимо связать присутствующий в крови избыток гепарина (например, после хирургической операции, которой предшествовала инъекция гепаринового раствора). Значительную опасность, однако, представляет передозировка антигепаринового препарата, поскольку сами по себе антигепариновые вещества вызывают острый токсический эффект. Их токсичность не проявляется на фоне гепарина именно благодаря образованию ИПЭК (гепарин/антигепариновый поликатион). Но после того, как содержащийся в крови гепарин "оттитрован" поликатионом, токсический эффект катастрофически возрастает. Иначе обстоит дело, если вместо раствора, содержащего свободные поликатионы – антагонисты гепарина, ввести их растворимый ИПЭК, образованный с участием относительно высокомолекулярных и малотоксичных карбоксилатных поланионов (ЛПЭ). Выше была отмечена способность сульфонатных полианионов (и, в частности, гепарина) необратимо замещать карбоксилатные. Поэтому результатом взаимодействия такого ИПЭК с гепарином станет образование нового нерастворимого ИПЭК(гепарин/антигепариновый

поликатион), т.е. требуемое связывание гепарина будет достигнуто



Но теперь передозировка уже не страшна, так как если она и случится, то вместо свободного антагониста гепарина в крови появится лишь его менее токсичный ИПЭК.

В этой статье рассмотрены лишь несколько примеров, иллюстрирующих возможности использования фундаментальных свойств растворимых ИПЭК для воздействия на биологические макромолекулы и системы, а также для их моделирования. Сегодня мы, вероятно, находимся в начале пути, который представляется перспективным уже из общих соображений. В самом деле, ИПЭК, образованные с участием неприродных полиэлектролитов, по существу представляют собой высококооперативные супрамолекулярные частицы. В этом смысле они подобны самособирающимся супрамолекулярным комплексам биополимеров. Взаимодействие и тех и других друг с другом в водных средах подчиняется тем же общим закономерностям и управляется принципиально сходными специфическими факторами. Поэтому существует объективная основа для гладкого перехода от биомиметики к реальным биофункциональным системам, действующим не только *in vitro*, но также *in vivo*. Особый интерес в этом смысле представляет перспектива применения растворимых ДНК-содержащих ИПЭК для генетической трансформации клеток. Последняя проблема заслуживает специального обзора, публикуемого далее в этом же номере журнала [63].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kabanov V.A. // Pure and Appl. Chem., Macromol. Chem. 1973. V. 8. P. 121.
2. Kabanov V.A., Zezin A.B. // Soviet Sci. Rev., Sec. B., Chem. Rev. 1982. V. 4. P. 207.
3. Tsuchida E., Abe K. // Adv. Polym. Sci. 1982. V. 45. P. 1.
4. Kabanov V.A., Zezin A.B. // Makromol. Chem., Suppl. 1984. V. 6. P. 259.
5. Kabanov V.A. // Polymerization in Organized Media / Ed. by Paleos C.M. Gordon and Breach Sci. Pub., 1992. P. 369.
6. Кабанов В.А., Евдаков В.П., Мустафаев М.И., Антипина А.Д. // Молек. биология. 1977. Т. 11. С. 582.
