

УДК 541.64:547.96

СИНТЕЗ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕЛКОВ¹

© 2007 г. И. Л. Валуев, Ю. А. Талызенков, И. В. Обыденнова, Л. И. Валуев, Н. А. Платэ

Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиеva Российской академии наук

119991 Москва, Ленинский пр., 29

Поступила в редакцию 05.10.2006 г.

Принята в печать 25.01.2007 г.

Синтезированы сополимеры N,N-диэтилакриламида с N-акрилоилфталимидом. Значения НКТС синтезированных сополимеров уменьшаются как с увеличением ММ сополимеров, так и с повышением содержания звеньев более гидрофобного N-акрилоилфталимида. Реакцией сополимеров с белковым ингибитором протеиназ овомукоидом получены полимерные производные белка. Показано, что с ростом количества иммобилизованного овомукоида его биологическая активность, а также значения НКТС полимерных производных увеличиваются. Изучено влияние биологически активных сред на значения НКТС полимерных производных.

В настоящее время не вызывает сомнения перспективность использования так называемых “умных” полимеров для решения проблемы направленного транспорта лекарственных препаратов в живом организме. Одним из наиболее универсальных способов получения лекарственных препаратов направленного действия является иммобилизация лекарства на полимерном носителе, способном выполнять векторные функции, т.е. транспортировать лекарство в определенный участок организма. К таким носителям следует отнести полимеры, макромолекулы которых могут при изменении некоторых параметров окружающей среды претерпевать конформационные изменения, приводящие к фазовым переходам.

В работе [1] нами был предложен достаточно универсальный подход к созданию лекарственных препаратов направленного действия, который заключался в химическом связывании лекарства с полимером, обладающим НКТС в водных растворах, и нагревании места локализации до температуры выше НКТС. Полимер в этом месте выделяется в отдельную фазу, концентрируя хи-

мически связанное с ним лекарство. Использование термоактивации в качестве движущей силы процесса направленного транспорта представлялось достаточно перспективным, поскольку в зонах воспалений или новообразований нередко наблюдается местное повышение температуры, что должно обеспечивать самопроизвольное концентрирование лекарства в указанных зонах. Кроме того, почти всегда существует возможность локального нагревания органа-мишени и принудительного транспорта лекарства в этот орган. Предложенный подход был проверен в модельных экспериментах на примере лекарств белковой природы с использованием в качестве полимера-носителя тройного сополимера N-изопропилакриламида с акриламидом и N-акрилоилгидроксифталимидом (АФИ) и в дальнейшем развит нами и для других полимерных систем, обладающих НКТС [2–4].

Поскольку при практическом использовании термоактивации в качестве движущей силы транспорта в живом организме возможности изменения температуры крайне невелики (обычно это 3–4°C), то возникает необходимость достаточно тонкого регулирования значений НКТС синтезированных полимерных систем с учетом того, что данные системы должны функционировать в биологически активных средах, которые в свою очередь также способны оказывать влияние на температуру фазовых переходов.

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Отделения химии и наук о материалах РАН (“Разработка методов создания термо- и рН-чувствительных полимеров и изучение зависимости конформационного поведения синтезированных макромолекул от их строения”).

E-mail: ivaluev@ips.ac.ru (Валуев Иван Львович).

В связи с этим цель настоящей работы – изучение зависимости транспортных свойств системы полимер–белок и биологической активности иммобилизованного соединения от строения системы и состава водного раствора, в котором ей предстоит функционировать. В качестве белка в работе использован овомукоид из белка утиных яиц – гликопротеин, основная биологическая функция которого заключается во взаимодействии с протеолитическими ферментами с ингибированием их активности, а в качестве полимера носителя – сopolимеры N,N-диэтилакриламида (ДЭАА) с АФИ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сополимеризацию ДЭАА с АФИ проводили в ДМФА при 80°C, используя ДАК в качестве инициатора. Сополимеры выделяли после испарения ДМФА переосаждением в системе ацетон–гексан. Состав сopolимера определяли из данных элементного анализа. Для иммобилизации овомукоида в раствор сopolимера в 0.1 M *tris*-HCl буфере (pH 8.0) вводили раствор овомукоида и перемешивали 6 ч при комнатной температуре. Продукты отделяли от исходных веществ гель-фильтрацией на Сепарозе 4B.

