



УДК 577.156;547.963;541.64:542.953;577.15.3:541.127

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА РАСТВОРИМЫХ ГЕТЕРОБЕЛКОВЫХ КОНЪЮГАТОВ НА ОСНОВЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

© 1995 г. С. В. Кольцова

*Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004, Санкт-Петербург,
Васильевский остров, Большой проспект, 31*

Поступила в редакцию 20.10.93 г. После доработки 20.10.94 г.

На примере сывороточного альбумина и протеолитических ферментов (урокиназы, трипсина, α -химотрипсина) исследованы закономерности направленной поликонденсации разных по заряду белков с помощью глутарового альдегида. Показано, что электростатическое взаимодействие разнозаряженных белковых макромономеров в процессе поликонденсации обеспечивает избирательный синтез растворимых гетеробелковых конъюгатов регулируемого компонентного состава с полным сохранением каталитической активности и высоким содержанием фермента (до 3 - 4 молекул фермента на молекулу альбумина) в конъюгатах с молекулярной массой от 2×10^5 до 9×10^5 . Изучена зависимость констант скоростей и активационных параметров процесса термоинактивации гетероконъюгатов от их состава, молекулярной массы и степени модификации аминогрупп белков. Показано, что гетероконъюгаты электрически асимметричных белков, в частности трипсина и сывороточного альбумина, в сотни раз и более стабильнее нативного фермента в нейтральном растворе в интервале 38 - 60°C.

Ключевые слова: иммобилизованные протеолитические ферменты, белковые конъюгаты, поликонденсация, электростатическое взаимодействие, термальная стабильность.

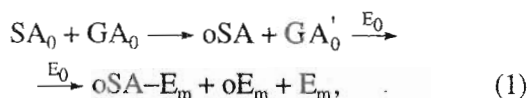
В связи с проблемой поиска рациональных путей конструирования новых полимерных лекарственных веществ неуклонно возрастает актуальность исследований, направленных на получение растворимых гетеробелковых конъюгатов с помощью би- или полифункциональных сшивающих агентов [1 - 3]. Можно полагать, что сшивка белков (ферментов) является одним из наиболее прогрессивных подходов к созданию нового класса физиологически активных веществ повышенной селективности и комбинированного действия, способных к биодegradации и пролонгированному действию в организме [2].

В статье представлены результаты исследования ковалентной сшивки сывороточного альбумина с рядом протеолитических ферментов: урокиназой, трипсином и α -химотрипсином. В качестве сшивающего агента использован глутаровый альдегид [4], в основе взаимодействия которого с непротонированными аминогруппами белков лежит реакция конденсации, протекающая с обра-

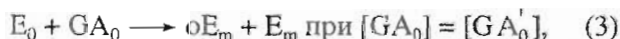
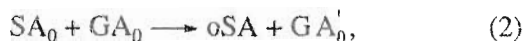
зованием как внутри-, так и межмолекулярных мостиков. В отличие от широко используемой статистической сшивки белков с помощью глутарового альдегида [2, 4] в данной работе исследован процесс направленной поликонденсации белковых макромолекул, включающий в себя использование белкового носителя в олигомерных формах заданного диапазона молекулярных масс, варьирование числа модифицированных глутаровым альдегидом аминогрупп взаимодействующих белков и учет электростатического взаимодействия диполярных белковых макромономеров в процессе поликонденсации. Кроме этого в статье представлены данные кинетического изучения термостабильности полученных гетеробелковых конъюгатов. Исследование проведено с целью изучения закономерностей формирования растворимых гетеробелковых конъюгатов в процессе поликонденсации разнозаряженных белков, а также с целью определения оптимальных экспериментальных параметров избирательного синтеза высокоактивных гетероконъюгатов регулируемой молекулярной массы и регулируемого компонентного состава, обогащенных ферментом и обладающих значительной термостабильностью.

Сокращения: UK - урокиназа, T - трипсин, CT - α -химотрипсин, SA - сывороточный альбумин, Hb - гемоглобин, GA - глутаровый альдегид, E - фермент, oSA и oHb - олигомерный сывороточный альбумин и олигомерный гемоглобин, oSA-E и oHb-E - гетеробелковые конъюгаты.

Ранее [5] было предложено использовать олигомерный сывороточный альбумин и олигомерный гемоглобин широкого спектра молекулярных масс в качестве водорастворимых, биodeградируемых носителей для ферментов различных классов. Разработан метод направленной поликонденсации белков, в котором осуществляется ковалентная фиксация фермента на поверхности плотно упакованного [6] олигомерного носителя, что практически исключает маскирование активного центра и связанную с этим потерю каталитической активности иммобилизованного фермента. В основе метода лежит следующая схема сшивки белков:



где SA_0 , GA_0 и E_0 – исходные формы сывороточного альбумина, глутарового альдегида и фермента; oSA – олигомерный альбумин; GA'_0 – свободный глутаровый альдегид, оставшийся после модификации аминокрупп в альбумине и образования oSA . Возможные продукты реакции: E_m – модифицированный глутаровым альдегидом GA'_0 мономерный фермент, oE_m – олигомерный фермент, $oSA-E_m$ – гетеробелковый конъюгат. Конъюгаты типа $SA-E_m$ в схеме не рассматриваются, так как сшивку SA_0 проводили до практически полного его включения в oSA . В независимых экспериментах, проведенных в две стадии:



после гель-хроматографического разделения продуктов реакции определяется средневесовая молекулярная масса (\bar{M}_w) олигомерного носителя, число модифицированных аминокрупп белков в продуктах реакции, концентрация свободных альдегидных групп (GA'_0) и доля oE_m , которая соответствует максимально возможной доле олигомерного фермента в конечных продуктах поликонденсации, полученных по реакции (1). Концентрации SA_0 и GA_0 в реакциях (1) и (2) и E_0 в реакциях (1) и (3) одинаковы. В реакционных смесях (1), (2, в 1/2 объема) и (3) после окончания процесса сшивки белков двойные связи восстанавливаются добавлением боргидрида натрия, что обеспечивает устойчивость продуктов поликонденсации в процессе их дальнейшего анализа. Во вторую половину реакционной смеси (2) добавляется избыток лизина для определения концентрации свободного глутарового альдегида (GA'_0) по методике работы [7].

Для синтеза гетероконъюгатов на основе указанных выше разнозаряженных белков (ферментов) исследованы два варианта поликонденсации по реакции (1): I – концентрация GA'_0 равна 0; II – концентрация GA'_0 не равна 0.

Вариант I реакции (1):

концентрация GA'_0 равна 0.

Этот вариант синтеза гетеробелковых конъюгатов описан в работе [5], поэтому в нашей статье детали эксперимента не обсуждаются, а приведены только те данные, которые представляют интерес для сопоставления с новыми результатами. При проведении реакции (1) по I варианту осуществлялся сравнительный анализ двух реакций – (1) и (2), поскольку глутаровый альдегид модифицирует аминокруппы только белкового носителя (4–5 аминокрупп на молекулу SA или Hb). Присоединение фермента к олигомерному носителю происходит при отсутствии в реакционной смеси свободного глутарового альдегида (GA'_0), что исключает возможность образования олигомеров фермента по реакции (3) и не приводит к снижению его активности, которое, как правило, наблюдается при статистической сшивке белков (ферментов) [8, 9]. В результате были получены растворимые гетеробелковые конъюгаты с \bar{M}_w от 2×10^5 до 9×10^5 , в которых полностью сохраняется каталитическая активность исследованных протеолитических ферментов по высокомолекулярным субстратам – фибрину (трипсин и α -химотрипсин) и плазминогену (урокиназа). Для I варианта реакции (1) $E_m \equiv E_0$.

