

На правах рукописи

ЗЕЛЕПУГА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ФЕРМЕНТНЫХ
ПРЕПАРАТОВ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

03.00.02 - биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург - 2007

Работа выполнена в лаборатории химии пептидов Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного отделения Российской Академии наук

Научный руководитель: Доктор химических наук,
Козловская Эмма Павловна

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, ст. н. с.
Тимковский Андрей Леонидович

кандидат химических наук, доцент
Глазова Наталья Владимировна

Ведущая организация: Институт высокомолекулярных соединений РАН

Защита состоится 22 мая 2007 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный политехнический университет по адресу: 194021 Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 5, факультет медицинской физики и биоинженерии.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет».

Автореферат разослан «_____» _____ 2007г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат физико-математических наук, доцент

 Власова О.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Разработка новых лекарственных препаратов сопряжена с решением огромного числа трудных задач как теоретического, так и практического плана. Современные подходы к разработке новых лекарственных средств основаны на понимании молекулярных механизмов, как нормального развития живого организма, так и возникающих в нем патологических процессов. Поэтому в создании новых или модификации известных лекарственных средств все большую роль начинают играть подходы, основанные на молекулярной биофизике. Особое место среди лекарственных средств занимают ферменты – белковые макромолекулы с разнообразными структурой и функциями, чья роль в фундаментальных процессах биологии делает их не только превосходными мишенями для лекарств, но и перспективными лекарственными препаратами. В частности, рибонуклеазы (РНказы) являются высокоактивными противовирусными средствами.

Обладая высокой терапевтической активностью, нативные ферменты имеют и ряд существенных недостатков, среди которых: быстрое разрушение их в организме, нежелательные побочные эффекты вследствие возможных иммунных реакций организма на чужеродный белок, а для микробных ферментов – еще и токсичность. Изменение физико-химических свойств и биологической активности белков путем посттрансляционной модификации является широко распространенной стратегией регуляции метаболических процессов в живой клетке. Особенно перспективными являются межмолекулярные комплексы (конъюгаты) активного фермента с инертным стабилизирующим носителем. Разработанные ранее системы гетероолигопротеинов на основе олигомеров гемоглобина и донорского сывороточного альбумина (САЧ) и химически фиксированных на них молекул фермента позволяют стабилизировать и пролонгировать действие фермента (Горячева Л.К. и др., 1989). Однако такие гетероолигопротеины характеризуются высокой молекулярной массой и низким содержанием биологически активного вещества (не более 7%) и не могут быть эффективно использованы в качестве лекарственных препаратов. В связи с этим весьма актуальной является задача разработки на основе молекулярно-биофизического подхода рациональных путей модификации ферментных препаратов, а также создания и отбора наиболее эффективных и безопасных носителей.

Данная работа посвящена разработке биофизической стратегии и получению на ее основе водорастворимых конъюгатов безлигандного сывороточного альбумина человека (БЛСАЧ) с панкреатической РНказой и РНказой из *Bacillus intermedius 7P* с высоким содержанием (до 30-40%) и высокой биологической активностью действующего фермента.

Цель и задачи исследования. Цель работы создание биофизической стратегии по созданию перспективных лекарственных препаратов пролонгированного действия на основе веществ белкового происхождения, обладающих новыми фармакологическими свойствами, с использованием методов молекулярной биофизики и современных компьютерных технологий.

Для достижения указанной цели в работе ставились следующие задачи:

1. Подобрать оптимальный носитель для модификации физиологически активных веществ, обладающий биосовместимостью, минимальной иммуногенностью, аллергенностью и позволяющий получать высокоактивные лекарственные препараты
2. Модифицировать САЧ, используемый в качестве носителя ферментов, с целью увеличения его способности к связыванию с полипептидными препаратами, изучить способы освобождения САЧ от связанных с ним лигандов и разработать методику получения безлигандного САЧ (БЛСАЧ).
3. Изучить физико-химические свойства (БЛСАЧ): исследовать динамику поведения БЛСАЧ в растворе и его гидрофобность, влияние денатурирующих условий (значений рН среды и концентрации мочевины) на структуру белка.
4. Разработать методику получения конъюгатов ферментов (РНКаз) с БЛСАЧ: исследовать влияние условий и времени комплексообразования БЛСАЧ с ферментами, а также соотношения компонентов в реакционной смеси на степень связывания панкреатической РНКазы и биназы. Разработать метод выделения каталитически активных конъюгатов.
5. Провести теоретическое исследование молекулярных механизмов изменения биологических свойств ферментов в конъюгате с БЛСАЧ.
6. Изучить противовирусную активность полученных конъюгатов и динамику проявления ферментативной активности в кровотоке животных после введения конъюгатов различной молекулярной массы.

Положения, выносимые на защиту

1. Связывающая способность белка-носителя (САЧ) может быть существенно повышена путем его освобождения от связанных с ним балластных лигандов.

2. Предложенный в работе метод такого освобождения с использованием сильного анионита АВ-17-8 обеспечивает эффективную очистку коммерческого САЧ от связанных с ним лигандов как физиологического, так и экзогенного происхождения и позволяет получить безлигандный САЧ (БЛСАЧ).

3. Применение БЛСАЧ в качестве носителя биологически активного белкового компонента и использование предложенного в работе метода проведения соконденсации существенно увеличивает содержание активного компонента в составе конъюгатов и значительно улучшает терапевтическое действие и фармакологические свойства модифицированных ферментов.

4. Построенные компьютерные молекулярные модели открывают новые возможности в прогнозировании оптимизации биологических свойств модифицированных ферментов. Методы компьютерного анализа и выявляемые с его помощью закономерности взаимодействия БЛСАЧ с активным компонентом могут использоваться для разработки способов направленного создания широкого набора лекарственных препаратов.

Научная новизна и практическая значимость. Впервые разработана стратегия создания перспективных лекарственных препаратов пролонгированного действия, основанная на фундаментальных закономерностях взаимодействия лекарственных препаратов с транспортным белком плазмы крови человека (САЧ). Применение этой

стратегии позволит целенаправленно конструировать лекарственные препараты с новыми полезными фармакологическими свойствами. Впервые предложен и экспериментально апробирован оптимальный метод получения конъюгатов САЧ с ферментными препаратами, обеспечивающий высокое содержание и высокую активность фермента. Разработанный метод позволяет использовать вместо донорского гомологичный САЧ из плазмы крови пациента. Впервые построена компьютерная молекулярная модель комплекса панкреатической РНКазы с сывороточным альбумином, содержащего более одной молекулы фермента.

Апробация работы. Основные результаты настоящей работы были представлены на Международной, Всесоюзных и Всероссийских конференциях: “Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование” (Рига, 1989), “Методы получения, анализа и применения ферментов” (Юрмала, 1990), 9-й Конференции межвузовского проекта “Ферменты микроорганизмов” (Казань, 1991), III Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004) и Региональной научной конференции «Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии» (Владивосток, 2004), 30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference (Budapest, Hungary, 2005).

Публикации. По материалам работы опубликовано 6 статей и 7 тезисов докладов.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность д.т.н., профессору В.М. Коликову за неоценимый вклад в формирование научного мировоззрения, благодарит д.м.н. М.Л. Медведева (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова) за сотрудничество в проведении биологического тестирования полученных ферментных препаратов, д.б.н. Т.М. Третьяк (Институт белка, г. Пущино-на-Оке) за проведение совместного исследования распределения полученного ферментного препарата по органам экспериментальных животных, Г.Н. Лихацкой за помощь в построении гипотетических структур поликомплексов БЛСАЧ и ферментов с помощью программы GRAMM (лаборатория биоиспытаний Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН).

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 162 машинописных страницах, содержит 34 рисунка и 18 таблиц, в том числе 5 табл. в Приложении. Она включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и обсуждение, заключение и выводы. Библиографический раздел включает 430 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи работы, показано ее научно-практическое значение.

Первая глава – обзор литературы, в котором рассмотрены основные способы модификации белков, в том числе ферментов, приводящие к улучшению фармакологических свойств последних. Описаны функции, свойства и структура САЧ, а также локализация и закономерности организации центров связывания данного белка с различными лигандами.

Во второй главе описаны объекты и методы исследования, использованные в работе.

В третьей главе изложены метод и результаты получения и исследования физико-химических свойств альбумина, очищенного от связанных с ним лигандов (БЛСАЧ). Изложены результаты исследования процесса комплексообразования БЛСАЧ с РНКазы и последующей поликонденсации полученных комплексов с помощью глутарового альдегида. Приведены данные о ферментативной активности, кажущейся молекулярной массе и биологических свойствах полученных конъюгатов. Во второй части главы проблема стабилизации биологической активности лекарственных веществ белкового происхождения (на примере РНКазы А) рассматривается с общих позиций физической и структурной химии: проводится теоретический анализ связи структуры комплексов обезжиренного альбумина с ферментом и биологической активностью последнего. На основании знаний трехмерной структуры биологических макромолекул, а также механизмов белок-белковых взаимодействий, конкретные научные задачи решались с использованием имеющегося в наличии пакета специализированного программного обеспечения, включая докинг лигандов, конформационный анализ, минимизацию энергии, молекулярную динамику и некоторые ресурсы глобальной сети Интернет.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и исследование физико-химических свойств безлигандного сывороточного альбумина человека

В борьбе с вирусными возбудителями заболеваний человека и животных, наряду с вакцинацией и противовирусной химиотерапией, имеющими определенные ограничения в применении, весьма полезным является применение нуклеаз – ферментов, деполимеризующих генетический материал вируса. Однако введенные чужеродные ферменты быстро утрачивают активность вследствие разрушения протеазами или блокирования ингибиторами. В связи с этим очевидна необходимость защиты и пролонгации функционирования в организме введенного фермента. Такой эффект может быть достигнут путем иммобилизации ферментов на синтетических или природных полимерных носителях. При этом носитель не должен вызывать накопления препарата в отдельных органах и трудностей с его выведением из организма. Поэтому в качестве носителей удобнее всего использовать гомологичные сывороточные альбумины (САЧ) с их ярко выраженной транспортной функцией и умеренной иммуногенностью. Ранее проводилась иммобилизация панкреатической РНКазы на олигомерах САЧ или гемоглобина с использованием глутарового альдегида (ГА) (Горячева Л.К. и др., 1989; в дальнейшем метод I). Метод I позволил получить конъюгаты, содержащие в среднем 0,3 моля фермента на 1 моль САЧ, и полностью сохранить активность фермента в процессе соконденсации. Тем не менее, низкое содержание фермента в полученных конъюгатах не дает возможности использовать данный подход для получения высокоактивных лекарственных средств.

