



УДК 547.144.615.281  
ББК 24.7

## ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

**Москвичева Яна Борисовна**

Аспирант кафедры молекулярной биотехнологии  
Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)  
moskvichev.36@mail.ru  
Московский проспект, 26, 190013 г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Петровский Станислав Викторович**

Аспирант кафедры молекулярной биотехнологии  
Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)  
s.v.petrovsky@spbniivs.ru  
Московский проспект, 26, 190013 г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Гинак Анатолий Иосифович**

Доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой молекулярной биотехнологии  
Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)  
mbt@lti-gti.ru  
Московский проспект, 26, 190013 г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Аннотация.** Изучали взаимодействие окисленных циклических декстранов-циклодекстрина (далее – ЦД) с белком – бактериальной стрептокиназой. При максимальном молярном трехсоткратном избытке ЦД молекулярная масса конъюгата стрептокиназы с циклодекстрином достигает 65 кД, причем с одной макромолекулярной стрептокиназы связывается 14 остатков ЦД.

Включение аденозина в конъюгат стрептокиназы с ЦД приводит к образованию тройного комплекса, где один остаток циклодекстрина поглощает одну молекулу аденозина.

**Ключевые слова:** циклодекстрин, стрептокиназа, аденозин, химическая модификация, гель-хроматография, окисление олигосахаридов, комплексы.

Известно, что стрептокиназа [К.Ф.3.4.99.22] – бактериальный белок, обладающий тромболитической активностью [6].

Ранее подробно описан процесс химической модификации стрептокиназы окисленным декстраном [2].

В некоторых случаях тромболитической терапии целесообразно сочетать такой курс

лечения с применением вазодилататоров. Так, аденозин оказывает отчетливое сосудорасширяющее действие. Аденозин участвует в обменных процессах, усиливает ресинтез АТФ в миокарде при ишемии, оказывает коронарорасширяющее действие, что позволяет рекомендовать аденозин в качестве гипотензивного антиаритмического средства [5].

Представляло интерес осуществить такую модификацию стрептокиназы, которая бы позволила сочетать в препарате тромболитическую активность и гипотензивное действие.

В качестве модифицирующего агента мы выбрали окисленный олигосахарид. Взаимодействие белков с окисленными декстранами – хорошо изученный процесс [3]. Здесь мы выбрали в качестве олигосахарида  $\gamma$ -циклодекстрин, являющийся циклическим олигосахаридом с молекулярной массой равной 1298 Да. Циклодекстрины способны включать в свою внутреннюю полость малые молекулы.

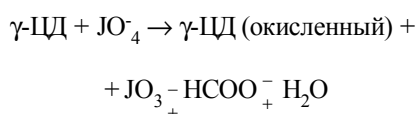
Нами использован метод иммобилизации при включении в  $\gamma$ -циклодекстрин аденозина (Ад). Предварительно  $\gamma$ -циклодекстрин ( $\gamma$ -ЦД) окисляли периодатом калия и затем химически связывали с белком стрептокиназой (СК) в условиях, аналогичных тем, в которых была изучена химическая модификация стрептокиназы окисленным декстраном [1].

В водном растворе СК представляет глобулу с радиусом Стокса равным 31,1 А°. Концентрацию белка СК в растворе определяли по оптической плотности в ультрафиолетовой области спектра, используя приведенные значения удельного коэффициента поглощения  $\epsilon_{\lambda 280}^{1\%} = 8,8$  и  $\epsilon_{\lambda 277}^{0.1\%} = 0,98$  [4]. Спектральные характеристики растворов исследовали с помощью спектрофотометра Hitachi U-2900 производства Японии.

В качестве олигомера-модификатора использовали  $\gamma$ -ЦД фирмы «Pharmatec. Inc.»

Количество ковалентных связей в конъюгатах, образованных между стрептокиназой и окисленным  $\gamma$ -циклодекстрином, определяли по убыли свободных аминогрупп в конъюгатах по сравнению с нативным белком.

