

УДК 541.64:532.72

ТРАНСПОРТНЫЕ ФУНКЦИИ СИСТЕМЫ БЕЛОК-ПОЛИДИЭТИЛАКРИЛАМИД

© 2000 г. И. Л. Валуев, А. А. Антипов, И. В. Обыденнова, И. М. Шаназарова,
М. А. Розенфельд, Л. И. Валуев, Н. А. Платэ

Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчева Российской академии наук
117912 Москва, Ленинский пр., 29

Поступила в редакцию 09.09.1999 г.
Принята в печать 28.02.2000 г.

Изучена зависимость НКТС и биологической активности сополимера белка с N,N-диэтилакриламидом от его состава. Показано, что при увеличении доли белка в сополимере до 33 мас. % происходит повышение НКТС. Сополимеры с более высоким содержанием белка вообще не имеют НКТС. Биологическая активность иммобилизованного белка уменьшается с увеличением содержания звеньев N,N-диэтилакриламида в сополимере.

В последние десятилетия широко изучается проблема создания систем для направленного транспорта лекарственных препаратов в живом организме. Эта проблема весьма актуальна, так как в обычных условиях в пораженный орган попадает не более 10% лекарственного вещества, введенного в организм, и ее решение позволит ввести в обращение многие высокоактивные препараты, не используемые из-за высокой токсичности.

Метод получения таких систем основан на связывании молекул лекарственного вещества с молекулами-векторами, способными транспортировать его в тот или иной орган-мишень. В качестве таких молекул-векторов можно использовать вещества двух различных типов. Во-первых, соединения, обладающие повышенным средством к пораженному органу: гормоны [1], лектины [2], белки и ферменты [3], гликопротеины [4] и другие олигомерные и макромолекулярные соединения. Во-вторых, вещества, способные избирательно концентрироваться в определенном месте под действием различных внешних факторов, таких как действие магнитного поля [5], изменение pH [6] или температуры [7] и т.д.

В работах [8, 9] нами был предложен новый подход к решению проблемы направленного транспорта лекарственных препаратов белковой природы, который заключается в иммобилизации белков на водорастворимых полимерах с НКТС вблизи 37°C с последующим нагреванием

нужного места в организме до температуры выше НКТС. Полимер выделяется в этом месте в отдельную фазу, концентрируя химически связанный с ним белок. Движущей силой направленного транспорта (диффузии) является градиент химического потенциала, возникающий при изменении температуры.

Естественно, что использование такой "термоактивации", возможно только при соблюдении двух условий. Во-первых, после иммобилизации белка полимер-носитель должен сохранять способность к фазовому переходу при температурах выше НКТС, т.е. осуществлять транспортную функцию. Во-вторых, полимер-носитель не должен оказывать денатурирующее воздействие на молекулу белка при температурах выше НКТС. Так, в работе [9] нами было показано, что если активность трипсина, иммобилизованного на сополимере N-изопропилакриламида, при температурах выше НКТС практически не отличается от активности нативного ферmenta, то активность иммобилизованной на том же сополимере, но более склонной к гидрофобной инактивации пероксидазы хрена резко уменьшается после фазового перехода полимера-носителя.

Вопрос о транспортных возможностях полимера-носителя, т.е. о том, какое количество белка может переносить определенное количество полимера, до сих пор оставался открытым. В связи с этим целью работы является изучение зависимости транспортных функций системы белок-полимер от

Таблица 1. Зависимость состава продуктов сополимеризации НПОМ и ДЭАА от состава исходной мономерной смеси

Состав мономерной смеси, НПОМ : ДЭАА, моль/моль	ОМ в сополимере, % ($\pm 3\%$)	ОМ в геле, % ($\pm 3\%$)
1 : 2500	17	19
1 : 600	22	6
1 : 400	25	2
1 : 200	26	—

ее состава. В качестве белка в работе использован овомукoid из белка утиных яиц – гликопротеин, основная биологическая функция которого заключается во взаимодействии с протеолитическими ферментами с ингибированием их активности, а в качестве полимера-носителя – полидиэтилакриламид.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Овомукoid из белка утиных яиц (**ОМ**), выделяли и очищали по методике [10], N,N-диэтилакриламид (**ДЭАА**) фирмы “Sigma” (США) использовали без дополнительной очистки.

Сополимеры ОМ и ДЭАА синтезировали радикальной сополимеризацией ДЭАА и ненасыщенного производного овомукoidа (**НПОМ**) в водном растворе. В качестве инициатора использовали окислительно-восстановительную систему персульфат аммония – N,N,N',N'-тетраметилэтидиамин.

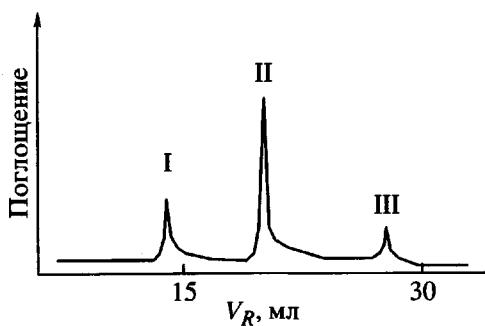


Рис. 1. Хроматограмма водорастворимых продуктов сополимеризации ДЭАА с НПОМ.

НПОМ получали путем взаимодействия овомукoidа с хлорангидридом акриловой кислоты [11].

Состав продуктов сополимеризации находили с помощью ГПХ на колонке (1.5 × 60 см) с Sephadex G-100, уравновешенной бидистиллированной водой, предварительно удалив образующиеся в процессе полимеризации гелеобразные продукты. Детектирование осуществляли на спектрофотометре “Hitachi-4010” (Япония) при длине волны 220 нм.

Антитриптическую активность ОМ определяли по подавлению амидазной активности трипсина по методу Какадэ [12], используя в качестве субстрата *n*-нитроанилид N, α -бензоил-D,L-аргинина.

НКTC определяли по помутнению 1%-ных растворов сополимеров, регистрируемом на спектрофотометре “Hitachi-4010” (Япония) при длине волны 500 нм.

ММ сополимеров измеряли методом светорассеяния на приборе “Malvern-4400” (Великобритания) в бидистиллированной воде. В качестве стандарта использовали дважды перегнанный бензол.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иммобилизованные производные ОМ получали сополимеризацией НПОМ с ДЭАА. Используемое НПОМ содержало четыре–пять связей C=C на молекулу ОМ. При использовании НПОМ с меньшим количеством ненасыщенных связей его конверсия в процессе сополимеризации не превышает 10% [13], а введение в молекулу ОМ большего количества связей C=C приводит к существенному уменьшению его антитриптической активности [10].

Поскольку НПОМ содержит более одной двойной связи, то оно может выступать одновременно и в качестве сшивющего агента. По этой причине наряду с образованием водорастворимых продуктов реакции в процессе сополимеризации происходило образование сшитого геля. При этом чем больше количество НПОМ в исходной мономерной смеси, тем больше образуется сшитого продукта (табл. 1).

Хроматограммы водорастворимых продуктов реакции представлены на рис. 1. Видно, что сополимеризация приводит к образованию как сополимеров ОМ с ДЭАА (пик I), так и гомополимера ДЭАА (пик III). Последнее обусловлено большим мольным избытком ДЭАА и особенностями протекания сополимеризации макромономеров с низкомолекулярными мономерами в присутствии

Таблица 2. Зависимость состава сополимера ОМ и ДЭАА и его ММ от состава исходной мономерной смеси

Состав мономерной смеси НПОМ : ДЭАА, моль/моль	Состав сополимера НПОМ : ДЭАА, моль/моль	$M_w \text{ исх.} \times 10^{-4}$, $T < \text{НКTC} (\pm 5\%)$	$M_w \text{ пред.} \times 10^{-4}$, $T > \text{НКTC} (\pm 5\%)$
1 : 2500	1 : 2500	45.5	1000.0
1 : 1250	1 : 1000	—	—
1 : 600	1 : 510	18.5	140.0
1 : 400	1 : 280	13.3	57.0
1 : 200	1 : 130	10.2	370.0