ММ продуктов оценивали методом упругого светорассеяния на приборе “Malvern-4400” (Великобритания) с 64-канальным коррелятором K7025 в диапазоне углов рассеяния 20°–90°. Образцы обеспыливали пропусканием через мембранные фильтры “Sinpor” (Чехия) с размером пор 0.17 мкм.

Хроматографические исследования проводили на системе “Shimadzu” с использованием колонки Symmetry300 C18 и УФ-детектора (длина волны 280 нм).

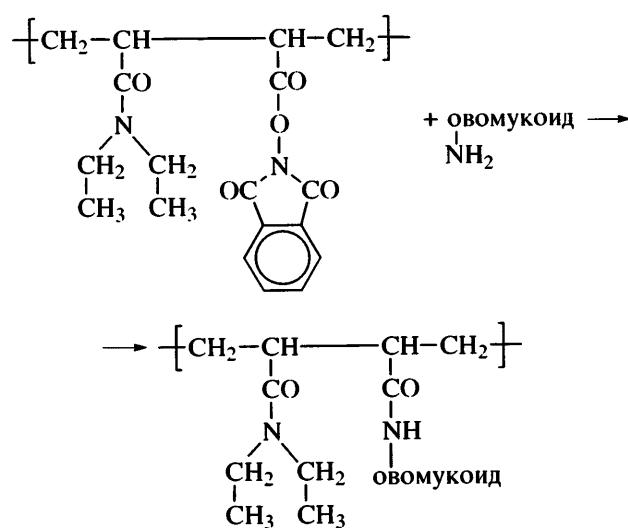
Значения НКТС измеряли по помутнению 1%-ных растворов сopolимеров при 500 нм (скорость нагревания и охлаждения составляла 1 град/мин).

Биологическую активность овомукоида определяли по подавлению им амидазной активности трипсина, используя в качестве субстрата *n*-нитроанилид-N- α -бензоил-D,L-аргинина [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез полимерных систем для термоактивируемого направленного транспорта обычно включает две стадии. На первой стадии получают активированные полимерные носители, способные реагировать с молекулами лекарственного препарата и имеющие НКТС, несколько превышающую физиологическое значение, а на второй стадии проводят иммобилизацию лекарства на этом носителе.

В настоящей работе активированный полимер получали сополимеризацией ДЭАА с АФИ, а иммобилизацию овомукоида осуществляли по схеме



Изучение зависимости состава сopolимеров от состава исходной мономерной смеси показало, что в использованном интервале исходных концентраций сомономеров (1–5 мол. % АФИ) состав сopolимера практически не отличается от состава мономерной смеси. Рассчитанные значения констант сополимеризации для пары ДЭАА (M_1)–АФИ (M_2) равны $r_1 = 0.69 \pm 0.16$, $r_2 = 0.57 \pm 0.12$. Синтезированные носители представляли собой линейные структуры с $M = (2.5 \text{ до } 25.0) \times 10^4$, в которых мольное содержание АФИ варьировалось от 0.9 до 5.2 мол. %.

На рис. 1 приведены температурные зависимости оптической плотности раствора гомополимера ДЭАА, а также растворов сopolимеров ДЭАА и АФИ. Условно кривые можно разбить на два участка. Первый характеризуется незначительными изменениями оптической плотности раствора при постепенном увеличении температуры; рост температуры способствует накоплению со-

