

МЕДИЦИНСКИЕ
ПОЛИМЕРЫ

УДК 541.64:536.7

ТРАНСПОРТНЫЕ ФУНКЦИИ ПОЛИМЕРОВ
С НИЖНЕЙ КРИТИЧЕСКОЙ ТЕМПЕРАТУРОЙ РАСТВОРЕНИЯ

© 2019 г. И. Л. Валув^{а,*}, Л. В. Ванчугова^а, Л. И. Валув^а

^аИнститут нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук,
119991 Москва, Ленинский пр., 29, Россия

* e-mail: ivaluev@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 19.03.2019 г.

После доработки 01.04.2019 г.

Принята к публикации 11.04.2019 г.

Полимерные производные белков были синтезированы реакцией аминокруппы белков с поли N,N-диэтилакриламидами, содержащими концевую карбоксильную группу, имеющими молекулярную массу $(13-62) \times 10^3$ и обладающими нижней критической температурой растворения 34–29°C. Впервые показано, что значение нижней критической температуры растворения полученных производных определяется не только молекулярной массой полимера и белка, но и конформацией макромолекулы белка.

DOI: 10.1134/S2308113919040144

К одному из наиболее интересных и практически важных направлений исследований в области полимеров медико-биологического назначения несомненно относится изучение возможности использования так называемых “умных” полимеров для решения проблемы направленного транспорта в живом организме биологически активных соединений, в том числе высокомолекулярных белков. К “умным” относятся и полимеры с нижней критической температурой растворения. Указанные полимеры растворимы в водных средах при температуре ниже НКТР, но при температуре, равной НКТР, претерпевают конформационный переход и выпадают в осадок. Использование термоактивации как движущей силы процесса транспорта представляется достаточно универсальным и перспективным, поскольку именно повышение температуры обычно является сигналом о появлении зон воспаления или новообразования, что должно обеспечивать самопроизвольное накопление полимера и связанного с ним лекарства в таких зонах. Кроме того, почти всегда существует возможность локального нагревания органа-мишени и принудительного транспорта белка в этот орган [1–6].

Естественно, что использование конформационных переходов в качестве движущей силы транспорта возможно только в том случае, когда разработаны методы регулирования значения НКТР носителей для конкретной области применения и очерчен круг соединений, пригодных для подобного транспорта.

Проблема регулирования НКТР носителя решается достаточно просто. В настоящее время в качестве такого рода носителей наиболее широко используются полимерные производные N-замещенных акриламидов, НКТР которых находится в области 5–90°C [7]. Регулирование НКТС данных полимеров достигается сополимеризацией N-замещенного акриламида с гидрофильным или гидрофобным мономером [8]. Сополимеризация с первыми мономерами приводит к повышению НКТС, а сополимеризация со вторыми — к ее понижению.

Вопрос об универсальности предложенного подхода по отношению к различным белкам возникает вследствие того, что переход носителя через НКТС может сопровождаться изменением нативной структуры белка и его активности. Например, активность трипсина, иммобилизованного на сополимерах N-изопропилакриламида, при переходе через НКТР остается постоянной, в то время как активность α -химотрипсина в области НКТР падает практически до нуля, но затем полностью восстанавливается при снижении температуры [9]. Конформационные изменения в макромолекуле полимера могут вызывать и необратимую инактивацию белка, что наблюдалось при нагревании до НКТР пероксидазы хрена, не устойчивой к воздействию гидрофобных агентов [9, 10].

До последнего времени оставался неясным вопрос о зависимости транспортных свойств носителя от молекулярной массы и надмолекулярной

организации иммобилизованного белка, т.е. какими соединениями можно нагружать носитель, чтобы сохранялась его способность к конформационному переходу с образованием осадка при температуре выше НКТР.

Цель настоящей работы – выяснение зависимости транспортных свойств полимера от его молекулярной массы и надмолекулярной структуры связанного с ним белка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали N,N-диэтилакриламид, панкреатический ингибитор трипсина ($M = 6500$), гирудин ($M = 12 \times 10^3$), ингибитор трипсина из сои ($M = 21 \times 10^3$), овальбумин ($M = 45 \times 10^3$), сывороточный альбумин человека ($M = 67 \times 10^3$), 1-этил-(3,3-диметиламинопропил)карбодиимид (“Sigma”, США), меркаптоуксусную кислоту (“Serva”, США), утиный овомукоид ($M = 31 \times 10^3$) (“Белмедпрепараты”, Беларусь).

Поли-N,N-диэтилакриламид (ПДЭАА) синтезировали методом радикальной полимеризации N,N-диэтилакриламида в водном растворе в присутствии передатчика цепи меркаптоуксусной кислоты [11]. Инициатором полимеризации служила смесь персульфата аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина.

