



УДК 578.245.4

НАНОКОМПЛЕКСЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ С ПОЛИСИАЛОВОЙ КИСЛОТОЙ. ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2009 г. В. В. Безуглов[#], Н. М. Грецкая, Д. В. Клинов, М. Ю. Бобров, Е. Д. Шибанова, М. Г. Акимов, Е. В. Фомина-Агеева, Г. Н. Зинченко, Д. И. Баирамашвили, А. И. Мирошников

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 13.10.2008 г. Принята к печати 27.10.2008 г.

Впервые описано получение наноконплексов рекомбинантных белков (интерферонов $\alpha 2b$ и $\beta 1b$, инсулина и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека) с природной полисиаловой кислотой (PSA). Включение белка в состав комплекса незначительно меняет его электрофоретическую подвижность. С помощью атомно-силовой микроскопии показано, что средний размер комплексов инсулина с PSA 23 кДа составляет 10–20 нм и более 60% молекул гликополимера несет по одной молекуле белка. Опытами на клеточных культурах подтверждено сохранение исходной способности цитокинов влиять на клеточную пролиферацию после образования комплекса с PSA. В опытах *in vivo* продemonстрировано пролонгирование гипогликемического действия инсулина в составе наноконплекса с PSA.

Ключевые слова: инсулин рекомбинантный человеческий, интерфероны, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, полисиаловая кислота, наноконплексы.

ВВЕДЕНИЕ

Модификация рекомбинантных белков путем ковалентного присоединения полимерных молекул в настоящее время является весьма распространенным способом повышения их стабильности и длительности терапевтического действия. Наибольшую известность получил метод модификации генно-инженерных белков с помощью присоединения к ним молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ), так называемое “ПЭГелирование”. Были разработаны различные химические стратегии ПЭГелирования, включающие алкилирование или ацилирование аминогрупп, а также реакции по тиольным группам белков. На фармацевтическом рынке появились лекарственные препараты ПЭГелированных ферментов и цитокинов: аспарагиназы (Онкаспар) и аденозиндеаминазы (Адаген), альфа-интерфероны (Пегасис и ПЭГ-Интрон) [1]. Это всего несколько примеров из непрерывно увеличивающегося числа новых ПЭГелированных белков. Однако, несмотря на признание за ПЭГелированием несомненного успеха в продлении фармакологического эффекта белков и полипептидов, сомнения в полной безвредности таких препаратов продолжают оставаться.

Главный недостаток ПЭГ – его практически полная неспособность к биодеградации, что может приводить к накоплению полимера в печени и других органах и тканях. Это заставляет искать альтернативные способы повышения стабильности рекомбинантных белков.

Один из таких способов – использование природных биодеградируемых полимеров вместо синтетических. В последнее время для ковалентной модификации рекомбинантных белков наряду с ПЭГ стали применять полисиаловую кислоту [2]. PSA – природный гомогликополимер, состоящий из повторяющихся звеньев *N*-ацетилнейраминовой кислоты, соединенных связью ($\alpha 2 \rightarrow 8$). Она входит в состав молекул адгезии нервных клеток млекопитающих [3] и является компонентом клеточной стенки некоторых бактерий [4]. PSA не обладает иммуногенностью, узнается сиалидазами организма, расщепляющими ее до остатков нейраминовой кислоты, и не накапливается в организме. Несомненно, ковалентно присоединенная PSA может до некоторой степени моделировать у рекомбинантных белков гликозидные остатки природных молекул, сохраняя присущую им специфическую биологическую активность [2, 5–7]. Но при этом, как и любая ковалентная модификация, конъюгация с PSA изменяет свойства белка и особенно спектр продуктов его метаболизма. Поэтому нельзя исключать у получающих полисиалированные белки пациентов возникновения иммунных реакций на

Сокращения: G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека; IFN $\alpha 2b$ – интерферон $\alpha 2b$; IFN $\beta 1b$ – интерферон $\beta 1b$; ВОПГ – высокоориентированный пиролитический графит; PSA – полисиаловая кислота; ПЭГ – полиэтиленгликоль.