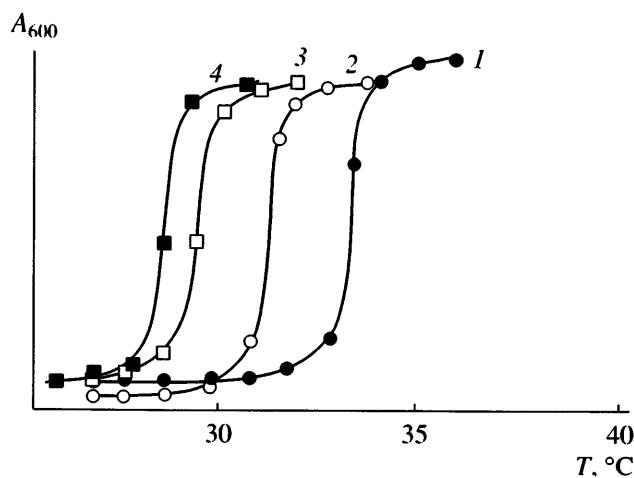


Рис. 1. Температурная зависимость оптической плотности растворов гомополимера ДЭАА (1) и его сополимеров, содержащих 0.9 (2), 3.0 (3) и 5.2 мол. % АФИ (4).

ответствующих структурных зародышей, не нарушающему при этом фазового равновесия. Постепенное накопление конформационных структур при достижении определенной критической температуры приводит к фазовому расслоению – второй участок кривой, характеризующийся значительным увеличением оптической плотности раствора при незначительном повышении температуры. Наличие такого кооперативного перехода при температурах вблизи НКТС наблюдалось также для сополимеров N-изопропилакриламида с N-метакрилоил-L-лейцином при изучении их спектров кругового дихроизма [6].

Значения НКТС синтезированных сополимеров, как и следовало ожидать, уменьшаются как с увеличением ММ сополимеров, так и с повышением содержания звеньев более гидрофобного сомономера – АФИ (табл. 1).

Иммобилизацию овомуконда проводили путем смешивания водных растворов сополимера и белка при комнатной температуре. Протекание реакции контролировали с использованием методов высокоеффективной хроматографии и светорассеяния. На рис. 2 представлены хроматограммы растворов белка, исходного сополимера и продуктов их взаимодействия.

На хроматограмме четко виден характерный для индивидуальных белков пик, который в процессе реакции с сополимером теряет свою остроту и приобретает более размытый присущий полиме-

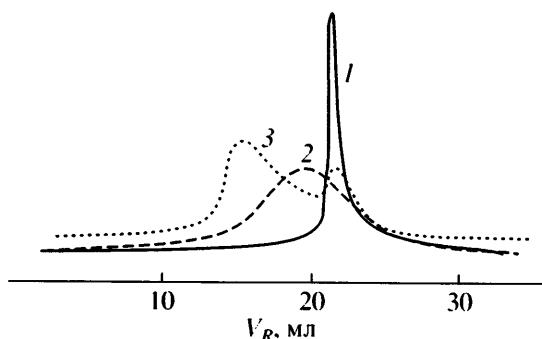


Рис. 2. Кривые ГПХ раствора овомуконда (1), сополимера ДЭАА, содержащего 3 мол. % АФИ ($M = 3.0 \times 10^4$) (2), и продукта их взаимодействия (соотношение сополимер : овомуконд = 1 : 1) (3).

рам вид. При этом следует отметить, что сами продукты взаимодействия белков с сополимером благодаря своей полимерной составляющей характеризуются широким молекулярно-массовым распределением.

Исчезновение пика исходного белка в продуктах реакции указывает на то, что весь введенный в реакцию овомуконд взаимодействует с сополимером. Это подтверждают также результаты изучения синтезированных производных овомуконда методом упругого светорассеяния при температуре ниже НКТС (табл. 2). Видно, что повышение содержания овомуконда в исходной смеси приводит к пропорциональному росту ММ продукта реакции.

