



УДК 577.156.3.02+547.962.04

**НОВЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ КОНЪЮГАТОВ БЕЛКОВ
С АНТИТЕЛАМИ НА ОСНОВЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИМЕРОВ***Сахаров П. Ю., Ларионова Н. Н., Митюшина Г. В.,
Гаврилова Е. М., Казанская И. Ф., Березин П. В.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Иммобилизация биологически активных веществ белковой природы открывает пути создания систем, обеспечивающих транспорт лекарственных средств от места введения до места действия. Обзор основных принципов и теоретических подходов к созданию систем направленного транспорта описан в работе [1]. Для этих целей можно с успехом использовать высокоспецифическое взаимодействие антиген — антитело. В этом случае антитело выступает в роли носителя иммобилизованного на нем лекарственного начала к антигену органа-мишени. Первые попытки осуществления направленного транспорта лекарственных препаратов с помощью антител были проведены на примере цитотоксических веществ [2].

Предлагаемый нами способ заключается в соиммобилизации белков и антител на водорастворимых полимерных матрицах. Такой метод позволяет легко и быстро синтезировать конъюгаты белков с антителами с произвольным соотношением исходных компонентов, а также предотвращает образование гомополимеров молекул белков и иммуноглобулинов, что невозможно при использовании низкомолекулярных сшивающих агентов [3]. В дополнение к этому белковые препараты, ковалентно связанные с растворимыми полимерами, часто обладают повышенной стабильностью, а их иммуногенные свойства гораздо менее выражены, чем у нативных.

В данной работе описана соиммобилизация ценного терапевтического агента [5], основного панкреатического ингибитора трипсина (Кунитца) (I) и антител на СМ-декстрани, предварительно активированном водорастворимым карбодимидом. В качестве модельной системы взаимодействия антиген — антитело была выбрана IgG-фракция сыворотки кролика против иммуноглобулина человека (выбор системы обусловлен коммерческой доступностью препарата).

В результате соиммобилизации были получены комплексы, содержащие 465 мг белка на 1 г препарата, при этом 88,5% белка по весу приходится на долю IgG, а 11,5% составляет ингибитор. При проведении сравнительного изучения соиммобилизованных и нативных форм ингибитора и антител было обнаружено, что в процессе химической модификации сохраняется 16% специфической активности IgG кролика, в то время как молекулы ингибитора полностью остаются активными. Приведенные данные показывают, что в полученном комплексе молярное соотношение активных молекул IgG — I = 1 : 20. Следует особо подчеркнуть, что иммуно-

логическая активность определялась по реакции с антигеном, иммобилизованным на твердом носителе [6], что, по-видимому, можно считать моделированием взаимодействия антител с мембраносвязанными антигенами. Влияние модификации на структуру и функцию молекулы ингибитора, связанного с полисахаридом, отражает величина константы ингибирования трипсина — K_i . Константа ингибирования для препарата соиммобилизованных ингибитора и IgG на CM-декстрани оказалась равной $1 \cdot 10^{-9}$ М, а величина константы ингибирования трипсина нативным ингибитором — $1 \cdot 10^{-10}$ М [7]. Эффективность ингибирования протеиназ модифицированным ингибитором несколько уменьшается, вероятно, за счет стерических затруднений со стороны таких больших молекул, как CM-декстран (M 60 000) и IgG кролика (M 160 000). Однако величина K_i остается малой.

Таким образом, продемонстрирована возможность нового способа получения конъюгатов белков и антител на основе водорастворимых полимеров на примере соиммобилизации ингибитора трипсина и иммуноглобулина кролика на CM-декстрани с сохранением антипротеолитической и иммунологической активности. Можно надеяться, что полученные таким способом полимерные конъюгаты физиологически активных веществ белковой природы со специфическими антителами смогут накапливаться в органах-мишенях, что позволит разрешить многие проблемы современной медицины.

Экспериментальная часть

В работе использованы основной панкреатический ингибитор трипсина — препарат «Гордокс» (Gedeon Richter, Венгрия) и трипсин отечественного производства. Антитела IgG выделяли методом ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 из сыворотки крови кроликов, иммунизированных глобулиновой фракцией человека [8]. Препарат диализовали против 0,1 М NaCl при 4° С.

Соиммобилизацию белкового ингибитора трипсина и IgG проводили на водорастворимом CM-декстрани (H^+ -форма), предварительно активированном 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимидом [9]. Препараты соиммобилизованных ингибитора и IgG отделяли от избыточного количества ингибитора методом гель-хроматографии на колонке с G-100, а от избытка IgG — с помощью аффинной хроматографии на трипсиносефарозе 6В.

Ингибирующую активность полученных препаратов определяли как в работе [7]. Определение специфической активности IgG описано в работе [6]. Содержание белка и полисахарида определяли по методу Лоури [10] и Дюбуа [11] соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ларионова Н. И., Торчилин В. И. (1980) Хим. фарм., № 4, 21—36.
2. Rowland G. F., O'Neil G. J., Davies D. A. L. (1975) Nature, 255, 488—489.
3. Ford D. J., Radin R., Pesce A. J. (1978) Immunochemistry, 15, 237—243.
4. Weston P. D., Devries J. A., Wrigglesworth R. (1980) Biochim. et biophys. acta, 612, 40—49.
5. Haberland G., McConn R. (1979) Fed. Proc., 38, 2760—2767.
6. Schuur A. H. W. M., Van Weemen B. K. (1977) Clin. chim. acta, 81, 1—40.
7. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю. (1979) Биохимия, 44, 350—358.
8. Adinolf M., Rose M. J., Mollinson P. Z., Polley M. J. (1966) J. Exptl Med., 123, 951—969.
9. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю., Березин И. В. (1979) Биохимия, 44, 2033—2038.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
11. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956) Analyt. Chem., 28, 350—355.

Поступило в редакцию
8.X.1980

A NEW TECHNIQUE FOR PREPARATION OF PROTEIN-ANTIBODY CONJUGATES ON THE BASIS OF WATER-SOLUBLE POLYMERS

SAKHAROV I. YU., LARIONOVA N. I., MITYUSHINA G. V.,
GAVRILOVA E. M., KAZANSKAYA N. F., BEREZIN I. V.

Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

A new technique is proposed to obtain protein-antibody preparations co-immobilized on water-soluble polymers. Basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) and rabbit immunoglobulin G isolated from the serum raised against human IgG were covalently bound with water-soluble CM-dextran. The synthesized conjugates contained 465 mg protein per G of the preparation. The molar ratio of active molecules of the rabbit IgG to the protein inhibitor was 1:20. