



УДК 547.964:541.64

“ЗВЕЗДООБРАЗНЫЕ” КОНЬЮГАТЫ БЕЛКОВ С КАРБОЦЕПНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ, НЕСУЩИМИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, И ИХ ИММУНОГЕННОСТЬ

© 2003 г. Г. П. Власов[#], Г. А. Панкова, И. Н. Никонова, Н. Г. Антонов

Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004, Санкт-Петербург, Большой просп., 31
Поступила в редакцию 18.10.2000 г. Принята к печати 30.01.2002 г.

С целью определения возможности регулирования иммунного ответа против компонентов полимер-белкового конъюгата проведен синтез “звездообразных” полимер-белковых конъюгатов на основе бычьего сывороточного альбумина и пероксидазы хрена, в которых молекулы модифицирующего карбоцепного полимера односторонне связаны с белком и которые содержат в карбоцепной части остатки аналога сальсолинола (1-метил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина), а именно, 1-винил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина, или остатки пептидного гормона брадикинина. Показано, что изменение химической природы карбоцепной части полимер-белкового конъюгата позволяет повышать или снижать уровень выработки антител как против низкомолекулярных соединений, связанных с полимерными фрагментами, так и против белкового носителя.

Ключевые слова: брадикинин; “звездообразные” карбоцепные полимер-белковые конъюгаты; 1-метил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (сальсолинол); 1-винил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин; иммуногенность.

ВВЕДЕНИЕ

Химическая модификация водорастворимыми синтетическими или природными полимерами белков, нуклеиновых кислот и полисахаров, а также низкомолекулярных биологически активных веществ – антибиотиков, цитостатиков и других соединений часто используется для получения био-конъюгатов с принципиально новыми, направленными регулируемыми свойствами [1]. В качестве полимерных носителей чаще всего применялись карбоцепные [2] и гетероцепные полимеры – полисахара, например декстран [3], полиэтиленгликоль [4], полиэтиленмин [5]. Синтетические полипептиды в качестве модификаторов биологически активных веществ применяются сравнительно редко [6], хотя полипептиды, как и белки, имеют по сравнению с карбоцепными полимерными носителями определенные преимущества. Конъюгаты на их основе способны к биодеградации, что

является определяющим при их использовании в медицине. В то же время белки, как носители или модификаторы биологически активных соединений, в отличие от карбоцепных полимеров или полиэтиленгликоля иммуногенны и вызывают выработку антител против молекул, связанных с ними. Результатом этого может быть иммунологическая инактивация иммобилизованных на белковом носителе соединений, обладающих определенным видом биологической активности [1, 5]. С другой стороны, эта способность белкового носителя активировать иммунную систему и повышать уровень выработки антител против связанных с ним низкомолекулярных соединений, например фрагментов антигенных детерминант гликопротеинов вирусов или бактерий, токсинов, стероидов или продуктов их метаболизма, может быть чрезвычайно полезной и широко используется при создании диагностикумов и для получения защитных полусинтетических вакцин [1]. Однако при использовании белковых конъюгатов для таких целей наряду с усилением иммунного ответа против низкомолекулярного гаптена наблюдается выработка антител против самого носителя, а также против слейсера, связывающего гаптен с носителем, причем доля антител против белка может значительно превосходить долю антител против гаптена [7]. Наличие в антисыворотках антител против носителя может привести как к супрессии иммунного ответа на гаптен [8],

Сокращения: BK – брадикинин; BSA – бычий сывороточный альбумин; DEAA – диэтилацеталь акролеина; HRP – пероксидаза хрена; МАА – метакриловая кислота; MI – макроинициатор; Ова – овальбумин; SPPC – “звездообразные” полимер-белковые конъюгаты; Suc – остаток янтарной кислоты; THIQ – 1-метил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (сальсолинол); VMI – N-винил-2-метилимидазол; VP – N-винилпирролидон; VTHIQ – 1-винил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин.

[#] Автор для переписки (тел.: (812) 323-1050; эл. почта: gpvlasov@hq.macro.ru).

так и к взаимодействиям этих антител с другими белками [9].

В связи с этим одной из основных проблем при создании биоконъюгатов независимо от цели их синтеза является настоятельная необходимость регулирования иммунного ответа против компонентов конъюгата. В данном сообщении с использованием разработанного нами ранее метода [10–14] синтезированы “звездообразные” конъюгаты белков с карбоцепными полимерами, содержащими остатки 1-винил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина, аналога 1-метил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (сольсалинола), или пептидного гормона брадикинина, а также рассмотрена возможность регулирования иммунного ответа как против биологически активных низкомолекулярных компонентов конъюгата, так и против белкового носителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методы получения полимерных конъюгатов биологически активных веществ. Для синтеза конъюгатов полимеров с биологически активными веществами чаще всего используют полимеры, содержащие заранее активированные функциональные группы [1–3]. К недостаткам такого подхода следует отнести то, что при реакции активированного полимерного реагента с полифункциональным реагентом – белком в принципе невозможно получить конъюгаты, стандартизованные как по составу, так и по молекулярным массам [1, 3], так как происходит многовариантное связывание обоих реагирующих компонентов. Уже давно делались попытки избежать такой многовариантности (многоточечности) связывания компонентов конъюгата. Например, полимеризацией *N*-карбоксиянгидридов аминокислот на аминоклупах белка, как инициаторах полимеризации [15], можно получить конъюгаты, в которых каждая молекула модифицирующего полипептида связана одним своим концом (карбок-сильным) одноточечно с модифицируемым белком. Другим удачным примером подобных попыток является модификация белков полиэтиленгликолем, содержащим на одном из своих концов активированную группировку [4].

В последние годы значительно возрос интерес к получению конъюгатов белков с одноточечным связыванием модифицирующих карбоцепных полимерных цепей с модифицируемым белком. Чаще всего синтез подобных конъюгатов включает получение низкомолекулярных олигомеров, содержащих одну реакционноспособную группировку на одном из концов олигомерной цепи, и их ковалентное связывание с белком [16–20].

“Звездообразные” полимер-белковые конъюгаты (SPPC). Ранее мы разработали общий спо-

соб синтеза “звездообразных” (starburst) полимер-белковых конъюгатов с одноточечным связыванием молекулы модифицирующего карбоцепного полимера с модифицируемым белком [10–14]. Синтез включал в себя два основных этапа. На первом этапе белок модифицировался активированными производными (диметилимида-том или диазидом) 2,2'-азобисизомасляной кислоты с образованием белкового макроинициатора (MI). Реакция проходила по аминоклупам белка с образованием соответственно амидинной ($-C(=NH_2)^+-NH-$) и амидной ($-C(=O)-NH-$) связи между низкомолекулярным фрагментом инициатора и белком. Выбор одного из двух вариантов модификатора позволял сохранить или варьировать общий электрический заряд белка (pI): в первом случае при образовании амидинной связи заряд белка практически не изменяется [21, 22], во втором – изоэлектрическая точка белка изменяется, так как часть аминоклупов белка превращается в амидные группировки.