Зависимость измеряемой ММ продукта реакции от температуры, представленная на рис. 3, показывает, что при увеличении температуры на начальном этапе ММ не изменяется. Затем при

Таблица 1. Зависимость значения НКТС сополимеров от доли звеньев АФИ в сополимере при различных ММ

Доля АФИ в сополимере, мол. %	НКТС ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) для сополимеров с разной ММ		
	$(2.5-3.5) \times 10^4$	$(7.5-9.7) \times 10^4$	$(21.0-25.0) \times 10^4$
0	34.0	33.0	30.0
0.9 ± 0.2	32.0	31.5	28.5
2.1 ± 0.3	29.5	30.0	27.5
3.0 ± 0.4	29.0	29.0	26.5
4.3 ± 0.4	28.0	28.5	26.0
5.2 ± 0.5	27.5	27.5	25.0

Таблица 2. Молекулярные характеристики полимерных производных овомукоида при температурах ниже и вблизи критической

Мольное соотношение сополимер : овомукоид в исходной смеси	$M \times 10^{-4}$		НКТС, °C (± 0.5)	A*, % от исходной
	ниже НКТС ($\pm 7\%$)	вблизи НКТС ($\pm 10\%$)		
Исходный сополимер	8.5	80.0	29.0	—
1 : 1	12.0	75.0	36.0	56
1 : 2	15.5	61.0	39.5	72
1 : 3	20.0	39.0	41.0	86

* Антитриптическая активность овомукоида.

незначительном повышении температуры происходит лавинообразный рост ММ, что обусловлено увеличением вероятности взаимодействия макромолекул полученных производных овомукоида между собой с их дальнейшей ассоциацией (рис. 3).

Как показывают данные табл. 2, с увеличением содержания овомукоида в системе разница ММ производных овомукоида при температурах ниже и вблизи НКТС (степень ассоциации) уменьшается.

Зависимость НКТС синтезированных производных овомукоида и антитриптической активности иммобилизованного овомукоида от состава

этих производных носит тот же характер, что и для описанных ранее сополимеров ненасыщенного производного овомукоида и ДЭАА [7]. Иммобилизация объемистой макромолекулы белка увеличивает гидрофильность исходного сополимера, повышая тем самым его НКТС. И чем больше макромолекул белка связано с полимерной цепочкой, тем меньше влияние самой полимерной цепи на растворимость и тем выше значение НКТС. Иммобилизация более трех молекул овомукоида на одной макромолекуле носителя приводит к образованию производного, не имеющего НКТС и полностью растворимого в воде в широком интервале температур.

Ингибиторная активность иммобилизованного овомукоида уменьшается с увеличением доли синтетического носителя и основной причиной этого, скорее всего, являются стерические препятствия, создаваемые синтетической макромолекулой для взаимодействия овомукоида с достаточно высокомолекулярным трипсином ($M = 24.5 \times 10^3$). То же относится и к активности углеводной части овомукоида, которую оценивали путем измерения константы взаимодействия овомукоида с конканавалином А (Кон А) ($M = 10.2 \times 10^5$). Значение этой константы составляет $(2.5 \pm 0.5) \times 10^3$, $(2.2 \pm 0.5) \times 10^3$, $(1.8 \pm 0.5) \times 10^3$ и $(1.2 \pm 0.5) \times 10^3$ л/моль для нативного овомукоида и овомукоида, иммобилизованного на сополимере ДЭАА-АФИ при соотношении сополимер : овомукоид = 1 : 3, 1 : 2 и 1 : 1 соответственно.

Поскольку синтезированные полимерные системы предполагается использовать в биологически активных средах живого организма, необходимо было выяснить влияние некоторых компонентов данных сред на значение НКТС. В качестве таких компонентов были использованы не взаи-

