

УДК 541.64.542.954.547.28

## ОСОБЕННОСТИ ПОЛИКОНДЕНСАЦИИ БЕЛКОВ С ГЛУТАРОВЫМ АЛЬДЕГИДОМ

© 1996 г. Н. П. Кузнецова, Л. Р. Гудкин, С. В. Кольцова, Р. Н. Мишаева

Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук  
199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31

Поступила в редакцию 29.08.95 г.

Исследована поликонденсация белков (гемоглобина или сывороточного альбумина) с глутаровым альдегидом. Обнаружено отсутствие стехиометрии в расходовании аминных и альдегидных групп в реакционной смеси при избытке глутарового альдегида. Убыль альдегидных групп из раствора в 6–10 раз превышает количество модифицированных аминогрупп, что может быть результатом образования олигомеров глутарового альдегида, связанных с белком. Предполагается, что межмолекулярная сшивка в белковых конъюгатах осуществляется за счет взаимодействия олигомеров глутарового альдегида, присоединенных к разным белковым макромолекулам.

Реакция химической сшивки белков с помощью бифункционального сивающего агента – глутарового альдегида (ГА) широко распространена при фиксации и иммобилизации биологических объектов [1]. Процесс протекает с высокой скоростью, в мягких условиях, не влияющих на нативную конформацию макромолекул белков и ферментов, конечные продукты поликонденсации весьма устойчивы. Реакция между белками и ГА используется для получения новых видов полимерных лекарственных и диагностических средств, в связи с чем в литературе подробно представлены биологические свойства высокомолекулярных гомо- и гетеробелковых конъюгатов, где в качестве мономера выступают полифункциональные белковые макромолекулы. Вместе с тем практически не изучены полимерные аспекты образования таких высокомолекулярных белковых конъюгатов. До сих пор из-за сложности структуры компонентов неясна химическая природа сшивания белков с помощью ГА, в основе которой лежит реакция поликонденсации белка с альдегидом, включающая образование шиффова основания между альдегидными группами ГА и непротонированными аминогруппами белковой макромолекулы.

В данной работе рассмотрены особенности процесса поликонденсации белков (на примере гемоглобина и сывороточного альбумина) и предложен механизм образования макромолекулярных белковых конъюгатов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) (10%-ный раствор производства Ленинградского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробио-

логии им. Пастера), предварительно освобожденный от стабилизаторов диализом; бычий сывороточный альбумин (БСА) ("Calbiochem", США); трипсин ("Serva", Германия); гемоглобин крови человека, полученный осмотическим гемолизом эритроцитов донорской крови с последующим удалением стромальных элементов скоростным центрифугированием [2]. Концентрацию гемоглобина (ГГ) определяли спектрофотометрически при длине волн 540 нм с ацетонциангидрином ( $\epsilon = 11.5$  л/моль см) [3]. Водный раствор ГА ("Reanal", Венгрия) очищали вакуумной перегонкой, отбирали фракцию, кипящую при 24–25°C (остаточное давление 3–5 мм рт. ст.), и хранили в виде 8–10%-ного водного раствора, подкисленного до pH 3.8, в темноте при 4°C. ГА имел степень чистоты (по спектральным данным)  $D_{235}/D_{280} < 0.3$ , соответствующую мономерной форме [4–6]. Концентрацию альдегидных групп ГА определяли методом дифференциальной pH-метрии с гидроксиленом [7]. При расчете содержания альдегидных групп ГА рассматривался как бифункциональный мономер с  $M = 100$ . Содержание аминогрупп в сывороточном альбумине и трипсине определяли с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой [8].

В системе БСА–ГА количество оставшегося свободным ГА находили по методике [9], основанной на получении производных ГА с лизином, выделении их методом ГПХ и спектрофотометрическом определении их концентрации.

Количество оставшегося свободным ГА в реакциях с ГГ определяли в фильтрате после ультрафильтрации реакционной смеси через фильтр UM-10 ("Amicon", США) под давлением 0.3 атм. Предварительно в контрольном эксперименте было показано, что свободный ГА при ультрафильтрации мембраной не задерживается.

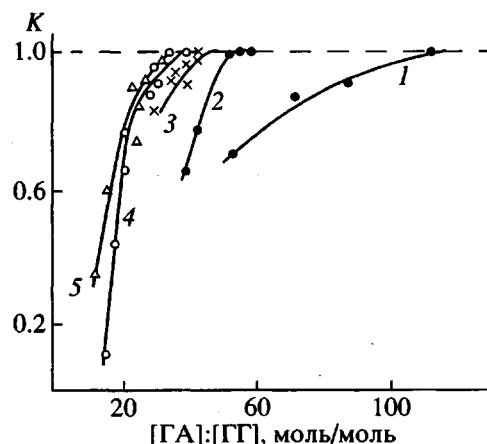


Рис. 1. Зависимость степени превращения ГГ в полимерное производное  $K$  от исходного соотношения реагирующих компонентов  $[ГА] : [ГГ]$ .  $[ГГ] = (0.12-0.15) \times 10^{-3}$  (1);  $(0.3-0.4) \times 10^{-3}$  (2, 3);  $(0.6-0.8) \times 10^{-3}$  (4);  $(1.1-1.2) \times 10^{-3}$  моль/л (5). Время реакции 1 ч,  $T = 6^\circ\text{C}$  (кривая 3 – для  $22^\circ\text{C}$ ).

Оставшиеся немодифицированными в результате реакции ГГ–ГА функциональные аминогруппы и группы SH белка определяли дифференциальным титрованием: основные изменения наблюдали в области pH 7.5–10.5. Потенциометрическое титрование растворов нативного и модифицированного ГГ проводили в автоматическом режиме в системе для титрования ("Radiometer", Дания) при  $22^\circ\text{C}$  [10]. Количество модифицированных аминогрупп и групп SH определяли дифференциальным методом.

Величину средних ММ белковых конъюгатов ( $\bar{M}_w$  и  $\bar{M}_n$ ) рассчитывали из данных ММР, полученных методом ГПХ на колонке с сефарозой 6B ("Pharmacia", Швеция), предварительно проактивированной по известным белковым стандартам по методике [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что процесс поликонденсации ГА с белками протекает через образование шиффовых оснований, альдиминовые связи которых оказываются стабильными и не подвергаются гидролизу на исходные компоненты, что не характерно для обычных шиффовых оснований [12, 13]. В образовании конъюгатов белков с ГА участвуют как внутримолекулярные, так и межмолекулярные связи, в результате чего образуются сшитые модифицированные белковые макромолекулы. Баланс внутри- и межмолекулярных мостиков зависит от количества доступных (экспонированных в растворе) реакционноспособных (непротонированных) аминогрупп белковой молекулы, их расположения на поверхности белковой глобулы,

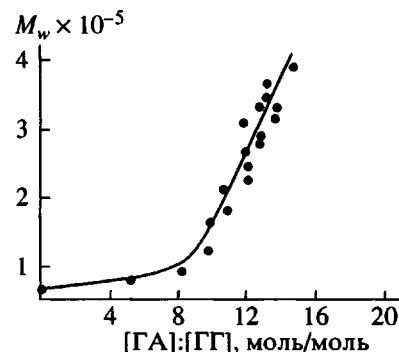


Рис. 2. Зависимость  $\bar{M}_w$  сшитого полимерного гемоглобина от исходного соотношения  $[ГА] : [ГГ]$  в реакционной смеси.  $[ГГ] = (0.7-1.0) \times 10^{-3}$  моль/л, pH 6.8, время реакции 1 ч,  $T = 10^\circ\text{C}$ .

а также от величины общего заряда диполярного белкового макроиона в условиях сшивки. В молекуле ГГ имеется 38 аминогрупп [14], часть которых участвует в образовании солевых связей, общий заряд макромолекулы электрически скомпенсирован и нейтрален; все это определяет тенденцию к предпочтительной межмолекулярной сшивке белковых глобул [15, 16].