[#] Автор для связи (тел.: (495) 330-65-92; эл. почта: vvbez@oxy-lipin.ibch.ru).

гидролитические пептидные фрагменты, содержащие остатки *N*-ацетилнейраминаовой кислоты.

Мы предположили, что PSA, несущая на каждом звене свободную карбоксильную группу, может выступать акцептором положительно заряженных аминогрупп белков. Кроме того, поскольку PSA способна образовывать протяженные спиральные участки, узнаваемые антителами к PSA [8], можно предполагать дополнительные спираль-спиральные взаимодействия между молекулами белка и PSA, удерживающие их в составе единого комплекса. В настоящем сообщении мы описываем получение и некоторые характеристики комплексов PSA с инсулином, IFN α 2b, IFN β 1b и G-CSF.

Комплекс PSA с белками получают смешиванием растворов всех компонентов при определенном значении pH, обычно ниже 6.0, перемешиванием в течение некоторого времени с последующим доведением pH до определенных для данной лекарственной формы значений, обычно 7.4. Полисиаловую кислоту перед введением в состав комплекса активируют подкислением ее водного раствора с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-25 для отделения от низкомолекулярных олигомеров и солей. Комплексы полисиаловой кислоты и белка могут храниться как в растворе, так и в виде лиофильно высушенного препарата без потери биологической активности белка. Полисиаловая кислота и белок в составе комплекса связаны нековалентно. Они могут быть легко отделены друг от друга хроматографически на обращенной фазе. В условиях гельпроникающей хроматографии белок и PSA элюируются в составе комплекса и разделяются только в присутствии денатурирующих концентраций мочевины или гуанидиний хлорида. Соотношение белок–полисиаловая кислота в сформированном комплексе определяют фотометрически по специфическим реакциям на белок и сиаловую кислоту (см. “Эксперимент. часть”).

Образование комплекса PSA–белок зарегистрировано с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в неденатурирующих невосстанавливающих условиях. Подвижность комплекса, регистрируемая по белку, в сравнении с исходным белком определена, хоть и незначительно, изменяется. Это можно проиллюстрировать на примере комплексов G-CSF (*M* 19.6 кДа) с PSA (*M* 22 кДа), полученных при различном соотношении белок–PSA (рис. 1). Можно заметить, что с увеличением количества PSA в составе комплекса электрофоретическая подвижность белка уменьшается.

Исследование вторичной структуры белка в составе комплекса методом КД затруднено вкладом PSA в спектр комплекса. Мы показали, что кривые КД белка в составе комплекса, полученные после вычитания сигнала PSA, лишь незначительно отличаются от спектра нативного белка (данные не приведены), однако для интерпретации этих различий

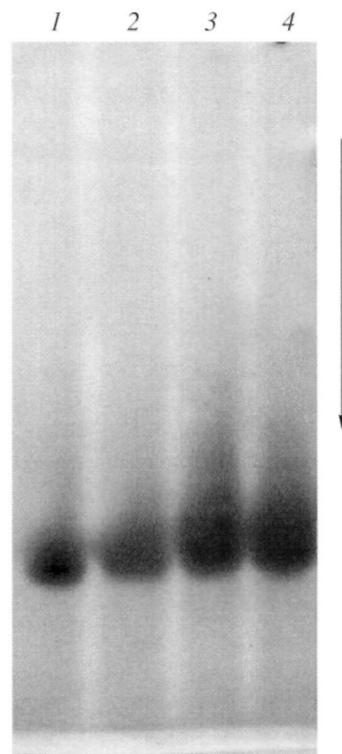


Рис. 1. Электрофореграммы комплексов PSA–G-CSF, полученных при двух- (2), трех- (3) и четырехкратном (4) мольном избытке PSA (22 кДа). 8% полиакриламидный гель, неденатурирующие условия, pH 8.8. 1 – стандарт G-CSF. Стрелкой указано направление электрофореза.

как конформационных изменений молекулы белка необходимы более детальные исследования.

Образование белок-гликополимерных комплексов можно зафиксировать с помощью атомно-силового микроскопа. Недавно Клиновым и соавт. были разработаны методические подходы, позволяющие получать АСМ-изображения высокого разрешения на молекулярном уровне. Данные подходы основаны на использовании амфифильных подложек, в частности, поверхности модифицированного высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ). Было показано, что при адсорбции на поверхность модифицированного ВОПГ биомолекулы и супрамолекулярные комплексы сохраняют свою структуру [9–11]. Другим ключевым фактором, необходимым для получения высокого разрешения на молекулярном уровне, является использование сверхострых АСМ-зондов с радиусом кривизны острия около 1 нм [12].

Метод АСМ дает информацию о микрорельефе поверхности и позволяет измерить не только длину, но и высоту наблюдаемых объектов. На рис. 2 представлены типичные АСМ-изображения комплексов инсулина с PSA (*M* 23 кДа). Измеряемая в АСМ высота молекул PSA, которые выглядят на изображениях хорошо расправленными, составляет

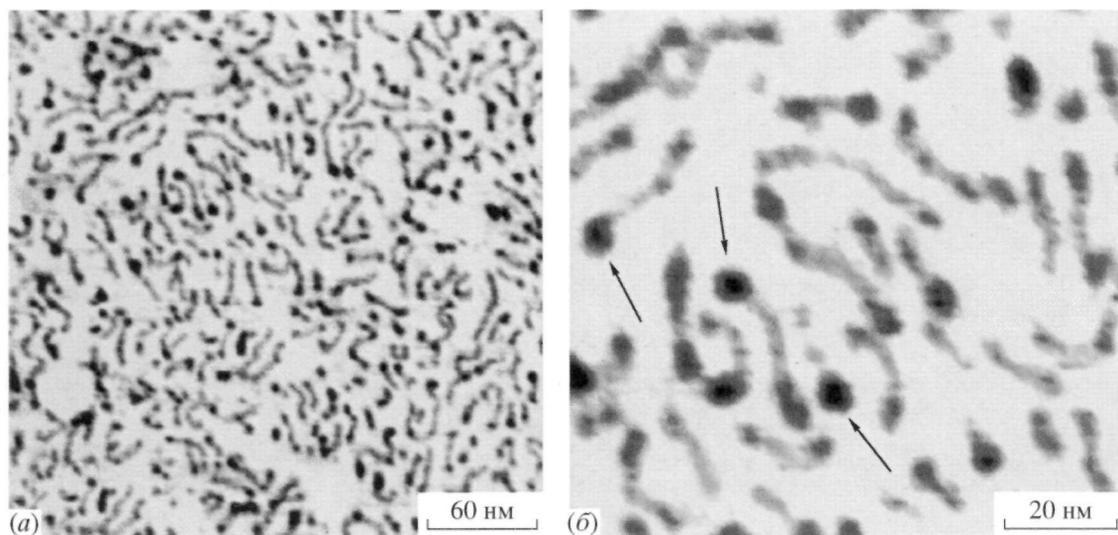


Рис. 2. ACM-изображение комплексов инсулина – PSA M 23 кДа (1 : 1). Масштаб: 60 (а), 20 нм (б), стрелкой указаны молекулы инсулина.

0.3–0.5 нм, средняя длина молекул – около 10–20 нм, что соответствует молекулярной массе 23 кДа, с учетом сокращения длины молекулы PSA за счет образования спиральных участков и изгибов. Высота молекул инсулина, измеряемая при помощи ACM, соответствует 0.7–1 нм, что существенно больше высоты молекул PSA (см. рис. 2б). При концентрации комплексов 0.1 мкг/мл, около 60% молекул PSA несет по одной молекуле инсулина, причем последние распределены неравномерно по всей длине молекулы PSA и связаны преимущественно с одним из концов ее молекулы. Это свидетельствует о специфичности взаимодействия между PSA и инсулином, причина которой в настоящее время изучается. Таким образом, при помощи ACM впервые визуализированы нековалентные комплексы инсулина с PSA и показано, что взаимодействие молекул при

образовании комплекса носит специфичный характер.

Сохранение биологической активности конкретного белка в комплексе с PSA следует из данных экспериментов на культурах клеток, чувствительных к данному белку. Природные цитокины, к которым относятся интерфероны и G-CSF, оказывают регулирующее действие на пролиферацию клеток. Для тестирования комплексов интерферонов с PSA использовали клетки линии Дауди, являющиеся стандартной моделью изучения антипролиферативного эффекта препаратов группы интерферонов [13].

Активность препаратов интерферонов определяли по количеству жизнеспособных клеток после 72-часовой инкубации с испытуемыми веществами (рис. 3, 4). В качестве препаратов сравнения исполь-

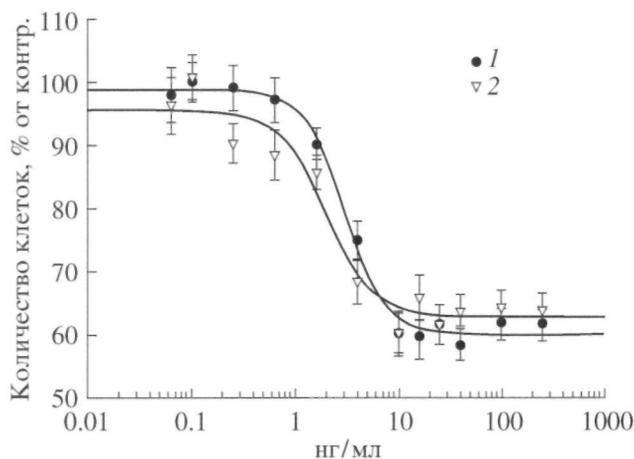


Рис. 3. Влияние комплекса PSA–IFN α 2b (2 : 1; PSA, M 22 кДа) (1) и стандартного образца IFN α 2b (2) на пролиферацию клеток линии Дауди. На оси абсцисс – концентрация в расчете на белок.

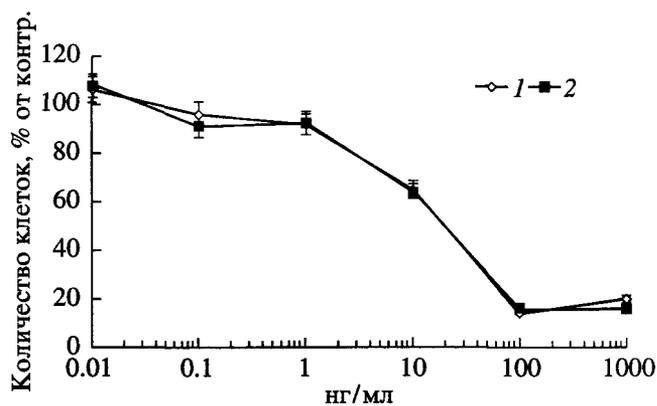


Рис. 4. Влияние комплекса PSA–IFNβ1b (2 : 1; PSA, M 22 кДа) (1) и стандартного образца IFNβ1b (2) на пролиферацию клеток линии Дауди.

зовали немодифицированные IFNα2b и IFNβ1b с такой же концентрацией, как белок в составе комплекса. Видно, что во всем диапазоне концентраций – от не оказывающих влияния на клетки до токсических – комплексы IFNα2b и IFNβ1b с PSA проявляют такую же активность, как и немодифицированные белки, а наблюдаемые различия статистически недостоверны.

Для определения биологического действия G-CSF в составе комплекса с PSA использовали предложенную для рекомбинантных G-CSF модель клеток промиелоцитарной лейкемии человека HL-60, дифференцированных в нейтрофилоподобные клетки действием DMSO [14]. Поскольку G-CSF способен увеличивать число нейтрофилов при введении в организм, в данной модели его прибавление к культуре обработанных DMSO клеток вызывает их пролиферацию (рис. 5). Как и в случае интерферонов, активность комплекса PSA–G-CSF не отличалась от активности нативного белка. Таким образом, комплексообразование белков с PSA в предложенных условиях не снижает их специфической биологической активности, в отличие от белков, содержащих ковалентно присоединенную PSA, для которых отмечено снижение активности [2].

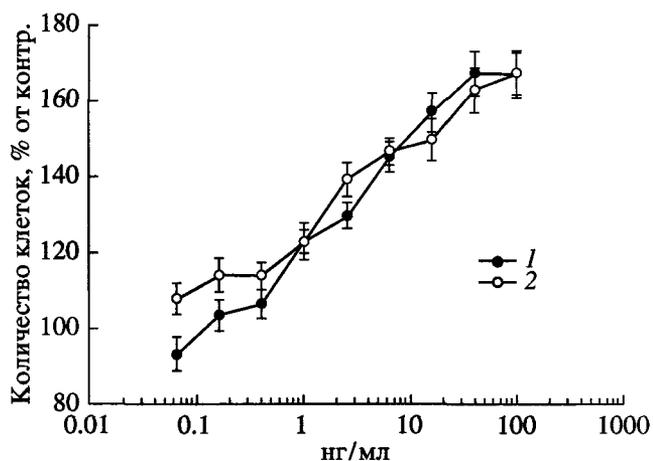


Рис. 5. Влияние комплекса PSA–G-CSF (2 : 1; PSA, M 22 кДа) (1) и стандартного образца G-CSF (2) на пролиферацию клеток HL-60, дифференцированных в нейтрофилоподобные клетки действием DMSO.

лентно присоединенную PSA, для которых отмечено снижение активности [2].

Важным с практической точки зрения свойством полученных нами комплексов является пролонгирование фармакологического действия входящих в их состав рекомбинантных белков, что подтверждается данными биологических испытаний *in vivo*. Наиболее удачным для проверки данного эффекта является гипогликемический тест, который позволяет оценить длительность действия препарата на животных. Уровень глюкозы в крови экспериментальных животных остается пониженным, пока введенный препарат инсулина сохраняет свою активность. Активность комплекса сравнивали с эквивалентной дозой (по белку) стандартного образца инсулина.

Опыты на кроликах показали (таблица), что после однократного введения уровень глюкозы остается пониженным в группе животных, получивших инсулин, в течение не более 3 ч, тогда как у животных, получивших инъекцию комплекса инсулин–PSA (15 кДа), даже через 6 ч уровень глюкозы в крови оставался пониженным. Аналогичные ре-

Гипогликемическое действие комплекса инсулин–PSA (M 15 кДа) в опытах на кроликах

Образец*	Уровень глюкозы (% к исходному) через промежуток времени, ч			
	1.5	3	4.5	6
Стандартный образец инсулина	73.7 ± 0.8	94.8 ± 0.5	100.2 ± 12.7	109.7 ± 25.8
Комплекс инсулин–PSA (1 : 1, моль/моль)	59.2 ± 24.2	72.3 ± 27.7	86.1 ± 32	85.1 ± 13.1

* 40 МЕ/мл, 0.5 МЕ/кг.

зультаты были получены в опытах на мышах. В этих экспериментах действие инсулина практически прекращалось через 120 мин после введения препарата, а комплекс был активен до конца эксперимента (180 мин). Эти результаты определенно свидетельствуют о пролонгации фармакологического действия белка в составе комплекса с PSA.

Таким образом, нами впервые описано получение наноконплексов рекомбинантных белков с полисиаловой кислотой различной молекулярной массы. Эти комплексы сохраняют присущую белку специфическую биологическую активность и обладают пролонгированным фармакологическим эффектом по сравнению с немодифицированным белком.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантные белки: инсулин человека, IFN α 2b, IFN β 1b и G-CSF – производство ИБХ РАН. PSA *M* 15 и 23 кДа – FDS Pharma (Великобритания), PSA *M* 22 кДа – Sigma (США). Колонки PD-10 с сефадексом G-25 производства фирмы “GE Healthcare” (Великобритания). МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид), фосфатно-солевой буфер – фирмы “Панэко” (Россия), культуральная среда ARPMI 1640 – Invitrogen (США). Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jasko J-810 при комнатной температуре в районе 190–250 нм с шагом 0.2 нм. Оптическое поглощение измеряли на планшетном фотометре Эфос 9305 (ОАО МЗ “Сапфир”, Россия).