На втором этапе макроинициатор использовался для полимеризации на нем винильных мономеров с образованием карбоцепных полимер-белковых конъюгатов, в которых каждая молекула модифицирующего полимера связана одним своим концом с белком одноточечно. С некоторыми изменениями этот подход был использован нами для получения конъюгатов синтетических пептидов, в которых модифицирующий полимер был связан одноточечно одним из своих концов с *C*-концом синтетического аналога нейрпептида, энкефалина [23]. Аналогичный подход был продемонстрирован при получении биологически деградируемых полимерных носителей, а именно блок-сополимеров типа *A–B* и *A–B–A*, где *A* – полипептидный, а *B* – карбоцепной блок [24, 25].

С использованием разработанного метода нами получены “звездообразные” конъюгаты инсулина, в которых в качестве модифицирующих полимеров выступали поли(*N*-винилпирролидон), поли(*N*-винилимидазол), полиакриловая кислота и полиакриламид [10, 12, 14]. При получении “звездообразных” конъюгатов трипсина [11, 13] и пероксидазы хрена [26] в качестве модифицирующего полимера выступал сополимер *N*-винилпирролидона с диэтилацеталем акролеина.

Преимущества SPPC. Значительные преимущества таких полимер-белковых конъюгатов по сравнению с конъюгатами, полученными на основе заранее синтезированных и активированных полимеров, выявились при изучении их физико-химических и биологических свойств. Так, для “звездообразных” конъюгатов инсулина нами было показано значительное уменьшение иммуно-реактивности полипептидного компонента конъюгата с сохранением существенной доли его гормональной активности [10]. Было показано также,

Таблица 1. Характеристика конъюгатов (Ia), (Iб), содержащих винильный аналог сальсолинола

Номер	Конъюгат	Число полимерных цепей, <i>m</i>	Мол. масса конъюгата	Мол. масса полимерной части	Содержание VTNIQ, мол. %	Пероксидазная активность*, %
(Ia)	Poly(VP _p ,VTNIQ _q)-HRP	3	46600	2600	5	13
(Iб)	То же	3	49400	5400	4	110

* Пероксидазная активность определяется относительно активности введенного в конъюгат белка.

что путем изменения химической природы модифицирующего полимера можно регулировать устойчивость конъюгата в условиях протеолиза [10].

Наиболее значительное преимущество SPPC – возможность модификации белка по его конкретным группам. Так, в случае инсулина мы получили конъюгаты, содержащие полимерные фрагменты, связанные с одной (A1), двумя (A1, B29) и тремя (A1, B1 и B29) аминокислотными группами [10, 12]. Изменить можно не только число полимерных цепей, привитых к белковому компоненту, но и их молекулярную массу. Мы показали, что сохранение значительного уровня биологической активности гормона при резком снижении его иммунореактивности может быть достигнуто уже при пришивке полимерных цепей с молекулярной массой всего 3–5 кДа [10, 12].

Преимуществом предложенного способа получения SPPC является также возможность использования для модификации белков поли(*N*-винилпирролидона) [10, 11], полимера, нашедшего достаточно широкое применение в медицине, без его предварительной химической модификации [27]. Мы впервые осуществили пришивку к белкам полимерных цепей на основе *N*-винилимидазола также без его модификации [10]. Однако до сих пор не были получены SPPC, содержащие в полимерных фрагментах конъюгата низкомолекулярные биологически активные соединения. В данной работе мы сообщаем о впервые осуществленном синтезе таких конъюгатов и о возможности на их примере решить проблему направленного регулирования иммунного ответа против отдельных компонентов конъюгатов.

Синтез SPPC, содержащих низкомолекулярные биологически активные соединения в полимерных фрагментах. Синтез конъюгатов проводили, используя два подхода (путь А и Б) (схема 1). Конъюгаты, содержащие модельное гетероциклическое биологически активное соединение, аналог сальсолинола, синтезировали согласно пути А. Макроинициатор MI-1 на основе HRP, полученный на первом этапе путем модификации фермента дихлоргидратом диметилимидаата 2,2'-азобисизомасляной кислоты, был использован далее для сополимеризации на нем *N*-винилпирролидона (VP) с 1-винил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолином (VTNIQ), 1-винильным анало-

гом сальсолинола, с получением, в зависимости от соотношения сомономеров, конъюгатов (Ia) и (Iб). Сальсолинол образуется в организме при конденсации эндогенного допамина с ацетальдегидом, продуктом окисления этилового спирта алкогольдегидрогеназой, и обладает сильным терапевтическим эффектом [28]. Наш интерес к синтезу конъюгатов (Ia) и (Iб) на основе HRP был связан не только с необходимостью оптимизации процесса получения антител против сальсолинола, но и с желанием использования их в качестве антигена, содержащего ферментативную метку, при иммуноферментном анализе антисальсолинольных антител, как это было сделано для такрина [26].

Синтез VTNIQ проводили аналогично синтезу сальсолинола (см. “Эксперимент. часть”) при конденсации допамина с акролеином (схема 2). Замена метильной группы на винильную, позволила ввести остаток сальсолинола в полимер-белковые конъюгаты (Ia) и (Iб), используя оригинальный полимеризационный подход (путь А).

Характеристики “звездообразных” полимер-белковых конъюгатов (Ia) и (Iб) на основе HRP-макроинициатора (MI-1), содержащих VTNIQ, приведены в табл. 1.

При попытке синтеза по аналогичной схеме (путь А, схема 1) серии конъюгатов, имеющих в полимерных фрагментах, связанных с BSA, синтетический пептидный гормон брадикинин, а именно при сополимеризации на макроинициаторе (MI-2) предварительно полученного *N*^α-метакрилоилбрадикинина с *N*-винилпирролидоном был получен конъюгат, практически не содержащий брадикинина. Неудача в данном случае может быть объяснена значительным снижением реакционной способности винильной связи в метакрилоильном фрагменте *N*^α-метакрилоилбрадикинина.

В связи с этим для получения на основе BSA SPPC, содержащих брадикинин, был использован другой подход – поликонденсационный (путь Б, схема 1). Особенностью этого подхода было то, что в макроинициаторе (MI-2) аминокислотные группы белка, оставшиеся свободными после модификации фрагментами 2,2'-азобисизомасляной кислоты до стадии прививки полимерных цепей, были дополнительно ацилированы янтарным ангидридом.