7. Kabanov V.A., Zezin A.B., Mustafaev M.I., Kasaikin V.A. // Polymeric Amines and Ammonium Salts / Ed by Goethals E.J. Oxford; New York: Pergamon Press, 1980. P. 173.
8. Зайцев В.С., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. РАН. 1992. Т. 322. № 2. С. 318.
9. Ибрагимова З.Х., Ивлева Е.М., Павлова Н.В., Бородулина Т.А., Ефремов В.А., Касаикин В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1992. Т. 34. № 9. С. 134.
10. Ибрагимова З.Х., Касаикин В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1986. Т. 28. № 8. С. 1640.
11. Лысенко Е.А., Бронич Т.К., Касаикин В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. 1994. Т. 36. № 2. С. 218.
12. Коробко Т.А., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. 1994. Т. 36. № 2. С. 223.
13. Хандурина Ю.В., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. 1994. Т. 36. № 2. С. 229.
14. Хандурина Ю.В., Дембо А.Т., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. 1994. Т. 36. № 2. С. 235.
15. Хандурина Ю.В., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. 1994. Т. 36. № 2. С. 241.
16. Кабанов В.А., Зезин А.Б., Харенко А.В., Калужная Р.И. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 230. С. 139.
17. Tsuchida E., Osada Y., Sanada K. // J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed. 1972. V. 10. P. 3397.
18. Гуляева Ж.Г., Полетаева О.А., Калачев А.А., Касаикин В.А., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1976. Т. 18. № 12. С. 2800.
19. Tsuchida E., Osada Y. // Makromol. Chem. 1974. B. 175. S. 603.
20. Харенко А.В., Старикова Е.А., Луценко В.В., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1976. Т. 18. № 7. С. 1604.
21. Гуляева Ж.Г., Зансхова М.Ф., Разводовский Е.Ф., Ефимов В.С., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1983. Т. 25. № 6. С. 1238.
22. Izumrudov V.A., Savitskii A.P., Bakeev K.N., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Makromol. Chem., Rapid Commun. 1984. V. 5. P. 709.
23. Izumrudov V.A., Bronich T.K., Zezin A.B., Kabanov V.A. // J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed., 1985. V. 23. P. 439.
24. Kabanov V.A., Zezin A.B., Izumrudov V.A., Bronich T.K., Bakeev K.N. // Makromol. Chem. Suppl. 1985. V. 13. P. 137.
25. Zezin A.B., Izumrudov V.A., Kabanov V.A. // Frontiers of Macromolecular Science, Blackwell Sci. Pub. 1989. P. 219.
26. Бакеев К.Н., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 229. С. 1405.
27. Бакеев К.Н., Изумрудов В.А., Кучанов С.И., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. С. 132.
28. Bakeev K.N., Izumrudov V.A., Kuchanov S.I., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Macromolecules. 1992. V. 25. P. 4249.
29. Izumrudov V.A., Bronich T.K., Saburova O.S., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Makromol. Chem., Rapid Commun. 1988. V. 9. P. 7.
30. Краковяк М.Г., Ануфриева Е.В., Скороходов С.С. // Высокомолек. соед. А. 1972. Т. 14. № 5. С. 1127.

31. Павлова Н.Р., Кириш Ю.Э., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1979. Т. 21. № 9. С. 2062.
32. Kabanov V.A., Zezin A.B., Rogacheva V.B., Grishina N.V., Goethals E.J., Van de Velde M. // Makromol. Chem. 1986. V. 187. P. 1151.
33. Кабанов В.А., Жирякова М.В., Каргов С.И., Зезин А.Б., Изумрудов В.А. // Докл. РАН. 1993. Т. 329. № 1. С. 66.
34. Кабанов В.А., Жирякова М.В., Каргов С.И., Зезин А.Б., Изумрудов В.А. // Докл. РАН. 1993. Т. 332. № 6. С. 50.
35. Изумрудов В.А., Касацкин В.А., Ермакова Л.Н., Зезин А.Б. // Высокомолек. соед. А. 1978. Т. 20. № 2. С. 400.
36. Мустафаев М.И., Кабанов В.А. // Фармакология и токсикология. 1980. Т. 43. С. 395.
37. Kabanov V.A., Zezin A.B. // Pure and Appl. Chem. 1984. V. 56. № 3. P. 343.
38. Изумрудов В.А., Харенко О.А., Харенко А.В., Гуляева Ж.Г., Касацкин В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1980. Т. 22. № 3. С. 692.
39. Кабанов В.А., Зезин А.Б., Рогачева В.Б., Изумрудов В.А., Рыжков С.В. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 268. С. 1419.
40. Zezin A.B., Izumrudov V.A., Kabanov V.A. // Makromol. Chem., Macromol. Symp. 1989. V. 26. P. 249.
41. Margolin A.L., Izumrudov V.A., Shviadas V.K., Zezin A.B., Kabanov V.A., Berezin I.V. // Biochem. Biophys. Acta. 1981. V. 660. P. 359.
42. Марголин А.Л., Изумрудов В.А., Шерстюк С.Ф., Зезин А.Б., Швядас В.К. // Молек. биология. 1983. Т. 17. С. 1001.
43. Margolin A.L., Sherstiuk S.F., Izumrudov V.A., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 146. P. 625.
44. Margolin A.L., Izumrudov V.A., Shviadas V.K., Zezin A.B. // Biotechn. Bioeng. 1982. V. 24. P. 237.
45. Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Изумрудов В.А., Швядас В.К., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 284. С. 997.
46. Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Изумрудов В.А., Швядас В.К., Зезин А.Б., Кабанов В.А., Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 253. С. 1508.
47. Charles M., Roughlin R.W., Hasselberg F.Y. // Biotechn. Bioeng. 1974. V. 16. P. 1530.
48. Roughlin R.W., Aizawa M., Charles M. // Biotechn. Bioeng. 1976. V. 18. P. 199.
49. Leemputten E.V., Horisberger M. // Biotechn. Bioeng. 1976. V. 18. P. 587.
50. Pat. 4088538. USA. 1978.
51. Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Изумрудов В.А., Швядас В.К., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. С. 230.
52. Swerdlow B.M., Setlow B., Setlow P. // J. Bacteriol. 1981. V. 148. P. 20.
53. Warth A.D. // J. Bacteriol. 1980. V. 143. P. 27.
54. Bradbury J.H., Foster J.R., Hammer L. // Biochim. Biophys. Acta. 1981. V. 660. P. 678.
55. Изумрудов В.А., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Швядас В.К., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 269. С. 631.
56. Изумрудов В.А., Марголин А.Л., Швядас В.К., Зезин А.Б. // Тез. V Всесоюз. симпоз. по ферментной инженерии, Кабулетти. 1985. Т. 1. С. 13.
57. А.с. 1200681 СССР. 1985.
58. А.с. 1894708 СССР. 1988.
59. Дзантиеев Б.Б., Блинцов А.Н., Цивилева Л.С., Березин И.В., Егоров А.М., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. С. 222.
60. Дзантиеев Б.Б., Блинцов А.Н., Бобкова А.Ф., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А., Атабеков И.Г. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 311. С. 1482.
61. Kabanov A.V., Levashov A.V., Khrutskaya M.M., Kabanov V.A. // Makromol. Chem. 1990. V. 191. P. 2801.
62. Скородинская А.М., Кеменова В.А., Чернова О.В., Ефимов В.С., Лакин К.М., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Хим.-фармацевт. журн. 1983. № 12. С. 1463.
63. Кабанов А.В., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 198.

## Physicochemical Basis and the Prospects of Using Soluble Interpolyelectrolyte Complexes

V. A. Kabanov

Moscow State University  
Moscow, 119899 Russia

**Abstract** – Interpolyelectrolyte complexes (IPECs) are formed in cooperative reactions involving oppositely charged polyions. Soluble nonstoichiometric IPECs, which are formed in dilute solutions by polyions of different degrees of polymerization (i.e., contour length), may be considered as specific amphiphilic block copolymers. We discuss the most important properties of soluble IPECs, particularly, their participation in reactions of polyion exchange and substitution. The kinetics of these interpolyelectrolyte reactions and their equilibrium are also considered as controlled by the concentration and nature of low-molecular-mass counterions and the degree of polymerization of the interacting polyions. The disproportionation occurring in IPECs, when pH or ionic strength is varied, may be used to engineer the enzyme–IPEC systems in which the catalytic activity is mediated by interpolyelectrolyte reactions. The other uses may be the high-efficiency pseudohomogeneous immunodiagnostics, “mild” heparin antagonists, and other promising biomedical applications.