



УДК 577.152.14

## ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ “УМНЫМИ” ПОЛИМЕРАМИ

© 2010 г. Т. А. Валужева<sup>\*#</sup>, И. Л. Валуев<sup>\*\*</sup>, И. В. Обыденнова<sup>\*\*</sup>, Л. И. Валуев<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,  
119071, Москва, Ленинский просп., 33;

<sup>\*\*</sup> Учреждение Российской академии наук Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва

Поступила в редакцию 04.05.2010 г. Принята к печати 18.05.2010 г.

Изучена модификация белкового ингибитора протеиназ, овомукоида из белка утиных яиц, поли-*N,N*-диэтилакриламидом, обладающим нижней критической температурой смешения (НКТС). В молекуле овомукоида модификации подвергались свободные аминогруппы остатков лизина и *N*-концевого остатка, что приводило к существенному снижению активности ингибитора по отношению к трипсину и небольшому ее уменьшению по отношению к химотрипсину. При нагревании раствора модифицированного белка выше НКТС наблюдали трансформацию антитриптических центров овомукоида в антихимотриптические. Показано, что это явление обусловлено гидрофобизацией остатков лизина, локализованных в реактивных центрах ингибитора, при сохранении структуры «петли связывания», в результате чего молекулы химотрипсина начинали взаимодействовать с этими остатками, принимая их за остаток гидрофобной аминокислоты антихимотриптического центра.

**Ключевые слова:** овомукоид, полимеры с нижней критической температурой смешения, модификация.

## ВВЕДЕНИЕ

Отличительной особенностью практически всех природных биологически активных соединений, в том числе белков, является уникальная направленность и специфичность их биологического действия. Самой природой они предназначены функционировать в строго определенных условиях, которые не всегда совпадают с условиями их применения для решения различных задач прикладной биохимии и медицины. Так, например, при использовании белка в качестве лиганда в аффинных сорбентах для выделения отдельных компонентов из крови необходимо, чтобы его максимальная активность проявлялась при pH 7.4 [1], в то время как применение ферментов для лечения воспалительных процессов требует смещения pH-оптимума их действия в кислую область [2]. Решение возникающих проблем, как правило, достигается химической модификацией белков низкомолекулярными соединениями. В результате необратимой химической реакции удаётся синтезировать новые производные белков с требуемым комплексом таких свойств, как суммарный заряд, соотношение гидрофильных и гидрофобных групп и т.д. [3]. Можно предположить, что гораздо более широкие перспективы открывает использование в качестве модифицирующих агентов так называемых “умных” полимеров, способных обратимо

изменять конформацию своих макромолекул при небольших изменениях параметров внешней среды: модифицирующее действие таких полимеров также должно быть обратимым и зависящим от параметров внешней среды.

Цель данной работы – изучение возможности обратимого регулирования активности белков путем их химической модификации “умными” полимерами.

В качестве объекта в данной работе был использован овомукоид из белка утиных яиц – полифункциональный природный ингибитор протеолитических ферментов, уже нашедший применение в клинике как основной компонент антипротеиназных препаратов “Овомин” и “Овосорб” [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее интенсивно изучаемым в настоящее время классом “умных” полимеров являются полимеры, обладающие НКТС. Эти полимеры растворяются в водных средах при температуре ниже НКТС, а при температуре выше НКТС претерпевают конформационный переход и выпадают в осадок [5, 6]. В работах [7–9] мы предложили использовать это явление для направленного транспорта связанных с такими полимерами белков и других физиологически активных соединений. Нагревание мишени (например, органа живого организма или части поверхности химического реактора) выше НКТС приводило к тому, что весь находящийся в растворе полимер

Сокращения: НКТС – нижняя критическая температура смешения; ПАА – полиакриламид; DEAA – *N,N*-диэтилакриламид; PDEAA – поли-*N,N*-диэтилакриламид.

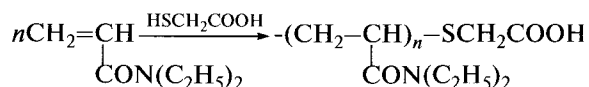
<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: (495) 952-13-84; факс: (495) 954-2732; эл. почта: valueva@inbi.ras.ru).