Активация полисиаловой кислоты. К раствору 110 мг полисиаловой кислоты (*M* 22 кДа) в 1.72 мл воды (рН 7.0) прибавляли при комнатной температуре (23°C) 70 мкл 0.5 М HCl до рН 4.5. Полученный раствор наносили на предварительно промытую водой колонку PD-10 и элюировали водой, с контролем элюата при 240 нм. Фракции, соответствующие фронту, вершине и 2/3 хвостовой части первого пика, собирали и лиофилизировали. Получено 86 мг белого порошка. Хранили при температуре ниже –18°C. Аналогично проводили активацию PSA *M* 15 и 23 кДа.

Комплекс полисиаловой кислоты с инсулином. При перемешивании растворяли 250 мг активированной полисиаловой кислоты (*M* 15 кДа) в 5 мл воды. При необходимости раствор дотитровывали 0.5 М HCl до значения рН 4.5. К полученному прозрачному раствору прибавляли при постоянном перемешивании порциями раствор 96 мг инсулина (*M* 5.8 кДа) в 4 мл воды (рН 2.0). Немедленно образуется объемный белый осадок. Перемешивали при комнатной температуре (23°C) 30 мин и доводили рН раствора до значения 6.75–7.0. Полученный прозрачный раствор стерильно фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и лиофилизировали. Получили 300 мг белого кристаллического ве-

щества. В навеске полученного комплекса определяли содержание белка и полисиаловой кислоты, используя бицинхониновый [15] и резорциновый [16] методы соответственно, и вычисляли мольное соотношение PSA–белок. Для данного образца оно составило 1.02 : 1. Аналогично приготавливали комплекс инсулин–PSA *M* 23 кДа с мольным соотношением PSA–белок 1 : 1.

Комплекс полисиаловой кислоты с цитокинами на примере IFN β 1b. К раствору (2 мл) IFN β 1b в 10 mM фосфатном буфере (рН 7.3), содержащем 2% маннита, с концентрацией 0.89 мг белка/мл при перемешивании при комнатной температуре (20°C) прибавляли одной порцией 0.1 мл раствора активированной PSA (*M* 22 кДа) с концентрацией 27 мг/мл (рН 4.6). Перемешивали смесь при этой температуре 35 мин. Затем доводили рН полученного раствора до значения 7.2 0.1 М NaOH. Полученный раствор стерильно фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Определали мольное соотношение PSA–белок как указано выше. Для данного образца оно составило 2 : 1.

По аналогичной процедуре приготавливали растворы комплексов других цитокинов с PSA (*M* 22 кДа), используя растворы IFN α 2b (фосфатно-солевой буфер, рН 7.3, 1.8 мг белка/мл) и G-CSF (натрий-ацетатный буфер, рН 5.0, 4.5 мг белка/мл). Мольное соотношение PSA–белок для комплекса PSA–IFN α 2b составило 2 : 1, для комплекса PSA–G-CSF – 2 : 1, 3 : 1 или 4 : 1. Полученные комплексы анализировали на наличие олигомерных форм с помощью электрофореза в неденатурирующих невосстанавливающих условиях (8% полиакриламидный гель, рН 8.8) (см. для примера рис. 1).

АСМ-микроскопия наноконплексов. На поверхность свежесколотого высокоориентированного пиролитического графита наносили 40 мкл раствора-модификатора графита GM фирмы “Нанотюнинг” (Россия). После 10 мин инкубации каплю сдували сжатым аргоном, согласно разработанной ранее методике [10–12]. На подготовленную таким образом поверхность ВОПГ наносили каплю водного раствора комплекса инсулин–PSA (*M* 23 кДа) с концентрацией 0.1 мкг/мл, полученного последовательным разведением водного раствора комплекса с концентрацией 1 мг/мл, приготовленного из сухого вещества непосредственно перед экспериментом. После инкубации в течение 5 мин каплю сдували сжатым аргоном. Для визуализации комплексов инсулин–PSA использовали прибор Solver P-47 bio фирмы “НТ-МДТ” (Россия), АСМ-изображения получены в прерывисто-контактном режиме (“tapping mode”) с использованием сверхострых кантилелевров высокого разрешения производства “Нанотюнинг” (Черноголовка, Россия, <http://www.nanotuning.com/>). АСМ-изображения получены в условиях воздушного окружения при неконтролируемой влажности окружающего воздуха. Скорость скани-