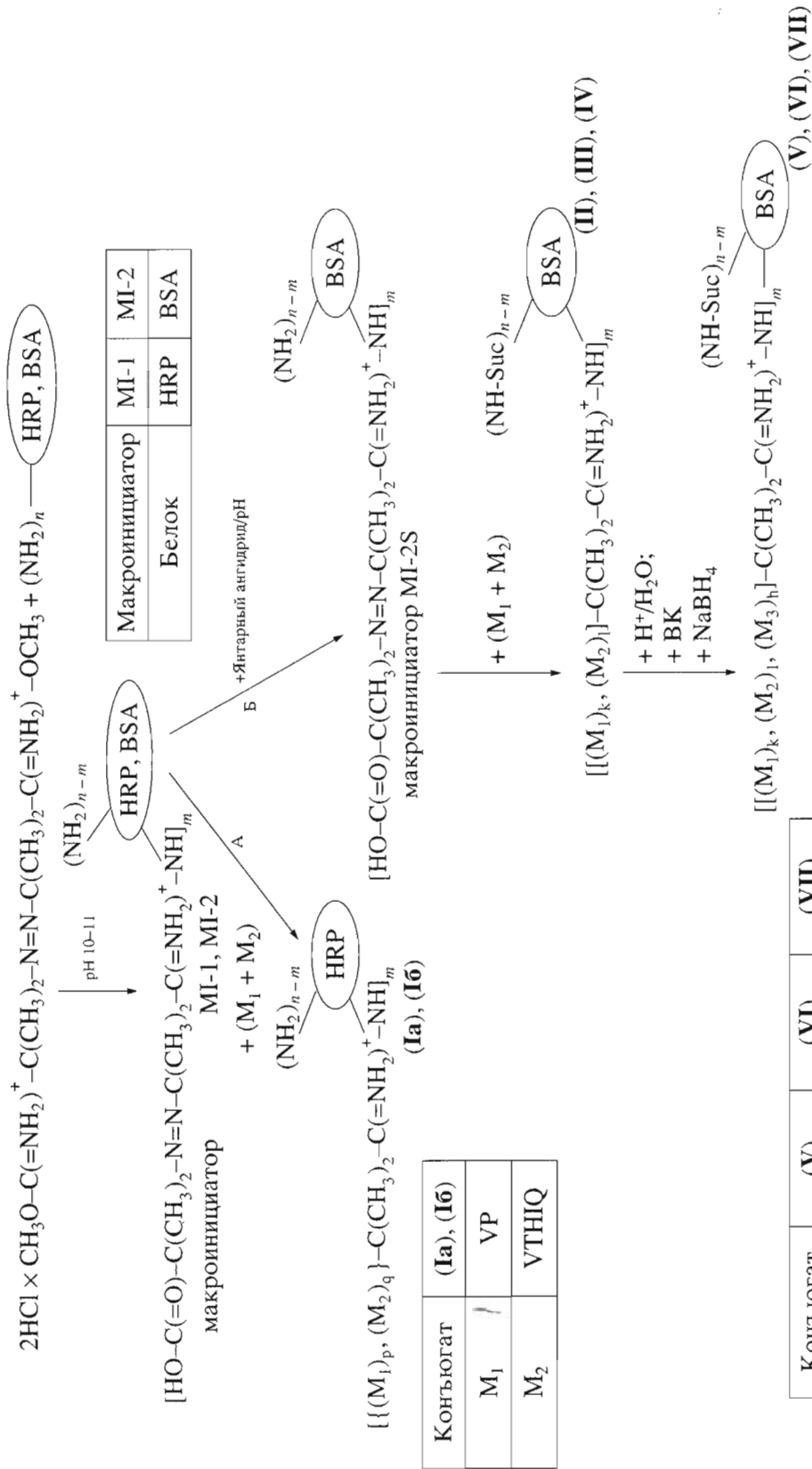


Схема 1. Получение SPPC на основе пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина.

Таблица 2. Характеристики брадикининсодержащих конъюгатов

Номер конъюгата	Брадикинин-содержащий конъюгат	Число полимерных цепей (<i>n</i>), моль/моль конъюгата	Содержание янтарной кислоты, моль/моль конъюгата	Мол. масса полимерных цепей	Мол. масса одной полимерной цепи	Состав полимера, мол. %	Содержание альдегидных групп, мол. %*	Содержание остатков брадикинина, моль/моль конъюгата
(V)	Poly(MAA _k , DEAA ₁ , BK _h)-BSA(Suc)	30	30	170000	5600	MAA /DEAA, 75/25*	6.5	46
(VIII)	Poly(MAA _k , DEAA ₁ , BK _h)	1	–	30000	–	MAA/DEAA, 70/30**	4.8	2
(VI)	Poly(VP _k , DEAA ₁ , BK _h)-BSA(Suc)	19	41	760000	40000	VP/DEAA, 90/10*	4.0	12
(IX)	Poly(VP _k , DEAA ₁ , BK _h)	1	–	40000	–	VP/DEAA, 80/20***	5.0	2
(VII)	Poly(VMI _k , DEAA ₁ , BK _h)-BSA(Suc)	40	20	760000	19000	VMI/DEAA, 93/7*	3.5	23
(X)	Poly(VMI _k , DEAA ₁ , BK _h)	1	–	30000	–	VMI/DEAA, 75/ 25***	2	1
(XI)	BK _h -BSA(Suc)****	–	60	–	–	–	–	16

* Данные ЯМР.

** Данные кондуктометрического титрования.

*** Данные элементного анализа.

**** Получен из сукцинированного BSA и BK в присутствии водорастворимого карбодиимида [32].

Дополнительная модификация свободных аминогрупп белка превращает его в полианионный носитель, способный в значительной степени активировать иммунную систему [29–31]. При сополимеризации на сукцинированном макроинициаторе диэтилацетата акролеина (DEAA) с метакриловой кислотой (MAA), *N*-винилпирролидоном (VP) или *N*-винил-2-метилимидазолом (VMI) были получены полимерные конъюгаты (II), (III) и (IV), содержащие в полимерной части конъюгата фрагменты диэтилацетата акролеина наряду с фрагментами метакриловой кислоты, *N*-винилпирролидона и *N*-винил-2-метилимидазола.

Дальнейший синтез включал превращение части диэтилацетальных групп $[-CH_2-CH(OC_2H_5)_2-]$ в конъюгатах (II)–(IV) в альдегидные группы акролеиновых фрагментов $[-CH_2-CH(CH=O)-]$, которое проходило на стадии выделения при pH 3.5.