В табл. 1 приведены некоторые характеристики гетероконъюгатов, синтезированных по варианту I в работе [5], таблица дополнена двумя новыми системами (4 и 5). Хотя система 4 (oSA – стрептокиназа) не является протеолитической, включение ее в эту таблицу, по-видимому, уместно, поскольку эта система ярко демонстрирует обсуждаемый ниже эффект электростатического взаимодействия белков в процессе их поликонденсации с помощью глутарового альдегида. Видно, что I вариант реакции (1) позволяет получить широкий набор растворимых высокоактивных гетеробелковых конъюгатов, включающих один или два исследованных фермента. Однако полное связывание ферментов достигается только при большом молярном избытке белкового носителя в реакционной смеси (20–40 моль/моль E_0), что связано, безусловно, с низким содержанием активированных аминокрупп на поверхности олигомерного носителя. При этом наблюдается четкая зависимость доли связанного фермента от суммарного заряда взаимодействующих белковых

Таблица 1. Растворимые гетеробелковые конъюгаты, полученные по варианту I реакции (1) [5]

Номер системы	Гетероконъюгаты $\bar{M}_w (2-9) \times 10^5$	$SA_0(Hb_0)/E_0$ в реакционной смеси, моль/моль	$(oSA(oHb)-E_0)/E_0$	Активность иммобилизованного фермента, % от исходной
1	oSA-трипсин	1	0.10	100
		5	0.25	100
		10	0.55	100
		20	1.0	100
2	oSA-урокиназа	10	0.35	100
		20	0.50	100
		40	1.0	100
3	oHb-урокиназа	5	0.30	100
		20	0.65	100
4	oSA-стрептокиназа*	10	0.10	100
		25	0.30	100
		40	0.60	100
5	oSA $\left\{ \begin{array}{l} \text{трипсин} \\ \text{урокиназа} \end{array} \right.$	40	1.0	100
		40	0.60	100

* В системе oSA – стрептокиназа измерялась каталитическая активность не самой стрептокиназы (которая лишена протеолитической активности), а активных комплексов стрептокиназы с плазминогеном, образующихся в процессе определения активности использованным в данной работе методом.

макрономеров. Так, в системе разнозаряженных белков (SA с pI 4.8 и трипсин с pI 10.8) полное связывание трипсина с oSA наблюдается при молярном соотношении $SA_0/T_0 = 20$ в реакционной смеси при pH 7.0, в то время как при сшивке белков с одинаковыми изоэлектрическими точками (SA и стрептокиназы с pI 4.7) не удается достичь полного включения стрептокиназы в гетероконъюгаты с oSA даже при исходном молярном избытке SA_0 , равном 40 моль/моль стрептокиназы. Электростатический эффект ярко проявляется при синтезе тройной системы гетероконъюгатов (T_0 -oSA-UK₀). Как видно из табл. 1, при исходных молярных соотношениях $SA_0/T_0(UK_0) = 40$, обеспечивающих полное включение трипсина и урокиназы в двойные конъюгаты oSA- T_0 и oSA-UK₀, в тройной гетероконъюгат T_0 -oSA-UK₀ полностью включен только трипсин, а урокиназа, для которой pI равно 7.6 - 9.7 (изоформы), связана только на 60%.

Таким образом, I вариант реакции (1) не позволяет синтезировать гетеробелковые конъюгаты с высоким молярным содержанием ферментов, что в определенной степени снижает достоинства данного подхода к созданию полимерных модификаций ферментов.

Для получения гетероконъюгатов с высоким содержанием фермента (до 3 - 4 моль фермента на 1 моль мономерного белкового носителя) был исследован процесс направленного избирательного синтеза гетеробелковых конъюгатов на основе разнозаряженных белков в условиях моди-

фикации аминокрупп как олигомерного носителя, так и фермента, при низкой концентрации белковых макрономеров с учетом их электростатического взаимодействия. Этот вариант сшивки белков (вариант II) рассмотрен в данной статье детально на примере сывороточного альбумина и трипсина (или α -химотрипсина).

*Вариант II реакции (1):
концентрация GA_0' не равна 0*

В этом варианте проводился сравнительный анализ процессов (1), (2) и (3). Сшивка сывороточного альбумина осуществлялась при избытке глутарового альдегида (2 моль и более альдегидных групп GA_0 на 1 моль аминокрупп SA_0), обеспечивающем модификацию наиболее реакционно-способных 14 аминокрупп белка [10] и наличие несвязанного глутарового альдегида (GA_0') после образования oSA. Концентрацию GA_0 варьировали в узких пределах, обеспечивающих постоянную степень модификации аминокрупп альбумина (14 аминокрупп) и переменную концентрацию GA_0' , позволяющую модифицировать от 3 до 8 аминокрупп трипсина или α -химотрипсина, что составляет 21 - 57% общего числа (равного 14) ϵ -аминогрупп, расположенных на поверхности макромолекул этих ферментов [11, 12]. После окончания реакций (1) в реакционной смеси определяли активность ферментов по высокомолекулярному субстрату (фибрину), которая во всех исследованных

случаях составила около 100% их исходной активности.

При получении гетеробелковых конъюгатов α SA- T_m и α SA- CT_m для определения доли включенного в конъюгат фермента и расчета компонентного состава конъюгатов проводился гель-хроматографический анализ конечных продуктов поликонденсации на сефарозе 6В. В качестве элюента использовали 0.2 М фосфатный буфер с pH 7.0, что, как было показано в соответствующих контрольных экспериментах, полностью исключает присутствие в элюатах ион-ионных комплексов белковых компонентов. Поэтому полученные хроматограммы могут служить надежным доказательством образования ковалентных гетеробелковых конъюгатов. На рис. 1 для примера приведена хроматограмма конечных продуктов реакции трипсина с α SA, полученных по II варианту реакции (1) для случая модификации 8 аминокрупп трипсина. Для сравнения приведены контрольные хроматограммы трипсина исходного (T_0) и модифицированного (T_m) по реакции (3).

Контрольные хроматограммы (пик II) свидетельствуют о том, что в исследованных разбавленных растворах белков не образуются высокомолекулярные олигомеры трипсина. Для модифицированного трипсина наблюдается присутствие лишь небольшой примеси димеров и тримеров, которая исчезает в контрольных хроматограммах по мере уменьшения числа модифицированных аминокрупп трипсина с 8 до 3. Следовательно, пик I на приведенной хроматограмме представляет собой гетероконъюгат α SA- T_m , в который в условиях эксперимента включено свыше 90% исходного количества трипсина.

Следует подчеркнуть, что в присутствии α SA практически не образуется даже примеси димеров и тримеров трипсина (а модифицированный трипсин избирательно связывается только с олигомерным альбумином), поскольку их образование по реакции (3) сопровождается снижением исходной каталитической активности, а активность конечных продуктов поликонденсации по реакции (1) составляет 100% активности исходного трипсина. Аналогичные результаты были получены при хроматографическом анализе продуктов поликонденсации α SA с α -химотрипсином, проведенной по II варианту реакции (1).

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать определенный вывод о том, что в исследованных системах разнозаряженных белков при их низкой концентрации (порядка 1×10^{-4} М) и модификации аминокрупп как носителя, так и фермента происходит избирательный синтез гетеробелковых конъюгатов.

С учетом того факта, что в процессе производимой полимерной модификации ферментов их каталитическая активность полностью сохраняется

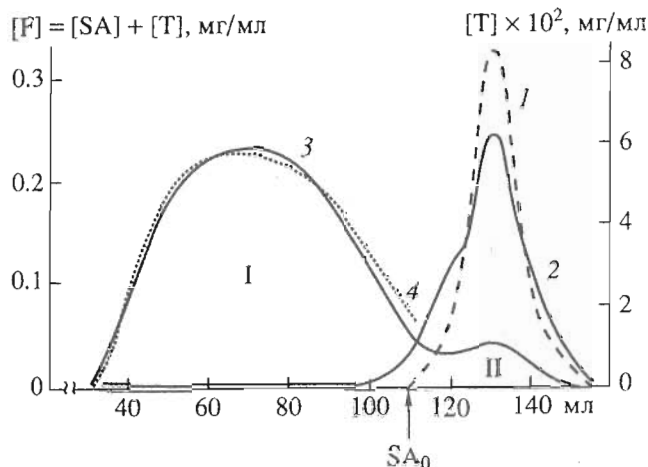


Рис. 1. Гель-хроматография (сефароза 6В (1.7 × 67 см), элюент – 0.2 М фосфатный буфер, pH 7.0) продуктов поликонденсации трипсина с олигоальбумином, проведенной по варианту II, с контролем по содержанию в реакционной смеси трипсина по [35] (3; правая ось ординат) и общего белка (P) по [34] (4; левая ось ординат); 1 и 2 – контрольные хроматограммы исходного трипсина (T_0) и трипсина, в котором модифицировано 8 аминокрупп по реакции (3). Пик I – α SA- T_m , пик II – свободный трипсин. Стрелкой показано место выхода SA_0 . Условия реакции (1): pH 7.0; ионная сила 0.15; 8°C, время реакции 1 ч; в трипсине модифицировано 8 аминокрупп, в SA – 14, молярное соотношение $SA_0/T_0 = 1$ в реакционной смеси. $[-CHO]_{GA_0} / [-NH_2]_{SA_0} = 3$ моль/моль в реакциях (1) и (2), $[-CHO]_{GA_0} / [-NH_2]_{T_0} = 4$ моль/моль в реакциях (1) и (3).

ся, на основе хроматограмм и определения во фракциях общей концентрации белка и концентрации ферментов (по данным измерения активности с использованием соответствующей калибровочной зависимости для расчета концентрации) рассчитывалась доля связанного фермента и концентрация белка-носителя (как разность между общей концентрацией белка и концентрацией фермента). Из полученных данных рассчитывался компонентный состав гетеробелковых конъюгатов – количество молекул фермента на молекулу мономерного сывороточного альбумина.

На основе хроматограмм конечных продуктов реакции α SA с T_m или CT_m , полученных при различных исходных концентрациях глутарового альдегида (GA_0) и, следовательно, различных концентрациях GA_0 , обеспечивающих различную степень модификации аминокрупп ферментов, исследовалась зависимость доли включенных в гетероконъюгаты трипсина (химотрипсина) и компонентного состава конъюгатов от числа модифицированных аминокрупп ферментов при постоянстве этого параметра для олигомерного

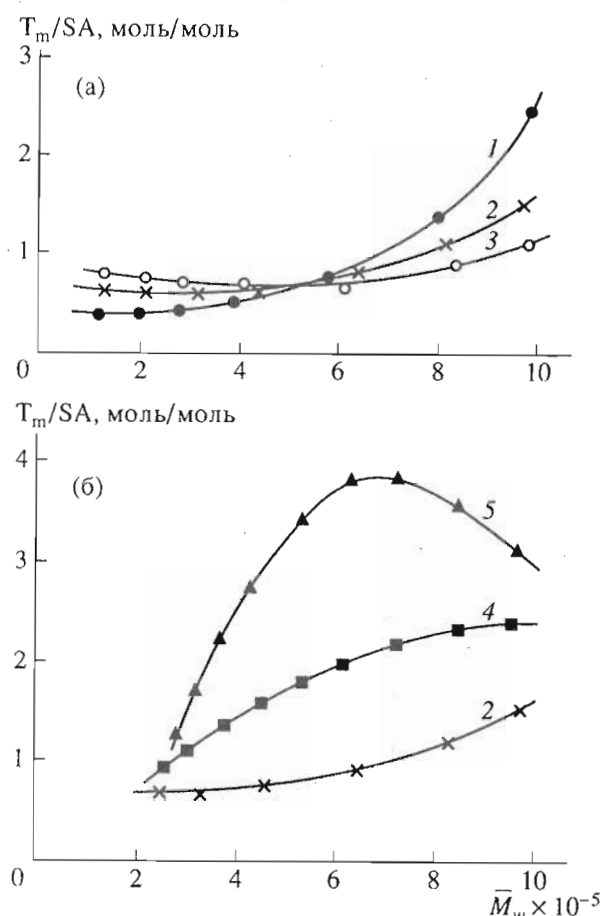


Рис. 2. Влияние степени модификации аминокрупп трипсина (а) и его концентрации (б) на состав гетероконъюгатов трипсина с олигоальбумином в зависимости от их молекулярно-веса. Количество модифицированных аминокрупп: в альбумине – 14, в трипсине – 3 (1); 5 (2, 4, 5) и 8 (3) моль/моль белка, $[SA_0]$ 0.5×10^{-4} М, $[T_0]$ 0.5×10^{-4} (1 - 3); 1×10^{-4} (4) и 2×10^{-4} М (5). Время реакции 1 ч, pH 7.0; ионная сила 0.15; 8°C.

носителя. Полученные данные для системы oSA-T_m представлены в табл. 2 и на рис. 2.

Из табл. 2 видно, что в исследованных условиях доля связанного с oSA трипсина возрастает с

0.35 до 1.0 при увеличении числа его модифицированных аминокрупп с 3 до 8. Зависимость состава гетероконъюгатов от их молекулярной массы для трех исследованных степеней модификации аминокрупп трипсина (3, 5 и 8 аминокрупп на молекулу трипсина) показывает (рис. 2а), что состав конъюгатов oSA-T_m варьирует от 0.3 до 2.0 моль трипсина на 1 моль SA в интервале \bar{M}_w от 2×10^5 до 9×10^5 при эквимолярном соотношении этих белков в исходной реакционной смеси. Увеличение концентрации исходного трипсина в 4 раза при одинаковой степени модификации его аминокрупп (5 аминокрупп) повышает содержание фермента в гетероконъюгатах до 1 - 4 моль трипсина на 1 моль SA в указанном выше интервале молекулярных масс конъюгатов (рис. 2б).

В табл. 2 проведено также сравнение вариантов I и II синтеза гетеробелковых конъюгатов по реакции (1) на примере системы oSA-трипсин. Видно, что вариант II, основанный на модификации аминокрупп как носителя, так и фермента, обладает явным преимуществом, так как не только обеспечивает сохранение каталитической активности трипсина в конъюгатах с oSA различной молекулярной массы, но и позволяет при модификации около 50% общего числа аминокрупп трипсина полностью включить фермент в конъюгаты при эквимолярном соотношении макромономеров в исходной реакционной смеси, в то время как в варианте I для этого требуется 20-кратный избыток SA. При этом время реакции в варианте II меньше в 4 раза.

Изучение закономерностей реакции поликонденсации трипсина и α -химотрипсина с олигоальбумином при варьировании ионной силы раствора позволило оценить вклад электростатического взаимодействия в процесс химической сшивки белков и показало, что этот вклад регулируется степенью модификации аминокрупп ферментов при постоянстве этого фактора для альбумина (рис. 3). При модификации около 20% общего числа аминокрупп трипсина (СТ) и эквимолярном соотношении SA₀/T₀ в реакционной

Таблица 2. Сопоставление вариантов I и II синтеза растворимых гетеробелковых конъюгатов с \bar{M}_w $(2 - 9) \times 10^5$ по реакции (1) на примере системы олигоальбумин-трипсин

Вариант реакции (1)	Число модифицированных аминокрупп, моль/моль SA	Число модифицированных аминокрупп, моль/моль трипсина	SA ₀ /T ₀ в реакционной смеси, моль/моль	Время реакции, ч	Активность иммобилизованного трипсина, % от исходной	(oSA-T ₀ (T _m))/T ₀
I	4	0	1	4	100	0.10
	4	0	10	4	100	0.55
	4	0	20	4	100	1.0
II	14	3	1	1	100	0.35
	14	5	1	1	100	0.60
	14	8	1	1	100	1.0

смеси доля включенного в гетероконъюгаты фермента при уменьшении ионной силы с 0.2 до 0.02 резко возрастает (с 0.3 до 0.8 для T_m и с 0.15 до 0.6 для CT_m), что приводит к увеличению молярного содержания трипсина (химотрипсина) в гетероконъюгатах (рис. 3а, 1 - 4; рис. 3б, 9, 10). Это обусловлено, вероятно, дополнительным ионным взаимодействием оставшихся немодифицированными аминокислотными группами ферментов с карбоксильными группами олигоальбумина и "концентрированием" макрокатионов T_m или CT_m вблизи поверхности отрицательно заряженного олигомерного носителя. При модификации более 50% аминокислотных групп трипсина, т.е. при значительном уменьшении числа свободных аминокислотных групп, эффект электростатического притяжения макромолекул трипсина и альбумина практически не проявляется, и в интервале ионной силы 0.02 - 0.2 состав гетероконъюгатов $oSA-T_m$ остается постоянным и близким к исходному молярному соотношению этих белков в реакционной смеси (рис. 3а, 7, 8).

Сравнение составов гетероконъюгатов $oSA-T_m$ и $oSA-CT_m$ (рис. 3а, 3б) свидетельствует о существенной роли в их формировании топологии заряженных групп на поверхности макромолекул белков. При большом сходстве физико-химических характеристик трипсина и α -химотрипсина и одинаковой степени модификации их аминокислотных групп (при практически равном их общем количестве и полной доступности) "полюсное" распределение заряженных групп в трипсине в отличие от равномерного в α -химотрипсине [13] приводит к резкому возрастанию содержания T_m в высокомолекулярных гетероконъюгатах. Этот результат можно объяснить сильным электростатическим взаимодействием электрически асимметричных макромономеров трипсина и сывороточного альбумина [14]. Естественно, что величина электростатического эффекта будет возрастать с увеличением \bar{M}_w oSA , что может объяснить наблюдаемую резкую зависимость состава конъюгатов $oSA-T_m$ от их молекулярной массы. При увеличении концентрации трипсина в реакционной смеси можно достичь высокого содержания T_m и в низкомолекулярных конъюгатах при ионной силе 0.02 (рис. 3а, 5, 6). В отличие от трипсина для α -химотрипсина таких эффектов не наблюдается и фермент равномерно распределен в гетероконъюгатах $oSA-CT_m$ во всем исследованном интервале их молекулярных масс.