рования 0.5–1 Гц, амплитуда свободных колебаний 2–4 нм.

Антипролиферативное действие препаратов интерферонов. Аликвоты растворов комплексов $IFN\alpha 2b$ -PSA и $IFN\beta 1b$ -PSA с соотношением белок-гликополимер 1 : 2 (моль/моль) в фосфатно-солевом буфере и препаратов сравнения в фосфатно-солевом буфере с эквивалентной концентрацией по белку вносили в лунки 96-луночного планшета, содержащие 100 мкл (5×10^4) клеток Дауди в культуральной среде ARPMI 1640 с таким расчетом, чтобы конечная концентрация белка составила от 0.064 до 250 нг на 1 мл среды. Клетки инкубировали с веществами при 37°C и 5% CO в течение 72 ч. Затем в каждую лунку прибавляли по 10 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в фосфатно-солевом буфере) и инкубировали планшет при 37°C и 5% CO₂ не менее 2 ч. Далее в каждую лунку прибавляли 100 мкл лизирующего буфера, содержащего в 50 мл смеси 25 мл DMF и 25 мл раствора 10 г додецилсульфата натрия в 50 мМ ацетатном буфере, pH 4.7. Измеряли оптическое поглощение в лунках с помощью планшетного фотометра при двух длинах волн 570 и 620 нм. Относительное количество жизнеспособных клеток вычисляли по формуле:

$$100 \times (A_{570} - A_{620})_o / (A_{570} - A_{620})_k,$$

где $(A_{570} - A_{620})_o$ и $(A_{570} - A_{620})_k$ – значения оптического поглощения в лунках с образцами и в лунках без образцов.

Опыты повторяли 3–5 раз.

Проллиферативную активность препаратов G-CSF определяли аналогично испытаниям препаратов интерферонов с тем отличием, что вместо клеток линии Дауди использовали клетки линии промиелоцитарной лейкемии человека HL-60, дифференцированные в нейтрофилоподобные клетки добавлением 1.25% DMSO в культуральную среду [14]. В качестве препарата сравнения использовали раствор чистого G-CSF в натрий-ацетатном буфере (pH 5.0) с концентрацией 4.5 мг белка/мл.

Испытание биологической активности комплекса инсулин-PSA (15 кДа) проводили на кроликах одного пола массой 2.5–3.5 кг, содержащихся на стандартном рационе вивария. Животных способом случайного отбора распределяли на две равные группы по три особи. Одной группе подкожно вводили раствор комплекса с концентрацией 40 МЕ*/мл из расчета 0.5 МЕ/кг веса животного, другой группе – такую же дозу раствора стандартного образца инсулина с концентрацией 40 МЕ/мл. Отбирали кровь из ушной вены непосредственно перед инъекцией и через 1.5, 3.0, 4.5 и 6.0 ч после нее. Определение содержания глюкозы в сыворотке крови проводили глюкозооксидазным методом с использованием на-

бора Glucose (Human, Германия) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