$\gamma$ -циклодекстрин окисляли периодатом калия. Реакцию проводили в течение 1 часа при постоянном перемешивании. Количество периода калия, необходимое для окисления ЦД, рассчитывали по уравнению реакции:



Активация ЦД заключалась в окислении его глюкопиранозных звеньев с образованием свободных альдегидных групп с помощью

калия йоднокислого мета. Перед проведением реакции химического связывания активированного ЦД со СК проводили его очистку от избытка ионов окислителя  $\text{JO}_4^-$  и образовавшихся ионов  $\text{JO}_3^-$ .

Для этой цели использовали слабоосновный анионит типа АРА. Анионит предварительно переводили в ацетатную форму с помощью 0,5 М раствора уксусной кислоты.

Определение содержания альдегидных групп в окисленном ЦД, а также в восстановленных препаратах основано на реакции этих групп с солянокислым гидроксиламином. При этом взаимодействии выделяется соляная кислота, которую оттитровывают стандартным раствором NaOH и по количеству щелочи, пошедшей на титрование, рассчитывают содержание альдегидных групп [1].

Контроль за степенью модификации СК осуществляли с помощью метода гель-хроматографии. Хроматографию проводили на стеклянной колонке объемом 100 мл, заполненной гелем Сефадекс G-200 в качестве неподвижной фазы.

В качестве элюента на колонку подавался физиологический раствор со скоростью 5 мл/час. Под действием потока подвижной фазы вещества, нанесенные на колонку, перемещаются вдоль нее с различными скоростями, величины которых обратно пропорциональны коэффициенту распределения ( $K_{av}$ ) хроматографируемых веществ, причем чем меньше размер молекулы, тем больше  $K_{av}$ .

Для калибровки колонки использовали набор фирмы Serva со стандартизованными белками известной молекулярной массы (Мм).

Коэффициент распределения определяли по формуле:

$$K_{av} = \frac{V_1 - V_0}{V_m - V_0},$$

где  $V_m$  – максимальный объем удерживания, соответствующий веществу полностью включенному в гранулы геля (фенилаланин,  $V_m = 100$  мл);  $V_1$  – объем удерживания исследуемого вещества;  $V_0$  – свободный объем данной колонки, определяемый веществом, полностью исключенным из гранул геля (голубой декстран,  $V_0 = 40$  мл);

В таблице 1 приведены результаты калибровки колонки с Сефадексом G-200. На

рисунке 1 приведена зависимость  $K_{av}$  от величины  $\lg(M_m)$ .

За степень окисления  $\gamma$ -ЦД принимали величину, численно равную количеству пар альдегидных групп, приходящихся на 100 элементарных звеньев  $\alpha$ -D-глюкозы.

Определение количества свободных аминокрупп и степени модификации белка ( $\alpha$ ) проводили спектрофотометрически с помощью 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты (ТНБС). Калибровочную прямую строили по растворам глицина. Степень модификации рассчитывали на основе 3–5 измерений оптической плотности растворов с различными концентрациями белка. Результаты измерений  $\alpha$  рассчитывали как долю аминокрупп, вступивших в реакцию образования ковалентных

связей с олигомерной матрицей от общего числа свободных аминокрупп исходной СК.

При определении концентрации вещества в растворе спектрофотометрическими методами погрешность определения составляла < 5 %.

Содержание альдегидных групп по результатам иодометрического титрования определяется с погрешностью 10 %. Погрешность определения степени модификации СК с помощью ТНБС составляет 3–5 %.

Погрешность определения молекулярных масс по данным гель-хроматографии составила 15 %.