Таким образом, представленные на рис. 3 данные демонстрируют второе преимущество варианта II сшивки белков - возможность регулирования содержания исследованных ферментов в гетероконъюгатах от 0.3 до 3 - 4 моль на 1 моль мономерного альбумина (при изменении степени модификации аминокислотных групп ферментов, их концен-

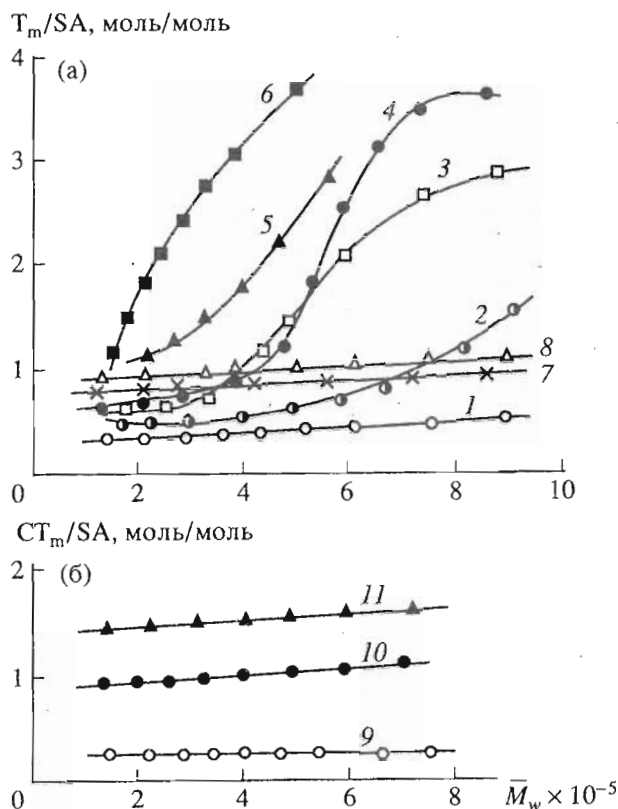


Рис. 3. Зависимость состава гетероконъюгатов олигоальбумина с трипсином (а) и α -химотрипсином (б) от их молекулярно-весового распределения при количестве модифицированных аминокислотных групп: SA - 14; T_m (CT_m) - 3 (1 - 6; 9 - 11) и 8 моль/моль белка (7, 8) и ионной силе раствора 0.2 (1, 7, 9); 0.1 (2); 0.05 (3) и 0.02 (4 - 6; 8, 10, 11). Концентрация белков в реакционных смесях (M): $[SA_0] 0.5 \times 10^{-4}$, $[T_m(CT_m)] = 0.5 \times 10^{-4}$ (1 - 4; 7 - 10); 1×10^{-4} (5, 11) и 2×10^{-4} (6). Время реакции 1 ч, pH 7.0; 8°C.

трации в реакционной смеси и ионной силы раствора) в интервале молекулярных масс гетероконъюгатов $2 \times 10^5 - 9 \times 10^5$.

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕТЕРОБЕЛКОВЫХ КОНЪЮГАТОВ

Проведено кинетическое исследование не-обратимой тепловой инактивации трипсина и α -химотрипсина, нативных и включенных в гетероконъюгаты с oSA по варианту II, при pH 7.5 в интервале 38 - 75°C. Количественной мерой стабилизации служила величина эффекта стабилизации (Θ^i) при данной температуре, который представляет собой отношение констант скоростей инактивации нативного и иммобилизованного фермента [15]. Для исследованных систем эффект стабилизации $\Theta^i = k(E_0)/k(oSA-E_m)$. Если $\Theta^i > 1$, значит, иммобилизация ферментов стабилизирует их при данной температуре. Изучена зависимость эффекта стабилизации от молекулярной

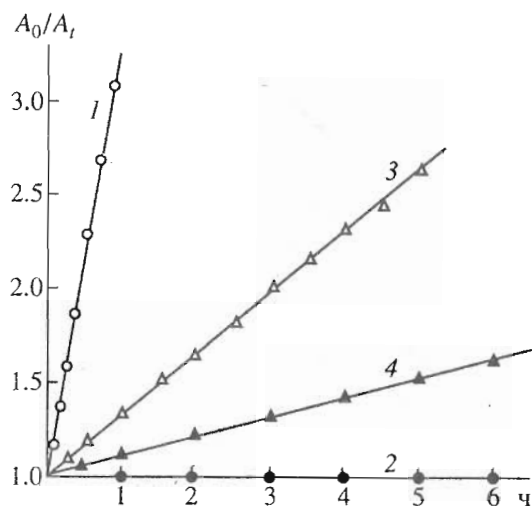


Рис. 4. Зависимость обратной относительной активности трипсина, α -химотрипсина и их гетероконъюгатов с олигоальбумином от времени инкубации в условиях автолиза. Условия: 0.1 М фосфатный буфер, pH 7.5; 38 - 48°C. $[T_0]_0 = [CT_0]_0 = [oSA-T_m(\text{по ферменту})]_0 = [oSA-CT_m(\text{по ферменту})]_0 = 1 \times 10^{-5}$ М, субстрат - фибрин. 1 - T_0 (38°C); 2 - $oSA-T_m$ (38 - 48°C), образцы 3 - 10 из табл. 3; 3 - CT_0 (38°C); 4 - $oSA-CT_m$ (38°C), образец 11: \bar{M}_w 2.2×10^5 , молярное соотношение в конъюгате $CT_m/SA = 1.3$. A_0 - исходная активность, A_t - активность после инкубации в течение времени t .

массы и состава гетероконъюгатов, а также от числа модифицированных аминогрупп ферментов при постоянном значении этой характеристики для олигомерного альбумина. Проведено сопоставление термостабильности гетероконъюга-

тов, полученных различными методами сшивки трипсина с SA с помощью GA.

Известно [16 - 21], что при температурах ниже 45°C в области pH 5 - 9 инактивация нативных трипсина и химотрипсина следует кинетике реакции второго порядка и протекает по схеме, включающей быструю обратимую денатурацию ферментов с последующим гидролизом денатурированного фермента нативным (автолиз). При более высоких температурах инактивация этих ферментов в разбавленных растворах (порядка 10^{-6} М и ниже) характеризуется константой скорости первого порядка мономолекулярного процесса денатурации ферментов даже при нейтральных значениях pH [22 - 24]. На рис. 4 представлены зависимости остаточной активности A_t (пропорциональной концентрации активного фермента) от времени инкубации (t) в координатах: обратная относительная активность - время инкубации для T_0 и CT_0 , а также гетероконъюгатов $oSA-T_m$ и $oSA-CT_m$. Линейность полученных зависимостей свидетельствует о кинетике реакции второго порядка. По наклонам прямых определены константы скорости (k , $M^{-1} c^{-1}$) и рассчитаны эффекты стабилизации Θ^i , которые представлены в табл. 3. В этой же таблице приведены характеристики всех исследованных фракционированных образцов гетероконъюгатов $oSA-T_m$ и $oSA-CT_m$. Рассчитанные из данных рис. 4 константы скорости автолиза T_0 и CT_0 при pH 7.5 и 38°C составляют соответственно 72 и $8.8 M^{-1} c^{-1}$, что удовлетворительно согласуется с данными других авторов [16, 18, 19]. Что касается исследованных иммобилизованных форм этих ферментов, то, по данным рис. 4 и табл. 3, гетероконъюгаты $oSA-T_m$ с

Таблица 3. Изменение эффектов стабилизации (Θ^i) и активационных параметров процесса необратимой термоинактивации трипсина и α -химотрипсина, включенных в гетероконъюгаты $oSA-T_m$ и $oSA-CT_m$ различного состава и различной молекулярной массы

Номер	Образец	Число модифицированных аминогрупп, моль/моль фермента	$\bar{M}_w \times 10^{-5}$	E_m/SA в конъюгате, моль/моль	Необратимая инактивация (pH 7.5)			ΔH^* , ккал/моль	ΔS^* , э. е.	ΔG^* (60°C), ккал/моль
					Автолиз $1/\Theta$ (38 - 48°C)	Денатурация (60°C)				
						Θ_1	Θ_2			
1	Трипсин	0	0.24	-	1	1	-			
2	α -Химотрипсин	0	0.25	-	1	1	-			
3	$oSA-T_m$	3	2.2	1.1	0	84	40	47	65	25.2
4		3	2.2	2.0	0	34	10	34	27	24.5
5		3	5.0	1.0	0	160	80	42	47	25.7
6		3	5.0	2.4	0	79	23	32	20	25.1
7		3	5.0	5.0	0	24	10	39	44	24.4
8		8	2.0	1.0	0	240	-	39	39	25.9
9		8	5.1	1.0	0	640	-	41	43	26.4
10		8	9.0	1.0	0	∞	-			
11	$oSA-CT_m$	3	2.2	1.3	0.3 (38°C)	1.0	-			

