



УДК 577.15.02:547.917

СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ КОВАЛЕНТНЫХ И НЕКОВАЛЕНТНЫХ АДДУКТОВ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ- α -ХИМОТРИПСИНА С ЦИКЛОДЕКСТРИНАМИ, МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

© 1999 г. И. Н. Топчиева[#], Е. М. Сорокина*,
Е. М. Медведева, Н. В. Ефремова*, Б. И. Курганов*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва, В-234, ГСП-3, Воробьевы горы;

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Поступила в редакцию 14.09.98 г. Принята к печати 16.03.99 г.

Исследована термостабильность комплексов ковалентных и нековалентных аддуктов на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ) и α -химотрипсина (ХТ), образующихся в присутствии полиэтиленоксидсодержащих производных β -циклодекстрина (β ЦД-ПЭО). Ковалентные [ПЭГ-ХТ]_к-конъюгаты были получены путем химической модификации NH₂-групп белка моноальдегидными производными монометоксиполиэтиленгликоля. Нековалентные [ПЭГ-ХТ]_н-комплексы получали действием повышенных давлений (1.1–400 МПа) на смесь ХТ и ПЭГ. В работе изучены супрамолекулярные структуры, образующиеся в результате комплексообразования между цепями ПЭГ, входящими в состав ПЭГ-ХТ-аддуктов (ПЭГ_{ад}) и β ЦД-ПЭО. Уменьшение константы скорости медленной стадии термоинактивации ХТ (k_2) в составе ПЭГ-ХТ-аддуктов в присутствии β ЦД-ПЭО свидетельствует о комплексообразовании между β ЦД-ПЭО и ПЭГ_{ад}. Из зависимости величины k_2 от мольного отношения β ЦД-ПЭО к ПЭГ_{ад} определен стехиометрический состав образующихся супрамолекулярных структур. Показано, что каждая полимерная цепь в составе [ПЭГ-ХТ]_к-конъюгатов образует инклюзионный комплекс с β ЦД-ПЭГ, в то время как в случае [ПЭГ-ХТ]_н-комплексов лишь половина полимерных цепей ПЭГ_{ад} участвует в образовании супрамолекулярных структур. Несмотря на то, что по термостабильности ковалентные и нековалентные ПЭГ-ХТ-аддукты одного и того же состава существенно различаются между собой, предельные значения константы скорости k_2 для [ПЭГ-ХТ]_к- и [ПЭГ-ХТ]_н-аддуктов в составе тройной системы, достигаемые при соотношениях (β ЦД-ПЭО) : (ПЭГ_{ад}), соответствующих стехиометрии образующихся тройных систем, практически одинаковы (k_2 0.007 с⁻¹; 45°C, 0.02 М Трис-НСI-буфер, рН 8.0). Предложены структуры супрамолекулярных дендритоподобных ансамблей, образующихся при взаимодействии ковалентных и нековалентных ПЭГ-ХТ-аддуктов с β ЦД-ПЭО.

Ключевые слова: α -химотрипсин; полиэтиленгликоль; конъюгаты; комплексы; термостабильность; циклодекстрины.

Модификация белков производными полиэтиленгликоля (ПЭГ) широко используется в биотехнологии для придания им важных в практическом отношении свойств, а именно, повышенной стабильности, сниженной иммуногенности и антигенности, пролонгированности их действия, растворимости в органических растворителях. Основная роль полимерных цепей в ПЭГ-белко-

вых конъюгатах состоит в изменении микроокружения белковой глобулы, а также в их способности препятствовать взаимодействию белка с макромолекулярными агентами. Дополнительные возможности изменения свойств белков в ПЭГ-ХТ-аддуктах могут быть достигнуты за счет комплексообразования между ПЭГ, входящим в состав аддуктов (ПЭГ_{ад}), и циклодекстрином (ЦД). Циклодекстрины, называемые также циклоолигоамилозами или цикломальтоолигосахаридами, представляют собой циклические олигосахариды, построенные из D(+)-глюкопиранозных звеньев, связанных между собой α -1,4-гликозидной связью (рис. 1). Циклодекстрин, имеющий в сво-

Сокращения: ХТ – α -химотрипсин; ПАВ – поверхностно-активное вещество; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ПЭО – полиэтиленоксид; β ЦД – β -циклодекстрин; β ЦД-ПЭО – ковалентные аддукты 2,3,6-ПЭО- β -циклодекстрин.

[#] Автор для переписки (факс: (7095) 939-01-74; e-mail: kurganov@gagarinclub.ru).

ем составе шесть, семь, восемь и т.д. глюкопиранозных звеньев, называется α -, β -, γ -циклодекстрином и т.д. [1]. Известно, что ПЭГ образует комплексы включения с α ЦД, причем на одну молекулу ПЭГ нанизываются десятки молекул ЦД, образуя “молекулярные ожерелья” [2]. Ранее было показано, что полимерные цепи ПЭГ, входящие в состав ПЭГ-белковых ковалентных конъюгатов, доступны для взаимодействия с α ЦД и способны к образованию “молекулярных ожерелий” [2]. Недостатком таких систем является то, что они обладают меньшей растворимостью в воде по сравнению с исходными ПЭГ-белковыми конъюгатами, что ограничивает их применение в биотехнологии.

Для придания растворимости комплексам на основе ПЭГ-белковых аддуктов и циклодекстринов нами использованы производные циклодекстринов разветвленной структуры, способные образовывать комплексы включения с ПЭГ [3]. В качестве таких производных были выбраны ковалентные аддукты полиэтиленоксида (ПЭО) и ЦД: 2,3,6-ПЭО-циклодекстрин (ЦД-ПЭО), синтез и свойства которых описаны в работах [4, 5].