Полученные полимеры, содержащие концевую карбоксильную группу, очищали от низкомолекулярных примесей гель-хроматографией на колонке (1.5×40 см) с Сефадексом G-25, уравновешенным бидистиллированной водой, и лиофильно высушивали.

Иммобилизацию белка проводили в водном растворе в присутствии 1-этил-(3,3-диметиламинопропил)карбодиимид, перемешивая раствор в течение 4 ч при комнатной температуре.

ММ продуктов оценивали методом упругого светорассеяния на приборе “Malvern-4400” (“Фирма”, Великобритания) с 64-канальным коррелятором K7025 в диапазоне углов рассеяния $20^\circ - 140^\circ$. В качестве источника света использовали гелий-неоновый лазер с длиной волны 632.8 нм. Образцы обеспыливали пропусканием через

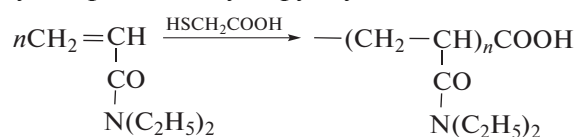
мембранные фильтры “Sinpor” (“Фирма”, Чехия) с размером пор 0.17 мкм.

Значение НКТР определяли по зависимости пропускания ($\lambda = 500$ нм) растворов полимеров от температуры на спектрофотометре “Hitachi U-3410” (Япония) с терморегулируемой приставкой (скорость нагревания и охлаждения кювет 1 град/мин).

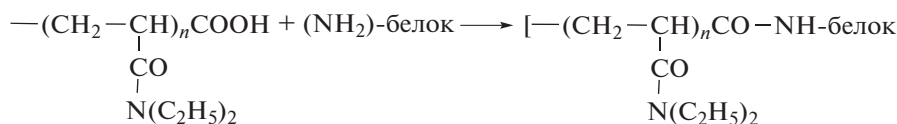
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Создание систем термоактивированного направленного транспорта для механического перемещения белковых молекул, основанного на использовании конформационных переходов из статистического клубка в гидрофобную глобулу, требует соблюдения по крайней мере двух обязательных условий. Во-первых, макромолекула носителя после связывания с ней белка должна сохранять способность к фазовому переходу при НКТР, а во-вторых, она не должна изменять биологическую активность иммобилизованного на ней соединения. Для транспорта белков в живом организме выбор носителя дополнительно ограничен требованием к его молекулярной массе. Она не может быть выше 40×10^3 , поскольку только такие синтетические полимеры могут выводиться из организма естественным путем через почки после окончания времени их функционирования [12].

Выяснение транспортных возможностей полимеров различной ММ проведено на примере ПДЭАА. Сначала полимеризацией N,N-диэтилакриламида в присутствии передатчика цепи (меркаптоуксусной кислоты) были синтезированы полимеры с $M = (13-62) \times 10^3$, содержащие концевую карбоксильную группу:



Затем взаимодействием этих полимеров с белками, ММ которых составляла $(6.5-67) \times 10^3$, в присутствии карбодиимида были получены соответствующие диблок-сополимеры. Реакция протекала по следующей схеме:



Результаты измерения НКТР полученных диблок-сополимеров приведены в табл. 1.

Видно, что транспортная способность ПДЭАА (наличие НКТР) в первую очередь определяется

степенью полимеризации полимера. При этом поведение диблок-сополимеров, в которых ММ блока ПДЭАА не превышает 38×10^3 , (постепенное повышение НКТР с увеличением ММ белка)

Таблица 1. Значения НКТР производных белков и ПДЭАА

ММ ПДЭАА $M \times 10^{-3}$	НКТР производного ПДЭАА и белка, °C ($\pm 1^\circ\text{C}$)						
	нет	панкреатический ингибитор трипсина	гирудин	ингибитор трипсина из сои	овомукоид	овальбумин	сывороточный альбумин человека
13	34	38	41	нет	нет	нет	нет
38	33	36	38	38	40	нет	нет
54	30	31	32	31	30	29	нет
62	29	30	31	29	31	30	нет

аналогично поведению статистических сополимеров ДЭАА и акриламида с распределением гидрофильного компонента по всей длине макромолекулы [8]. В данном случае молекула белка оказывает возмущающее действие на поведение блока ПДЭАА, сравнимого с ним по размерам. При этом макромолекула диблоксополимера ведет себя как единое целое, гидрофильность которого непрерывно повышается по мере увеличения ММ белка вплоть до потери способности образовывать новую фазу при нагревании, т.е. до исчезновения НКТР.

Совершенно другая зависимость наблюдается для более высокомолекулярного ПДЭАА с $M = (54-62) \times 10^3$. Белковые производные данных полимеров либо имели НКТС, равную НКТР носителя, либо были растворимы во всем изученном интервале температур. Это указывает на то, что блок ПДЭАА при температуре выше его НКТС претерпевает, как показано в работе [13], конформационный переход, стремясь выпасть в осадок, а последующее поведение сополимеров определяется молекулярной массой связанного с полимером белка. Белки с ММ ниже 45000 не препятствовали ассоциации блоков носителя, что приводило к фазовому расслоению системы. Более высокомолекулярные белки хотя и не препятствовали ассоциации блоков ПДЭАА, но предотвращали расслоение системы, вероятно вследствие сольубилизирующего эффекта, обусловленного большим объемом внешней гидратированной оболочки белковой глобулы.

Для выяснения роли эффекта сольубилизации в процессе термоактивируемого транспорта были измерены НКТР белковых производных после их термической денатурации. Известно, что при денатурации глобулярных белков, которые имеют компактную структуру с гидрофобными участками внутри макромолекулы, полипептидная цепь разворачивается и существует уже в виде беспорядочного клубка с экспонированными гидрофобными участками [14]. В результате денатурации первичная структура, а следовательно, ММ белков не изменяются. Разрушение нативной конформации макромолекулы белка в результате

термической денатурации диблок-сополимеров приводило к снижению измеряемых значений НКТР. Так, после нагревания (75°C в течение 2 ч) у производного трипсина и ПДЭАА с $M = 38 \times 10^3$ нижняя критическая температура растворения снижалась с 38 до 31°C , а у производного трипсина и ПДЭАА с $M = 13 \times 10^3$ уже появлялась НКТР, равная 33°C . Это значит, что молекула денатурированного белка уже не стабилизирует конформационно измененные макромолекулы ПДЭАА, и они агрегируют с образованием осадка, т.е. данный полимер становится способным транспортировать денатурированную молекулу трипсина.

Таким образом, полученные в работе результаты показывают, что способность полимеров к термоактивируемому транспорту белков (образованию новой фазы при нагревании раствора) хотя и зависит от ММ используемых компонентов, но главная роль, определяющая “грузоподъемность” полимера, принадлежит не массе переносимой макромолекулы белка, а надмолекулярной структуре этой молекулы в растворе. Это необходимо учитывать при решении ряда прикладных задач, особенно задачи безопасного выведения таких производных из организма.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИНХС РАН.

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. *Yin X., Hoffman A.S., Stayton P.S.* // Biomacromolecules. 2006. V. 7. № 5. P. 1381.
3. *Tian H.Y., Yan J.J., Wang D., Gu C., You Y.Z., Chen X.S.* // Macromol. Rapid Commun. 2011. V. 32. № 8. P. 660.
4. *Valuev L.I., Chupov V.V., Zefirova O.N., Lebedeva T.L., Plate N.A.* // Pure Appl. Chem. 1995. V. 67. № 6. P. 963.
5. *Zeinali E., Haddadi-Asl V., Roghani-Mamaqani H.* // J. Biomed. Mater. Res. 2018. V. 106. № 1. P. 231.
6. *Nuhn H., Klok H.A.* // Biomacromolecules. 2008. V. 9. № 10. P. 2755.

7. *Bae Y.H., Okano T., Kim S.W.* // Pharm. Res. 1991. V. 8. № 5. P. 624.
8. *Yoshida R., Sakai K., Okano T., Sakurai Y.* // J. Biomater. Sci. 1994. V. 6. № 6. P. 585.
9. *Valuev L.I., Zefirova O.N., Obydenнова I.V., Plate N.A.* // J. Bioactive Compatible Polymers. 1994. V. 9. № 1. P. 55.
10. *Valuev I.L., Obydenнова I.V., Vanchugova L.V., Valuev L.I., Sivov N.A., Valueva T.A.* // Polymer Science B. 2017. V. 59. № 1. P. 80.
11. *Torchilin V.P., Levchenko T.S., Whiteman K.R., Yaroslavov A.A., Tsatsakis A.M., Rizos A.K., Michailova E.V., Shtilman M.I.* // Biomaterials. 2001. V. 22. № 21. P. 3035.
12. *Платэ Н.А., Васильев А.Е.* Физиологически активные полимеры. М.: Химия, 1986.
13. *Валуев И.Л., Обыденнова И.В., Шаназарова И.М., Розенфельд М.А., Платэ Н.А.* // Докл. РАН. 2000. Т. 372. № 2. С. 189.
14. *Птицын О.Б.* // Успехи совр. биологии. 1970. Т. 69. № 1. С. 26.