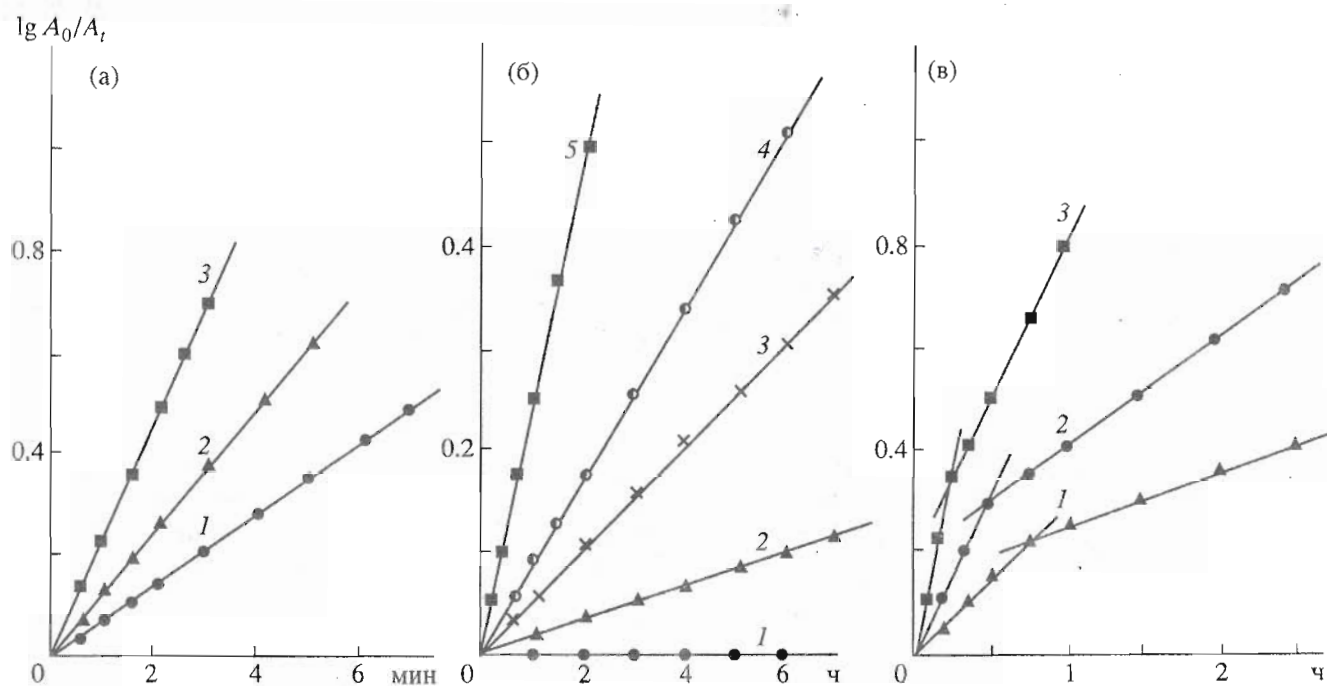


Рис. 5. Зависимость логарифма обратной относительной активности от времени инкубации для процесса мономолекулярной термоинактивации трипсина нативного и в гетероконъюгатах с олигоальбумином. Условия: 0.1 М фосфатный буфер, pH 7.5; 55 - 75°C. $[T_0]_0 = [oSA-T_m]_0 = [T_0]_0 = 1$ мкМ, субстрат - фибрин. а: 1, 2, 3 - трипсин, соответственно 55, 60 и 65°C. б: oSA-T_m, в T_m модифицировано 8 аминогрупп. 1 - 60°C, образец 10: \bar{M}_w 9×10^5 , молярное соотношение в конъюгате T_m/SA = 1. 2, 3, 4, 5 - 60, 65, 70 и 75°C соответственно, образец 9: \bar{M}_w 5×10^5 , молярное соотношение в конъюгате T_m/SA = 1. в: oSA-T_m, в T_m модифицированы 3 аминогруппы, 65°C. 1, 2, 3 - образцы 5, 6, 7 из табл. 3: \bar{M}_w 5×10^5 , молярное соотношение в конъюгатах T_m/SA = 1.0; 2.4 и 5.0 соответственно.

молекулярной массой в интервале $(2 - 9) \times 10^5$, содержащие на одну макромолекулу мономерного SA от 1 до 5 макромолекул T_m с числом модифицированных аминогрупп от 3 до 8, исключительно стабильны в условиях автолиза. Для них (образцы 3 - 10 в табл. 3) константы скорости инактивации в интервале 38 - 48°C равны нулю и эффекты стабилизации Θ' стремятся к бесконечности. В отличие от этого константа скорости автолиза гетероконъюгатов oSA-CT_m с аналогичными характеристиками уже при 38°C только в 3 раза меньше константы скорости автолиза нативного α -химотрипсина.

Резкое различие термостабильности гетероконъюгатов oSA-T_m и oSA-CT_m наблюдается не только при автолизе, но и в процессе мономолекулярной термоинактивации, исследованной в сильно разбавленных растворах (1×10^{-6} М по ферменту) в интервале 55 - 75°C при pH 7.5. Полученные данные частично представлены на рис. 5а, 5б, 5в и в табл. 3. Нативный трипсин (T₀) исследован при 55, 60 и 65°C (рис. 5а). При более высоких температурах даже использованная в работе микрометодика инкубации образцов не позволяет получить надежные значения A₁, так как уже при 65°C время полужизни трипсина составляет около 90 с. Для гетероконъюгатов oSA-T_m исследование за-

висимостей констант скоростей инактивации и активационных параметров от представленных в табл. 3 характеристик конъюгатов проведено при 60, 65, 70 и 75°C. При 55°C для всех образцов oSA-T_m (№ 3 - 10 в табл. 3) инактивации не наблюдалось в течение 4 ч. На основании вышеизложенного оптимальной температурой для сопоставления констант скоростей инактивации нативного и иммобилизованного трипсина и расчета эффектов стабилизации выбрана 60°C. При этой же температуре проведено сравнительное изучение термостабильности нативного α -химотрипсина (CT₀) и гетероконъюгатов oSA-CT_m.

Приведенные на рис. 5 линейные зависимости логарифма обратной относительной активности от времени инкубации для нативного трипсина и конъюгатов oSA-T_m в указанных выше интервалах температур свидетельствуют о кинетике инактивации первого порядка. Для нативного трипсина это согласуется с данными работ [22, 24], полученными для коммерческих образцов трипсина (содержащих смесь α - и β -трипсина), но противоречит результатам работы [19], в которой показан второй порядок инактивации вплоть до 65°C для индивидуальной формы β -трипсина.

Константы скорости инактивации нативного трипсина при pH 7.5 и 55 и 60°C, определенные по

наклонам прямых 1 и 2 на рис. 5а, составляют соответственно 2.5×10^{-3} и $5.1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Полученное значение константы для 55°C коррелирует с величиной константы $2.0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, определенной в работе [24] для инактивации нативного трипсина при pH 8.0 и 50°C .

Из зависимостей, представленных на рис. 5б, видно, что инактивация гетероконъюгатов oSA-T_m с молекулярной массой от 5×10^5 до 9×10^5 , включающих трипсин с 8 модифицированными аминокислотными группами, характеризуется при каждой исследованной температуре одной константой скорости k_1 (одной прямой), что свидетельствует о гомогенности по стабильности таких конъюгатов в исследованных интервалах их молекулярных масс и температур. Рассчитанные из полученных прямых константы скорости инактивации конъюгатов (образцы 8 - 10 в табл. 3) варьируют от 0 до $2.4 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. В отличие от конъюгатов такого типа для конъюгатов oSA-T_m , включающих трипсин с тремя модифицированными аминокислотными группами, наблюдается бифазная кинетика инактивации (рис. 5в), что означает наличие в каждом образце по меньшей мере двух типов конъюгатов, различающихся по константам скоростей инактивации ($k_1 < k_2$). Вероятнее всего, эти типы конъюгатов различаются числом связей между трипсином и SA. Такие корреляции были найдены, например, для полимерных модификаций ферментов [23]. Зависимости, аналогичные представленным на рис. 5в, получены для всех исследованных образцов конъюгатов oSA-T_m различного состава и различной молекулярной массы, включающих трипсин с тремя модифицированными аминокислотными группами (образцы 3 - 7 в табл. 3), и для всех исследованных температур ($60, 65, 70$ и 75°C). Для указанных конъюгатов и температур величины констант k_1 и k_2 , определенные из этих зависимостей, находятся соответственно в интервалах $(0.3 - 27.4) \times 10^{-4}$ и $(0.7 - 76.7) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