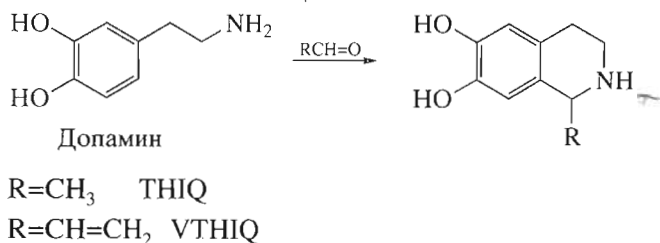


Схема 2. Синтез сальсолинола (THIQ) и его 1-винил-аналога (VTNIQ).

Конъюгаты BSA, содержащие альдегидные группы в полимерной части, были далее использованы для связывания с *N*-концом брадикинина с образованием альдиминной связи (основания Шиффа) между полимером и пептидом $[-CH_2-CH(CH=BK)-]$. Восстановление альдиминной связи NaBH₄ приводит к SPPC (V), (VI) и (VII) (табл. 2, схема 1), в которых брадикинин присутствует в виде фрагментов $[-CH_2-CH(CH_2-BK)-]$.

В табл. 2 приведены также характеристики полимерных конъюгатов (VIII)–(X), содержащих брадикинин, но не содержащих BSA, полимерная структура которых, в целом, аналогична структуре полимерных фрагментов SPPC на основе BSA (V)–(VII). Их синтез был предпринят в связи с необходимостью выяснения влияния на иммуногенность конъюгатов белкового компонента BSA и иммуноадьювантной активности полимерной части конъюгатов. Синтез этих конъюгатов, выделение и связывание с ними брадикинина проводили по схеме 3, аналогичной схеме 1. Отличие состояло в том, что в качестве инициатора полимеризации был использован коммерческий 2,2'-динитрил азобисизомаляной кислоты.

В табл. 2 представлены также характеристики стандартного конъюгата BK с BSA (XI), полученного при реакции сукцинированного BSA с BK в присутствии водорастворимого карбодиимида [32]. Синтез конъюгата (XI) был выполнен в связи с необходимостью сравнения иммуногенных SPPC (V)–(VII) и полимерных конъюгатов (VIII)–

Таблица 3. Титр антител против THIQ, VTHIQ и BSA

Номер конъюгата	Иммуноген	Антиген	Титр (ELISA)
(XIIa)	THIQ ₁₀ -BSA(Suc)*	BSA	204800
(XIIб)	THIQ ₂₀ -BSA(Suc)*	THIQ ₁₃ -Ova**	не определяется
(Ia)	Poly(VP _p , VTHIQ _q)-HRP	BSA	192400
(Iб)	То же	THIQ ₁₃ -Ova**	160
		THIQ ₁₃ -Ova**	640
		THIQ ₁₃ -Ova**	2560

* Получен для сравнения из сукцинированного BSA и THIQ карбодимидным методом [32] с содержанием THIQ – 10 (XIIa) и 20 мол. % (XIIб).

** Получен из Ova и THIQ с использованием глутарового альдегида [9].

(X) с иммуногенными свойствами конъюгата, полученного традиционным путем.

Иммуногенные свойства полимерных конъюгатов, содержащих сальсолинол и брадикинин. Иммуногенные свойства полимерных конъюгатов, содержащих сальсолинол (табл. 3) и пептидный гормон брадикинин (табл. 4), определяли по титру выработанных антигаптеновых антител в крови иммунизированных соответствующими конъюгатами кроликов, в присутствии и в отсутствие (для брадикининсодержащих конъюгатов) адъюванта Фрейнда. Титр антител определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

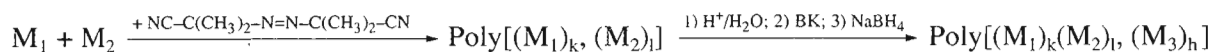
Сравнение иммуногенности SPPC. В табл. 3 представлены сравнительные данные по иммуногенным свойствам SPPC на основе HRP, содержащих сальсолинол в полимерной части, (Ia) и (Iб), и сальсолинолсодержащих конъюгатов, полученных на основе сукцинированного BSA с помощью водорастворимого карбодимида (XIIa) и (XIIб). Можно видеть, что титры антител против сальсолинола в случае SPPC (Ia) и (Iб) даже при меньшей доле сальсолинола, чем в конъюгатах (XIIa) и (XIIб), значительно выше. Иммунизация кроликов стандартными конъюгатами дает антисыворотки, обогащенные антителами против носителя. Значительное обогащение антисывороток антителами против сальсолинола при

использовании SPPC и снижение титра антител против носителя связано, вероятно, с экранированием антигенных детерминант белкового носителя полимерными цепями и более удачным представлением низкомолекулярного гаптена иммунокомпетентным клеткам. В этом случае полимерный фрагмент выполняет функцию спейсера. Преимущества SPPC как полусинтетических иммуногенов более явно проявляются при рассмотрении табл. 4.

Из данных табл. 4 следует, что антисыворотка, полученная в присутствии адъюванта Фрейнда против SPPC (V), имеющего в полимерной части полиметакриловую кислоту, дает максимальный титр антител как против ВК, так и против BSA по сравнению с титрами антител, выработанных также в присутствии адъюванта Фрейнда против конъюгатов (VI), (VII) и (XI).

Причина повышения иммунного ответа против компонентов SPPC на основе BSA, содержащего полиметакриловую кислоту, объясняется, вероятно, тем, что полианионная структура полимерного носителя способна активировать иммунную систему организма [29–31], вызывая тимус-независимый иммунный ответ [31].

Антисыворотка против конъюгата (VI) с поли(*N*-винилпирролидоновыми) фрагментами, полученная в присутствии адъюванта Фрейнда, имеет титр антител против брадикинина, сопостави-



Конъюгат	(VIII)	(IX)	(X)
M ₁	MAA	VP	VMI
M ₂	DEAA	DEAA	DEAA
M ₃	BK	BK	BK

Схема 3. Получение полимерных конъюгатов, содержащих брадикинин.

Таблица 4. Титр антител против брадикинина и BSA

Номер конъюгата	Иммуноген	Антиген			
		Иммунизацию проводили с адъювантом Фрейнда		Иммунизацию проводили без адъюванта Фрейнда	
		ВК-Ova***	BSA	ВК-Ova***	BSA
(V)	Poly(MAA _k , DEAA ₁ BK _h)-BSA(Suc)	5120	102400	320	2560
(VIII)	Poly(MAA _k , DEAA ₁ BK _h)	1280	*	**	**
(VI)	Poly(VP _k DEAA ₁ BK _h)-BSA(Suc)	2560	3200	*	160
(IX)	Poly(VP _k , DEAA ₁ BK _h)	*	*	**	**
(VII)	Poly(VMI _k , DEAA ₁ BK _h)-BSA(Suc)	40	640	*	*
(X)	Poly(VMI _k , DEAA ₁ BK _h)	320	*	**	**
(XI)	BK _h -BSA(Suc)***	2560	6400	320	2560

* Титр не определяется.

** Иммунизацию не проводили.

*** Получен из Ova и ВК с использованием глутарового альдегида [9].

мый с таковым при иммунизации стандартным конъюгатом (XI), но ниже титра антител против SPPC (V) с полиметакриловой кислотой. Вероятно, введение в полимерный иммуноген поли(*N*-винилпирролидоновых) цепей, не несущих заряда, приводит к падению общего отрицательного заряда конъюгата, что, вполне вероятно, снижает его иммуногенность.

Подтверждением этого могут быть необычные на первый взгляд результаты по иммуногенности конъюгата (VII) с поли(*N*-винил-2-метилмидазольными) цепями. Можно было бы ожидать, что поликатионная структура полимерных фрагментов в этом случае, так же как ранее обсуждаемая полианионная структура полиметакрилоильных фрагментов конъюгата (V), должна будет активировать иммунную систему [29–31]. Однако из данных табл. 4 следует, что мы имеем значительное снижение титра антител как против брадикинина, так и против BSA. Объяснение этого факта было найдено при сравнении иммуногенности конъюгатов ВК (V), (VI), (VII), антисыворотки против которых были получены в отсутствие адъюванта Фрейнда, и полимерных конъюгатов ВК (VIII), (IX) и (X), не содержащих BSA.

Иммуноадъювантная активность полимерных фрагментов конъюгатов BSA. Для определения вклада иммуноадъювантной активности полимерных фрагментов конъюгатов в табл. 4 приведены данные для антисывороток, полученных при иммунизации конъюгатами (V), (VI), (VII) без адъюванта Фрейнда. Конъюгат (V), содержащий полиметакриловую кислоту, без адъюванта Фрейнда позволил получить титр антител против ВК и BSA, сопоставимый с аналогичными титрами антител против стандартного конъюгата на основе сукцинированного BSA (XI), полученных также без адъюванта Фрейнда.

Иммунизация конъюгатом (VI) без адъюванта Фрейнда дает титр антител против BSA значительно более низкий по сравнению с титрами антител после иммунизации конъюгатами (V) и (XI) также без адъюванта Фрейнда. Примечательно то, что в пуле антител, выработанных против конъюгата (VI), практически полностью отсутствуют антитела против ВК. Из этого следует, что поли(*N*-винилпирролидон) в отличие от полиметакриловой кислоты [29–31] не обладает иммуноадъювантной активностью.

В случае конъюгата (VII) иммунизация без адъюванта Фрейнда дала антисыворотки, в которых полностью отсутствуют антитела не только против брадикинина, но и против BSA.

Для более полного выяснения вопроса о причинах снижения выработки антител против компонентов конъюгата (VII) в присутствии адъюванта Фрейнда и их полного отсутствия при иммунизации без адъюванта Фрейнда была проведена иммунизация полимерными конъюгатами брадикинина (VIII), (IX) и (X), не содержащими белкового компонента (BSA), который сам может активировать иммунную систему.

Как и следовало ожидать [29–31], поликатионный конъюгат (X), так же как полианионный конъюгат (VIII), в отличие от конъюгата на основе незаряженного поли(*N*-винилпирролидона) (IX), может активировать иммунную систему, вызывая иммунный ответ против ВК.

Вклад сукцинированного BSA в иммуногенность его конъюгатов. Для определения вклада в иммуногенность конъюгатов белкового компонента следует сравнить титры антител при использовании полианионного полимерного конъюгата ВК (VIII) с титром антител против SPPC (V), содержащего полимер той же структуры и

сукцинированный BSA. Титр антител против ВК в случае конъюгата (V) явно выше, чем титр антител против ВК на полимерном носителе (VIII). Аналогичные данные получены для пары конъюгатов (VI) и (IX) с той разницей, что полимерный конъюгат (IX) был практически не иммуногенен. Полученные результаты однозначно подтверждают определенный вклад сукцинированного BSA в иммуногенность конъюгатов (V) и (VI). Однако сравнение иммуногенных свойств конъюгатов (VII) и (X) дает обратную зависимость. Конъюгат ВК на основе поли(*N*-винил-2-метилимидазола) (X), уступая по иммуногенности полиметакрилоильному конъюгату ВК (VIII), в то же время заметно превосходит иммуногенность SPPC (VII). В случае конъюгата (VII), имеющего в своем составе как поликатионные поли(*N*-винил-2-метилимидазольные) фрагменты, так и полианионные фрагменты сукцинированного BSA, способные по отдельности активировать иммунную систему, снижение иммуногенности конъюгата происходит в результате значительной нейтрализации общего заряда конъюгата.

В результате проведенного исследования разработаны два подхода к синтезу SPPC, содержащих в односторонне связанных с белком полимерных фрагментах низкомолекулярные биологически активные соединения. Первый, полимеризационный, подход (путь А), рассмотренный на примере получения сальсолинолсодержащих конъюгатов, включает сополимеризацию 1-винильного производного сальсолинола (VTNIQ) с соответствующим винильным мономером (VP) с использованием предварительно синтезированного макроинициатора на основе HRP. Второй, поликонденсационный, подход (путь Б) включает предварительное получение SPPC на основе сукцинированного BSA, содержащих в полимерном фрагменте после кислотного гидролиза части диэтилацетальных групп альдегидные группы, которые далее были использованы для конденсации с брадикинином.

В результате изучения иммуногенных свойств SPPC, содержащих в полимерном фрагменте аналог сальсолинола и брадикинин, показано, что, меняя химическую природу полимерного компонента, можно в определенной степени регулировать иммунный ответ как против низкомолекулярного гаптена, так и против белкового компонента. Повышение иммунного ответа против конъюгата может быть достигнуто в результате использования в качестве модифицирующих полимерных фрагментов полиметакриловой кислоты. Использование же в качестве полимерного модификатора белкового носителя поли(*N*-винил-2-метилимидазольных) фрагментов позволяет снизить иммунный ответ как против низкомолекулярного гаптена, так и полимер-белкового носителя. Полученные данные дают возможность

направленно регулировать иммуногенность SPPC, содержащих в полимерных фрагментах низкомолекулярные биологически активные соединения, в зависимости от цели их дальнейшего использования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы бычий сывороточный альбумин, овальбумин, допамин и *N*-винилпирролидон (Merck, ФРГ), *N*-винил-2-метилимидазол (Fluka, Швейцария), брадикинин (Saxon Biochemical GmbH, ФРГ), 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид (Sigma, США), глутаровый альдегид, тринитробензолсульфоуксусная кислота и метакриловая кислота (Serva, ФРГ), пероксидаза хрена (Биолар, Латвия), диэтилацеталь акролеина и 2,2'-азобисизобутиронитрил (Реахим, Россия). При необходимости вещества были очищены перегонкой в вакууме или перекристаллизацией. Для диализа использовали диализные трубки Visking (Serva).