больших количеств инициатора [13]. Пик II соответствует непрореагировавшему ОМ. Молекулярная масса синтезированных сополимеров составляет $(1.0\text{--}4.5) \times 10^5$ (табл. 2). Зная ММ и состав сополимеров, легко убедиться, что каждая макромолекула сополимера содержит в среднем одну-две молекулы ОМ.

Зависимость НКTC от состава синтезированных сополимеров представлена в табл. 3. Видно, что при увеличении доли ОМ в сополимере до 0.2 мол. % (33 мас. %) (НПОМ : ДЭАА = 1 : 500) происходит повышение НКTC. Сополимеры с более высоким содержанием ОМ вообще не имеют НКTC и полностью растворимы в воде в широком температурном интервале. Аналогичная зависимость была обнаружена в работе [8] для сополимеров N-изопропилакриламида с акриламидом.

Оценка методом светорассеяния эффективной ММ сополимеров при различных температурах показала (рис. 2), что с повышением температуры ММ сначала не изменяется, а затем в некотором температурном интервале из-за взаимодействия макромолекул сополимера между собой измеряемая ММ нарастает до определенного предельного значения, величина которого приведена в табл. 2.

Наблюдаемое явление скорее всего объясняется "дифильностью" сополимеров при температурах выше НКTC. Полидиэтилакриламидные фрагменты при расслоении гидрофобны и стремятся сформировать новую фазу, в то же время ОМ сохраняет высокое сродство к воде при температурах как ниже, так и выше НКTC полидиэтилакриламида. В этом случае хорошо просматривается наличие двух противодействующих сил,

одна из которых способствует слипанию макромолекул сополимера с конформационно измененными ПДЭАА-фрагментами, а другая предотвращает процесс ассоциации за счет солюбилизирующего эффекта. Для изученной системы визуально наблюдаемое расслоение раствора сополимера происходит в случае образования ассоциатов из более, чем четырех макромолекул (табл. 2, $M_w \text{ пред.}/M_w \text{ исх.}$).

Антитриптическую активность входящего в состав сополимера ОМ оценивали путем измерения остаточной активности трипсина после его взаимодействия с сополимерами. Результаты изучения представлены в табл. 4. Видно, что с увеличением содержания звеньев ДЭАА в сополимере удельная активность ОМ уменьшается, и при содержании ОМ 0.04 мол. % его активность составляет около 55% от активности исходного НПОМ.

Таблица 3. Зависимость НКTC сополимеров от их состава

Состав сополимера НПОМ : ДЭАА, моль/моль	НКTC, °C ($\pm 0.5\%$)
Гомополимер ДЭАА	26
1 : 2500	28.5
1 : 1000	30.5
1 : 510	32
1 : 280	Отсутствует
1 : 130	»

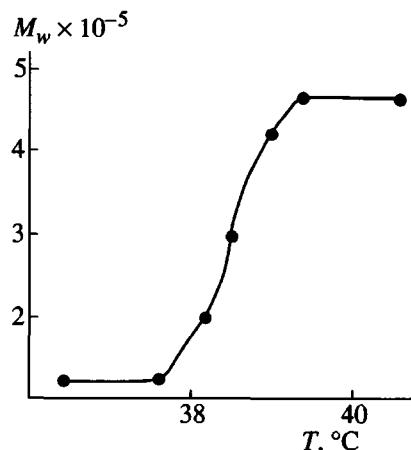


Рис. 2. Зависимость ММ сополимера НПОМ с ДЭАА (ДЭАА : НПОМ = 510 : 1) от температуры.

Причиной такой зависимости, вероятно, является экранирование активных центров ОМ с фрагментами ПДЭАА, которое приводит к затруднению образования комплекса ОМ-трипсин. При этом очевидно, что чем длиннее будут фрагменты ПДЭАА, тем большее влияние они будут оказывать. Отсюда следует, что для максимального сохранения активности НПОМ после его сополимеризации с ДЭАА следует создавать короткие олигомерные фрагменты диэтилакриламида. Однако, как показано выше, такие низкомолекулярные цепи ПДЭАА не обладают способностью к фазовому переходу при повышении температуры и, следовательно, не могут обеспечить термонаправленного транспорта всей системы.

Таким образом, полученные в работе результаты наглядно демонстрируют, что для сохранения высокой активности иммобилизованного белкового препарата по отношению к высокомо-

Таблица 4. Зависимость активности ОМ, входящего в состав сополимера с ДЭАА, от его состава

Состав сополимера НПОМ : ДЭАА, моль/моль	Антитриптическая активность ОМ, % от НПОМ ($\pm 5\%$)
1 : 2500	55
1 : 510	75
1 : 280	81
1 : 130	84

лекулярным субстратам необходимо минимизировать количество полимера-носителя. В то же время следует иметь в виду, что для каждой системы направленного транспорта существуют предельные соотношения между обоими компонентами. Для изученной системы увеличение количества белка в сополимере выше 0.2 мол. % (33 мас. %) приводит к тому, что полученные системы теряют способность к транспорту при изменении температуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoless S., Morton T.F., Sartori M.F. // J. Polym. Sci. 1979. V.17. № 12. P. 4111.
2. Anderson R.G., Brown M.S. // J. Cell. Biol. 1981. V. 88. № 3. P. 441.
3. Yamamoto K., Katsuda N., Kato K. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 92. № 5. P. 499.
4. Kopechek J., Kopechkova-Reimanova P. // J. Chromatogr. Biomed. Appl. 1986. V. 376. № 1. P. 221.
5. Плявинь Ю.А., Блум Э.Я. // Магнитная гидродинамика. 1983. № 4. С. 3.
6. Brannan-Peppas L., Peppas N.A. // J. Contr. Release. 1989. V. 8. № 2. P. 267.
7. Li X., Bennet O.B., Adams N.W., Kim S.W. // Polym. Prepr. 1990. V. 31. № 2. P. 198.
8. Валуев Л.И., Зефирова О.Н., Обыденова И.В., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1993. Т. 35. № 1. С. 83.
9. Валуев Л.И., Чупов В.В., Валуева Т.А., Ванчугова Л.В., Синани В.А., Ноа О.В., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1991. Т. 33. № 1. С. 75
10. Ванчугова Л.В., Валуева Т.А., Валуев Л.И., Ромашкин В.И., Розенфельд М.А., Мосолов В.В., Платэ Н.А. // Биохимия. 1988. Т. 22. № 8. С. 1455.
11. Платэ Н.А., Валуев Л.И., Егоров Н.С., Аль-Нури М.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1977. Т. 13. № 5. С. 673.
12. Kakade M.L., Simons M., Liener Y.E. // Cereal Chem. 1969. V. 46. № 5. P. 518.
13. Платэ Н.А., Валуев Л.И., Чупов В.В. // Высокомолек. соед. А. 1980. Т. 22. № 9. С. 1963.

Transport Functions of an Albumin–Poly(diethylacrylamide) System

**I. L. Valuev, A. A. Antipov, I. V. Obydennova, I. M. Shanazarova,
M. A. Rozenfel'd, L. I. Valuev, and N. A. Platé**

*Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences,
Leninskii pr. 29, Moscow, 117912 Russia*

Abstract—The effects of composition of the albumin–N,N-diethylacrylamide copolymer on its LCST and biological activity were studied. It was shown that as the fraction of albumin in the copolymer grows to 33 wt %, LCST increases. Copolymers with a higher content of albumin show no LCST. The biological activity of immobilized albumin decreases as the content of N,N-diethylacrylamide units in the copolymer grows.