При 60°C на основе полученных констант скоростей мономолекулярного процесса необратимой термоинактивации T_0 и конъюгатов oSA-T_m рассчитаны эффекты стабилизации Θ_1 и Θ_2 (соответствующие константам k_1 и k_2) (табл. 3). Из приведенных данных видно, что трипсин, включенный в гетероконъюгаты oSA-T_m всех исследованных типов, значительно стабильнее нативного фермента. В зависимости от молекулярной массы и состава конъюгатов, а также от степени модификации аминокислотных групп трипсина величина эффекта стабилизации для более стабильных фракций конъюгатов (Θ_1) варьирует от 24 до бесконечности. Следует отметить, что указанный выше интервал величин k_1 для образцов 3 - 10 (табл. 3) при $60 - 75^\circ\text{C}$ свидетельствует о том, что даже при 75°C все исследованные конъюгаты oSA-T_m стабильнее нативного трипсина при 60°C . Анализ

полученных эффектов стабилизации показывает, что из трех переменных параметров конъюгатов oSA-T_m увеличение молекулярной массы конъюгатов и степени модификации аминокислотных групп трипсина повышает эффекты стабилизации. Напротив, при постоянстве этих двух параметров увеличение молярного соотношения T_m/SA в конъюгатах от 1 до 5, которое должно приводить к уменьшению числа ковалентных связей между T_m и SA, сопровождается резким падением величин Θ_1 и Θ_2 (в 6 - 8 раз). Максимальный эффект стабилизации получен для конъюгатов oSA-T_m с \bar{M}_w 9×10^5 , содержащих в эквимольном соотношении SA и трипсин, в котором модифицировано около 50% общего числа аминокислотных групп. Значительные эффекты стабилизации трипсина в конъюгатах oSA-T_m при термоденатурации (табл. 3) объясняют и исключительную устойчивость этих конъюгатов к автолизу, поскольку, как было сказано выше, первой стадией автолиза является переход фермента в денатурированную форму. Следует подчеркнуть, что простая модификация аминокислотных групп трипсина в исследованных нами пределах не дает существенной стабилизации фермента при автолизе [11] и уменьшает константу скорости автолиза всего лишь в 1.2 - 1.8 раза [25].

Что касается стабильности гетероконъюгатов oSA-CT_m в условиях высокотемпературной термоденатурации, то она значительно ниже стабильности конъюгатов oSA-T_m . Так, например, уже при 60°C для образца (№ 11 в табл. 3) oSA-CT_m с \bar{M}_w 2.2×10^5 и эквимольным содержанием SA и CT_m , в котором модифицированы три аминокислотные группы, наблюдается полное совпадение кинетической кривой инактивации с таковой для нативного химотрипсина, и, следовательно, эффект стабилизации равен 1. Для аналогичного по характеристикам конъюгата oSA-T_m (образец 3 в табл. 3) $\Theta_1 = 84$ и $\Theta_2 = 40$. Наблюдаемое резкое различие в термостабильности конъюгатов oSA-T_m и oSA-CT_m можно, вероятно, также интерпретировать с точки зрения числа связей между ферментами и сывороточным альбумином. Локальное распределение заряженных групп в трипсине значительно повышает вероятность его многоточечного связывания с электрически асимметричной макромолекулой сывороточного альбумина, что, например, наблюдалось при комплексообразовании трипсина с синтетическими блочными полиэлектролитами [26], в то время как макромолекулы химотрипсина, по-видимому, связаны единичными связями с макромолекулами альбумина в конъюгатах oSA-CT_m .

В соответствии со стандартной процедурой (рис. 6) определены параметры активации процесса термоденатурации трипсина в нативном состоянии и в конъюгатах oSA-T_m (более ста-

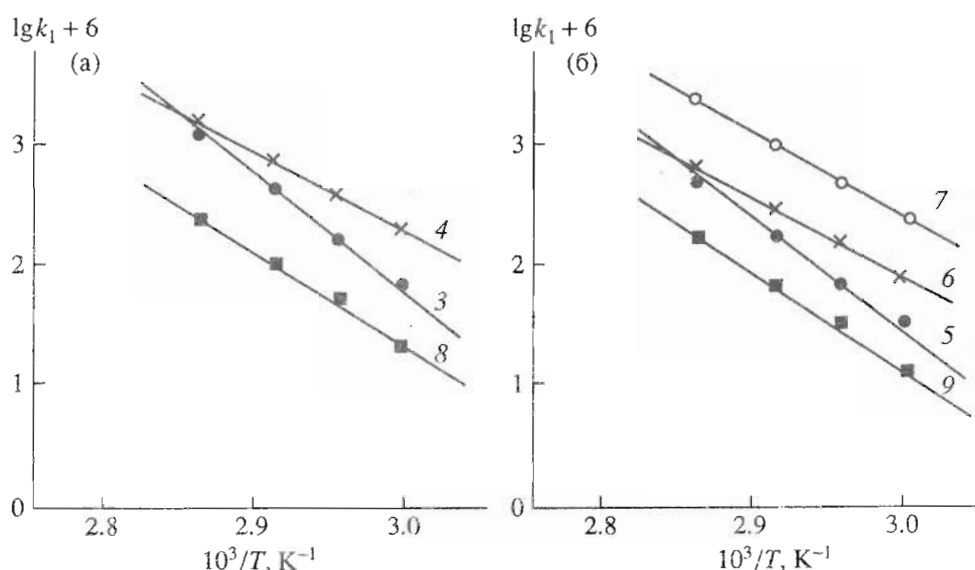


Рис. 6. Зависимость констант скоростей (k_1) от температуры для процесса мономолекулярной термоинактивации гетероконъюгатов $oSA-T_m$, имеющих \bar{M}_w 2.2×10^5 (а) и 5.0×10^5 (б). Номера прямых соответствуют номерам образцов в табл. 3.

бильных фракциях) различной молекулярной массы и различного состава (табл. 3). Обращает на себя внимание (рис. 6) более крутой наклон температурных зависимостей логарифма константы скорости k_1 и, следовательно, большая энтальпия активации для гетероконъюгатов, содержащих в эквимольных количествах SA и T_m , в котором модифицированы три аминокислоты (образцы 3 и 5 в табл. 3). Этот эффект можно объяснить наибольшим числом связей между макромолекулами трипсина и альбумина в конъюгатах различного \bar{M}_w такого состава по сравнению с конъюгатами, содержащими 2 и 5 моль T_m на 1 моль мономерного SA. В исследованном температурном интервале вблизи $75^\circ C$ для конъюгатов, содержащих 1 и 2 моль T_m на 1 моль SA (образцы 3 и 4, 5 и 6), имеются изокINETические точки, соответствующие одинаковому эффекту стабилизации.

Рисунок 7 демонстрирует компенсационный эффект – линейную зависимость между энтальпией и энтропией инактивации для всех исследованных гетероконъюгатов $oSA-T_m$. Известны аналогичные зависимости для широкого набора модифицированных и иммобилизованных полимерами ферментов [15]. Несмотря на “эффективный” характер активационных параметров процесса термоинактивации ферментов (не позволяющий отнести эти параметры к определенным молекулярным перестройкам), приведенные в табл. 3 активационные параметры кажутся информативными, поскольку относятся к системам на основе одного и того же фермента, и, более того, его иммобилизация осуществляется одним и тем же олигомерным белковым носителем [27].

Проведено сопоставление термостабильности гетероконъюгатов трипсина с альбумином, полученных различными методами шивки этих белков с помощью глутарового альдегида. Рисунок 8а демонстрирует различие в стабильности гетероконъюгатов $oSA-T_0$ и $oSA-T_m$, полученных по вариантам I и II реакции (1). Видно, что вариант II дает более стабильные полимерные формы трипсина. Так, за 1.5 ч инкубации при $48^\circ C$ и pH 7.5 нативный трипсин полностью теряет активность, I тип конъюгатов ($oSA-T_0$) сохраняет 20% исходной активности, а II тип ($oSA-T_m$) сохраняет 100% исходной активности даже после 3 ч инкубации в этих условиях. Рисунок 8б демонстрирует значительно более высокую стабильность конъюгатов II типа по сравнению с конъюгатами, полу-

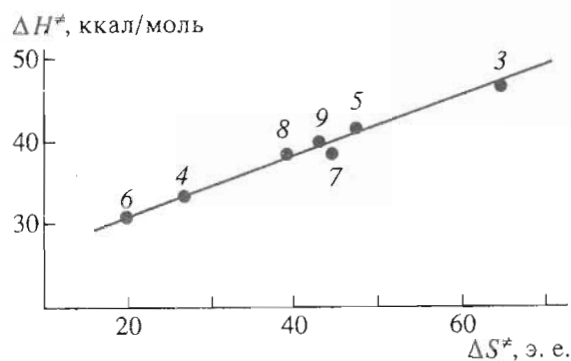


Рис. 7. Компенсационная зависимость для термодинамических активационных параметров ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger мономолекулярного процесса термоинактивации трипсина, ковалентно связанного с олигоальбумином. Номера точек на прямой соответствуют номерам образцов гетероконъюгатов $oSA-T_m$ в табл. 5.

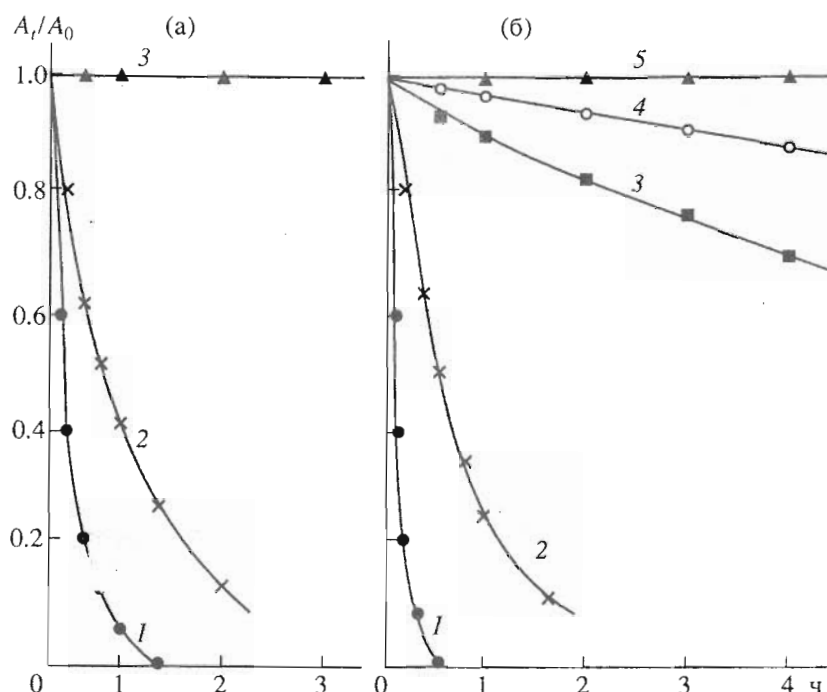


Рис. 8. Сравнение термостабильности гетероконъюгатов трипсина с сывороточным альбумином, полученных различными методами сшивки этих белков с помощью глутарового альдегида. а: 48°C. 1 – T_0 ; 2 – $oSA-T_0$ (получен по варианту I) с \bar{M}_w 8×10^5 ; 3 – $oSA-T_m$ (получен по варианту II), образцы 3 - 10 из табл. 3. б: 60°C. 1 – T_0 ; 2 – статистические конъюгаты с \bar{M}_w 7.5×10^5 (данные работы [28]); 3, 4, 5 – $oSA-T_m$ (получены по варианту II), образцы 8 - 10 соответственно. Условия: 0.1 М фосфатный буфер, pH 7.5 (в работе [28] использован 0.1 М трис-буфер, pH 8.0). $[T_0]_0 = [oSA-T_0(T_m)(по ферменту)]_0 = 1 \times 10^{-5}$ М (а) и 1 мкМ (б).

ченными статистической сшивкой трипсина с сывороточным альбумином в работе [28]. Из представленных на этом рисунке зависимостей видно, что при 60°C за 30 мин инкубации при pH 7.5 статистические гетероконъюгаты сохраняют около 40% исходной активности, а остаточная активность конъюгатов $oSA-T_m$ в этих условиях колеблется от 85 до 100% в зависимости от их молекулярной массы и степени модификации аминогрупп трипсина. Даже после инкубации в течение 4 ч трипсин в конъюгатах II типа сохраняет от 60 до 100% исходной активности, в то время как статистические гетероконъюгаты полностью инактивируются.

Таким образом, проведенное кинетическое исследование термостабильности гетероконъюгатов, полученных на основе трипсина или α -химотрипсина и альбумина, выявило еще одно преимущество предложенного в данной работе метода избирательного синтеза гетеробелковых конъюгатов разнозаряженных белковых макромономеров. Оно заключается в том, что вариант II сшивки белков (в отличие от варианта I и статистической сшивки) позволяет синтезировать гетероконъюгаты электрически асимметричных белков, в частности трипсина и SA ($oSA-T_m$), которые в сотни раз и более термостабильнее нативного

фермента в нейтральных растворах. Такие высокие значения эффектов стабилизации известны только для жестко фиксированных на нерастворимых матрицах или микрокапсулированных ферментов [15, 29].

В заключение целесообразно рассмотреть данные, касающиеся стабильности олигомерных белковых носителей, использованных в работе для иммобилизации протеолитических ферментов, в условиях синтеза, хранения и исследования гетеробелковых конъюгатов.

Так как сшивку белков проводили в течение 1 - 4 ч при pH 7.0 и 8°C (см. методическую часть статьи), вероятность гидролиза олигомерных носителей (oSA и oHb) в процессе синтеза гетероконъюгатов ничтожна, поскольку, как показали контрольные эксперименты, в этих условиях, далеких от оптимальных для действия ферментов, не наблюдалось даже автолиза немодифицированных мономерных ферментов, в частности трипсина и α -химотрипсина.

Далее, в процессе хроматографического анализа реакционных смесей (как показано на рис. 1) при pH 7.0 и 8°C также не происходит деструкции полимерных форм гетероконъюгатов, о чем свидетельствуют рехроматограммы выделенных гетероконъюгатов ($oSA-T_0$, $oSA-T_m$, $oSA-UK_0$), на

которых наблюдается один пик, совпадающий по объему элюции с пиком гетероконъюгатов на первичных хроматограммах. Рассчитанные на основе первичных хроматограмм и рехроматограмм значения \bar{M}_w гетероконъюгатов практически одинаковы. При этом следует отметить, что даже после длительного (до 6 мес.) хранения при 8°C растворов фракционированных гетероконъюгатов (oSA-UK₀, oHb-UK₀, oSA-T_m) молекулярные массы их остаются неизменными.

Что касается стабильности олигомерных носителей в процессе определения активности гетероконъюгатов или кинетического изучения их термостабильности при автолизе (38 - 48°C, pH 7.5), то представленные в табл. 3 эффекты стабилизации (стремящиеся к бесконечности) для наиболее широко исследованных в работе конъюгатов oSA-T_m хотя и косвенно, но вполне надежно свидетельствуют о том, что в указанных процессах вероятность гидролиза oSA модифицированным или иммобилизованным трипсином сведена к минимуму, поскольку oSA стабилизирован межмолекулярными связями и состоит из молекул альбумина, в котором модифицированы наиболее доступные и реакционноспособные аминокислотные группы (14 аминокислот [14]), способные принять участие во взаимодействии с карбоксильной группой специфического центра трипсина [11].

И наконец, биологическое исследование некоторых полученных протеолитических (фибринолитических) гетероконъюгатов, в частности oSA-UK₀ и oHb-UK₀, показало их стабильность *in vivo*, о чем свидетельствует их пролонгированное фибринолитическое действие в организме животных и четкая зависимость эффекта пролонгации от молекулярной массы фракционированных гетероконъюгатов [30].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследовались следующие белки: бычий сывороточный альбумин (Calbiochem) с молекулярной массой (M_r) 67000 и изоэлектрической точкой (pI) 4.8; бычий трипсин (Serva) с M_r 24000 и pI 10.8; бычий α -химотрипсин (Serva) с M_r 25000 и pI 9.6; урокиназа человека, полученная по [31], с M_r 33000 и pI 7.8 - 9.6 (изоформы); стрептокиназа (Behringwerke) с M_r 47000 и pI 4.7. Использовался глутаровый альдегид (Reanal), перегнанный под вакуумом; концентрация альдегидных групп в нем определялась методом дифференциальной pH-метрии [32]. Двойные связи в шпигтах белках восстанавливали боргидридом натрия (Serva). Содержание аминокислотных групп в белках определялось с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой (Serva) [33], количество модифицированных аминокислотных групп рассчитывалось по разности между исходным количеством и оставшимся после реакции. Концентрацию белков оп-

ределяли по [34]. Протеолитическая активность всех ферментов и их иммобилизованных форм исследовалась методом фибриновых пластин [35], концентрацию активного фермента рассчитывали по стандартной калибровочной зависимости.