Таблица 1. Свойства синтезированных полимеров и их производных

$n (m)$	Температура образования осадка, °C ± 0.5	
	$(\text{DEAA})_n\text{-SCH}_2\text{COOH}$	$[(\text{DEAA})_n\text{-SCH}_2\text{CO-NH}]_m\text{-OM}$
10 (1)	38	Не образуется
18 (1)	36	»
22 (1)	34	»
22 (5)	33	»
80 (1)	31	36
80 (3)	31	34
120 (1)	28	32
500 (1)	28	33

выпадал в осадок в зоне нагревания, привнося в нее связанное с ним соединение.

В настоящей работе полимеры получали полимеризацией DEAA в присутствии передатчика цепи — меркаптоуксусной кислоты, обеспечивающей регулирование молекулярной массы полимера. Были синтезированы полимеры со степенями полимеризации “ $n$ ” от 10 до 550, содержащие концевую карбоксильную группу:

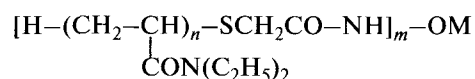


Все синтезированные полимеры обладали НКТС, причем, чем выше была степень полимеризации полимера, тем ниже было значение НКТС, определяемой, как температура образования осадка в водном растворе (табл. 1).

Взаимодействием этих полимеров с овомукоидом в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида были синтезированы производные, содержащие от одной до пяти полимерных цепей PDEAA, связанных с одной молекулой овомукоида:

Таблица 2. Зависимость от температуры количества молекул трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина, связываемых одной молекулой модифицированного овомукоида

$n (m)$	Количество связываемых молекул фермента ± 0.03			
	трипсин		$\alpha$ -химотрипсин	
	30°C	40°C	30°C	40°C
10 (1)	1.68	0.98	0.86	1.45
18 (1)	1.61	0.90	0.77	1.48
22 (1)	1.55	0.85	0.82	1.54
22 (5)	1.06	0.36	0.72	1.70



(где OM — овомукоид,  $n = 10\text{--}500$ ,  $m = 1\text{--}5$ ).

Значения НКТС этих производных приведены в табл. 1. Видно, что связывание полимера с макромолекулой водорастворимого овомукоида способствовало его гидрофилизации и приводило к некоторому повышению значения НКТС. При этом существовало минимальное значение степени полимеризации PDEAA ( $22 < n < 80$ ), ниже которого продукт его взаимодействия с овомукоидом уже не образовывал осадка при повышении температуры. Это явление, по-видимому, обусловлено тем, что при температуре вблизи НКТС макромолекулы PDEAA претерпевали конформационный переход и стремились сформировать новую фазу. В то же время овомукоид, растворимый в воде, сольбилизировал конформационно измененные макромолекулы, предотвращая их дальнейшую ассоциацию.

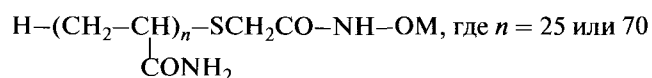
В молекуле овомукоида присутствуют три независимых центра связывания ферментов, два из которых в положении P1 содержат остатки лизина и связывают две молекулы трипсина и один — химотрипсин [10]. Поскольку взаимодействие полимера с овомукоидом происходило с участием свободных аминогрупп ингибитора, в том числе части аминогрупп остатков лизина реактивных центров, то эта реакция приводила к снижению количества связываемых овомукоидом молекул трипсина при температуре ниже НКТС полимера (30°C) (табл. 2). Причем, чем больше молекул полимера связано с молекулой овомукоида, тем ниже его антитриптическая активность. Активность овомукоида по отношению к химотрипсину при этом лишь слегка уменьшалась, что, скорее всего, обусловлено экранированием антихимотриптического центра длинными молекулами полимера.