В настоящей работе нами предложены методы обнаружения комплексообразования между цепями ПЭГ, входящими в состав ковалентных и нековалентных аддуктов ПЭГ с α -химотрипсином, и ЦД-ПЭО и изучены ферментативные свойства новых супрамолекулярных структур, включающих эти компоненты.

Ковалентные ПЭГ-белковые аддукты, конъюгаты $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_k]$, были получены путем химической модификации NH_2 -групп α -химотрипсина моноальдегидными производными полиэтиленгликоля с молекулярными массами 750 и 1900 Да. Нековалентные ПЭГ-белковые аддукты, комплексы $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_n]$, получали действием повышенных давлений на смесь α -химотрипсина и ПЭГ с молекулярными массами от 300 до 4000 Да. Характеристики ПЭГ-белковых конъюгатов и ПЭГ-белковых комплексов приведены в табл. 1. Интересно, что в зависимости от условий проведения химической модификации могут быть получены $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_k]$ -конъюгаты с различным содержанием как полимерных цепей, так и белка. В то же время было обнаружено, что содержание белка в $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_n]$ -комплексках практически не зависит от условий проведения реакции (давления, времени контакта реагентов), а также от молекулярной массы ПЭГ. Тот факт, что состав $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_n]$ -комплексков не зависит от молекулярной массы ПЭГ, может означать, что полимерные цепи ПЭГ различной молекулярной массы фиксируются на одних и тех же участках на поверхности белковой глобулы. Мы показали, что каталитическая активность $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_n]$ -комплексков не отличается от каталитической активности

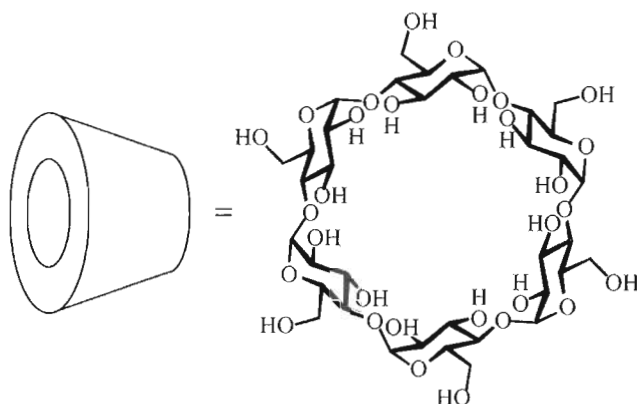


Рис. 1. Структурные формулы циклодекстринов.

исходного α -химотрипсина. Это свидетельствует о том, что присоединенные полимерные цепи ПЭГ не создают стерических препятствий для субстрата в области активного центра фермента.

На рис. 2 и 3 представлены полученные нами экспериментальные данные по кинетике термоинактивации нативного α -химотрипсина и α -химотрипсина в составе $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_k]$ - и $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_n]$ -аддуктов. Кинетические кривые термоинактивации удовлетворительно описываются суммой двух экспонент:

$$A/A_0 = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t), \quad (1)$$

Таблица 1. Характеристика ковалентных и нековалентных аддуктов α -химотрипсина (ХТ) с полиэтиленгликолем (ПЭГ)

Объекты исследования*	Содержание белка в аддукте, %
Конъюгаты ХТ с ПЭГ	
$[(\text{ПЭГ}750)_6-\text{ХТ}]_k$	85
$[(\text{ПЭГ}1900)_3-\text{ХТ}]_k$	83
$[(\text{ПЭГ}1900)_6-\text{ХТ}]_k$	68
$[(\text{ПЭГ}1900)_7-\text{ХТ}]_k$	64
$[(\text{ПЭГ}1900)_{11}-\text{ХТ}]_k$	53
Комплексы ХТ с ПЭГ	
$[(\text{ПЭГ}300)_{31}-\text{ХТ}]_n$	73
$[(\text{ПЭГ}750)_{12}-\text{ХТ}]_n$	74
$[(\text{ПЭГ}1500)_8-\text{ХТ}]_n$	68
$[(\text{ПЭГ}1900)_6-\text{ХТ}]_n$	69
$[(\text{ПЭГ}1900)_7-\text{ХТ}]_n$	65
$[(\text{ПЭГ}3000)_3-\text{ХТ}]_n$	74
$[(\text{ПЭГ}4000)_2-\text{ХТ}]_n$	76

* Цифра у аббревиатуры ПЭГ соответствует молекулярной массе полиэтиленгликоля, а нижний индекс – числу его полимерных цепей в аддукте.

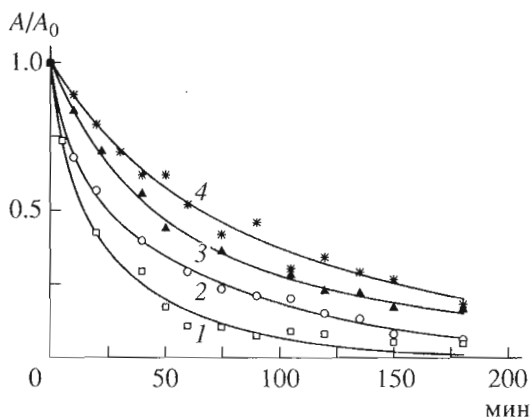


Рис. 2. Кинетические кривые термоинактивации α -химотрипсина (ХТ) (1) и его ковалентных [ПЭГ-ХТ]_к-конъюгатов: (ПЭГ750)₆-ХТ (2), (ПЭГ1900)₃-ХТ (3) и (ПЭГ1900)₇-ХТ (4). 0.2 М Трис-НСI-буфер, рН 8.0; 45°C. Концентрация белка в растворе 1×10^{-5} М.

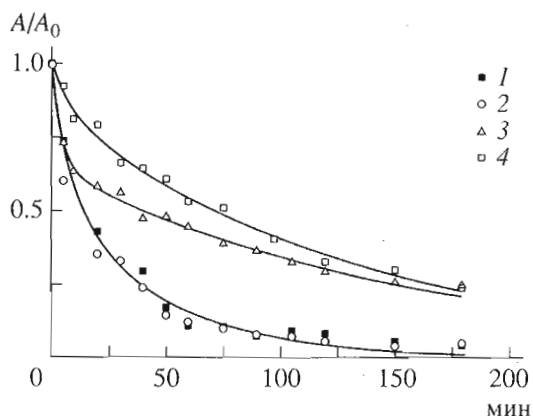


Рис. 3. Кинетические кривые термоинактивации α -химотрипсина (ХТ) (1) и его нековалентных комплексов: 2 – [(ПЭГ1900)₇-ХТ]_н, 3 – [(ПЭГ1900)₇-ХТ]_н-(β ЦД-ПЭО); комплекс получен по способу 1. Отношение β ЦД-ПЭО/ПЭГ_{ад} равно 1 : 2 моль/моль. 4 – [(ПЭГ1900)₇-ХТ-(β ЦД-ПЭО)]_н; комплекс получен по способу 2. 0.2 М Трис-НСI-буфер, рН 8.0; 45°C. Концентрация белка в растворе 1×10^{-5} М.

где A/A_0 – относительная ферментативная активность, A_1 и A_2 – относительные вклады отдельных стадий процесса ($A_1 + A_2 = 1$) и k_1 и k_2 – константы скорости термоинактивации для каждой стадии. Описание экспериментальных зависимостей ферментативной активности от времени функцией (1) проводили путем минимизации суммы квадратов отклонений с помощью программы Origin 3.73. Биэкспоненциальная кинетика термоинактивации характерна для ряда ферментов, в частности, для α -химотрипсина [6]. При этом обычно принимают, что исходный препарат фермента содержит две формы – лабильную и стабильную, доли которых составляют A_1 и A_2 соответственно.

Предполагается, что при повышенной температуре инактивация этих двух форм происходит независимо, с константами скорости k_1 и k_2 .

Как видно из рассчитанных констант скорости термоинактивации для нативного химотрипсина и его аддуктов с ПЭГ (табл. 2), доля первой стадии процесса термоинактивации (A_1) для [ПЭГ-ХТ]_к-конъюгатов меньше соответствующего значения для нативного α -химотрипсина, вследствие чего величина k_1 не во всех случаях может быть определена. Сопоставление величин k_2 , характеризующих инактивацию более стабильной формы фермента, показывает, что при переходе от α -химотрипсина к его ковалентным конъюгатам с ПЭГ наблюдается заметная стабилизация фермента. Из рис. 2 видно, что термическая стабильность конъюгатов [ПЭГ-ХТ]_к увеличивается как с увеличением молекулярной массы присоединенного к белку ПЭГ (кривые 2 и 4), так и с увеличением числа полимерных цепей в конъюгате, приходящихся на одну молекулу белка (кривые 3 и 4).

Изучение кинетики термоинактивации нековалентных [ПЭГ-ХТ]_н-комплексов показало, что по термической стабильности они, в противоположность ковалентным конъюгатам, практически не отличаются от нативного α -химотрипсина (табл. 2 и рис. 3, кривая 2). Поскольку, как нами ранее было показано, [ПЭГ-ХТ]_н-комплексы не разрушаются в условиях проведения эксперимента по термоинактивации [7], можно предположить, что нековалентная фиксация ПЭГ не приводит к экранированию гидрофобных участков на поверхности белковой глобулы, необходимому для повышения термической стабильности белка, как это происходит в случае ковалентных ПЭГ-ХТ-аддуктов [8, 9].

Основываясь на этих представлениях, можно полагать, что изменение конформационного состояния полимерных цепей в ПЭГ-белковых аддуктах, например в результате комплексообразования с циклодекстринами, может оказать влияние на термическую стабильность белка. Действительно, было показано, что подобное комплексообразование приводит к уменьшению термической стабильности белка и одновременно к существенному уменьшению растворимости полимер-белковых ковалентных конъюгатов [10]. На примере этой системы нами был сделан вывод о том, что изучение термостабильности является весьма информативным методом исследования процесса комплексообразования. В данной работе в качестве комплексообразователя вместо циклодекстрина были использованы разветвленные производные α - и β -ЦД: конъюгаты 2,3,6-ПЭО- α -циклодекстрин (α ЦД-ПЭО) и 2,3,6-ПЭО- β -циклодекстрин (β ЦД-ПЭО). Структура конъюгатов ЦД схематически представлена на рис. 4.

Таблица 2. Константы скорости термоинактивации α -химотрипсина и его ковалентных и нековалентных аддуктов с ПЭГ (45.0°C, pH 8.0)

Объекты исследования	Молярное соотношение (ПЭГ _{ал}): (βЦД-ПЭГ)	A ₁	k ₁ , c ⁻¹	A ₂	k ₂ , c ⁻¹
Нативный ХТ	–	0.33 ± 0.11	0.15 ± 0.07	0.67 ± 0.11	0.0240 ± 0.0040
ПЭГ-ХТ-конъюгаты					
[(ПЭГ750) ₆ -ХТ] _к	–	0.24 ± 0.12	0.042 ± 0.036	0.76 ± 0.38	0.0140 ± 0.0050
[(ПЭГ1900) ₃ -ХТ] _к	–	0.040 ± 0.001	–	0.96 ± 0.03	0.0120 ± 0.0010
[(ПЭГ1900) ₃ -ХТ] _к -(βЦД-ПЭГ)	1 : 2	0.040 ± 0.001	–	0.96 ± 0.02	0.0087 ± 0.0005
[(ПЭГ1900) ₇ -ХТ] _к	–	0.030 ± 0.001	–	0.97 ± 0.03	0.0096 ± 0.0006
[(ПЭГ1900) ₇ -ХТ] _к -(βЦД-ПЭГ)	1 : 0.5	0.030 ± 0.001	–	0.97 ± 0.02	0.0080 ± 0.0005
то же	1 : 1	–	–	~1.0	0.0069 ± 0.0004
то же	1 : 2	0.020 ± 0.002	–	0.98 ± 0.01	0.0068 ± 0.0003
то же	1 : 4	0.010 ± 0.001	–	0.99 ± 0.02	0.0065 ± 0.0005
[(ПЭГ1900) ₁₁ -ХТ] _к	–	0.130 ± 0.004	–	0.87 ± 0.03	0.0117 ± 0.0031
[(ПЭГ1900) ₁₁ -ХТ] _к -(βЦД-ПЭГ)	1 : 2	0.010 ± 0.001	–	0.99 ± 0.12	0.0063 ± 0.0011
ПЭГ-ХТ-комплексы					
[(ПЭГ300) ₃₁ -ХТ] _н	–	0.46 ± 0.10	0.20 ± 0.09	0.54 ± 0.12	0.0230 ± 0.0050
[(ПЭГ750) ₁₂ -ХТ] _н	–	0.56 ± 0.10	0.10 ± 0.01	0.44 ± 0.08	0.0240 ± 0.0060
[(ПЭГ1500) ₈ -ХТ] _н	–	0.54 ± 0.05	0.22 ± 0.01	0.46 ± 0.04	0.0230 ± 0.0030
[(ПЭГ1900) ₇ -ХТ] _н	–	0.58 ± 0.06	0.32 ± 0.01	0.42 ± 0.04	0.0230 ± 0.0030
[(ПЭГ1900) ₇ -ХТ] _н -(βЦД-ПЭГ)	1 : 0.25	0.32 ± 0.02	0.20 ± 0.06	0.68 ± 0.05	0.0170 ± 0.0016
то же	1 : 0.4	0.29 ± 0.01	0.15 ± 0.04	0.71 ± 0.03	0.0090 ± 0.0009
то же	1 : 0.5	0.27 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.73 ± 0.02	0.0070 ± 0.0007
то же	1 : 1	0.38 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.62 ± 0.03	0.0070 ± 0.0009
то же	1 : 2	0.35 ± 0.01	0.24 ± 0.04	0.65 ± 0.02	0.0060 ± 0.0005
то же	1 : 4	0.36 ± 0.01	0.29 ± 0.06	0.63 ± 0.02	0.0050 ± 0.0005
[(ПЭГ1900) ₇ -ХТ-(βЦД-ПЭГ)] _н *	–	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.06	0.85 ± 0.04	0.0075 ± 0.0008

* Комплекс получен путем воздействия повышенного давления на смесь трех компонентов: α -химотрипсина, полиэтиленгликоля 1900 и β -циклодекстрин-ПЭО (способ 2, см. "Эксперимент. часть").

Как было показано в работе [3], конъюгаты βЦД-ПЭО образуют растворимые инклюзионные комплексы с концевыми участками полимерных цепей ПЭГ, входящих в состав неионных поверхностно-активных веществ (ПАВ), в которых βЦД-ПЭО выступает в роли молекулы "хозяина", способной включать в свою полость ПЭО-фрагменты ПАВ. Можно полагать, что фрагменты ПЭГ, входящие в состав ковалентных и нековалентных аддуктов α -химотрипсина с ПЭГ, также способны к образованию подобных комплексов.

Изучение кинетики термоинактивации [(ПЭГ1900)₇-ХТ]_к-конъюгата показало, что добавление βЦД-ПЭО приводит к увеличению термической стабильности белка (кривая 2 на рис. 5), в то время как добавление αЦД-ПЭО не влияет на его термостабильность (кривая 3 на рис. 5). По-видимому, эффективный размер полости αЦД в конъюгате αЦД-ПЭО вследствие стерического влияния присоединенных цепей ПЭГ уменьшается по сравнению с размером полости исходного αЦД и поэтому αЦД-ПЭО не спосо-

бен образовывать комплекс с полимерными цепями [(ПЭГ-ХТ)_к-конъюгатов.

На рис. 6 представлена зависимость константы скорости термоинактивации k₂ химотрипсина в

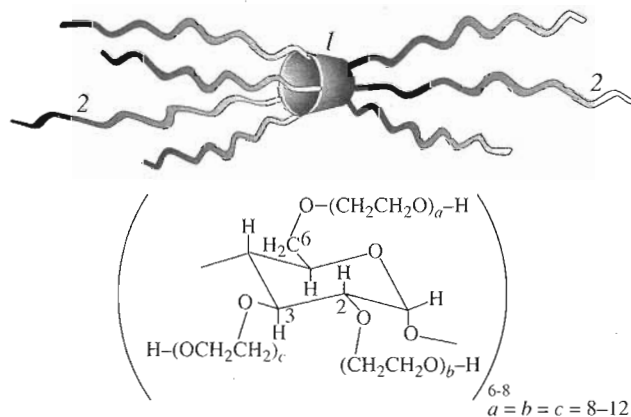


Рис. 4. Структура ковалентных аддуктов полиэтиленоксида (ПЭО) и α - или β -циклодекстрина (ЦД); 1 – циклодекстрин, 2 – полиэтиленоксид.

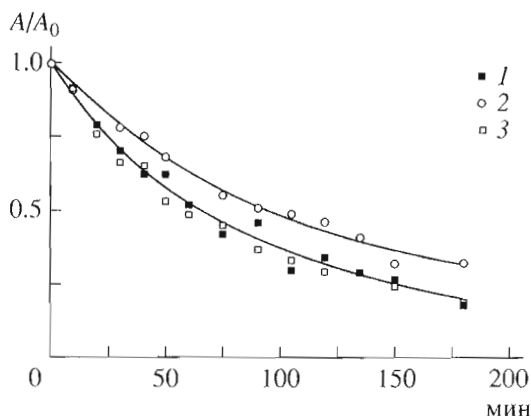


Рис. 5. Кинетические кривые термоинактивации ковалентного $[(\text{ПЭГ}1900)_7\text{-ХТ}]_k$ -конъюгата в отсутствие ЦД-ПЭО (1) и в присутствии: β ЦД-ПЭО (2) и α ЦД-ПЭО (3). Отношение β ЦД-ПЭО/ПЭГ_{ад} равно 1 : 1 моль/моль. 0.2 М Трис-НСI-буфер, рН 8.0; 45°C. Концентрация белка в растворе 1×10^{-5} М.

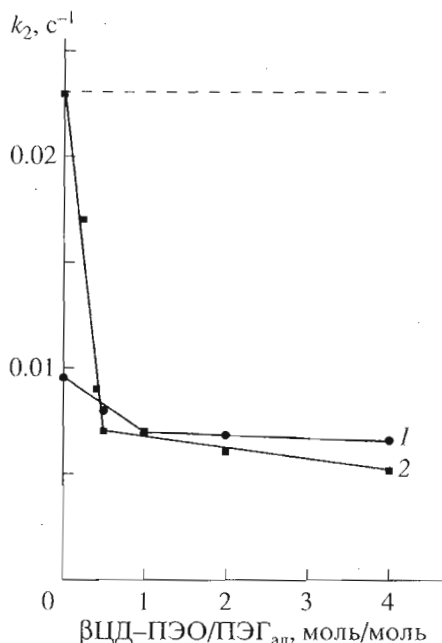


Рис. 6. Зависимость константы k_2 термоинактивации α -химотрипсина (ХТ), входящего в состав трехкомпонентных систем на основе $[(\text{ПЭГ}1900)_7\text{-ХТ}]_k$ -конъюгата (1) и $[(\text{ПЭГ}1900)_7\text{-ХТ}]_n$ -комплекса (2), от соотношения β ЦД-ПЭО и ПЭГ_{ад} в системе. Пунктирной линией обозначено значение k_2 для термоинактивации нативного ХТ или нативного ХТ в присутствии β ЦД-ПЭО.

составе тройных систем от молярного соотношения β ЦД-ПЭО и ПЭГ_{ад}, входящего в состав ковалентного и нековалентного $(\text{ПЭГ}1900)_7\text{-ХТ}_k$ -аддуктов. Эта зависимость для ковалентного конъюгата демонстрирует уменьшение величины k_2 с увеличением β ЦД-ПЭО в системе и имеет излом

при эквимольном соотношении компонентов. Специальными опытами было показано, что β ЦД-ПЭО не оказывает влияния на термостабильность нативного α -химотрипсина. Следовательно, уменьшение константы скорости термоинактивации k_2 в присутствии β ЦД-ПЭО свидетельствует об образовании комплекса между производными β ЦД и полимерными цепями ПЭГ_{ад}. Ранее, при изучении системы (ПЭО-содержащее ПАВ)-(β ЦД-ПЭО) методом измерения поверхностного натяжения [3] нами было показано, что кривые зависимости поверхностного натяжения ПАВ от соотношения компонентов имеют вид кривой титрования. Излом на этих кривых указывал на образование комплекса со стехиометрией 1 : 1. Иными словами, в образующемся инклюзионном комплексе одна молекула β ЦД-ПЭО нанизывается на ПЭО-фрагмент молекулы ПАВ. Как следует из данных, представленных на рис. 6, аналогичная картина наблюдается и в случае ковалентного ПЭГ-белкового конъюгата.

Для $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_n]$ -комплексов показано (на рис. 3), что термическая стабильность фермента, входящего в их состав, так же как для α -химотрипсина в ковалентных конъюгатах с ПЭГ, существенно увеличивается в присутствии β ЦД-ПЭО. Идентичность состава ковалентных и нековалентных ПЭГ-ХТ-аддуктов в рассматриваемых тройных системах с β ЦД-ПЭО (рис. 6, табл. 2) дает основание для прямого сопоставления кинетических данных по влиянию β ЦД-ПЭО на их термостабильность. Как видно из табл. 2, повышение термостабильности $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_n]$ -комплекса связано, в первую очередь, с уменьшением константы скорости термоинактивации k_2 (изменение константы скорости k_1 незначительно). Как и в случае $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_k]$ -конъюгата, зависимость константы скорости k_2 для термоинактивации нековалентного ПЭГ-ХТ-комплекса от молярного соотношения β ЦД-ПЭО и ПЭГ_{ад} имеет вид кривой с изломом (рис. 6) и свидетельствует об образовании комплекса производного β ЦД с полимерными цепями, расположенными на поверхности белковой глобулы. В то же время, положение точки излома для $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_n]$ -комплекса отличается от соответствующего значения для $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_k]$ -конъюгата и соответствует молярному отношению β ЦД-ПЭО/ПЭГ_{ад}, равному 0.5 : 1 (или 1 : 2). Таким образом, можно полагать, что только половина полимерных цепей ПЭГ, входящих в состав $[(\text{ПЭГ}-\text{ХТ})_n]$ -комплекса, участвует в комплексобразовании с производными β ЦД.

Обращает на себя внимание тот факт, что предельные значения констант скорости термоинактивации k_2 для ковалентных и нековалентных ПЭГ-ХТ-аддуктов, достигаемые при стехиометрических отношениях β ЦД-ПЭО к ПЭГ_{ад} практически одинаковы (k_2 0.007 с⁻¹). Это означает, что несмотря на существенные различия в термоста-

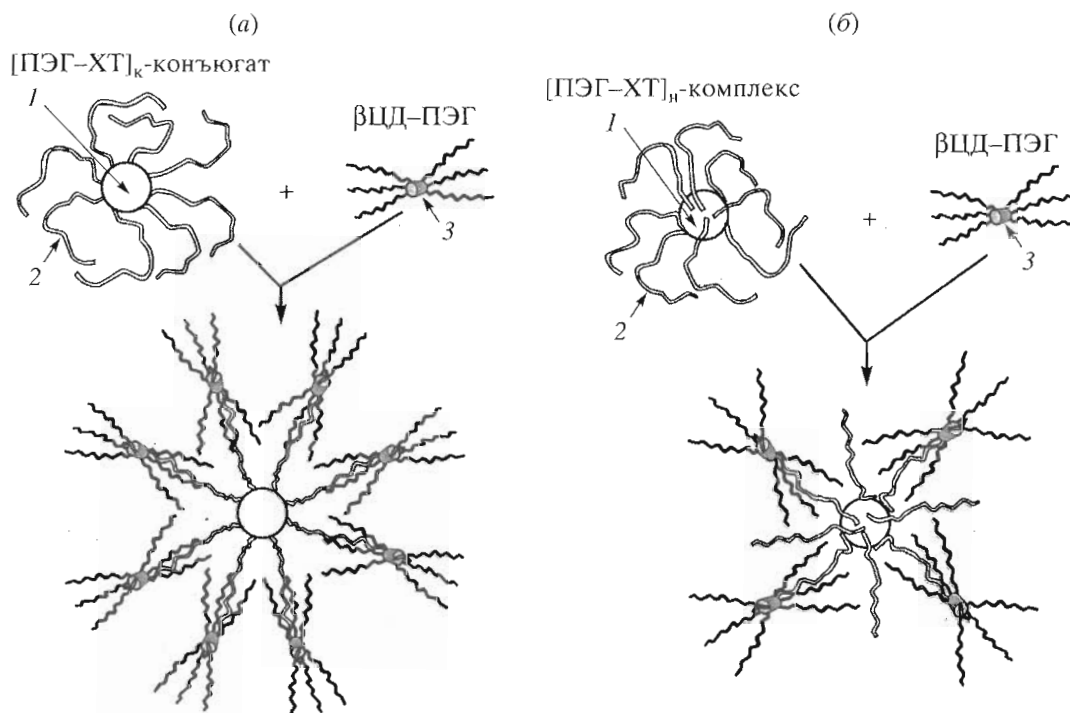


Рис. 7. Предполагаемые дендритоподобные структуры комплексов, образованных ковалентными (а) и нековалентными (б) ПЭГ-ХТ-аддуктами и βЦД-ПЭО. 1 — α-химотрипсин (ХТ); 2 — полиэтиленгликоль (ПЭГ) и 3 — ковалентный аддукт на основе полиэтиленоксида (ПЭО) и β-циклодекстрина, 2,3,6-ПЭО-β-циклодекстрин (βЦД-ПЭО).

бильности исходных ковалентных и нековалентных ПЭГ-ХТ-аддуктов, стабильность супрамолекулярных структур, образующихся при взаимодействии с βЦД-ПЭО, одинакова. Следовательно, в трехкомпонентных ПЭГ-ХТ-(βЦД-ПЭО)-комплексах микроокружение белковой глобулы, создаваемое цепями ПЭГ, является практически идентичным, независимо от того, каким образом цепи ПЭГ присоединены к белковой глобуле. В этой связи, представлялось весьма интересным получить подобные супрамолекулярные системы действием повышенного давления на смесь трех компонентов: α-химотрипсина, ПЭГ и βЦД-ПЭО (способ 2). Анализ состава комплекса, полученного по способу 2, показал наличие в нем всех трех компонентов, причем оказалось, что по термостабильности комплексы, полученные обоими способами близки друг к другу (см. рис. 3 и табл. 2). По-видимому, воздействие повышенного давления на смесь трех компонентов приводит к образованию супрамолекулярного ансамбля того же типа, который образуется при проведении двухстадийного синтеза.

Увеличение термической стабильности, обнаруженное в системах, содержащих ПЭГ-ХТ-аддукты и конъюгат βЦД-ПЭО, по-видимому обусловлено тем, что комплексообразование ПЭГ_{ад} с βЦД-ПЭО приводит к "удлинению" и "разветвлению" полимерных цепей. Заметим, что при ис-

пользовании полимерных реагентов разветвленной структуры (например ди-ПЭГ-реагентов [11]) для модификации белков наблюдается существенное увеличение их стабильности по сравнению с аддуктами белков с ПЭГ-реагентами [11].

Создание супрамолекулярных структур на основе нековалентных комплексов ПЭГ-белок и βЦД-ПЭО позволяет получать белковые препараты с повышенной термостабильностью, минуя стадию химической модификации белков. Заметим, что наиболее простой способ получения подобных супрамолекулярных структур состоит в том, что действию повышенного давления подвергается смесь трех компонентов (α-химотрипсина, ПЭГ и βЦД-ПЭО).

Полученные данные позволяют представить строение супрамолекулярных ансамблей, образующихся при взаимодействии ковалентных и нековалентных аддуктов α-химотрипсина с ПЭГ и βЦД-ПЭО (рис. 7). По-видимому, такие структуры, включающие высокоразветвленные элементы на основе производных βЦД и содержащие белок и полимерные цепи ПЭГ, близки по архитектуре к дендримерам [12]. Таким образом, разработанный нами ранее метод молекулярной самосборки дендритоподобных структур [2] применен в данной работе для получения аддуктов, содержащих ПЭГ и белок, и представляет один из способов повышения термической стабильно-

сти белков. Рассмотренные дендритоподобные структуры являются уникальным примером молекулярной самосборки с участием биологических и синтетических макромолекул.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие вещества: кристаллический α -химотрипсин (Sigma, США) с активностью 40–60 ед. на 1 мг, полиэтиленгликоль (ПЭГ) со среднечисловой молекулярной массой 300, 750, 1500, 1900, 3000, 4000 Да фирмы "Serva" (Германия), α - и β -циклодекстрины фирмы "Cyclolab" (Венгрия), перекристаллизованные нами из воды. В качестве субстрата α -химотрипсина служил этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-тирозина (ВТЭЕ) (Sigma, США). Для приготовления буферных растворов использовали Трис (Reanal, Венгрия).

В качестве носителя для аффинной хроматографии использовали сефарозу, модифицированную соевым ингибитором трипсина (Sigma, США). Для получения данного носителя к 5.0 г BrCN-сефарозы (Pharmacia, Швеция) в 20 мл 0.5 М Трис-НСl-буфера рН 8.9 добавляли 40 мг соевого ингибитора трипсина. После этого носитель промывали 500 мл 3 М KCl, 500 мл 1 мМ HCl (рН 3.0) и многократно промывали 0.02 М фосфатным буфером, рН 7.8.

Модификацию α -химотрипсина моноальдегидными производными монометокси-ПЭГ для получения ковалентных [ПЭГ-ХТ]_к-конъюгатов проводили по методике, описанной ранее в работе [13].

Для получения нековалентных [ПЭГ-ХТ]_н-комплексов в раствор белка (2 мг/мл) в 0.02 М фосфатном буфере, рН 7.0, добавляли 200-кратный молярный избыток ПЭГ. Смесь перемешивали до полного растворения компонентов. Избыточное давление в системе создавали центрифугированием в течение 1 ч при 25°C и 37000–142000 *g* в препаративной ультрацентрифуге MOM-3180 (*r*_{ср} 5.1 см). Для каждого значения ускорения была рассчитана соответствующая ему величина максимального давления, создаваемого в системе (без учета градиента давления от мениска ко дну ячейки).

Выделение ПЭГ-ХТ-аддуктов из реакционной смеси проводили двумя методами. *Метод 1.* Аликвоту реакционной смеси, содержащую 10 мг α -химотрипсина, разводили до 20 мл 0.02 М фосфатным буфером, рН 7.6–7.8 и комплексы белков с полимерами отделяли от избытка ПЭГ хроматографически на колонке 0.7 × 10.0 см с аффинным сорбентом (сефарозой, модифицированной соевым ингибитором трипсина) с элюцией 0.02 М фосфатным буфером, рН 7.8. Состав элюата анализировали по поглощению УФ-света при 206 нм. Элюцию аддукта производили, используя в каче-

стве элюента 1 мМ HCl (рН 3.0) и определяя состав элюата по поглощению УФ-света при 280 нм, с последующими диализом и лиофилизацией.

Метод 2. Реакционную смесь подвергали диализу против дистиллированной воды. Для концентрирования раствор, содержащий ПЭГ-ХТ-аддукт помещали в диализный мешок и засыпали сухим полиэтиленгликолем с молекулярной массой 100000. Продукт выделяли путем осаждения избытком ацетона (10 : 1 по объему), охлажденного до 0°C [14].

Отсутствие примеси свободного ПЭГ в продукте контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol (Kavalier, Чехословакия) в системе хлороформ-этанол-вода (36 : 12 : 1 по объему). Хроматограммы проявляли в иодной камере.

Содержание белка в аддуктах определяли спектрофотометрически при 280 нм и с помощью биуретовой реакции [15], используя нативный α -химотрипсин в качестве стандарта. Содержание ПЭГ (число полимерных цепей, приходящееся на одну молекулу белка, *n*) определяли по следующей формуле:

$$n = \frac{(100 - \text{вес. \% ХТ}) / \bar{M}_n}{\text{вес. \% ХТ} / M}$$

где \bar{M}_n – среднечисловая молекулярная масса полимера, *M* – молекулярная масса белка.

Синтез конъюгатов ЦД-ПЭО проводили путем полимеризации оксида этилена, инициируемой гидроксильными группами полифункционального инициатора – циклодекстрина, по методике, описанной ранее в работе [4].

Трехкомпонентные системы ПЭГ-ХТ-(β ЦД-ПЭО) получали двумя способами. *Способ 1.* К предварительно полученным ковалентным или нековалентным ПЭГ-ХТ-аддуктам добавляли β ЦД-ПЭО. С этой целью были получены растворы ПЭГ-ХТ-аддуктов с концентрацией белка 10⁻⁵ М и конъюгата β ЦД-ПЭО с концентрацией, рассчитанной исходя из необходимого мольного отношения β ЦД-ПЭГ к ПЭГ_{ад}.

Способ 2. К раствору α -химотрипсина (2 мг/мл) в 0.02 М фосфатном буфере, рН 7.0, добавляли 200-кратный молярный избыток ПЭГ и 400-кратный молярный избыток конъюгата β ЦД-ПЭО. Смесь перемешивали до полного растворения компонентов. Избыточное давление в системе создавали центрифугированием в течение 1 ч при 25°C и 37000–142000 *g* в препаративной ультрацентрифуге MOM-3180 (*r*_{ср} 5.1 см). Выделение продукта проводили методом осаждения ацетоном так же, как и в случае ПЭГ-ХТ-аддуктов.

Измерение термостабильности. Раствор фермента или аддукта с концентрацией 10⁻⁵ М (по α -химотрипсину) в 0.2 М Трис-НСl-буфере, рН 8.0, инкубировали в термостате при 45.0 ± 0.05°C. Че-

рез определенные промежутки времени отбирали пробы и определяли остаточную активность по начальной скорости гидролиза ВТЭЕ [13].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 96-03-33519а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wenz G. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994. V. 33. P. 803–822.
2. Топчиева И.Н., Герасимов В.И., Панова И.Г., Карезин К.И., Ефремова Н.В. // *Высокомолекуляр. соед. Сер. А.* 1998. Т. 40. С. 310–318.
3. Топчиева И.Н., Мишник П., Кюн Г., Карезин К.И., Елецкая С.В. // *Докл. РАН.* 1998. Т. 360. С. 364–367.
4. Topchieva I.N., Polyakov V.A., Elezkaya S.V., Bystryzky G.I., Karesin K.I. // *Polymer Bull.* 1997. V. 38. P. 359–364.
5. Topchieva I.N., Mischnick P., Kühn G., Polyakov V.A., Elezkaya S.V., Bystryzky G.I., Karesin K.I. // *Bioconj. Chem.* 1998. V. 9. P. 676–682.
6. Sadana A., Henley G.P. // *Biotechnol. Bioengin.* 1986. V. 28. P. 256–268.
7. Топчиева И.Н., Сорокина Е.М., Ефремова Н.В., Ксенофонтов А.Л. // *Биохимия.* 1998. Т. 63. С. 1543–1550.
8. Mozhaev V.V., Martinek K. // *Enzyme and Microb. Technol.* 1984. V. 6. P. 50–59.
9. Mozhaev V.V., Martinek K., Berezin I.V. // *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1988. V. 23. P. 235–275.
10. Ефремова Н.В., Топчиева И.Н. // *Биохимия.* 1993. Т. 58. С. 1071–1076.
11. Greenwald R.B., Martinez A. Non-antigenic Branched Polymer Conjugates: Patent US PCT/US94/12237 // PCT. 1995. WO 95/11924. P. 34.
12. Newkome G.R., Moorefield C.N., Vogtle F. *Dendritic Molecules. Concepts. Syntheses. Perspectives*; VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, 1997.
13. Ефремова Н.В., Можяев В.В., Топчиева И.Н. // *Биохимия.* 1992. Т. 57. С. 342–347.
14. Топчиева И.Н., Ефремова Н.В., Снитко Я.Э., Хворов Н.В. // *Докл. РАН.* 1994. Т. 339. С. 498–502.
15. Кочетов Г.А. *Практическое руководство по энзимологии.* М.: Высш. шк., 1980. С. 222.

Supramolecular Complexes of Polyethylene Glycol- α -Chymotrypsin Covalent and Noncovalent Adducts with Polyoxyethylene-modified Cyclodextrins

I. N. Topchieva*[#], E. M. Sorokina**[#], E. M. Medvedeva*, N. V. Efremova**[#], and B. I. Kurganov**[#]

*Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

**Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 117071 Russia

Complexes of covalent and noncovalent adducts of polyethylene glycol (PEG) and α -chymotrypsin (ChT), PEG–ChT, were generated in the presence of β -cyclodextrin derivatives of polyoxyethylene (β CD–PEO), and their thermal stability was studied. The covalent [PEG–ChT]_c conjugates were obtained by chemical modification of the protein amino groups with the monoaldehyde derivatives of monomethoxypolyethylene glycol. The noncovalent [PEG–ChT]_n complexes were obtained by the treatment of ChT–PEG mixtures with increasing pressure (1.1–400 MPa). Supramolecular structures resulting from complex formation between PEG chains of the PEG–ChT adducts (PEG_{ad}) and β CD–PEO were studied. The decrease in the rate constant of the slow stage of ChT thermal inactivation in PEG–ChT adducts (k_2) can serve as confirmation of complex formation between β CD–PEO and PEG_{ad}. The stoichiometric composition of our supramolecular structures was determined from the k_2 dependence on the molar ratio of β CD–PEO to PEG_{ad}. It was shown that each polymeric chain in the [PEG–ChT]_c conjugates forms an inclusion complex with β CD–PEO, whereas only half of the PEG_{ad} polymeric chains participate in the formation of supramolecular structures in the case of [PEG–ChT]_n complexes. Although covalent and noncovalent PEG–ChT adducts of the same composition significantly differ in their thermal stability, the maximal values of the k_2 rate constants for [PEG–ChT]_c and [PEG–ChT]_n adducts in the triple system attainable at the (β CD–PEO) to (PEG_{ad}) ratio corresponding to the stoichiometry of the resulting ternary systems are practically the same ($k_2 = 0.007 \text{ c}^{-1}$ at 45°C in 0.02 M Tris-HCl buffer solution, pH 8.0). Structures for the supramolecular dendrite-like ensembles formed upon the interaction of covalent and noncovalent PEG–ChT adducts with β CD–PEO were suggested.

Key words: α -chymotrypsin, complexes, conjugates, cyclodextrins, polyethylene glycol, thermal stability

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 939-0174; e-mail: kurganov@gagarinclub.ru.