Аминокислотный анализ конъюгатов после кислотного гидролиза проводили на аминокислотном анализаторе ААА Т339М Mikrotecna-Praha (Чехословакия). Потенциометрическое титрование осуществляли с помощью автоматического титратора (ИВС РАН). Иммуноферментный анализ (ELISA) проводили с использованием колориметрического иммуноферментного анализатора АКИ-Ц-01 (ОКБА, Россия). Спектры ¹H-ЯМР были сняты на спектрометре AC 200 (Bruker) с рабочей частотой этих ядер 200.13 МГц. Химические сдвиги рассчитывались от остаточных сигналов протонов дейтерированного растворителя (4.8 м.д. для H₂O). Были использованы стандартные импульсные последовательности для получения спектров с подавлением сигналов растворителя и без такового.

1-Метил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (сальсолинол, TNIQ) [33]. Раствор 1.53 г (8.1 ммоль) гидрохлорида допамина и 0.7 г (15.9 ммоль) ацетальдегида в 200 мл дистиллированной воды перемешивали 72 ч при комнатной температуре. После отгонки воды в вакууме остаток обрабатывали сухим эфиром. Т. пл. 196–197°C (лит. т. пл. 197–198°C [33]).

1-Винил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (1-винил-сальсолинол, VTNIQ) синтезировали из допамина с акролеином аналогично синтезу, описанному выше для сальсолинола. Т. пл. 94–96°C. С, Н, N анализ.

Макроинициаторы на основе пероксидазы хрена (MI-1) и бычьего сывороточного альбумина (MI-2) были получены при реакции дихлоргидрата диметилимидаата 2,2'-азобисомасляной кислоты [34] с белками при 0°C и pH 10–11 при перемешивании в течение 1 ч. Концентрация белка

составляла 1.0 мг/мл, мольное соотношение диметилимидат 2,2'-азобисизомаляной кислоты–белок, 100 : 1. Реакционную массу диализовали в течение 24 ч против воды и подвергали гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-75 (колонка 2.5 × 90 см) при скорости элюции 20 мл/ч. MI-2 элюировали разбавленной соляной кислотой (pH 3.2–3.7) и лиофилизировали, MI-1 – 0.15 M NaCl. Детектирование вели при длине волны 280 нм. Элюат с MI-1 до лиофилизации диализовали 24 ч против воды. Количество введенных в белок модифицирующих остатков 2,2'-азобисизомаляной кислоты (*m*) определяли по разнице содержания остатков аминокрупп в исходном (*n*) и модифицированном белке титрованием аминокрупп с тринитробензолсульфоокислотой (TNBS) [35]. Активность пероксидазы хрена определяли по методу [36] в фосфат-цитратном буфере с добавлением перекиси водорода, используя в качестве субстрата *o*-фенилендиамин.

Сукцинизированный макроинициатор на основе бычьего сывороточного альбумина (MI-2S). К 1% раствору макроинициатора (MI-2) в 1 M Na-бикарбонатном буфере (pH 8.0) при 25°C в течение 1 ч порциями добавляли янтарный ангидрид (0.8 г/г белка), поддерживая pH 8.0 с помощью 1 M NaOH. Через 2 ч реакционную смесь разбавляли двукратным объемом воды и диализовали в течение 24 ч против воды. После лиофилизации отсутствие свободных NH₂-групп определяли реакцией с TNBS [35].

“Звездообразные” полимер-белковые конъюгаты на основе пероксидазы хрена (Ia), (Iб). (Путь А). Полимеризацию смесей *N*-винилпирролидона и 1-винилсальсолинола с использованием макроинициатора MI-1 проводили в ампулах под аргоном при мольном соотношении макроинициатор–смесь мономеров, 1 : 300, в 0.1 M фосфатном буфере (pH 7.7) при 65°C в течение 2–2.5 ч. Мольное соотношение VP–VTNIQ для (Ia) составляло 70 : 30, а для (Iб) – 90 : 10. После завершения полимеризации содержимое ампул подвергали гель-хроматографии на колонке (колонка 2.5 × 90 см) с сефадексом G-75 элюцией конъюгатов 0.15 M NaCl. Детектирование вели спектрофотометрически на волне 280 нм. Элюаты конъюгатов (Ia) и (Iб) перед лиофилизацией подвергали диализу против воды в течение 24 ч. Ферментативную активность полимерных конъюгатов HRP определяли по методу [35]. Долю белкового компонента в конъюгате и молекулярную массу всего конъюгата определяли спектрофотометрически по методу Лорури [37]. Мольную долю VTNIQ в полимерной части конъюгата определяли спектрофотометрически (280 нм) по разнице мольных коэффициентов поглощения белковой составляющей в конъюгате и мольного коэффициента поглощения полимерного конъюгата, имеющего гаптен.

“Звездообразные” полимер-белковые конъюгаты на основе сукцинизированного бычьего сывороточного альбумина (II), (III) и (IV). (Путь Б). Полимеризацию смеси диэтилацетата акролеина с метакриловой кислотой, смеси диэтилацетата акролеина с *N*-винилпирролидоном и смеси диэтилацетата акролеина с *N*-винил-2-метилимидазолом с использованием макроинициатора MI-2S проводили в условиях, аналогичных условиям получения “звездообразных” полимер-белковых конъюгатов на основе пероксидазы хрена ((Ia), (Iб)). Соотношение макроинициатор–смесь мономеров было в пределах 1 : 2000 – 1 : 4000 (в зависимости от количества введенных остатков 2,2'-азобисизомаляной кислоты, *m*). Мольное соотношение мономеров составляло 30 : 70. После завершения полимеризации содержимое ампул подвергали гель-хроматографии на колонке (колонка 2.5 × 90 см) с сефадексом G-75 элюцией разбавленной соляной кислотой (pH 3.5). Мольную долю диэтилацетата акролеина и акролеина определяли по спектрам ЯМР. Так как в области исследуемых концентраций и соотношения белок–полимер сигналы BSA имели значительную ширину, при расчете содержания диэтилацетатных и ацетатных групп вклад протонов белка в интегральную интенсивность не принимался во внимание. Обоснованность этого допущения контролировалась по интенсивности сигналов в спектрах ¹H-ЯМР BSA, имеющих сдвиги менее 1.0 м.д., т.е. в области не характерной для данных полимеров. Мольную долю альдегидных групп рассчитывали по пикам, характерным для протона альдегидной группы (δ 9.12 и 9.14 м.д.) и сигналам метильной группы метакриловой кислоты (1.25 м.д.), сигналам протонов VP (3.30; 3.35; 3.4 м.д.) и сигналам протонов имидазола (6.43; 7.35 м.д.).