Авторы выражают благодарность А.Г. Габитову, Р.С. Есипову (все – ИБХ РАН, Москва) и В.П. Романову (Филиал ИБХ РАН, Пушкино Московская обл.) за предоставление образцов генно-инженерных белков, Д.Д. Генкину за предоставление образцов PSA 15 и 23 кДа, а также И.А. Куделиной (ИБХ РАН) за помощь в получении спектров КД и М. Красильщиковой (ИБХ РАН) за содействие в проведении экспериментов на животных. Работа частично поддержана ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Veronese F.M., Pasut G. // Drug Discovery Today. 2005. V. 10. P. 1451–1458.
2. Gregoriadis G., McCormack B., Wang Z., Lifely R. // FEBS Lett. 1993. V. 315. P. 271–276.
3. Gascon E., Vutskits L., Kiss J.Z. // Curr. Org. Chem. 2007. V. 11. P. 627–635.
4. Rohr T.E., Troy F.A. // J. Biol. Chem. 1980. V. 250. P. 2332–2342.
5. Jain S., Hreczuk-Hirsta D.H., McCormack B., Mital M., Epenetos A., Laing P., Gregoriadis G. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1622. P. 42–49.
6. Fernandes A.I., Gregoriadis G. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1341. P. 26–34.
7. Bezuglov V.V., Gretskeya N.M., Bobrov M.Yu., Aki-mov M.G., Fomina-Ageeva E.V., Zinchenko G.N., Bair-amashvili D.I., Miroshnikov A.I. // Russ. J. Bioorgan. Chemistry. 2009. V. 35. P. (Безуглов В.В., Грецакая Н.М., Бобров М.Ю., Акимов М.Г., Фомина-Агеева Е.В., Зинченко Г.Н., Баирамашвили Д.И., Мирошников А.И. // Биоорг. химия. 2009. Т. 35. С. 274–278).
8. Möhlenhoff M., Eckhardt M., Gerardy-Schahn R. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1998. V. 8. P. 558–564.
9. Klinov D., Dwir B., Kapon E., Borovok N., Molotsky T., Kotlyar A. // Nanotechnology. 2007. V. 18. P. 225102–225108.
10. Adamcik J., Klinov D.V., Witz G., Sekatskii S.K., Dietler G. // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 5671–5675.
11. Ovodova R.G., Popov S.V., Bushneva O.A., Golovchenko V.V., Chizhov A.O., Klinov D.V., Ovodov Yu.S. // Biochemistry (Moscow). 2006. V. 71. P. 538–542.
12. Klinov D., Magonov S. // Appl. Phys. Lett. 2004. V. 84. P. 2697–2699.
13. Ramon J., Saez V., Baez R., Aldana R., Hardy E. // Pharm. Res. 2005. V. 22. P. 1374–1386.
14. Yamaguchi T., Kogi M., Yamamoto Y., Hayakawa T. // Biol. Pharm. Bull. 1997. № 9. P. 943–947.
15. Stoscheck C.M. // Methods in Enzymol. 1990. V. 182. P. 50–69.
16. Svennerholm L. // Methods in Enzymol. 1963. V. 6. P. 459–462.

* Одна международная единица (1 МЕ) соответствует 0.0347 мг чистого кристаллического препарата инсулина человека.

Nanocomplexes of Recombinant Proteins and Polysialic Acid: Preparation, Characteristics, and Biological Activity

V. V. Bezuglov[#], N. M. Gretskaya, D. V. Klinov, M. Yu. Bobrov, E. D. Shibanova, M. G. Akimov, E. V. Fomina-Ageeva, G. N. Zinchenko, D. I. Bairamashvili, and A. I. Miroshnikov

[#]Phone: +7 (495) 330-65-92; e-mail: vvbez@oxylipin.ibch.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, V-437, Moscow, 117997 Russia.*

A preparation of nanocomplexes containing recombinant proteins (interferons a2b and blb, insulin, and human granulocyte colony stimulating factor) and natural polysialic acid (PSA) has been described. The incorporation of protein into the complex changes its electrophoretic mobility. Atomic force microscopy reveals the average size of 23-kD insulin complexes with PSA of 10–20 nm and demonstrates that more than 60% of glycopolymer molecules carry a single protein molecule. Experiments with cultured cells show that cytokines bound to polysialic acid retain their ability to regulate cell proliferation. Insulin bound to PSA has a prolonged hypoglycemic effect *in vivo*.

Key words: recombinant human insulin, interferons, granulocyte colony stimulating factor, polysialic acid, nanocomplexes.