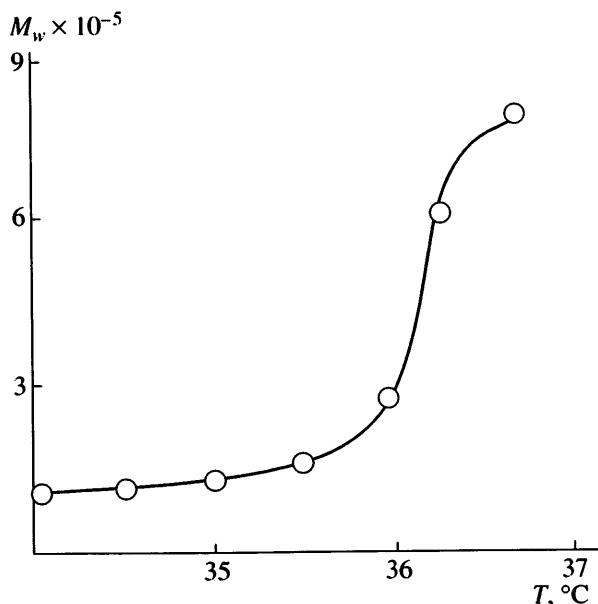


Рис. 3. Температурная зависимость ММ сополимера овомукоида и ДЭАА-АФИ (при мольном соотношении сополимер : овомукоид = 1 : 1).

модействующие с иммобилизованным овомукоидом соединения (NaCl и сывороточный альбумин, СА); соединения, которые образуют достаточно прочные комплексы с углеводной частью овому-

коида (Кон А) или его белковым компонентом (трипсин), а также плазма крови человека. Ниже приведены значения НКТС для мольного соотношения сополимер : овомукоид = 1 : 1:

Раствор	Вода	NaCl	СА	Кон А	Трипсин	Плазма
(концентрация, мг/мл)	—	(10)	(10)	(5)	(1.5)	—
НКТС, °C (± 0.5)	36.0	34.5	34.5	38.0	37.5	38.0

Видно, что связывание молекулы иммобилизованного овомукоида в комплекс с белками повышает гидрофильность полимерного производного, что и приводит к некоторому увеличению значений НКТС. В то же время растворение в воде не взаимодействующих с овомукоидом соединений, напротив, понижает значение НКТС. Понижение НКТС при добавлении NaCl наблюдали также в работе [8] для сополимеров на основе N-изопропилакриламида. Эти эффекты хотя невелики по абсолютному значению, однако их необходимо учитывать при возможном практическом применении синтезированных систем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Валуев Л.И., Зефирова О.Н., Обыденнова И.В., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1993. Т. 35. № 1. С. 83.
2. Valuev L.I., Zefirova O.N., Obydennova I.V., Plate N.A. // J. Bioact. and Compat. Polym. 1994. V. 9. № 1. P. 55.
3. Валуев И.Л., Антипов А.А., Обыденнова И.В., Шаназарова И.М., Розенфельд М.А., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. Б. 2000. Т. 42. № 8. С. 1419.
4. Валуев И.Л., Обыденнова И.В., Сытов Г.А., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. Б. 2005. Т. 47. № 4. С. 716.
5. Kakade M.L., Simons M., Liener Y.E. // Cereal. Chem. 1969. V. 46. № 5. P. 518.
6. Lebon F., Bignotti F., Penco M., Gangemi R., Longhi G., Abbate S. // Chirality. 2003. V. 15. № 3. P. 251.
7. Валуев Л.И., Валуев И.Л., Шаназарова И.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 1. С. 33.
8. Eeckman F., Moes A.J., Amighi K. // Int. J. Pharm. 2002. V. 241. № 1. P. 113.

Synthesis and Functional Properties of Thermosensitive Polymer Derivatives of Proteins

I. L. Valuev, Yu. A. Talyzenkov, I. V. Obydennova, L. I. Valuev, and N. A. Platé

Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences,
Leninskii pr. 29, Moscow, 119991 Russia
e-mail: ivaluev@ips.ac.ru

Abstract—N,N-Diethylacrylamide–N-acryloylphthalimide copolymers have been synthesized. The LCST of the synthesized copolymers decreases with increase in both the molecular mass of the copolymers and the content of more hydrophobic N-acryloylphthalimide units. Through the reaction of the copolymers with the proteinase enzyme inhibitor, ovomucoid, the polymer derivatives of protein have been prepared. It has been shown that the biological activity of ovomucoid and the LCST of polymer derivatives increase with the amount of the immobilized ovomucoid. The effect of biologically active media on the LCST values of polymer derivatives has been studied.