“Звездообразные” конъюгаты на основе сукцинизированного бычьего сывороточного альбумина, содержащие брадикинин в полиметакрилольном (V), поли(*N*-винилпирролидоновом) (VI) и поли(*N*-винил-2-метилимидазольном) (VII) фрагментах. Связывание брадикинина по альдегидным группам полимер-белковых конъюгатов проводили по аналогии с работой [9]. Конъюгаты (II), (III) и (IV) растворяли в 0.1 M боратном буфере, pH 10, и к раствору прибавляли раствор брадикинина в том же буфере из расчета 20–40 моль/моль конъюгата. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 4 ч. Основания Шиффа в конъюгатах восстанавливали NaBH₄. Реакционную смесь диализовали 40 ч против воды и сушили лиофильно. Мольную долю брадикинина определяли по результатам аминокислотного анализа после кислотного гидролиза конъюгатов.

Сополимеры диэтилацетата с метакриловой кислотой, *N*-винилпирролидоном и *N*-винил-2-метилимидазолом получали в этаноле в ампуле под

аргоном при 65°C в течение 48 ч в присутствии инициатора радикальной полимеризации динитрила 2,2'-азобисизомаляной кислоты. Суммарная концентрация мономеров составляла 20%, инициатора – 0.5% по отношению к концентрации мономеров, мольное соотношение мономеров – 30 : 70. Полученный вязкий раствор разбавляли этанолом и пересаждали в ацетон. Молекулярные массы сополимеров определяли вискозиметрическим методом; количество метакриловой кислоты в сополимере – кондуктометрическим титрованием; состав сополимера, включающего *N*-винил-2-метилимидазол, – по элементному анализу, определяя содержание азота, а состав сополимеров *N*-винилпирролидона и диэтилацетала акролеина – по данным ЯМР.

Конъюгаты брадикинина (VIII), (IX) и (X) на основе сополимеров получали при конденсации брадикинина по альдегидным группам сополимеров аналогично методу получения SPPC при синтезе (V), (VI), (VII). После обработки сополимеров соляной кислотой, pH 3.5, и лиофилизации их растворяли в 0.1 М боратном буфере, pH 10, и к раствору прибавляли брадикинин. Синтез проходил при комнатной температуре в течение 4 ч при мольном соотношении сополимер–пептид, равном 1 : 20–1 : 40. Восстановление оснований Шиффа в конъюгатах проводили добавлением NaBH_4 . Реакционную смесь диализовали 40 ч против воды и сушили лиофильно. Мольную долю брадикинина в конъюгатах (VIII), (IX) и (X) определяли по результатам аминокислотного анализа.

Конъюгаты с сукцинированным бычьим сывороточным альбумином сальсолинола (XIIa, XIIб) и брадикинина (XI) получали в соответствии с [32]. К 0.5% раствору белка в 0.1 М фосфатном буфере при pH 4.5 добавляли водорастворимый 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид в расчете 1 моль карбодиимида на каждую карбоксильную группу сукцинированного белка. Смесь перемешивали при комнатной температуре 1 ч, доводили pH до 7.0 и добавляли 0.5% раствор брадикинина или сальсолинола в 0.1 М боратном буфере, pH 9.6, из расчета 30–40 моль/моль белка. После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 3 ч реакционную массу диализовали в течение 40 ч против воды и лиофилизовали. Мольную долю ТНIQ в конъюгате определяли спектрофотометрически (280 нм) по разнице мольных коэффициентов поглощения полимерного конъюгата, имеющего гаптен, и мольного коэффициента полимерной составляющей в конъюгате. Мольную долю брадикинина определяли по результатам аминокислотного анализа после кислотного гидролиза конъюгата.

Получение антисывороток

Иммуногены – SPPC (V)–(VII) и полимерные конъюгаты (VIII)–(X), содержащие ВК (табл. 4),

SPPC, содержащие сальсолинол ((Ia), (Iб), табл. 3), конъюгаты сальсолинола ((XIIa), (XIIб), табл. 3) и конъюгат ВК с BSA ((XI), табл. 4) растворяли в физиологическом растворе, а затем добавляли полный адъювант Фрейнда (Difco, США). Полученные смеси вводили кроликам подкожно в несколько точек спины. Через неделю антиген вводили с неполным адъювантом Фрейнда (Sigma, США) и еще через неделю с полным адъювантом Фрейнда. Последнюю инъекцию проводили внутривенно через неделю без адъюванта. Всего на иммунизацию использовали 4.0 мг антигена. Для определения титра антител через неделю после внутривенной инъекции и в течение 4 недель раз в неделю отбирали кровь из краевой ушной вены.

Иммуноферментный анализ антисывороток (ELISA)

Антитела из антисывороток выделяли осаждением сульфатом аммония и готовили растворы с исходной концентрацией 10 мг/мл. Титр антител определяли методом твердофазного ИФА на 96-луночных планшетах (Biohit OY, Финляндия). Для промывания лунок и разведения конъюгата белка А с пероксидазой хрена использовали 0.01 М фосфатный буфер pH 7.2–7.4, содержащий 1% NaCl (PBS) и 0.05% Твин-20 (PBST). Для разведения антител использовали 0.1 М PBS с 0.05% Твин-20. В лунки планшета вносили по 100 мкл растворов BSA, ВК–Ova, ТНIQ–Ova, Ova (контроль) с концентрацией 100 мкг/мл в 0.1 М Натриумкарбонатном буфере pH 9.6. Смесь инкубировали при 4°C 20 ч. После удаления растворов антигенов лунки промывали 0.01 М PBS и вносили в каждую лунку по 150 мкл 0.5% раствора казеина в 0.1 М PBS. Инкубировали 1 ч при 37°C. После 6-кратной промывки PBST с интервалом 1 мин в лунки вносили по 100 мкл растворов антител, начиная с разбавления 1/20. Смесь инкубировали 1 ч при 37°C. После удаления растворов антител и 6-кратной промывки PBST вносили по 100 мкл раствора белка А, меченного пероксидазой хрена, и выдерживали 30 мин при 37°C. Затем удаляли раствор конъюгата, лунки промывали 6 раз PBST с интервалом 1 мин и вносили субстрат (0.5% раствор *o*-фенилендиамина в 0.1 М цитратно-фосфатном буфере, pH 5.0, содержащий 0.03% H_2O_2). Через 30 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 М H_2SO_4 . Оптическое поглощение в лунках измеряли при 492 нм. Результаты считали положительными при $A/A_k > 2$ (A – поглощение в лунках с антигеном, A_k – поглощение в лунках с контролем – Ova).