Благодаря транспортной функции, САЧ обладает множеством центров связывания различной специфичности и способностью адаптироваться к лигандам различной химической природы. Рядом авторов выдвигалось предположение, что физико-химические характеристики и связывающая способность САЧ в значительной мере определяются

степенью его «загруженности» различными лигандами, которая в свою очередь зависит от метода получения белкового препарата. В целях увеличения доли иммобилизованного фермента нами предложено использовать в качестве носителя безлигандный сывороточный альбумин человека (БЛСАЧ), то есть освободить САЧ от связанных с ним лигандов и тем самым увеличить его потенциал для взаимодействия с заданным биологически активным компонентом. Обычно применявшаяся процедура обезжиривания САЧ состоит в доведении значения pH раствора альбумина до 3,0 и адсорбции на древесном угле (Scheider W. et al., 1970), поверхности резины или гидроксид(алкокси)пропилдекстрана (Kragh-Hansen U., 1993). Сообщалось о снижении при этом содержания жирных кислот до 0,22 и 0,06 М/М, соответственно.

Предложенный нами метод очистки САЧ предполагает выдерживание САЧ в кислом растворе в присутствии сильного анионита АВ-17-8. В области значений pH 3,5-2,5 макромолекула САЧ претерпевает конформационную перестройку, в результате которой молекула белка разворачивается и легко освобождается от связанных лигандов при диссоциации. Используемый адсорбент имеет гидрофобную полистирольную матрицу и связывает лиганды, высвободившиеся в процессе разворачивания макромолекулы альбумина. Методом поляризованной люминесценции нами проведено сравнение эффективности связывания сывороточным альбумином молекул панкреатической РНКазы с включенной 9-антрилметилуретановой группировкой в качестве люминесцентной метки (РНКазы-ЛМ) при разных способах освобождения его от лигандов (рис.1). Очевидно, что способ снятия лигандов существенно влияет на способность альбумина связывать РНКазу.

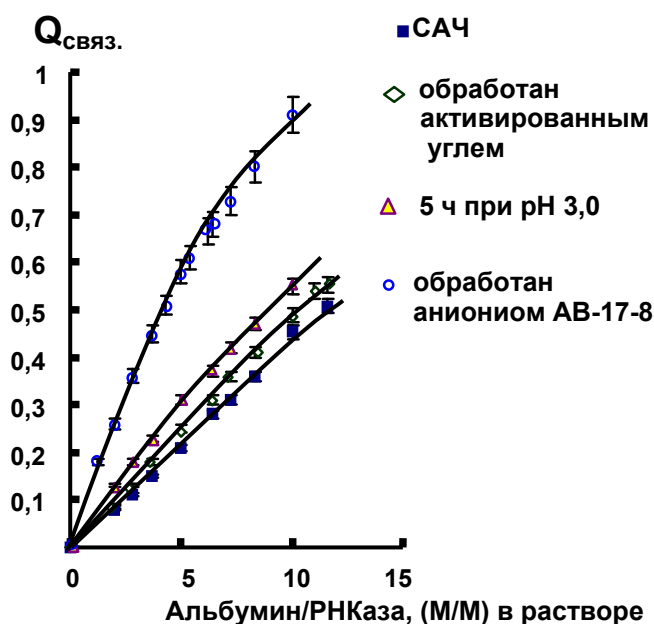


Рис. 1. Зависимость доли связанных САЧ молекул панкреатической РНКазы-ЛМ от мольного соотношения САЧ/РНКазы в растворе (при различных режимах обработки САЧ)

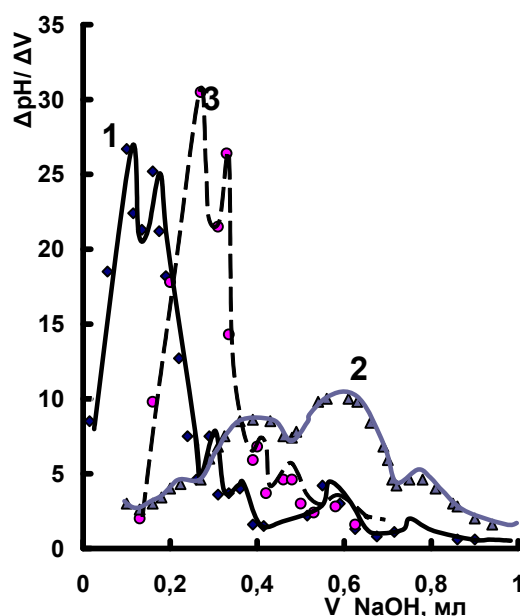


Рис. 2. Потенциометрическое титрование САЧ (1) и БЛСАЧ: сразу (2) и через 2 часа после растворения (3). Концентрация NaOH 0,137 М. Концентрация САЧ 2,85 мг/мл.

Изменение концентрации взаимодействующих компонентов при сохранении их мольного соотношения не привело к изменениям доли связанных молекул РНКазы ($Q_{\text{связ.}}$). Обнаружено, что различие значений $Q_{\text{связ}}$ для системы РНКазы-САЧ зависит прежде всего от числа участков связывания РНКазы в макромолекулах альбумина разных образцов. Наибольшей связывающей способностью обладает образец БЛСАЧ, полученный с помощью анионита АВ-17-8. Проведена экстракция связанных с САЧ и БЛСАЧ лигандов. Методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое силикагеля показано, что липиды и фосфолипиды практически отсутствуют в образцах БЛСАЧ, тогда как в образцах САЧ их содержание составляет соответственно 80% и 15% от общего количества экстрагированных лигандов. Мольное содержание свободных жирных кислот, среди которых преобладали линолевая, олеиновая, стеариновая и пальмитиновая, менялось от 2,2 моль на 1 моль САЧ до 0,03 моль на 1 моль БЛСАЧ.

С помощью потенциометрического титрования обнаружено существенное различие кривых титрования БЛСАЧ (рис. 2, кривая 2) и САЧ (рис. 2, кривая 1). Кроме того, отмечено изменение количества титруемых групп БЛСАЧ во времени. Если в области нейтральных и щелочных значений pH среды (pH 6,0-10,0) в исходном САЧ титровалось 46 групп, то в БЛСАЧ непосредственно после растворения титровалось 78 групп, а через 2 ч – 56 групп (рис. 2). Титрование в кислой области значений pH показало эквивалентное уменьшение во времени количества титруемых карбоксильных групп. По-видимому, в растворе происходит образование солевых мостиков между кислотными и основными группами БЛСАЧ после освобождения САЧ от лигандов.

Исследование влияния денатурирующих агентов, таких как кислота и мочевины, на структуру макромолекул САЧ и БЛСАЧ, проведенное методом спектроскопии кругового дихроизма (КД), обнаружило, что при освобождении САЧ от лигандов пространственная организация молекулы белка претерпевает незначительные изменения на уровне третичной

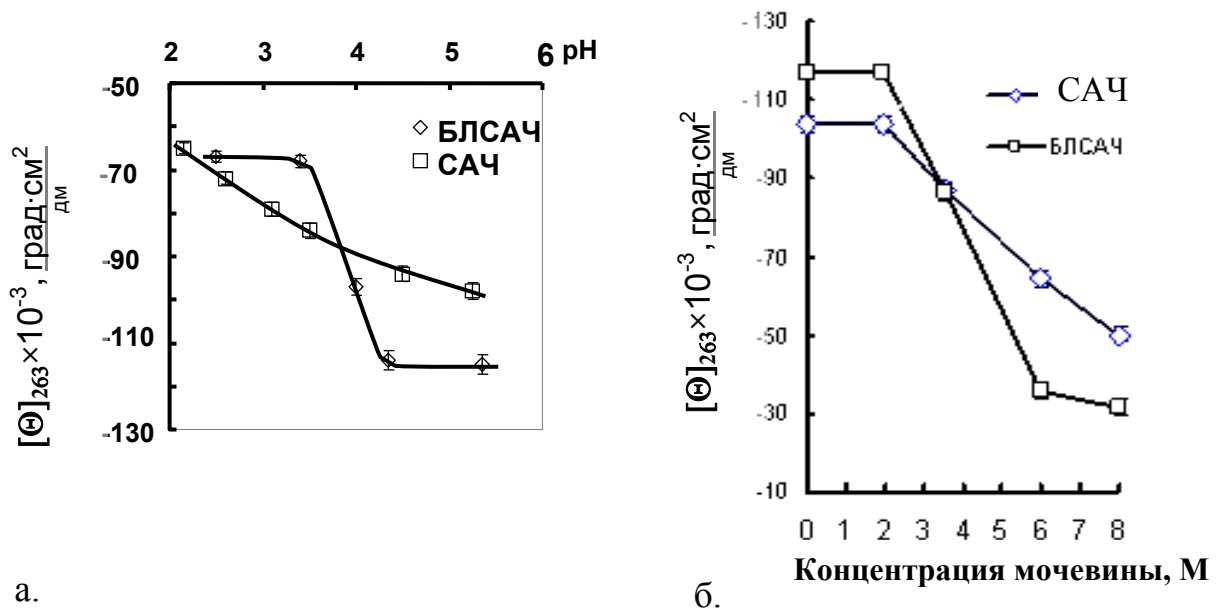


Рис. 3 Изменение молекулярной эллиптичности при λ 263 нм растворов САЧ и БЛСАЧ в интервале значений pH 5,0-2,0 (а) и растворах мочевины в 0,05М Na-фосфатном буферном растворе, pH 7,4 (б). Концентрация альбумина 0,5 мг/мл.