Изучение молекулярно-массового распределения и фракционирование гетеробелковых конъюгатов проводили гель-хроматографией на сефарозе 6B (Pharmacia). Величины средневесовых молекулярных масс \bar{M}_w рассчитывались согласно работе [36].

Необратимая термоинактивация иммобилизованных ферментов [24]: образцы в объеме 3 мл нагревали в термостате при исследуемой температуре, периодически отбирали пробы по 0.2 мл и быстро охлаждали до 0°C в водяной бане со льдом. Для нативных ферментов, времена инактивации (t) которых при высоких температурах варьировали в интервале 0 - 30 мин, использовали микрометодику термоинактивации исследуемых растворов: в серию стандартных тонкоосажденных микропробирок вводили по 0.3 мл исследуемого раствора, затем ячейку с пробой помещали в термостат с заданной температурой и периодически, в момент времени t , последовательно пробирки вынимали из термостата и быстро охлаждали до 0°C. При этой температуре пробы нативных и иммобилизованных ферментов хранили до определения активности. Выдерживание проб в этих условиях в течение 5 мин - 48 ч не изменяло величину остаточной активности. Остаточную активность (A_t) относили к исходной (A_0).

Синтез гетероконъюгатов по I варианту реакции (1) проводили в 0.1 М фосфатном буфере при pH 7.0 и 8°C в течение 4 ч; $[E_0] = 5 \times 10^{-5}$ М; $[SA_0]/[E_0] = 1 - 40$ моль/моль; $[H_2N\text{-группы } SA_0]/[ОНС\text{-группы } GA_0] = 2$ моль/моль.

Синтез гетероконъюгатов по II варианту реакции (1) проводили в 0.02 М фосфатном буфере, содержащем 0 - 0.2 М NaCl, при pH 7.0 и 8°C в течение 1 ч; $[E_0] = (0.5 - 2) \times 10^{-4}$ М; $[E_0]/[SA_0] = 1 - 4$ моль/моль; $[ОНС\text{-группы } GA_0]/[H_2N\text{-группы } SA_0] = 2$ моль/моль и выше.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Платэ Н.А., Васильев А.Е. // Физиологически активные полимеры. М.: Химия, 1986. С. 192 - 204.
2. Poznansky M.J. // Meth. Enzymol. 1988. V. 137. Part D. P. 566 - 574.
3. Kia-Ki Han, Richard C., Delacourt A. // Int. J. Biochem. 1984. V. 16. № 2. P. 129 - 145.
4. Morris R. // Meth. Enzymol. 1980. V. 70. Part A. P. 159 - 165.
5. Самсонов Г.В., Кузнецова Н.П., Кольцова С.Е. // Синтез, структура и свойства полимеров. Л.: Наука, 1989. С. 209 - 214.

6. Кузнецова Н.П., Кленин С.И., Волкова Л.А., Гудкин Л.Р., Самсонов Г.В. // Высокомолекуляр. соединения. А. 1989. Т. 31. № 7. С. 1539 - 1543.
7. Кузнецова Н.П., Мишаева Р.Н., Кольцова С.В., Гудкин Л.Р., Страгович Л.М., Большакова Е.Г. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 9. С. 871 - 879.
8. Богачева Т.И., Миргородская О.А., Москвичев Б.В. // Биохимия. 1977. Т. 42. Вып. 4. С. 609 - 615.
9. Горячева Л.К., Пономарева Р.Б., Кузнецова Н.П., Самсонов Г.В. // Высокомолекуляр. соединения. Б. 1989. Т. 31. № 1. С. 17 - 21.
10. Goldfarb A.R. // Biochemistry. 1966. V. 5. № 8. P. 2574 - 2579.
11. Keil B. // The Enzymes / Ed. P.D. Boyer. London, New York: Acad. Press, 1971. V. 3. P. 249 - 275.
12. Blow D.M. // The Enzymes / Ed. P.D. Boyer. London, New York: Acad. Press, 1971. V. 3. P. 185 - 212.
13. Keil B., Dlouha V., Holeyšovsky V., Šorm F. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1968. V. 33. № 7. P. 2307 - 2315.
14. Peters T.Jr. // Advances in Protein Chemistry // Eds. C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards. London, New York: Acad. Press, 1985. V. 37. P. 161 - 245.
15. Кутузова Г.Д., Узарова Н.Н., Березин И.В. // Успехи химии. 1984. Т. 53. Вып. 11. С. 1852 - 1890.
16. Антонов В.К., Воротынцева Т.И., Козан Г.А. // Молекулярн. биология. 1970. Т. 4. Вып. 2. С. 240 - 245.
17. Кольцова С.В., Самсонов Г.В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1976. № 1. С. 168 - 171.
18. Kumar S., Hein G.E. // Biochemistry. 1970. V. 9. № 2. P. 291 - 297.
19. Gabel D., Kasche V. // Acta chem. scand. 1973. V. 27. № 6. P. 1971 - 1981.
20. Wu H.-L., Wastell A., Bender M.L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 7. P. 4116, 4117.
21. Wu H.-L., Kundrot C., Bender M.L. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1982. V. 107. № 2. P. 742 - 745.
22. Жолы М. Физическая химия денатурации белков. М.: Мир, 1968. С. 230 - 231.
23. Мартинек К., Березин И.В. // Успехи химии. 1980. Т. 49. Вып. 5. С. 737 - 770.
24. Ulbrich R., Schellenberger A., Damerau W. // Biotechnol. and Bioeng. 1986. V. 28. № 4. P. 511 - 522.
25. Казанская Н.Ф., Кост О.А., Березин И.В. // Биоорган. химия. 1975. Т. 1. № 9. С. 1337 - 1344.
26. Кольцова С.В., Илларионова Н.Г., Кривобоков В.В., Трухманова Л.Б. // Высокомолекуляр. соединения. А. 1983. Т. 25. № 7. С. 1377 - 1384.
27. Метелица Д.И., Еремин А.Н. // Успехи химии. 1987. Т. 56. С. 1921 - 1948.
28. Cohenford M.A., Santoro P.F., Urbanowski J.C., Dain J.A. // Biotechnol. and Bioeng. 1986. V. 28. № 5. P. 736 - 740.
29. Wu H.-L., Lace D.A., Bender M.L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 7. P. 4118 - 4119.
30. Даниличев В.Ф., Кольцова С.В., Бойко Э.В. // Офтальмолог. журн. 1993. № 5 - 6. С. 303 - 307.
31. Fedorova Z.D., Samsonov G.V., Koltsova S.V., Vynyaeva N.A. // Thrombosis and Thrombolysis / Eds. E.I. Chazov, V.N. Smirnov. London, New York: Gordon and Breach, 1986. P. 255 - 282.
32. Roe H.R., Mitchel J.M. // Anal. Chem. 1951. V. 23. № 12. P. 1758 - 1760.
33. Fields R. // Biochem. J. 1971. V. 124. P. 581 - 590.
34. Lowry O.H., Rosenbrough N.V., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265 - 275.
35. Astrup T., Mullartz S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1952. V. 40. № 2. P. 346 - 351.
36. Кузнецова Н.П., Самсонов Г.В. // Высокомолекуляр. соединения. А. 1985. Т. 27. № 12. С. 2611 - 2614.

Influence of Electrostatic Interactions on the Formation and Properties of Soluble Heteroprotein Conjugates Based on Proteolytic Enzymes

S. V. Kol'tsova

*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia*

Abstract – The regularities of directed polycondensation of proteins with opposite charges by glutaric aldehyde were studied using serum albumin and proteolytic enzymes (urokinase, trypsin, α -chymotrypsin) as models. The electrostatic interaction of oppositely charged protein macromonomers in the polycondensation process was shown to facilitate the selective synthesis of soluble heteroprotein conjugates with molecular mass from 2×10^3 to 9×10^5 ; these conjugates have controlled component composition, high enzyme content (up to 3 to 4 molecules of an enzyme per one albumin molecule) and completely retain the enzyme catalytic activity. The dependence of rate constants and activation parameters of thermal inactivation of the heteroconjugates upon their composition, molecular mass and the degree of modification of the protein amino groups was investigated. Heteroconjugates of electrically asymmetric proteins, in particular, trypsin and serum albumin, were found to be several hundred times more stable than the starting enzymes at 38 - 60°C.

Key words: immobilized proteolytic enzymes, protein conjugates, polycondensation, electrostatic interaction, thermal stability.