Модификацию стрептокиназы окисленным очищенным ЦД проводили в 0,5 М содовом буферном растворе при pH 9,5 в течение

Таблица 1

**Объемы удерживания и коэффициенты распределения веществ с известной молекулярной массой на колонке с Сефадексом G-200 в 0,9 % NaCl, объем геля  $V = 100$  мл**

№	Наименование	Молекулярная масса (Мм), Да	Объем удерживания, мл	$K_{av}$	$\lg(M_m)$
1	Голубой декстран	2 000 000	40	–	–
2	Бычий сывороточный альбумин	66 000	65	0,42	4,8
3	Стрептокиназа	47 300	69	0,49	4,7
4	Химотрипсिनоген	25 000	77	0,62	4,4
5	Цитохром С	12 400	84	0,73	4,1
6	Фенилаланин	165	100	–	–

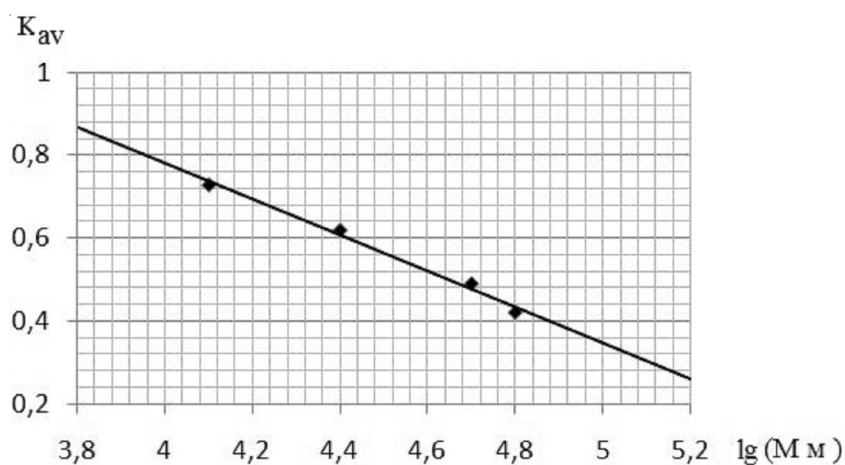


Рис. 1. Зависимость коэффициента распределения белков ( $K_{av}$ ) с известной молекулярной массой от величины  $\lg(M_m)$

1 часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании. В результате взаимодействия  $\epsilon$ -аминогрупп лизиновых остатков белка с альдегидными группами окисленного  $\gamma$ -ЦД образуется высокомолекулярный продукт СК-ЦД, содержащий неустойчивые двойные С=N-связи (основание Шиффа).

Для восстановления двойных связей С=N вносили в реакцию смесь двукратный молярный избыток боргидрида Na или K. При этом происходит стабилизация двойных связей с превращением их в одинарные, а непрореагировавших (избыточных) альдегидных групп декстрана в спиртовые.

Очистку, деминерализацию и концентрирование модифицированного раствора СК проводили на ультрафильтрационной установке Vivaflow 200, используя мембранный модуль 5 кДа HYS.

Деминерализацию проводили 4 раза десятикратным объемом очищенной воды. Контроль за степенью очистки вели спектрофотометрически по оптической плотности ( $D_{235}$ ) при длине волны  $\lambda = 235$  нм, добиваясь ее значения ниже 0,25 в кювете 1 см.

Для исследования связывания СК с окисленным  $\gamma$ -циклодекстрином использовали препарат  $\gamma$ -ЦД со степенью окисления 10,1 %. В таблице 2 приведены исходные соотношения СК и окисленного  $\gamma$ -ЦД в реакционной среде и характеристика полученного продук-

та модифицированной СК. В последнем столбце приведены рассчитанные молекулярные массы модифицированной СК. При максимальном молярном трехсоткратном избытке  $\gamma$ -ЦД в реакционной среде молекулярная масса конъюгата достигает 65 кД, причем на одну макромолекулу СК оказывается присоединенным до 14 остатков  $\gamma$ -ЦД. Объемы удерживания полученных продуктов систематически снижаются при увеличении степени модификации СК, но это снижение не очень сильно выражено.

Получение тройного комплекса СК-ЦД-Ад проводили с модифицированной СК, полученной при десятикратном массовом избытке  $\gamma$ -ЦД (см. табл. 2, строка 1).

Полученную на первом этапе модифицированную СК-ЦД после очистки высушивали лиофильно. Включение Ад в полученный препарат модифицированной СК проводили, растворяя 100 мг препарата СК-ЦД в 10 мл 0,01 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  при pH = 11,05. Затем в полученный раствор внесли 0,2 ммоль (54,3 мг) аденозина. Смесь выдерживали 1 час при температуре  $20 \pm 2$  °С и хроматографировали на колонке с сефадексом G-10. 100 мг препарата СК-ЦД соответствует  $1,53 \cdot 10^{-3}$  ммоль модифицированной СК, причем ЦД в этом препарате содержится 0,02 ммоль. Таким образом избыток Ад по отношению к количеству ЦД в растворе составляет 0,2 ммоль

Таблица 2

Условия химической модификации стрептокиназы окисленным  $\gamma$ -циклодекстрином

№ п/п	Исходное соотношение СК и $\gamma$ -ЦД в реакционной среде СК : ЦД		Объем удерживания ( $V_{мл}$ ), мл	Соотношения в конечном продукте СК : ЦД, моль/моль	Степень модификации ( $\alpha$ ), %	$K_{av}$	Рассчитанная молекулярная масса	
	мг/мг	моль/моль					Мм	lg (Мм)
1	1 : 10	1 : 364	66	1 : 14	44	0,43	65 472	4,82
2	1 : 5	1 : 182	66	1 : 14	44	0,43	65 472	4,82
3	1 : 1	1 : 36	68	1 : 8	25	0,45	57 684	4,76
4	1 : 0,5	1 : 18	68	1 : 6	19	0,49	55 088	4,74
5	1 : 0	1 : 0	69	1 : 0	0	0,49	47 300	4,70

Примечание. СК – стрептокиназа;  $\gamma$ -ЦД – циклодекстрин;  $V_{мл}$  – объем удерживания модифицированной СК.

Ад на 0,02 ммоль ЦД, входящего в структуру СК-ЦД.

Колонка с Сефадексом G-10 диаметром 1,3 см и высотой 15 см содержала 64 мл набухшего геля G-10. Скорость элюции составляла 26,5 мл/час · см<sup>2</sup>. Объем удерживания голубого декстрана составлял 27 мл, тирозина – 60 мл. На колонку с Сефадексом G-10 нанесли 10 мл приготовленного ранее раствора СК-ЦД-Ад в содовом буфере. Собрали высокомолекулярную фракцию, соответствующую объему удерживания голубого декстрана, в объеме 30 мл.

Если предположить, что потери модифицированной СК при хроматографии на колонке с Сефадексом G-10 отсутствовали, то ее концентрация составила в собранной фракции 0,51 · 10<sup>-4</sup> ммоль/мл.

Спектр поглощения СК в указанной концентрации показан на рисунке 2 (1). Спектр γ-ЦД приведен на рисунке 2 (2). На рисунке 2 (3) приведен спектр Ад. Видно, что в зоне максимума поглощения Ад при длине волны λ=259 нм СК и полиглокин практически не вносят заметный вклад в оптическую плотность.

Таким образом, замерив оптическую плотность раствора модифицированной СК и Ад можно при длине волны λ=259 нм определить концентрацию Ад в растворе высокомолекулярной фракции, то есть рассчитать количественно Ад, включенного в модифицированную СК. Предварительно определив оптическую плотность контрольного раствора Ад, расчетным путем нашли, что соотношение Ад и СК-ЦД в полученном растворе соответствует одному молю Ад, включенному в один моль ЦД (см. табл. 3).

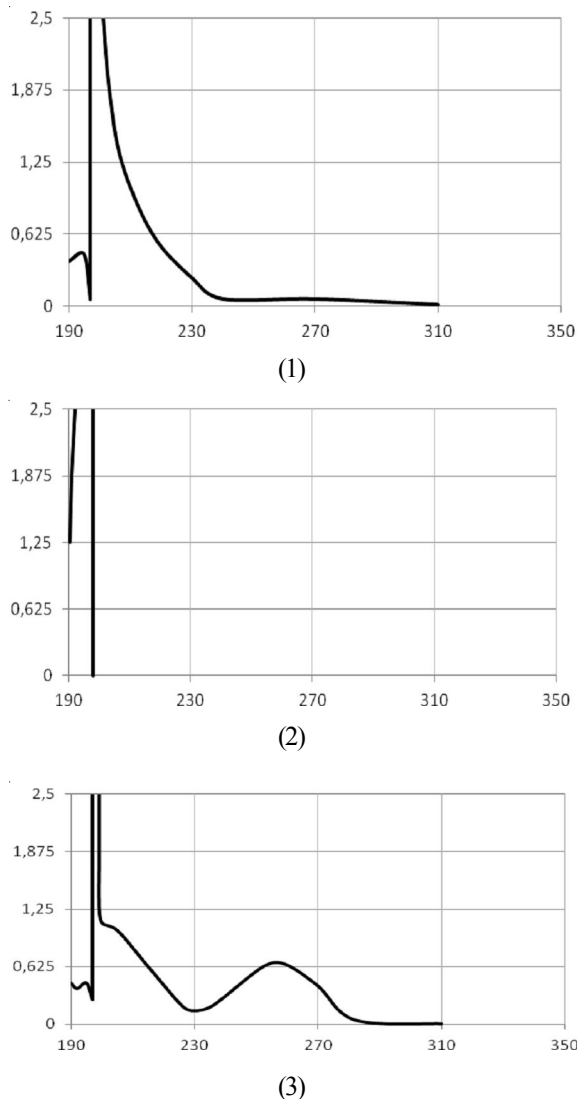


Рис. 2. Спектральные характеристики модифицированной стрептокиназы (1), γ-ЦД (2) и аденозина (3)

Таблица 3

**Характеристика модельной смеси модифицированной СК в присутствии Ад в соотношении СК-ЦД 0,003 ммоль/л : Ад 0,044 ммоль/л (1:14)**

Название вещества	Концентрация вещества С, ммоль/л	Оптическая плотность D *	Оптическая плотность D **
Стрептокиназа	0,003	0,050	0,050
Аденозин	0,044	0,695	0,695
Стрептокиназа + аденозин	0,003 : 0,044	0,735	0,685
γ-ЦД	0,044 ***	0	0

Примечание. D\* – оптическая плотность при λ=259 нм; D\*\* – оптическая плотность с учетом плотности стрептокиназы при λ=259 нм; \*\*\* – концентрация γ-ЦД (рассчитано из молекулярной массы 1 звена).

В заключение можно отметить, что циклодекстрин, связанный с белком стрептокиназой в результате взаимодействия окисленных глюкопиранозных звеньев с аминогруппами белка, сохраняет способность поглощать малые молекулы в свою внутреннюю полость.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. А. с. 1371004 СССР. Способ получения иммобилизованной стрептокиназы / Москвичев Б. В., Таратина Т. М., Иванова Г. П. [и др.] (СССР).
2. Москвичев, Б. В. Иммобилизованные ферменты в медицине и медицинской промышленности / Б. В. Москвичев, М. С. Поляк. – М. : Медбиоэкономика, 1983. – С. 51–71.
3. Пат. 1622986 Российская Федерация, Способ получения препарата Терридеказа, обладающего протеолитической активностью для парентерального введения / Москвичев Б. В., Иванова Г. П., Таратина Т. М., Безъязычная Т. С., Гринберг Г. Е.; заявитель и патентообладатель ВНИТИ Антибиотиков и ферментов медицинского назначения. – Приоритет – прекратил действие 24.12.1994; опублик. 1997, Бюл. № 11.
4. Conformational properties of streptokinase-differential scanning calorimetric investigations / K. Welfle et al. // *International Journal Biological – Macromolecules* 14. – 1992. – P. 19–22.
5. Munoz, A. Arch. Intern. Physiol. Cardiovascular Pharmacotherapy International Symposium / A. Munoz et al. // *Int. Symp.* – 1985. – № 45 – P. 37–39.
6. Yoshinori, M. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods / M. Yoshinori, H. K. Wong, B. Jiang // *Food Research International*. – 2005. – Vol. 38. – Iss. 3. – P. 243–250.

### **REFERENCES**

1. Moskvicev B.V., Taratina T.M., Ivanova G.P., etc. (USSR). *Sposob polucheniya immobilizovannoy streptokinazy* [The Way of Manufacturing the Immobilized Streptokinase]. A. s. 1371004 USSR.
2. Moskvicev B.V., Polyak M.S. *Immobilizovannye fermenty v meditsine i meditsinskoy promyshlennosti* [The Immobilized Enzymes in Medicine and Medical Industry]. Moscow, Medbioekonomika Publ., 1983, pp. 51-71.
3. Moskvicev B.V., Ivanov G.P., Taratina T.M., etc. *Sposob polucheniya preparata Terridekaza, obladayushchego proteolicheskoy aktivnostyu dlya parenteralnogo vvedeniya* [The Way of Receiving the Terridekaz Substance Possessing the Proteolytic Activity for Parenteral Introduction]. Pat. RF 1622986. 1997, byul. no. 11.
4. Welfle K., e. a. Conformational properties of streptokinase-differential scanning calorimetric investigations. *International Journal Biological – Macromolecules* 14, 1992, pp. 19-22.
5. Munoz A., e. a. Arch. Intern. Physiol. Cardiovascular Pharmacotherapy International Symposium. *Int. Symp.*, 1985, no. 45, pp 37-39.
6. Yoshinori M. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. *Food Research International*, 2005, vol. 38, iss. 3, pp. 243-250.

## **MULTIFUNCTIONAL MODIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

**Moskvicheva Yana Borisovna**

Postgraduate Student, Department of Molecular Biotechnology,  
Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University)  
moskvichev.36@mail.ru  
Moskovskiy Prospekt, 26, 190013 Saint Petersburg, Russian Federation

**Petrovskiy Stanislav Viktorovich**

Postgraduate Student, Department of Molecular Biotechnology,  
Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University)  
s.v.petrovsky@spbniivs.ru  
Moskovskiy Prospekt, 26, 190013 Saint Petersburg, Russian Federation

**Ginak Anatoliy Iosifovich**

Doctor of Chemical Sciences, Professor,  
Head of the Department of Molecular Biotechnology,  
Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University)  
mbt@lti-gti.ru  
Moskovskiy Prospect, 26, 190013 Saint Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The article studies the interacting of oxidized cyclic cyclodextrin dextrans (CD) with the protein - bacterial streptokinase. The oxidation was carried out with potassium periodate; free aldehyde groups were formed in CD molecule during this process. Excess of potassium periodate was removed on a column using ion – exchange resin (anionite APA with acetate ion). Reaction between streptokinase and oxidized cyclic dextran was monitored by gel-permation chromatography (sephadex G-200). The mass of complex of streptokinase with exciding cyclodextrin goes up to 65 kDa (the ratio by moles is 1-3). One streptokinase macromolecule is bound to 14 molecules of CD. It was shown that the chemical reaction between streptokinase and cyclodextrin proceeded in a way which is similar to its reaction with oxidized linear dextrans.

It was found that protein-bound CD retained the ability to absorb small molecules like adenosine in its inner shell. The complex of streptokinase with CD absorbs the molecule of adenosine and forms a new complex with adenosine intercalated in cyclodextrin part of the new complex.

**Key words:** cyclodextrin, streptokinase, adenosine, chemical modification, gel-chromatography, oxidation of oligosaccharides, complex.