структуры. Это выражается в повышении величины молекулярной эллиптичности при длине волны 263 нм ($[\theta]_{263}$) (рис. 3). Эти результаты позднее были подтверждены S Sugio и A. Bhattacharya методом рентгеновской кристаллографии (Sugio S., 1999; Bhattacharya A., 2000), которые предположили незначительные изменения конформации, касающиеся в основном положения субдомена III.

При уменьшении значений pH среды наблюдался конформационный переход макромолекулы БЛСАЧ в интервале 4,0-3,5 (рис. 3,а), в то время как для исходного САЧ в тех же условиях имело место более плавное изменение конформации. Конформационные изменения при увеличении концентрации мочевины (рис. 3,б) также носили более кооперативный характер в случае БЛСАЧ. Такие различия вполне объяснимы, поскольку в процессе освобождения САЧ от лигандов снимаются и гидрофобные «скрепки» в виде жирных кислот, скрепляющих три домена макромолекулы САЧ, что делает молекулу альбумина более гибкой и подвижной. Вероятно, это позволяет макромолекуле легче адаптироваться к структуре нового лиганда и, следовательно, улучшает связывание с последним. Следует отметить, что для обеих форм белка денатурация под действием, как ионогенных, так и неионогенных агентов является обратимым процессом, вплоть до значения pH 2,6 и концентрации денатуранта 8 М.

Гидрофобность БЛСАЧ оценивали методом поляризованной люминесценции (ПЛ) с помощью гидрофобного люминесцентного индикатора акридинового оранжевого (АО) и сопоставляли с гидрофобностью исходного САЧ. На рис. 4 представлена зависимость доли связанного АО ($Q_{\text{связ}}$) от его концентрации для САЧ и БЛСАЧ. Очевидно, что доля связанного с БЛСАЧ акридинового оранжевого, а следовательно, и гидрофобность БЛСАЧ меньше, чем у исходного белка, и не изменяется при хранении в течение года. Падение $Q_{\text{связ}}$ с увеличением концентрации АО обусловлено, вероятно, уменьшением числа вакантных мест связывания по мере их занятости индикатором. Построение графика Скэтчарда дало возможность оценить константы связывания и число мест связывания АО. Для САЧ константа связывания $K_{\text{САЧ-АО}} = (0,9 \pm 0,03) \cdot 10^5 \text{ Моль}^{-1}$ и число мест связывания $N_{\text{САЧ}} = (1 \pm 0,05) \cdot 10^5 \text{ моль/л}$, а для БЛСАЧ соответствующие значения: $K_{\text{БЛСАЧ-АО}} = (1 \pm 0,03) \cdot 10^5 \text{ Моль}^{-1}$ и $N_{\text{БЛСАЧ}} = (0,6 \pm 0,05) \cdot 10^5 \text{ моль/л}$. Как видно, константы связывания гидрофобного АО отличаются незначительно, однако число мест связывания гидрофобного АО в молекуле САЧ

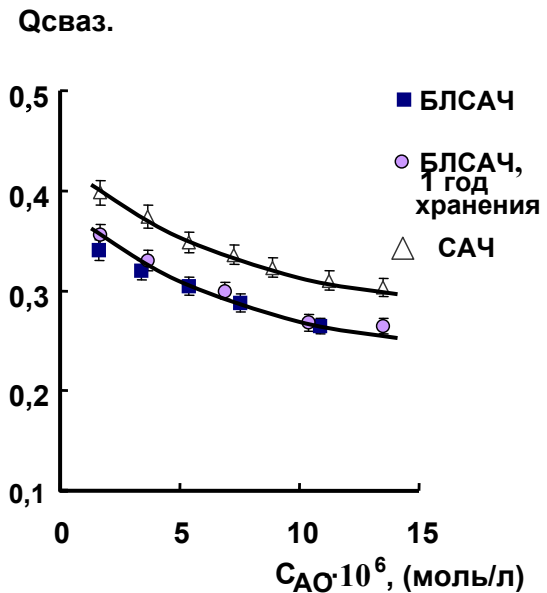


Рис. 4. Зависимость доли связанного альбумином АО от его концентрации для исходного САЧ, БЛСАЧ и БЛСАЧ через год хранения. Концентрация альбумина = 1 мг/мл.

после снятия лигандов несколько уменьшается.

Поскольку методом потенциометрического титрования показано существенное увеличение количества титруемых групп макромолекулы альбумина в результате снятия лигандов и, в то же время, методом поляризованной люминесценции установлено, что число мест связывания с гидрофобным лигандом несколько снижается, то можно сделать вывод о том, что увеличение эффективности связывания РНКазы безлигандным САЧ обуславливается в основном электростатическими взаимодействиями.

Получение конъюгатов ферментов с БЛСАЧ

Для того, чтобы наиболее полно использовать возможности мест связывания САЧ, освобожденных от лигандов, в качестве первой стадии модификации фермента проведено образование комплекса БЛСАЧ с РНКазой. Влияние таких факторов, как порядок добавления компонентов и продолжительность процесса на способность САЧ и БЛСАЧ образовывать полимерные комплексы (ПК) с ферментами рассмотрено на примере взаимодействия с бактериальной РНКазой. Экспериментальные данные свидетельствуют, что активность комплексов, образованных со свежерастворенным БЛСАЧ, не превышает 40-60%. Взаимодействие фермента с немодифицированным САЧ, а также с БЛСАЧ через 2 ч после его растворения не приводило к уменьшению активности фермента. При этом на количество включенного в комплекс альбумина влияет последовательность смешивания компонентов. Поскольку комплексообразование проводилось в мягких условиях (0,05 М Na-фосфатный буферный раствор, pH 7,4) разумно предположить, что в результате взаимодействия с БЛСАЧ активный центр фермента экранируется. В случае образования ПК БЛСАЧ с панкреатической РНКазой падения активности не наблюдалось. Следует отметить, что увеличение ионной силы раствора вызывало разрушение комплекса, что также указывает на ведущую роль электростатических взаимодействий в их образовании. Комплекс БЛСАЧ-РНКазы_В показал незначительную пролонгацию действия активного фермента в сыворотке крови при внутривенном введении кролику по сравнению со свободным ферментом. В целях увеличения стабильности препарата использовали «сшивку» полученного комплекса с помощью бифункционального реагента (ГА) (метод II). Продукты реакции соконденсации разделяли методом гелепроникающей хроматографии на колонке с Ультрогелем АСА-44 (рис. 5).

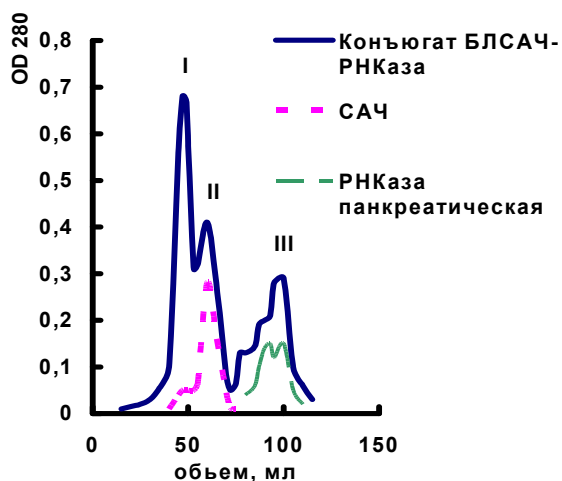


Рис. 5. Разделение продуктов соконденсации БЛСАЧ-РНКазы панкреатической (1), САЧ (2) и панкреатической РНКазы (3) методом гелепроникающей хроматографии на колонке с Ультрогелем АСА-44 (1,6×50 см), уравновешенной 0,05М Na-фосфатного буферного раствора, pH 7,4. Элюцию проводили рабочим буферным раствором, скорость элюции 12 мл/ч. На колонку нанесено 13 мг белка.

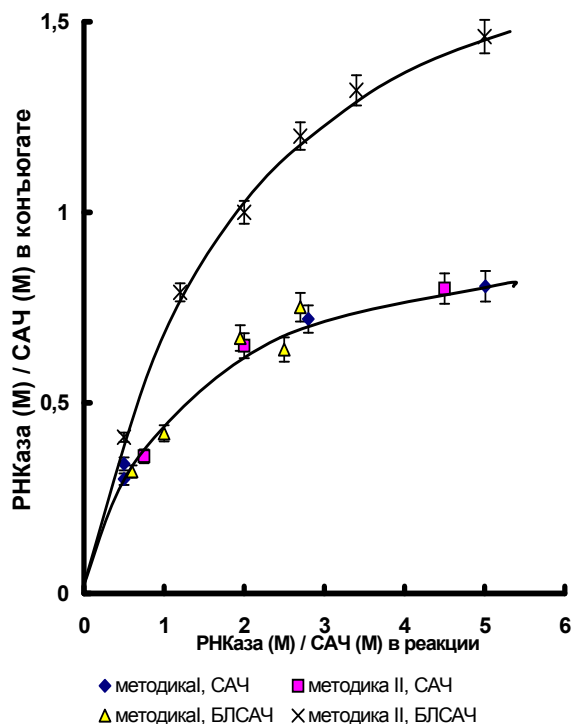


Рис. 6. Активность конъюгатов панкреатической РНКазы, полученных двумя методами (I и II).

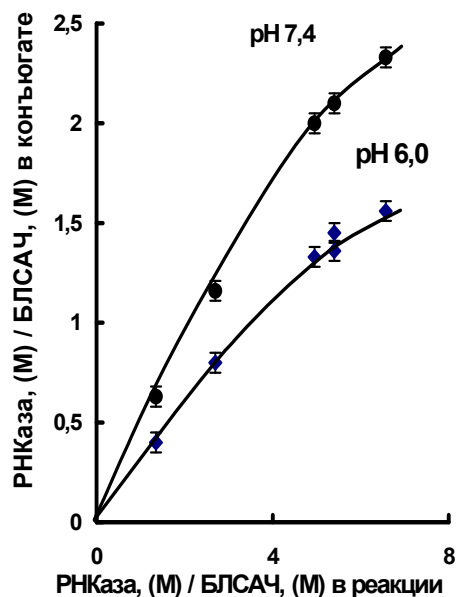


Рис. 7. Содержание бактериальной РНКазы в конъюгате в зависимости от соотношения компонентов в реакционной смеси.

Для сравнения конъюгаты были получены двумя методами (I и II) с использованием в качестве носителя БЛСАЧ и исходного САЧ (рис. 6). Показано, что наибольшей активностью обладали конъюгаты, полученные с БЛСАЧ по методу II. Активность же конъюгатов, полученных по методу I как с САЧ, так и с БЛСАЧ, а также по методу II с САЧ, практически совпадала и была значительно ниже. Очевидно, что для получения максимального связывания фермента носителем необходимо использовать только БЛСАЧ и проводить процесс по предложенной схеме. Условия соконденсации БЛСАЧ и обеих РНКаз оптимизированы по таким параметрам, как соотношение компонентов, концентрация ГА (табл. 1) и pH раствора (рис. 7). Как следует из экспериментальных данных, в 0,05 М Na-фосфатном буферном растворе, pH 7,4, при концентрации БЛСАЧ 2%, мольном соотношении РНКазы:БЛСАЧ = 5 и соотношении ГА:белок = 3 с одним молем БЛСАЧ связывается по меньшей мере до 2 молей биназы. Указанные условия соблюдали при проведении поликонденсации РНКаз и альбумина.

Предложенный метод экспериментально апробирован на примере иммобилизации протеаз, которые, как известно, также обладают противовоспалительным и противоотечным действиями.

Таблица 1. Влияние соотношения ГА:белок на связывание биназы в конъюгате.

Мольное соотношение ГА/белок в реакционной смеси (моль/моль)	Суммарная активность (%)	Количество биназы в конъюгате на 1 моль БЛСАЧ (моль)
0,5	68	0,1
1,5	100	0,38
3,5	94	1,8
6,0	95	1,17

Таблица 2. Характеристика конъюгатов САЧ и БЛСАЧ с химотрипсином

Форма САЧ	Метод получения конъюгата	Количество связанного химотрипсина, моль ХТР/моль САЧ	Сохранение ферментативной активности при соконденсации, (%)
САЧ _{исх}	метод I	0,02	30
САЧ _{исх}	метод II	0,75	95
БЛСАЧ	метод II	2,24	100

В таблице 2 приведены характеристики конъюгатов САЧ-химотрипсин и БЛСАЧ-химотрипсин, полученных методами I и II. Применение предложенного нами способа получения конъюгатов позволяет полностью сохранить активность фермента в процессе иммобилизации и получить препараты с высоким содержанием активного компонента - более двух молей химотрипсина на 1 моль БЛСАЧ.

Таким образом, для получения конъюгатов с высоким содержанием ферментного компонента в качестве носителя можно рекомендовать безлигандный САЧ, а сам процесс следует осуществлять в две стадии: на первой стадии получать ПК БЛСАЧ с ферментом, а далее проводить соконденсацию продуктов комплексообразования белков с помощью ГА.

Исследование физико-химических свойств синтезированных продуктов

Задача сохранения активности иммобилизованных ферментов является одной из центральных в биоконъюгации. Панкреатическая РНКаза и химотрипсин полностью сохраняли свою специфическую активность в составе полимерных комплексов и конъюгатов, полученных на основе БЛСАЧ по разработанному нами методу. Однако комплексы, образованные РНКазой *Bacillus intermedius* 7P и свежерастворенным БЛСАЧ, сохраняли только 40-60% активности. Связано ли уменьшение активности в данном поликомплексе с инактивацией фермента или оно вызвано недоступностью его активного центра? В последнем случае латентная ферментативная активность будет проявляться, например, при протеолитическом расщеплении олигоальбумина. Для выяснения причин частичной утраты ферментативной активности РНКазы_{Vi} в составе комплекса с БЛСАЧ проведен модельный эксперимент. Полимерный комплекс был "зафиксирован" с помощью ГА и были получены конъюгаты РНКазы_{Vi}-БЛСАЧ, а также олигоальбумин аналогичной

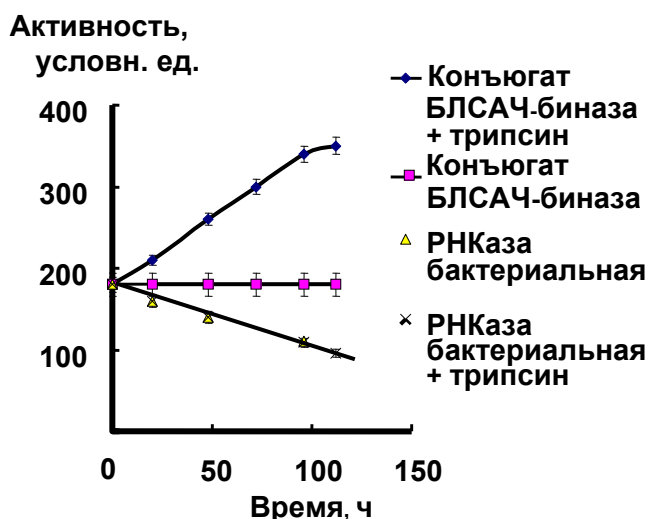


Рис 8. Динамика проявления ферментативной активности бактериальной РНКазы и конъюгата БЛСАЧ-биназа в присутствии трипсина и без него. Концентрация трипсина 0,03 мг/мл в 0,05 М Na-фосфатном буферном растворе, pH 6,5; концентрация белка 4,3 мг/мл

молекулярной массы. Ферментативная активность ПК при поликонденсации сохранялась полностью. В условиях, когда трипсин гидролизует олигоальбумин, но не РНКазу_{Вi}, наблюдали за изменением активности РНКазы_{Вi} и ее конъюгата с БЛСАЧ в течение 100 ч при комнатной температуре (рис. 8). На фоне небольшого падения активности свободного фермента, независимо от присутствия трипсина, конъюгат БЛСАЧ-РНКазы_{Вi} сохранял активность в растворе в течение всего времени эксперимента, что свидетельствует о стабилизации фермента в составе конъюгата. При добавлении трипсина к раствору конъюгата БЛСАЧ-РНКазы_{Вi} наблюдался рост трансферазной активности, приводившей к практически полному восстановлению утраченной активности фермента. Все вышесказанное позволяет сделать вывод, что получение конъюгатов ферментов с БЛСАЧ по предложенному нами методу позволяет создать макромолекулярные «микрореакторы», способные под действием эндогенных протеиназ постепенно высвобождать действующий биологически активный компонент во время пребывания в организме.

В результате разделения высокомолекулярных продуктов реакции соконденсации методом SDS-электрофореза в 7,0 % ПААГ показано, что фракция I (см. рис. 5) представляет собой смесь макромолекул с КММ 210-350 кДа для обоих ферментов, что соответствует конъюгатам следующего состава: 2 моля САЧ и 6 молей РНКазы, а также 3 моля САЧ и 1 моль РНКазы. Фракция II (рис. 5) включает в себя компоненты с КММ 68, 82 и 95 кДа для панкреатической РНКазы и 68, 80, и 92 кДа для бактериального фермента. Это указывает на содержание во фракции как свободного САЧ, так и конъюгатов, состоящих из 1 моля САЧ и 1-2 молей РНКазы. Следует отметить, что статистически вероятным является также и присутствие олигомеров альбумина.

Известно, что димеры РНКазы обладают повышенной противовирусной и противоопухолевой активностью, что зачастую связывают со способностью данной молекулярной формы РНКаз разрушать двунитевую РНК, содержание которой в опухолевых клетках повышено по сравнению с нормальными клетками. В связи с вышесказанным представляло интерес исследование способности конъюгатов, например, панкреатической РНКазы с БЛСАЧ, деградировать двунитевую РНК. Экспериментально показано, что специфическая активность в отношении данного субстрата во фракции II (см. рис. 5) почти в 20 раз превышает активность свободного фермента (рис. 9). Активность более высокомолекулярной фракции I, содержащей конъюгаты с КММ 220 кДа и выше, превышает активность в отношении двунитевой РНК в 170 раз по

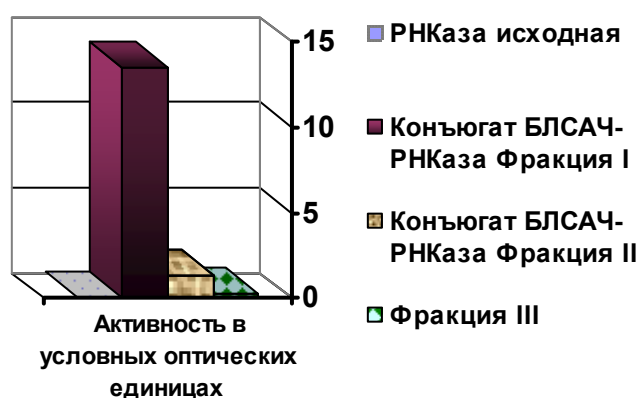


Рис. 9: Ферментативная активность конъюгатов панкреатической РНКазы с БЛСАЧ в отношении двунитевой РНК. Фракции I, II и III получены в результате гельхроматографии на колонке с Ультрогелем АСА-44 (1,6×50 см) (рис. 5.)

сравнению с нативной РНКазой.

Характер распределения активности в отношении дунитевой РНК во фракциях также является косвенным доказательством преимущественно внутримолекулярного связывания, а именно «скрепления» ПК БЛСАЧ-фермент в выбранных условиях проведения реакции поликонденсации с помощью ГА, так как в противном случае наблюдалось бы интенсивное образование искусственных димеров РНКазы, для которых характерна на два порядка более высокая активность в отношении дунитевой РНК по сравнению с наблюдаемой экспериментально.

Вышеописанные результаты позволяют сделать вывод, что взаимодействие панкреатической РНКазы с БСАЧ приводит к образованию сложных макромолекулярных комплексов, включающих в свой состав более одной молекулы фермента. Важно, что освобождение молекулы САЧ от связанных с ней лигандов способствует образованию комплексов, в которых активные центры взаимодействующих с носителем молекул фермента сближены в пространстве настолько, что препарат получает новое свойство – способность к деградации дунитевого высокомолекулярного субстрата.

Способ выделения конъюгатов альбумина и рибонуклеаз

Одним из ключевых и часто трудных вопросов в области инженерной энзимологии является необходимость характеризовать продукты, полученные биоконъюгацией. В результате реакции соконденсации нуклеаз с БЛСАЧ, наряду с образованием активных конъюгатов, статистически вероятным является синтез олигомеров альбумина и РНКаз. Гельпроникающая хроматография (ГПХ) продуктов реакции соконденсации позволяет отделить высокомолекулярные компоненты, включая конъюгаты, от свободного фермента. Следующий этап данного исследования – определение содержания олигоальбуминов в полученном препарате и разработка метода выделения активных конъюгатов. Сложность данной задачи заключается в необходимости разделения веществ близкой молекулярной массы и химической природы. Для её решения был предложен простой и оригинальный способ, учитывающий высокое сродство РНКазы к кремнеземам, –

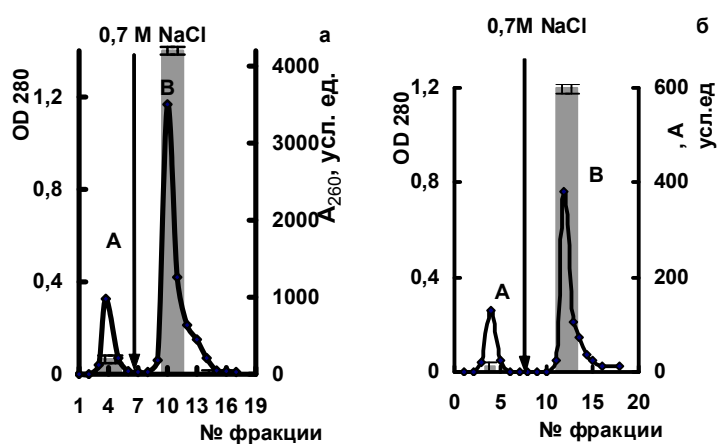


Рис. 10. Профили элюции конъюгата РНКаз с БЛСАЧ на колонке с макропористым стеклом МПС-200 (объем фракции 3 мл.): а - конъюгат Биназа-БЛСАЧ (КММ 210 и более кДа). На колонку нанесено 15 мг препарата, обладающего активностью 4400 Ед., б – конъюгат РНКаз_{панкр.}-БЛСАЧ КММ 82 - 95 кДа, на колонку нанесено 15 мг препарата, обладающего активностью 570 Ед.; «А» – фракция, содержащая олигомер альбумина; «В» - фракция, содержащая конъюгат, включающий в свой состав фермент. Цветом отмечена величина ферментативной активности фракций «А» и «В».

хроматография на макропористом стекле МПС-200. Адсорбент проявляет свойства слабого катионита, размеры пор достаточно велики и их внутренняя поверхность доступна для сорбционного взаимодействия с макромолекулами даже очень большой молекулярной массы (до 1000 кДа). Максимум сорбции белков (сывроточного альбумина, РНКазы и химотрипсиногена) из водных растворов на макропористом стекле наблюдается вблизи значения изоэлектрической точки (ИЭТ).

Поэтому, опираясь на адсорбционные свойства макропористых кремнеземов, были подобраны условия сорбции и десорбции РНКаз на макропористом стекле МПС-200 в зависимости от значений рН (6,0–9,0) и ионной силы раствора (0,05–1 М NaCl), так как именно в этом диапазоне значений рН наблюдается падение сорбции альбумина в динамическом режиме со 100% до 0%. Согласно экспериментальным данным, оптимальные условия, при которых РНКазы и, следовательно, содержащие их конъюгаты сорбируются на МПС-200, а альбумин и его олигомеры с адсорбентом не взаимодействуют, таковы: 0,05 М трис-НСl буферный раствор, рН 8,5. Практически полной десорбции нуклеаз удавалось достичь при использовании растворов высокой ионной силы – 0,7 М NaCl (рис. 10, табл. 3). В результате проведенных исследований показано, что в комплексообразование с ферментами вступает, по крайней мере, 76% макромолекул БЛСАЧ и количество макромолекул, не содержащих фермент в препаратах I и II, полученных после разделения продуктов реакции соконденсации с помощью ГПХ на Ультрогеле АСА 44, не превышает 24%, что удовлетворяет требованиям фармакопеи России.

Из данных о содержании белка и ферментативной активности во фракции «В» после разделения на колонке с МПС-200 (рис. 10, табл. 3), а также данных электрофореза следует, что препараты конъюгата с КММ 80–95 кДа состоят из 1 моля БЛСАЧ и 1 моля РНКазы и (или) 1 моля БЛСАЧ и 2 молей РНКазы, а препараты конъюгата с КММ 210-350 кДа – из 3 молей БЛСАЧ и 1 моля РНКазы и (или) 2 молей БЛСАЧ + 6 молей РНКазы. Для панкреатической РНКазы компоненты смеси, по-видимому, представлены в примерном

Таблица 3. Характеристика конъюгатов БЛСАЧ с панкреатической и бактериальной РНКазами, полученных хроматографией на МПС-200.

Объект	Молекулярная масса кДа	Активность Отн. ед.	Фракции на МПС-200						Предполагаемый состав конъюгата
			Белок, мг.		Активность, отн. ед.		Мольное соотношение РНКазы/САЧ		
			А	В	А	В	А	В	
Конъюгат БЛСАЧ-РНКазы фр. I									2 М САЧ +6 М РНКазы;
Панкреатическая	≥ 220	776	3,25	11,85	18	784	0,05	1,9	3М САЧ + 1М РНКазы
Бактериальная	≥ 210	4400	3,3	11,7	280	5325	0,13	3,3	
Конъюгат БЛСАЧ-РНКазы фракция II									1 М САЧ +1 М РНКазы
Панкреатическая	67 -95	570	3,5	11,5	12	597	0,05	1,7	1 М САЧ +2 М РНКазы
Бактериальная	67 -92	3750	2,9	12,1	193	4200	0,10	2,3	

равных количествах, в то время как в случае конъюгатов бактериальной РНКазы из *Bacillusintermedius* 7P можно предположить преобладание более высокоактивных конъюгатов. Среднее соотношение компонентов в таком конъюгате составляет 2,3 моля РНКазы на 1 моль БЛСАЧ для низкомолекулярного продукта (препарат II) и 3,3 моля РНКазы на 1 моль белка-носителя для более высокомолекулярных конъюгатов. Использование макропористых кремнеземов позволило охарактеризовать конъюгаты РНКаз различного происхождения с БЛСАЧ, а также дало метод получения конъюгатов без примеси олигомеров альбумина.

Таким образом, предложен эффективный метод получения модифицированных конъюгацией с БЛСАЧ форм ферментов. Он позволяет не только полностью сохранить каталитическую активность последних, но и в отличие от предложенных ранее, обеспечивает участие по меньшей мере, 75% макромолекул БЛСАЧ во взаимодействии с РНКазами, а также высокое содержание активного компонента в полученном препарате.

Изучение биологических свойств конъюгатов РНКаз с БЛСАЧ

Была оценена фармакологическая эффективность конъюгатов БЛСАЧ с панкреатической и бактериальной РНКазами. Определение времени циркуляции конъюгатов в кровеносной системе кроликов после их однократного внутривенного введения выявило существенное пролонгирование действия ферментов *in vivo*. Так, трансферазная активность в плазме крови после введения конъюгатов БЛСАЧ-РНКазы_{Vi} (80-92 кДа) сохранялась на уровне более 50% в течение 2-х суток, а при введении конъюгатов с КММ 220-350 кДа – и по истечении 3-х суток, тогда как время полувыведения свободного фермента составляло 2 часа. Возрастание трансферазной активности в плазме крови через 3 часа после введения конъюгата может быть связано с высвобождением фермента из "депо" при гидролизе альбуминовой составляющей конъюгата.

При внутривенном введении кроликам конъюгата панкреатической РНКазы с БЛСАЧ в аналогичных экспериментах также наблюдалась пролонгация трансферазной активности в плазме крови (рис. 11). Активность свободной РНКазы обнаруживается только в течение первых 20-30 мин после инъекции (кривая 3), в то время как при введении конъюгатов

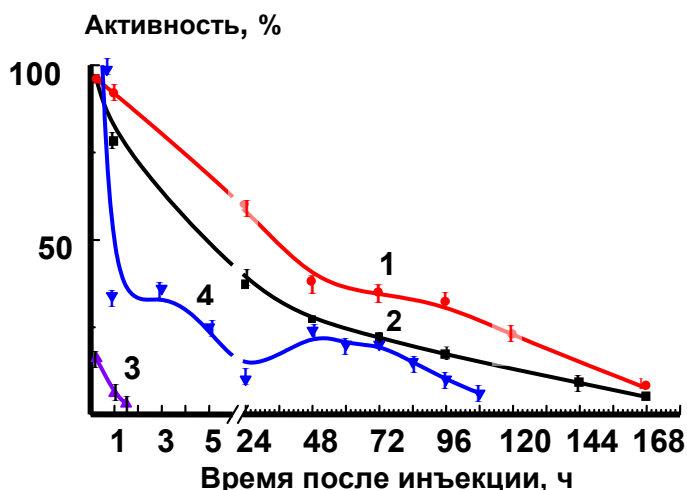


Рис. 11. Динамика трансферазной активности в плазме крови кроликов после однократного внутривенного введения конъюгатов БЛСАЧ-РНКазы панкреатической в дозе, соответствующей 0,5 мг фермента на 1 кг веса животного:
 1 – конъюгат ММ 68-95 кДа,
 2 – конъюгат с ММ 220-350 кДа,
 3 – панкреатическая РНКазы;
 4 – конъюгат с ММ 68-95 кДа в дозе, соответствующей по активности 5 мг фермента на 1 кг веса животного, после внутримышечного введения.

активность сохраняется на уровне 30-40% от исходной в течение 4 суток. Хотя при введении более высокомолекулярного конъюгата (кривая 2) уровень трансферазной активности несколько ниже, чем для низкомолекулярного, он остается достаточно высоким для терапевтического действия фермента. Преимуществом использования препаратов небольшой кажущейся молекулярной массы (68-95 кДа) является возможность вводить их не внутривенно, а внутримышечно, сохраняя при этом ферментативную активность в кровеносной системе в течение более двух суток на уровне 25% от введенной. Это существенно упрощает процедуру их применения.

Полученные конъюгаты РНКаз проявили высокую противовирусную активность в экспериментах на белых мышах, зараженных вирусом гриппа В/Lee/40, А/Lee/40 и А/PR/8/34 (Нон 1). При введении мышам конъюгата РНКаз в дозе 4-23 мкг фермента на мышь показатель $\Delta \lg LD_{50}$ ($\Delta \lg LD_{50}$ - изменение логарифма 50%-ной летальной дозы вируса в опыте с препаратом РНКазы по сравнению с контрольным опытом без препарата) увеличивается на 1,8 lg (табл. 4) и, что особенно актуально, препарат проявляет активность не только против вирусов гриппа типа А, но и типа В, от которого не защищает ремантадин. Аналогичный эффект установлен и в опытах на куриных эмбрионах (табл. 4) ($\Delta \lg ЭИД_{50}$ – изменение логарифма 50%-ной эмбриональной инфицирующей дозы вируса в опыте с

Таблица 4. Защитное действие панкреатической и бактериальной РНКаз, модифицированных двумя методами, при экспериментальной гриппозной инфекции

Препарат	Куриные эмбрионы		Мыши	
	Дозы препарата (в мкг по содержанию РНКазы)	$\Delta \lg ЭИД_{50}$	Дозы препарата (в мкг по содержанию РНКазы)	$\Delta \lg LD_{50}$
РНКазы панкреатическая:				
Нативная	1000	0,63	500	1,00
Модифицированная:				
Метод I (Горячева Л., 1989)	700 500	1,30 1,04	500 400	1,50 1,54
Метод II				
Конъюгат БЛСАЧ-РНКазы 220 -350 кДа	118	1,04	4,2	1,55
Конъюгат БЛСАЧ-РНКазы 67 -95 кДа	75,5 4,2	1,00 1,00	4,8	1,60
РНКазы бактериальная:				
Нативная	1,0	Токсичен	-	-
Модифицированная:				
Метод I (Горячева, 1989)	1,0 5,0	0,80 1,04	100,0	1,60
Метод II:				
Конъюгат БЛСАЧ-РНКазы_{В1} 220 -350 кДа	1,1 2,4	1,23 2,04	23,0	1,75
Конъюгат БЛСАЧ-РНКазы_{В1} 67 -92 кДа	0,83 1,75	0,98 1,75	17,5	1,82

препаратом по сравнению с контрольным экспериментом). Показано более выраженное защитное действие конъюгатов бактериального фермента.

РНказы уже используются в экспериментальной терапии опухолей и заболеваний вирусной этиологии. Нами была поставлена задача выяснения возможности прохождения конъюгатов панкреатической РНказы с БЛСАЧ через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в связи с возможностью применения пролонгированных форм РНказ для лечения ряда вирусных нейроинфекций. В опытах использовали крыс линии Вистар массой 180-200 г. В хвостовую вену однократно вводили ^3H -меченый исследуемый препарат в количестве 3,5 мг. Через определенные промежутки времени измеряли радиоактивность и определяли ферментативную активность в гомогенате мозга, очищенного от оболочек и сосудов (рис 13). Результаты экспериментов свидетельствуют, что экзогенная панкреатическая РНказа как в нативной, так и конъюгированной форме проникает из сыворотки крови в головной мозг крыс, без потери ферментативной активности. Нативная форма РНказы_{панкр.} проявила наибольшую активность через 15-30 мин после введения, но через 1,5 ч ее активность снижалась до контрольного уровня значений в контрольном опыте, как в сыворотке крови, так и в ткани мозга. Изучение динамики распределения конъюгатов БЛСАЧ-РНказа_{панкр.} выявило, что применение конъюгата с КММ 68-95 кДа позволяет получить стабильно высокий уровень активности в тканях мозга, по крайней мере в течение первых 24 ч, в то время как конъюгат с КММ 220-350 кДа имел несколько отличающуюся динамику проявления активности в тканях мозга (рис 12). Максимальная его активность наблюдается лишь через 3,5-5 ч после введения и сохраняется на достаточно высоком уровне в течение 24 ч, как в крови, так и в ткани мозга. Этот результат согласуется с полученными ранее данными о прохождении нативной панкреатической РНказы через ГЭБ и проявлении ею антивирусного

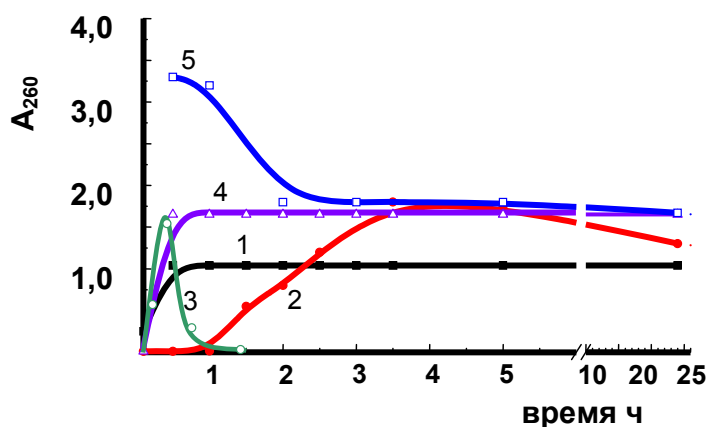


Рис. 12. Динамика изменения трансферазной активности в гомогенате клеток мозга (1 г) при однократном введении конъюгата РНказа-БЛСАЧ: 1 - КММ - 68-95 кДа; 2 - КММ - 220-350 кДа; 3 - РНказа_{панкр.}; и в плазме крови (1 мл): 5 - КММ - 68-95 кДа, 4 - КММ - 220-350 кДа

действия против нейровирусных инфекций.

Механизм проникновения РНказы в паренхиму мозга остается пока невыясненным. Изучение влияния 3,4-дигидрокси-L-фенилаланина (L-ДОФА) на интенсивность поступления конъюгата БЛСАЧ-РНказа_{панкр.} в мозг достоверных различий между контрольными и подопытными животными не обнаружило.

Таким образом, связывание с БЛСАЧ не препятствует проявлению ферментом анти-вирусной активности и способст-

вует пролонгированию его действия в ткани мозга, что, в свою очередь, должно повышать его эффективность. Это наблюдение позволяет сделать вывод о перспективности препаратов такого рода для практической медицины.

Компьютерное моделирование межмолекулярных комплексов САЧ и ферментов

Для установления молекулярных механизмов изменения биологических свойств ферментов в составе конъюгата с БЛСАЧ, полученного по предложенному методу, проведено компьютерное моделирование межмолекулярных комплексов обезжиренного альбумина (PDB код 1AO6) и РНКазы А (PDB код 1fs3). В силу отсутствия информации о структуре комплекса и локализации сайта связывания данных молекул с помощью оригинальной программы GRAMM (<http://vakser.bioinformatics.ku.edu>) проведен так называемый несвязанный докинг. Подбор параметров геометрического докинга, таких как величина шага решетки и величина отталкивающего потенциала силового поля проведен путем реконструкции модели комплекса для близких по строению (размерам) белковых макромолекул, кристаллическая структура комплекса которых установлена экспериментально, например, РНКазы А-ингибитор РНКазы (RI) (PDB код 1dfg; В.Кобе, J.Deisenho, 1996). Используются следующие параметры: размер ячейки трехмерной решетки (грид) 1-5 Å; отталкивающая часть потенциала 10 и интервал вращения 20°. Поскольку стерическая комплементарность не всегда является ведущим фактором молекулярного узнавания, докинг и оптимизация энергии для данной системы проведены с помощью программы ZDOC (<http://zlab.bu.edu/zlab/index.shtml>) и ресурсов сервера «ClusPro» (<http://nrc.bu.edu/cluster>). Это позволило дополнительно провести оптимизацию с учетом межмолекулярных электростатических взаимодействий и энергии десольватации на основании потенциала межатомных контактов (Zhang et al., 1997). При построении предполагаемой структуры комплекса САЧ-РНКазы_{панкр.} получено достаточно хорошее согласие между результатами независимых расчетов.

Структурный анализ гипотетических комплексов выявил наличие до пяти возможных участков связывания РНКазы А на поверхности САЧ (с учетом хорошей геометрической комплементарности и энергии связывания $\Delta E < -250$ усл. ккал/моль). Эти участки локализованы преимущественно вдоль впадины в пространственной структуре молекулы САЧ, где расположены основные сайты связывания САЧ с различными лигандами. Поскольку экспериментально получены макромолекулярные комплексы БЛСАЧ и РНКаз, содержащие более одной молекулы фермента, для определения мест локализации следующих сайтов связывания проведен последовательный докинг и построена модель структуры комплекса, включающего САЧ и 3 макромолекулы РНКазы А (рис. 13). Смещение положения глобальных минимумов оценочной функции при построении модели комплекса обезжиренного САЧ и трех молекул РНКазы А в направлении сайта связывания #2, по-видимому, отражает известное свойство РНКаз образовывать в растворах олигомерные формы, что часто связывают с механизмом их катализа.

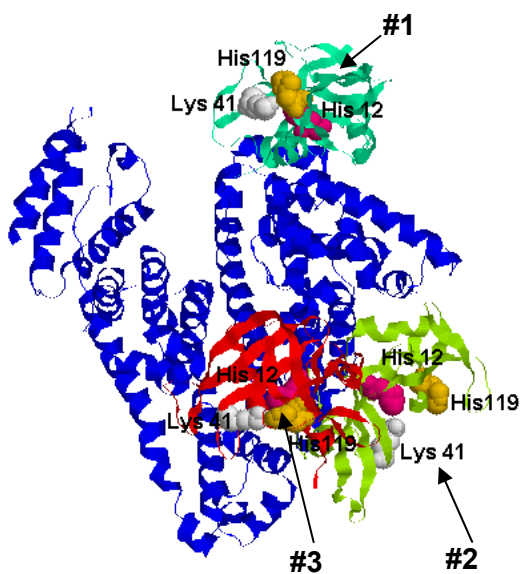


Рис. 13. Ленточная диаграмма предполагаемой структуры комплекса САЧ-3·РНКаза А. Отмечены предпочтительные сайты связывания. Выделены аминокислотные остатки активного центра РНКаза А

Анализ динамики предполагаемых структур комплексов САЧ-3·РНКаза А, проведенный на сервере eNemo (Suhre R., 2004), указывает на доступность активных центров для взаимодействия с субстратом и отсутствие стерических ограничений для подвижности аминокислотных остатков (АКО), формирующих активный центр ферментов, что соответствует полученным нами экспериментальным результатам. Близкое расположение активных центров ферментов, связанных в центрах #2 и #3 приводит к увеличению плотности положительного заряда в области связывания субстрата и дает теоретическое обоснование проявления полученными конъюгатами активности в отношении двунитовой РНК. Не столь значительный рост активности в отношении двунитового субстрата во фракции II (см. рис.10), которая содержит конъюгаты,

включающие 2 моля РНКаза, может являться свидетельством того, что наиболее приоритетные центры связывания РНКаза на молекуле альбумина достаточно удалены друг от друга. А существенное повышение активности по отношению к данному субстрату конъюгатов, в состав которых входит более двух молей РНКаза (во фракции I), подтверждает локализацию третичного центра связывания фермента в непосредственной близости от молекулы фермента уже вошедшей в состав комплекса с белком-носителем.

Анализ, аминокислотного состава поверхностей контактов молекулы САЧ в комплексе с молекулами фермента (РНКаза А), выявил локализацию в области поверхностей белок-белковых контактов АКО, входящих в состав различных лиганд-связывающих центров молекулы САЧ. Так сайт связывания РНКаза А #1 затрагивает Cys34, отвечающий за связывание сульфгидрильных соединений и Arg117, формирующий наиболее высокоаффинный сайт связывания одного из важнейших лигандов альбумина – длинноцепочечных жирных кислот. Центр связывания #2 затрагивает спирали h2, h3, h4 субдомена ПА, которые образуют центр неспецифического связывания лекарственных препаратов “Sudlow I” молекулы САЧ. Характерной особенностью центра связывания #3 является локализация на поверхности контактов АКО спиралей h10 субдомена IB, h1 субдомена ПА, h4 и h6 субдомена IIIA, которые входят в состав сайтов “Sudlow I” и “Sudlow II”, а также Arg222, участвующего во взаимодействии с билирубином, и Lys351, играющего главную роль в высокоаффинном центре связывания жирных кислот макромолекулами альбумина. Это позволяет предположить, что освобождение САЧ от связанных с ним лигандов должно

существенно повлиять на образование комплекса с ферментом, в особенности, в центрах связывания #2 и #3. Вероятно, это и позволяет объяснить увеличение активности экспериментально полученных комплексов (и в последствии конъюгатов) БЛСАЧ и РНКаз после снятия лигандов с макромолекулы донорского САЧ почти на порядок.

Сложной задачей в теоретических исследованиях белок-белковых взаимодействий является возможность идентифицировать комплексы, существующие *in vivo*, которые должны быть достаточно прочными для образования при биологических концентрациях мономеров. Для валидации предполагаемых структур комплексов с использованием ресурсов сервера «Protein-protein interactions» (Jones S., 1996) проведен анализ поверхности контактов, учитывающий такие характеристики взаимодействий, как количество, тип и положение взаимодействующих аминокислотных остатков, площадь поверхности контактов. После минимизации энергии комплексов в вакууме с помощью программ SPDBV и MOE был проведен анализ вероятных межмолекулярных контактов в комплексе обезжиренного САЧ и трех макромолекул РНКазы, а также дана оценка значений энергии образования комплексов (табл. 5).

Согласно полученным результатам, в образовании высокоактивного макромолекулярного комплекса принимают участие различные виды взаимодействий. Площадь поверхности макромолекулярных контактов, недоступная растворителю – ΔASA, составляет в среднем $1326,58 \pm 24,7 \text{ \AA}^2$, что составляет порядка 20% всей поверхности лиганда и соответствует значению данной величины для достаточно устойчивых комплексов (Jones, Thornton, 1996). Поверхности контактирующих белков в области сайта #1 имеют высокую комплементарность, что характерно для постоянных комплексов. Комплементарность молекул альбумина и РНКазы А в сайтах #2 и #3 ниже, однако для этих поверхностей отмечено наличие нескольких полостей, и в их образовании задействованы участки большого количества элементов вторичной структуры. Число водородных связей на 100 \AA^2 поверхности контактов и большое количество контактирующих аминокислотных остатков говорят в пользу образования достаточно прочных комплексов обезжиренного САЧ и нескольких макромолекул РНКазы А (Gong, Yoon, 2005; Winter, Henschel, 2006). Таким образом, анализ характеристик поверхностей контактов рассчитанных комплексов указывает на то, что предполагаемые структуры соответствуют современным представлениям о белок-белковых взаимодействиях и, по-видимому, являются достаточно прочными.

Таблица 5. Возможные межмолекулярные взаимодействия в комплексах обезжиренного САЧ и трех молекул РНКазы А

Участок	Водородные связи	Ионные связи	Гидрофобные взаимодействия	Энергия образования комплекса ΔE (условные ккал/моль)
#1	8	3	2	-2 341
#2	5	1	1	-311,5
#3	9*	1	-	-227,7

* в том числе 4 связи между молекулами РНКазы А, связанными в сайтах #2 и #3

Использование ресурсов серверов «Hydrophobic clusters detector» (<http://monkey.belozersky.msu.su/>) и «ClusPro» позволило провести анализ межмолекулярных гидрофобных взаимодействий и энергетического вклада аминокислотных остатков белков в свободную энергию связывания. Эти результаты, с одной стороны, красноречиво указывают на то, что АКО, расположенные в сайтах связывания традиционных физиологических лигандов САЧ, не только локализованы на поверхности контакта компонентов комплекса, но и принимают активное участие во взаимодействии с ферментом. С другой стороны, они дают возможность предположить, что движущими силами образования данных белок-белковых комплексов выступают преимущественно электростатические и гидрофобные взаимодействия. При этом их вклад варьирует в разных сайтах связывания. Форма электростатического потенциала свободных макромолекул и их комплексов, а также данные об электростатической компоненте свободной энергии связывания, составляющей около половины расчетной величины энергии связывания, показывают, что дальнедействующие электростатические взаимодействия являются иницирующими при образовании комплекса. А затем более тонкая архитектура комплекса «подстраивается» и стабилизируется гидрофобными взаимодействиями и водородными связями.

Полученные результаты позволяют предположить теоретическую возможность получения устойчивых мультимолекулярных комплексов, включающих БЛСАЧ и до трех (по крайней мере) молекул РНКазы А. Причем это не отражается на подвижности АКО, составляющих активный центр фермента. Кроме того, для всех ферментов, входящих в состав комплекса, не обнаружено стерических ограничений доступности активных центров для взаимодействия с субстратом.

Взаимодействие БЛСАЧ-модифицированных ферментов с ингибитором РНКаз

Известно, что для борьбы с проникшим чужеродным белком (и ферментом в частности) в организм использует первую очередь механизмы иммунной защиты, ингибирования его каталитической активности и протеолитическую деградацию. В связи с этим представляется чрезвычайно важным рассмотреть вопрос о взаимодействии БЛСАЧ-модифицированного фермента с ингибитором его активности. Анализ структуры полученных нами комплексов САЧ и панкреатической РНКазы показал, что лабильный в отношении протеолиза и иммунореактивный фрагмент РНКазы А (аминокислотные остатки 32-43) расположен на поверхности белок-белковых контактов и находится в экранированном состоянии, что препятствует взаимодействию протеиназ с модифицированными ферментами. Поэтому разумно будет предположить, что конъюгирование панкреатической РНКазы с БЛСАЧ, проведенное по предложенному методу, понижает риск протеолитической деградации модифицированного фермента в кровотоке и тканевых жидкостях (при введении в кровотоки) и, следовательно, способствует пролонгированию его действия, что и наблюдали в экспериментах *in vivo*.

В данной работе построена модель возможного взаимодействия цитоплазматического ингибитора рибонуклеаз (RI) с ПК, образованным молекулой обезжиренного САЧ и двумя молекулами РНКазы А. Аналогично была предсказана возможная структура комплексов

обезжиренного альбумина и бактериального фермента. Анализ полученных нами данных для гипотез комплексов в системах САЧ/2·РНКаза А/цитоплазматический ингибитор РНКаза и САЧ/3·Биказы/цитоплазматический ингибитор РНКаза, показал, что для данных систем характерно наличие двух центров связывания RI. При этом ни один из них не затрагивает активных центров, входящих в состав комплекса ферментов как в случае панкреатической РНказы, так и для бактериального фермента (рис 15, А и Б, соответственно) и, следовательно, не препятствует реализации ферментативной активности, необходимой для биологического действия препарата.

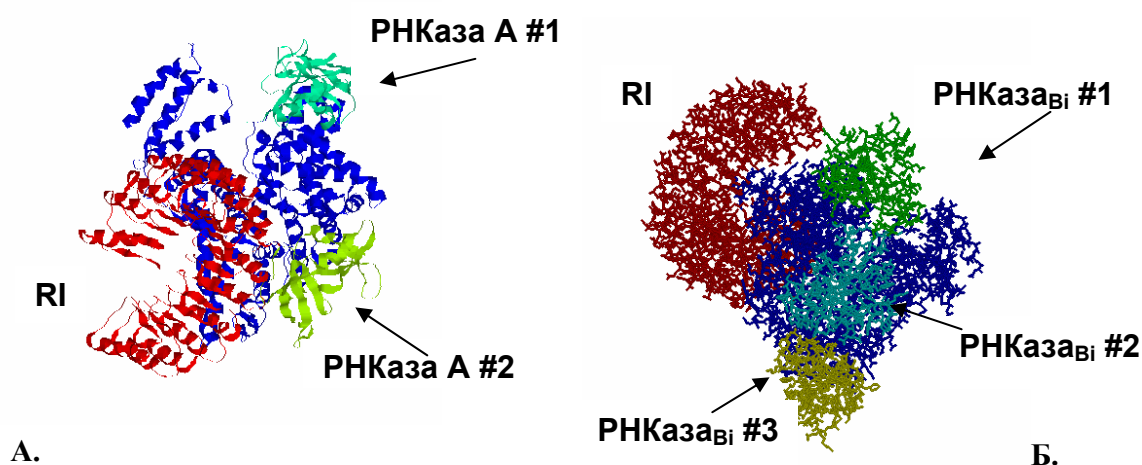


Рис. 15. Схемы предполагаемого взаимодействия комплексов САЧ с ферментами: А) ленточная диаграмма структуры комплекса САЧ/2·РНКаза А/RI; Б) проволочное представление модели взаимодействия RI и комплекса САЧ/3·РНказы_{Bi}.

Следует отметить, что моделирование всегда гипотетично и, следовательно, подтвердить локализацию центров связывания можно только после проведения дополнительных исследований – например, рентгеноструктурным анализом. Однако, в совокупности с данными о физико-химических свойствах полученных нами конъюгатов, которые достаточно хорошо согласуются с результатами проведенного теоретического исследования, мы можем высказать предположение о том, что представленные модели позволяют углубить понимание молекулярных механизмов изменения биологических свойств данных ферментов в составе конъюгатов, а также с достаточной долей вероятности предсказать характер поведения модифицированных ферментов.

На основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований с использованием методов структурной биохимии и компьютерного молекулярного докинга белков, минимизации энергии и анализа структуры комплексов предложен подход к разработке белковых лекарственных средств пролонгированного действия. Данный подход может быть использован для конструирования широкого набора лекарственных препаратов с заданными свойствами.

Результаты и выводы

1. Предложен и экспериментально обоснован оптимальный метод получения САЧ, очищенного от балластных лигандов – безлигандного сывороточного альбумина человека (БЛСАЧ).
2. Экспериментально разработан новый метод получения конъюгатов БЛСАЧ с терапевтическими ферментами, состоящий в комплексообразовании БЛСАЧ с соответствующим ферментом (в частности, нуклеазой или протеазой) и последующей соконденсации компонентов комплекса с помощью глутарового альдегида. Полученные этим методом конъюгаты обладают существенно повышенным отношением фермент/альбумин и придают ферментным компонентам ряд новых полезных терапевтических свойств.
3. В ходе биоиспытаний показано, что конъюгаты нуклеаз обладают высоким антивирусным пролонгированным действием и сниженной по сравнению со свободным ферментом токсичностью. Показано, что конъюгаты нуклеаз обладают активностью в отношении двунитевой РНК, что повышает возможности их терапевтической эффективности. Показано также, что полученные по предложенному методу конъюгаты РНКазы А, обладают способностью проходить через гематоэнцефалический барьер, и могут быть эффективны также при внутримышечном введении.
4. Примененные методы компьютерного моделирования позволяют провести анализ структур конъюгатов, изучить механизмы образования комплексов и прогнозировать свойства конъюгатов иного молекулярного состава.
5. На основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований с использованием методов структурной биофизики и современных компьютерных технологий предложена новая стратегия создания белковых лекарственных препаратов пролонгированного действия. Она включает использование безлигандного сывороточного альбумина человека (БЛСАЧ) в качестве носителя ферментов, теоретическое предсказание физико-химических и биологических свойств комплексов белка и фермента, получение и выделение фермент-альбуминовых конъюгатов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Пономарева Р.Б., Зелепуга Е.А., Ануфриева Е.В., Паутов В.Д., Шевелева Т.В. Взаимодействие рибонуклеазы с нативным и модифицированным сывороточным альбумином. //Всесоюзная конференция “Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование” Тезисы докл. Рига, 1989, С. 6
2. Пономарева Р.Б., Зелепуга Е.А. Самсонов Г.В. Конъюгаты нуклеаз с белками сыворотки крови, обладающие пролонгированным действием в организме. //Всесоюзная конференция “Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование” Тезисы докл. Рига, 1989, с. 65
3. Пономарева Р.Б., Зелепуга Е.А., Медведев М.Л., Самсонов Г.В. Модификация нуклеаз сывороточным альбумином. //Всесоюзная конференция “Методы получения, анализа и применения ферментов” Тезисы докл.. Юрмала, 1990, с. 126

4. Терпеловская О.Н., Зелепуга Е.А., Пономарева Р.Б., Третьяк Т.М. О проникновении РНКазы в ткань головного мозга. //Девятая конференция межвузовского проекта “Ферменты микроорганизмов” Тезисы докл. Казань 1991, с 39-42
5. Пономарева Р.Б., Зелепуга Е.А. Комплексообразование нуклеаз сывороточным альбумином. //Девятая конференция межвузовского проекта “Ферменты микроорганизмов” Тезисы докл. Казань 1991, с. 22-23
6. Пономарева Р.Б., Зелепуга Е.А., Медведев М.Л. Конъюгаты нуклеаз с безлигандным сывороточным альбумином. //Биологические науки, 1992, №2, с. 86-89
7. Терпеловская О.Н., Зелепуга Е.А., Пономарева Р.Б., Третьяк Т.М. Проникновение панкреатической РНКазы через гематоэнцефалический барьер в паренхиму головного мозга. Вопросы медицинской химии. , 1993, т.39, № 5, с. 41-43.
8. Пономарева Р.Б., Зелепуга Е.А., Илларионова Н.Г., Медведев М.Л. Взаимодействие рибонуклеазы *Bacillus intermedius* 7P с безлигандным сывороточным альбумином. //Прикладная биохимия и микробиология, 1994, т. 30, вып. 1, с. 88-93
9. Зелепуга Е.А., Пономарева Р.Б., Третьяк Т.М., Коликов В.М., Терпеловская О.Н., Медведев М.Л. Конъюгаты панкреатической рибонуклеазы с безлигандным сывороточным альбумином человека. //Биомедицинская химия, 2003, т.49, №6, стр. 588-597.
10. Зелепуга Е.А., Коликов В.М., Катушкина Н.В. Выделение конъюгатов альбумина и рибонуклеаз. //Прикладная биохимия и микробиология, 2004, т.40, №1, стр. 28–31.
11. Зелепуга Е.А., Лихацкая Г.Н. Высокоактивные комплексы панкреатической рибонуклеазы и модифицированного альбумина. //III Съезд биофизиков России 24-29 июня 2004 г. Воронеж. Тезисы докладов том 1, с. 41-42.
12. Зелепуга Е.А., Лихацкая Г.Н., Нурминский Е.А., Трифонов Е.В. Использование методов структурной биохимии и компьютерного моделирования для дизайна ферментных препаратов пролонгированного действия. //Материалы региональной научной конференции «Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии» Владивосток, 2004, С. 60-61
13. Zelepuga E. A., Likhatskaya G. N., Trifonov E. V., Nurminsky E. A. New approach for creation of drugs endowed with prolonged action on the basis of human serum transport protein. //FEBS Journal. 2005. V. 272 (s1), M2-022P

Соискатель



Зелепуга Е.А.