Содержание сшитых высокомолекулярных белковых конъюгатов зависит от концентрации ГГ и ГА и их соотношения в реакционной смеси. На рис. 1 представлена зависимость доли полимерного производного ГГ от исходного соотношения  $[ГА] : [ГГ]$ , варьируемого от 10 до 120 моль/моль для концентраций белка в интервале  $(0.12-1.2) \times 10^{-3}$  моль/л. Величина  $K$  характеризует степень превращения и определяется отношением концентраций образованного полимерного белкового производного (в расчете на мономерный белок) к общей концентрации белка в растворе. При  $K < 1$  существует только набор растворимых продуктов конденсации – полигемоглобины разных ММ. Степень превращения  $K = 1$  соответствует образованию геля.

При высоких концентрациях белка –  $(0.7-1.0) \times 10^{-3}$  моль/л наблюдается резкий рост  $\bar{M}_w$  полигемоглобина при изменении исходного соотношения  $[ГА] : [ГГ]$  от 10 до 15 моль/моль (рис. 2). В этом диапазоне соотношений имеет место практически линейное нарастание ММ полигемоглобина при увеличении концентрации ГА в реакционной смеси.

Вместе с тем при низких концентрациях ГА (до  $\sim 0.01$  моль/л), как видно из рис. 2, связывание ГА с белком протекает практически без измене-

Таблица 1. Поликонденсация белков (Б) с ГА\*

$\frac{[ГА]}{[Б]}$ , моль/моль	$\frac{[-\text{CHO}]_{\text{ГА}}}{[-\text{NH}_2]_{\text{Б}}}$ , моль/моль	$\frac{[\text{ГА}_{\text{своб}}]}{[\text{ГА}_{\text{исх}}]}$ , %	Количество модифицированных аминогрупп, моль/моль белка	$\frac{[-\text{CHO}_{\text{связ}}]_{\text{ГА}}}{[-\text{NH}_2_{\text{модиф}}]_{\text{Б}}}$ , моль/моль	$\frac{[\text{ГА}_{\text{связ}}]_{\text{мономер}}}{[-\text{NH}_2_{\text{модиф}}]_{\text{Б}}}$ , моль/моль
Система ГГ–ГА (фосфатный буфер 0.05 моль/л, pH 6.8)					
18	0.95	0.0	5.7	6.3	3.15
24	1.26	0.0	8.5	5.7	2.85
28	1.47	3.5	9.3	5.8	2.90
Система БСА–ГА (фосфатный буфер 0.1 моль/л, pH 7.0)					
46	1.53	17.5	11	6.9	3.55
64	2.06	21.0	14	7.2	3.60
76	2.53	24.4	14	8.2	4.10
94	3.13	27.8	14	9.7	4.90

\*  $[ГГ] = 7.7 \times 10^{-4}$  моль/л,  $[БСА] = 5 \times 10^{-4}$  моль/л. Первые 2 столбца относятся к исходной системе, остальные к конечному продукту поликонденсации.

ния ММ. Это может означать, что ГА образует внутримолекулярные мостики между стерически близкими аминогруппами молекулы ГГ. Наряду с этим ГА может реагировать одной альдегидной группой с аминогруппой белка, образуя шиффово основание, а вторая группа может оставаться в "подвешенном" состоянии на белковой глобуле. Тогда на одну модифицированную аминогруппу белка должны быть израсходованы две альдегидные группы ГА.

Для оценки стехиометрии реакции по убыванию количества функциональных групп белка и альдегидных групп ГА была изучена поликонденсация в двух системах ГГ и БСА с ГА. Результаты представлены в табл. 1, из которой видно, что с одной модифицированной функциональной группой ГГ связаны шесть альдегидных групп ГА. Следовательно, к одной аминогруппе белка могут быть ковалентно присоединены тримеры ГА. Данные, аналогичные системе ГГ–ГА, получены для реакции бычьего сывороточного альбумина с ГА. Количество связанных с белком альдегидных групп ГА в расчете на одну модифицированную аминогруппу БСА достигает 10. Если ГА рассматривать как бифункциональный мономер, в виде которого он вводится в реакцию, то в результате поликонденсации с белком происходит образование олигомерной формы ГА, "иммобилизованной" на белке в виде трех-пятимеров.

Известна способность ГА к медленной олигомеризации в водных слабощелочных растворах в результате альдольной конденсации [17]. Образующиеся олигомеры содержат сопряженные двойные связи ненасыщенных  $\alpha,\beta$ -производных типа

акролеина  $=\text{C}=\text{C}-\text{CHO}$  [18]. Они обнаружены при фракционировании коммерческих образцов ГА и наиболее исследованы в щелочных растворах

( $\text{pH} > 8.0$  и  $40^\circ\text{C}$ ), где ГА может образовывать даже осадки [19, 20].

В работах японских исследователей [21–23] изучались превращения мономерного ГА при выдерживании его в слабощелочных растворах ( $\text{pH} 7.5$ –8.0). Ими были обнаружены три-, пента- и гентамеры ГА, имеющие в структуре 1,3,5-триоксановый скелет. Выдвигалось предположение, что такой полимерный ГА, возможно, играет главную роль в реакции сшивки белков, что требует дополнительного экспериментального подтверждения [24, 25].

Что касается реакции поликонденсации ГА с ЧСА ( $M_r = 68 \times 10^{-3}$ ,  $\text{pI} 4.7$ ), то в нейтральных растворах при низкой ионной силе из-за электростатического отталкивания модифицируемых белковых макромономеров ЧСА процесс межмолекулярной сшивки очень замедлен по сравнению с системой ГГ–ГА [15, 16]. Это облегчает в данном случае определение изменения во времени количественных характеристик поликонденсации (табл. 2). Следует заметить, что из общего числа аминогрупп ЧСА доступными для титрования являются только 21 аминогруппа, в основном  $\epsilon$ -аминогруппы лизиновых остатков. Длительная поликонденсация ЧСА с ГА (в течение 48 ч) показала, что в условиях эксперимента модифицируется только две трети из числа доступных аминогрупп (13 аминогрупп), возможно, из-за разной степени их ионизации (в реакции с ГА участвуют только непротонированные аминогруппы), а также из-за стерических затруднений. О том же свидетельствуют данные табл. 1: в молекуле БСА модифицируются только наиболее реакционноспособные 14 аминогрупп из 57, что соответствует данным других авторов [26]. Уже за 15–30 мин реакции модифицируется 70–80% из способных реагировать аминогрупп ЧСА. При этом ММ практически

Таблица 2. Изменение  $\bar{M}_w$  и  $\bar{M}_n$  и количества модифицированных аминогрупп в процессе поликонденсации ЧСА с ГА

Время	Количество аминогрупп ЧСА	Количество модифицированных аминогрупп ЧСА	Степень модификации аминогрупп, %	$\bar{M}_w \times 10^{-3}$	$\bar{M}_n \times 10^{-3}$	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$
0	21	0	0	68	66	1.03
2 мин	17	4	28	—	—	—
5 мин	15	6	38	—	—	—
10 мин	13	8	60	77	72	1.07
15 мин	12	9	70	81	75	1.08
20 мин	12	9	70	85	78	1.09
30 мин	11	10	77	88	80	1.10
45 мин	11	10	77	—	—	—
1 ч	10	11	85	108	90	1.20
2 ч	10	11	85	125	100	1.26
6 ч	10	11	85	200	130	1.56
48 ч	8	13	100	>350	200	1.80

Примечание. [ЧСА] =  $7.5 \times 10^{-4}$  моль/л, pH 6.7,  $T = 10^\circ\text{C}$ .

ки не меняются, вероятно, появляется только незначительное количество димеров ЧСА. Далее процесс межмолекулярной сшивки развивается во времени, и степень полидисперсности  $\bar{M}_w/\bar{M}_n$  достигает величины 1.80. Но появление высокомолекулярных компонентов и нарастание величины  $\bar{M}_w$  происходит при практически неизменной степени модификации аминогрупп белка. Это может означать только то, что процесс межмолекулярной сшивки на данном этапе осуществляется в результате реакции между альдегидными группами олигомерного ГА, принадлежащим разным молекулам ЧСА.

Подтверждением образования химических сшивок между белковыми молекулами за счет реакции альдольной конденсации или присоединения, осуществляющейся между олигомерами ГА, "подвешенными" на белке, может служить со-конденсация двух модифицированных под действием ГА белков: БСА, в котором модифицированы все 14 возможных аминогрупп, и трипсина, производные которого содержат 3, 5 и 8 модифицированных ГА аминогрупп из всех доступных 14 [27]. Было показано, что при одной и той же степени модификации БСА увеличение степени модификации аминогрупп трипсина приводит к усилению соконденсации этих белков, увеличению количества трипсина, связанного в конъюгат с БСА (табл. 3). При модификации более половины аминогрупп в молекуле трипсина фермент полностью связывается с БСА [28].

Механизм процесса поликонденсации белков с ГА до сих пор не имеет однозначного объяснения. Наша попытка исследования процесса хими-

ческого сшивания белковых молекул ГА привела к установлению ряда фактов.

1. При взаимодействии аминогрупп белка с альдегидными группами ГА не наблюдается стехиометрического соответствия между расходом аминогрупп и групп SH белка и исчезновением из раствора альдегидных групп (их расходуется в 6–10 раз больше). Можно дать этому два объяснения: или образование альдиминной связи ГА с белком инициирует процесс собственной олигомеризации ГА с образованием "пришитых" к белку олигомеров ГА; или присутствие функциональных групп белка катализирует образование олигомерных форм ГА в растворе, которые и взаимодействуют с белком.

Важно, что в отсутствие белка в растворе в контрольных экспериментах при тождественных условиях изменение концентрации альдегидных групп ГА не наблюдалось.

2. Образование высокомолекулярных белковых конъюгатов (увеличение MM во времени)

Таблица 3. Характеристики гетероконъюгатов трипсина с БСА

Количество модифицированных аминогрупп в БСА, моль/моль	в трипсине, моль/моль	$[-\text{NH}_2_{\text{модиф}}]$	$[\text{БСА-трипсин}]$
		$[-\text{NH}_2_{\text{общ}}]$ в трипсине, %	$[\text{трипсин}]_{\text{иск}}$ , %
14	3	20	35
14	5	36	60
14	8	57	100

Примечание. [БСА] = [трипсин] =  $5 \times 10^{-5}$  моль/л, время реакции 1 ч,  $T = 8^\circ\text{C}$ , фосфатный буфер 0.1 моль/л, pH 7.0.

происходит практически без изменения количества модифицированных аминогрупп белка, т.е. межмолекулярная сшивка осуществляется не за счет образования шиффовых оснований, а, можно полагать, в результате взаимодействия остатков ГА, "подвешенных" к белковым молекулам.

На основании изложенного выше можно утверждать, что процесс химического сшивания белков с помощью ГА (последний всегда добавляется в избыточном количестве по отношению к количеству доступных непротонированных реакционноспособных аминогрупп белка) проходит в два этапа. На первом при добавлении в нейтральный белковый раствор водного раствора ГА (рН 3.8) начинается реакция между аминогруппами белка и альдегидными группами ГА с образованием шиффовых оснований. Образование альдиминной связи и наличие микроокружения белковой молекулы активируют, вероятно, присоединенную молекулу ГА [29] и инициируют наращивание олигомерной цепочки за счет избыточного ГА в растворе. Олигомеризация ГА может протекать или по схеме Рихарда и Ноулеса [17], или по механизму, предлагаемому Ташимой с соавторами [21]. В результате за первые 15–30 мин в белковой молекуле часть аминогрупп заменяется олигомерным ГА (предположительно трех–пятимерами). Второй этап реакции начинается через 15–30 мин и связан с образованием межмолекулярных мостиков – сшиванием белковых модифицированных молекул, но без образования шиффовых оснований. Эта реакция осуществляется в основном между олигомерными производными ГА, связанными с разными молекулами белка. Поэтому высокомолекулярные белковые конъюгаты, сшитые глутаровым альдегидом, представляют собой белковые молекулы, соединенные мостиками из олигомерных форм глутарового альдегида.

Приносим глубокую благодарность А.И. Ардити за помощь в работе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Платэ Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры. М.: Химия, 1986.
2. Rabiner S.F. // J. Exp. Med. 1967. V. 126. P. 1127.
3. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Л.: Медицина, 1968. С. 23.
4. Hardy P.M., Nichols A.C., Rydon H.N. // Chem. Commun. 1969. № 10. P. 565.
5. Wippel E.B., Ruta M. // J. Org. Chem. 1974. V. 39. № 12. P. 1666.
6. Dijk F., Oosbergen J.A., Hulstaert C.E. // Histochemistry. 1985. V. 83. № 6. P. 573.
7. Roe H.R., Mitchel G. // Anal. Chem. 1951. V. 23. № 12. P. 1758.
8. Fields R. // Biochem. J. 1971. V. 124. № 3. P. 581.
9. Кузнецова Н.П., Мишаева Р.Н., Кольцова С.В., Гудкин Л.Р., Страгович Л.М., Большикова Е.Г. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 9. С. 871.
10. Кузнецова Н.П., Гудкин Л.Р., Самсонов Г.В. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 1. С. 41.
11. Кузнецова Н.П., Самсонов Г.В. // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 12. С. 2611.
12. Hopwood D. // Fixation in Histochemistry / Ed. by Stoward P.J. London: Chapman and Hall, 1973. P. 47.
13. Hopwood D. // Histochem. J. 1969. V. 1. P. 323.
14. Тристрам Г.Р. // Белки / Под ред. Нейрат Г., Бейли К. М.: Изд-во иностр. лит. 1956. Т. 1. С. 244.
15. Кузнецова Н.П., Самсонов Г.В. // Высокомолек. соед. А. 1986. Т. 28. № 3. С. 643.
16. Кузнецова Н.П., Кленин С.И., Волкова Л.А., Гудкин Л.Р., Самсонов Г.В. // Высокомолек. соед. А. 1989. Т. 31. № 7. С. 1539.
17. Richard F.M., Knowles J.R. // J. Molec. Biol. 1968. V. 37. № 1. P. 231.
18. Monsan P., Puzo P., Mazarguil H. // Biochemie. 1975. V. 57. № 11/12. P. 1281.
19. Margel S., Rembaum A. // Macromolecules. 1980. V. 13. № 1. P. 19.
20. Rembaum A., Margel S. // Brit. Polym. J. 1978. V. 10. № 4. P. 275.
21. Tashima T., Kawakami U., Harada M., Sakata T., Saton N., Nakagawa T., Tanaka H. // Chem. Pharm. Bull. 1987. V. 35. № 10. P. 4169.
22. Tashima T., Kawakami U., Harada M., Imai M., Saton N., Nakagawa T., Tanaka H. // Chem. Pharm. Bull. 1989. V. 37. № 2. P. 377.
23. Tashima T., Imai M., Kuroda J., Jagi S., Nakagawa T. // J. Org. Chem. 1991. V. 56. № 2. P. 694.
24. Kawahara J., Ohnori T., Ohkubo T., Hattori S., Kawamura M. // Anal. Biochem. 1992. V. 201. № 1. P. 94.
25. Казанская Н.Ф., Кост О.А., Березин И.В. // Биоорган. химия. 1975. Т. 1. № 9. С. 1337.
26. Goldfarb A.R. // Biochemistry. 1966. V. 5. № 8. P. 2574.
27. Keil B. // The Enzymes / Ed. by Boyer P.D. London; New York: Acad. Press, 1971. V. 3. P. 249.
28. Кольцова С.В. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. № 6. С. 408.
29. Сайкс П.А. Механизм реакций в органической химии. М.: Химия, 1977. С. 205.

**Specific Features of the Condensation of Proteins with Glutaric Dialdehyde****N. P. Kuznetsova, L. R. Gudkin, S. V. Kol'tsova, and R. N. Mishaeva***Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences  
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia*

**Abstract**—The condensation of proteins (hemoglobin or serum albumin) with monomeric glutaric dialdehyde was studied. The absence of stoichiometry in the consumption of amino groups and aldehyde groups in the reaction mixture was observed when glutaric dialdehyde was in excess. The decrease in the number of aldehyde groups in solution exceeded the number of modified amino groups by 6 to 10 times. This may be the result of the formation of protein-bound oligomers of glutaric dialdehyde. We suggest that it is the glutaric dialdehyde oligomers linked to different protein molecules that form the intermolecular cross-linkages in the protein conjugates.