При нагревании раствора выше НКТС (40°C) макромолекула связанного с овомукоидом синтетического полимера из конформации статистиче-

ского клубка переходила в конформацию гидрофобной глобулы, что и приводило к существенному снижению антитриптической активности ингибитора. Такой конформационный переход полимера оказывал обратный эффект на антихимотриптическую активность ингибитора. Видно, что при 40°C эта активность возрастала, причем практически в той же степени, в какой уменьшалась активность по отношению к трипсину. Создавалось впечатление, что гидрофобизация макромолекулы PDEAA в результате конформационного перехода инициировала трансформацию части антитриптических центров ингибитора в антихимотриптические.

Изменения антиферментной активности модифицированного овомукоида носили обратимый характер. Охлаждение раствора до температуры ниже НКТС (30°C) приводило к повышению антитриптической и снижению антихимотриптической активности ингибитора до значений, определенных при 30°C. Именно обратимостью изменения активности при модификации овомукоида “умным” полимером и отличает эту реакцию от модификации белков обычными низко- или высокомолекулярными соединениями.

Следует отметить, что активность контрольных образцов овомукоида, модифицированных по аналогичной методике полиакриламидом, не обладающим НКТС,



практически не изменялась при нагревании раствора от 30 до 40°C.

Таким образом, причиной наблюдаемой трансформации части антитриптических центров овомукоида в антихимотриптические при его модификации PDEAA является “гидрофобизация” центров, ответственных за связывание трипсина, при нагревании раствора до температуры выше НКТС полимера-носителя. Такие “гидрофобизованные” центры начинают узнаваться химотрипсином и связываться с ним.

Известно, что белки, действующие на сериновые протеиназы, являются так называемыми “каноническими” ингибиторами и взаимодействуют с ферментами по субстратоподобному механизму [11]. Молекулы этих ингибиторов имеют на поверхности специфическую структуру – “петлю связывания”, в которой располагается пептидная связь между остатками P1–P1', природа которых соответствует специфичности действия протеиназы. Эта связь образует реактивный центр ингибитора. Для ингибиторов трипсина в положении P1 реактивного центра должен быть локализован остаток аргинина или лизина, а в ингибиторах химотрипсина – остатки гидрофобных аминокислот. Вполне вероятно, что гидрофобизация остатка лизина при сохранении структуры петли связывания и приводит к тому, что

**Таблица 3.** Зависимость активности модифицированного овомукоида по отношению к трипсину и α-химотрипсину от степени модификации и природы введенной группы

Модифицирующий агент	Количество модифицированных аминокрупп белка, ±1	Активность (% от исх. ±3%) по отношению к	
		трипсину	α-химотрипсину
HCOCl	1	96	100
	5	81	125
CH <sub>3</sub> COCl	1	94	108
	5	78	132
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COCl	1	88	116
	5	66	92

молекулы химотрипсина начинают взаимодействовать с этими остатками, принимая их за остаток гидрофобной аминокислоты.

Для подтверждения этого предположения реакцией свободных аминокрупп овомукоида с хлорангидридами муравьиной, уксусной и бензойной кислот были синтезированы производные с различной степенью гидрофобности. В табл. 3 приведены результаты определения активности полученных производных по отношению к трипсину и α-химотрипсину в зависимости от степени модификации овомукоида и природы модифицирующего агента. Видно, что при действии всех использованных хлорангидридов кислот антитриптическая активность ингибитора уменьшалась, причем с возрастанием числа модифицированных аминокрупп это уменьшение заметно возрастало. В то же время активность модифицированного ингибитора по отношению к α-химотрипсину существенно увеличивалась. Например, при модификации пяти его свободных аминокрупп хлорангидридом уксусной кислоты активность по отношению к химотрипсину возрастала на 32%. Некоторое снижение антихимотриптической активности было обнаружено при модификации пяти аминокрупп белка хлорангидридом бензойной кислоты. По-видимому, присоединение большого количества объемных заместителей к остаткам лизина нарушало в молекуле ингибитора специфическую структуру “петли связывания” и такой реактивный центр переставал узнаваться ферментом.

Таким образом, имеются все основания заключить, что причиной наблюдаемой обратной трансформации реактивных центров модифицированного PDEAA овомукоида при температуре выше НКТС является увеличение гидрофобности его молекулы.

Практическое применение обратимого изменения специфичности действия овомукоида можно проиллюстрировать в следующем эксперименте. Имобилизацией нативного или модифицирован-

**Таблица 4.** Зависимости от температуры емкости по трипсину и химотрипсину сорбентов на основе нативного и модифицированного PDEAA овомукоида\*

<i>n</i> ( <i>m</i> )	Емкость по трипсину, мг/мл ( $\pm 0.2$ )		Емкость по химотрипсину, мг/мл ( $\pm 0.2$ )	
	30°C	40°C	30°C	40°C
Нативный овомукоид	12.7	12.4	6.1	6.3
10(1)	12.0	10.2	5.4	7.2
22(1)	11.4	7.4	4.3	8.6
22(5)	7.5	~0	2.7	11.2

\* Содержание овомукоида в сорбенте – 8 мг/мл; pH 8.0.

ного PDEAA овомукоида в объеме полиакриламидного геля был получен аффинный сорбент, избирательность сорбции которого регулировалась изменением температуры (табл. 4). Видно, что емкости по трипсину и химотрипсину сорбента на основе нативного овомукоида практически не зависели от температуры. Однако в случае модифицированного овомукоида ее повышение выше значения НКТС полимера оказывало существенное влияние на емкости сорбентов. При этом, как и следовало ожидать, емкость по трипсину с увеличением температуры уменьшалась, а по химотрипсину – увеличивалась. Чем большее количество цепей PDEAA было иммобилизовано на белковой молекуле, тем в большей мере проявлялась данная температурная зависимость.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что модификация овомукоида цепями PDEAA со степенью полимеризации до 22 приводит к получению продуктов, активность которых по отношению к различным протеолитическим ферментам может обратимо изменяться с изменением температуры вследствие конформационного перехода молекул модификатора. Обнаруженное явление может быть использовано, как при создании аффинных сорбентов с программируемо изменяемой селективностью, так и для эффективного контроля протекания различных биокаталитических реакций.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Овомукоид из белка утиных яиц был выделен и очищен по методу, описанному в работе [10].

Поли-*N,N*-диэтилакриламид (PDEAA) и модельное соединение, полиакриламид (PAA), синтезировали методом радикальной полимеризации *N,N*-диэтилакриламида или акриламида (Sigma, США) в водном растворе в присутствии меркаптоуксусной кислоты [12]. В качестве инициатора полимеризации использовали окислительно-вос-

становительную систему персульфат аммония–*N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин.

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, а затем лиофильно высушивали.

Для активации концевой карбоксильной группы к раствору полимера в воде добавляли 1-этил-(3,3-диметиламинопропил)карбодиимид и перемешивали в течение 4 ч [13]. Затем в раствор добавляли овомукоид. Полученные продукты отделяли от низкомолекулярных примесей гель-хроматографией на колонке (1.5 × 40 см) с сефадексом G-25, уравновешенным бидистиллированной водой, а затем лиофильно высушивали.

Антитриптическую активность овомукоида определяли по подавлению амидазной активности трипсина, используя в качестве субстрата *n*-нитроанилид *N*<sup>α</sup>-бензоил-*L*-аргинина (Sigma, США) [14].

Антихимотриптическую активность овомукоида определяли по подавлению амидазной активности α-химотрипсина, используя в качестве субстрата *n*-нитроанилид *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина (Sigma, США) [15].

Количество цепей полимера, связанных с молекулой овомукоида, рассчитывали, исходя из разности количества свободных аминогрупп в молекулах нативного и модифицированного овомукоида, которые определяли титрованием аминогрупп три-нитробензолсульфокислотой (Sigma, США) [16].

Нижнюю критическую температуру смешения (НКТС) полимеров и продуктов их взаимодействия с овомукоидом определяли как температуру образования осадка при нагревании их водного раствора со скоростью 1–1.5°C/мин.

Полиакриламидный гель, содержащий иммобилизованный овомукоид, синтезировали радикальной сополимеризацией акриламида с *N,N'*-метил-бисакриламидом в присутствии ненасыщенного производного овомукоида, полученного ацилированием нативного или модифицированного ингибитора хлорангидридом акриловой кислоты [17].

Количество сорбированных ферментов определяли по разности их количества в растворе до и после контакта с сорбентом. Концентрацию ферментов в растворе определяли спектрофотометрически на приборе Hitachi-3400 (Япония) при длине волны 280 нм, используя калибровочные графики.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума Российской академии наук “Фундаментальные науки – медицине” и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-03-00029-а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plate N.A., Valuev L.I., Valueva T.A., Chupov V.V. // *Biomaterials*. 1993. V. 14. P. 51–56.
2. Вольф М., Рансбергер К. Лечение ферментами. М.: Мир, 1976. 232 с.
3. Химия полипептидов / Ред. П. Катсоянис. М.: Мир, 1977. 462 с.
4. Plate N.A., Kirkovsky V.V., Antiperovich O.F., Nicolaichik V.V., Valueva T.A., Sinilo S.B., Moin V.M., Lobacheva G.A. // *Biomaterials*. 1994. V. 15. P. 285–288.
5. Jeong B., Gutowska A. // *Trends Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 305–310.
6. Hoffman A.S. // *Clin. Chem.* 2000. V. 46. P. 1478–1486.
7. Галаев И.Ю. // *Успехи химии*. 1995. Т. 64. С. 505–535.
8. Валуев Л.И., Валуева Т.А., Валуев И.Л., Платэ Н.А. // *Успехи биологической химии*. 2003. Т. 43. С. 307–328.
9. Валуев И.Л., Обыденнова И.В., Сытов Г.А., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // *Высокомолекулярное соединение*. 2005. Т. 47. С. 716–719.
10. Шульгин М.Н., Валуева Т.А., Кестере А.Я., Мосолов В.В. // *Биохимия*. 1981. Т. 46. С. 473–480.
11. Laskowski M., Jr., Kato I. // *Annu. Rev. Biochem.* 1980. V. 49. P. 593–626.
12. 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. P. 3035–3043.
13. Valuev I.L., Chupov V.V., Valuev L.I. // *Biomaterials*. 1999. V. 19. P. 41–43.
14. Kakade M.L., Simons M., Liener Y.E. // *Cereal Chem.* 1969. V. 46. P. 518–523.
15. Erlanger B.F., Edel F., Cooper A.G. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1966. V. 115. P. 206–210.
16. Hynes R., Osuga D.T., Feeney R.E. // *Biochemistry*. 1967. V. 6. P. 541–547.
17. Платэ Н.А., Валуев Л.И., Чупов В.В. // *Высокомолекулярное соединение*. 1985. Т. 27. С. 2019–2034.

**Chemical Modification of Proteins by “Smart” Polymers****T. A. Valueva\*\***, **I. L. Valuev\*\***, **I. V. Obydenнова\*\***, **L. I. Valuev\*\***

# Phone: (495) 952-13-84; fax: (495) 954-2732; e-mail: valueva@inbi.ras.ru

\*Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky pr. 33, Moscow 119071, Russia;

\*\*Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow

The modification of proteinase inhibitor ovomucoid from duck eggs white by poly-*N,N*-diethylacrylamide having a low critical solution temperature (LCST) have been studied. Modification of free amino groups of lysine and *N*-terminal residue of ovomucoid is resulted in a significant decrease in the activity of the inhibitor toward trypsin and small decrease in the activity toward  $\alpha$ -chymotrypsin. At heating of the solution of modified ovomucoid above the LCST transformation of the antitryptic centers of ovomucoid in antichymotryptic centers was observed. It was shown that this phenomenon is due to the hydrophobization the lysine residues localized in the reactive centers of the inhibitor while maintaining the structure of the “linkage loops”. Therefore the  $\alpha$ -chymotrypsine molecules began to interact with these residues, mistaking them for the residues of hydrophobic amino acids of antichymotryptic centers.

*Key words:* ovomucoid, polymers with low critical solution temperature, modification.