Работа поддержана грантами МНФ (грант № R67000 и R67300), программы “Новейшие методы биоинженерии” (грант № 03-0003Н-329) и “Научные школы РФ” (грант № 96-15-97393).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hermanson G.T.* Bioconjugate Techniques. New York: Acad. Press, 1996.
2. *Laane A., Haga M., Aaviksaar A., Chytry V., Kopecek I.* // *Macromol. Chem.* 1983. V. 184. P. 1339–1344.
3. *Шельх Г.И., Кольцова С.В., Власов Г.П., Самсонов Г.В.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1979. Т. 15. С. 82–85.
4. *Abuchowski A., van Es T., Palchuk N.C., Davis F.F.* // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 3578–3581.
5. *Erbacher P., Remy J.S., Behr J.P.* // *Gene Ther.* 1999. V. 6. P. 138–145.
6. *Verlander M.S., Venter J.C., Goodman M., Kaplan N.O., Saks B.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1976. V. 73. P. 1009–1013.
7. *Geerligs H.J., Weijer W.J., Welling G.W., Welling-Westler S.* // *J. Immunol. Methods.* 1989. V. 124. P. 95–102.
8. *Schutze M.-P., Leclerc C., Jolivet M., Audibert F., Chedid L.* // *J. Immunol.* 1985. V. 135. P. 2319–2322.
9. *Briand J.P., Muller S., van Regenmortel M.H.V.* // *J. Immunol. Meth.* 1985. V. 78. P. 58–69.
10. *Vlasov G.P., Illarionova N.G., Izvarina N.L., Denisov I.G.* // *Macromol. Chem. Suppl.* 1985. V. 9. P. 239–249.
11. *Власов Г.П., Никонова И.Н., Илларионова Н.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1981. Т. 17. С. 494–499.
12. *Власов Г.П., Изварина Н.Л., Илларионова Н.Г.* // *Биохимия.* 1981. Т. 46. С. 942–950.
13. *Власов Г.П., Никонова И.Н., Илларионова Н.Г., Денисов И.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1987. Т. 23. С. 600–606.
14. *Власов Г.П., Изварина Н.Л., Илларионова Н.Г., Денисов И.Г., Мальцев Д.А.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1988. Т. 24. С. 56–61.
15. *Glaser A.N., Bar-Eli A., Katchalski E.* // *J. Biol. Chem.* 1962. V. 237. P. 1832–1838.
16. *Ito Y., Kotoura M., Chung D.-J., Imanishi Y.* // *Bioconjug. Chem.* 1994. V. 4. P. 358–361.
17. *Matsukata M., Takei Y., Aoki T., Sanui K., Ogata N., Sakurai Y.* // *Bioconjug. Chem.* 1997. V. 7. P. 96–101.
18. *Ding Z., Chen G., Hoffman A.S.* // *Bioconjug. Chem.* 1997. V. 7. P. 121–125.
19. *Lee H., Park T.G.* // *Biotechnol. Prog.* 1998. V. 14. P. 508–516.
20. *Takei Y.G., Matsukata M., Aoki K., Sanui N., Ogata A., Kikuchi Y., Sakurai T., Okano T.* // *Bioconjug. Chem.* 1994. V. 5. P. 577–582.
21. *Hunter M.J., Ludwig M.L.* // *Colowick and Natan Kaplan Methods in Enzymology / Eds P. Lidney.* New York, London: Acad. Press, 1972. V. 25. Part B. P. 585.
22. *Tuengler P., Peleiderer G.* // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1977. V. 484. P. 1–8.
23. *Vlasov G.P., Krasnikova E.N., Illarionova N.G., Denisov I.G.* // *Biopolymers.* 1987. V. 26. P. 1489–1498.
24. *Vlasov G.P., Rudkovskaja G.D., Ovsyannikova L.A.* // *Macromol. Chem.* 1982. V. 183. P. 2635–2644.
25. *Ovsyannikova L.A., Rudkovskaya G.D., Vlasov G.P.* // *Macromol. Chem.* 1986. V. 187. P. 2351–2356.
26. *Vlasov G.P., Nikonova I.N., Kozlov V.K.* // *Chemistry of Peptides and Proteins. V. 5/6. Part B / Eds D. Brandenburg, V. Ivanov, H. Voelter.* DWI Reports, 1993. V. 112B. P. 793–801.
27. *von Specht B.-U., Brendel W.* // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1977. V. 484. P. 109–114.
28. *Котин А.М., Бичева Н.К., Власов Г.П., Никонова И.Н.* // *Вопросы наркологии.* 1992. С. 45–54.
29. *Muckerheide A., Apple R.J., Pesce A.J., Michel J.G.* // *J. Immunol.* 1987. V. 138. P. 833–837.
30. *Muckerheide A., Domen P.L., Pesce A.J., Michel J.G.* // *J. Immunol.* 1987. V. 138. P. 2800–2804.
31. *Петров П.В., Хаитов Р.М.* Искусственные антигены и вакцины. М.: Медицина, 1988. С. 287.
32. *Erlanger B.F.* // *Pharmacol. Rev.* 1973. V. 25. P. 271–280.
33. *Schopf C., Bayerle H.* // *Ann.* 1934. V. 513. P. 190.
34. *Nureddin A., Inagami T.* // *Biochem. J.* 1975. V. 147. P. 71–78.
35. *Satake K., Okuyama T., Ohashi M., Shimoda T.* // *J. Biochem. (Japan)* 1960. V. 47. P. 654–660.
36. *Engval E.* // *Immunological Technique / Ed. van Hunakis H.* 1986. V. 70. P. 419–439.
37. *Lowry O.H., Rosenbrouh N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 263–275.

Starburst Conjugates of Proteins with Carbon-Chain Polymers Containing Low Molecular Biologically Active Compounds: Synthesis and Immunogenicity

G. P. Vlasov[#], G. A. Pankova, I. N. Nikonova, and N. G. Antonov

[#] Phone: (812) 323-1050, e-mail: gpvlasov@hq.macro.ru

Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 119004 Russia

The synthesis of starburst polymer–protein conjugates on the basis of bovine serum albumin and horseradish peroxidase was performed with the aim to study the possibilities of regulation of the immune response against the components of the conjugates. These polymers had one-point binding between the protein and the modifying carbon-chain polymer that contained 1-vinyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (a salsolinol analogue) or bradykinin (peptide hormone) residues in its carbon chain. Changes in the chemical nature of the carbon-chain part of the polymer–protein conjugate were shown to increase or decrease the level of antibody production both against the low-molecular compounds attached to the polymeric fragments and against the protein carrier. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: bradykinin, immunogenicity, 1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol), star-like carbon-chain polymer–protein conjugates, 1-vinyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline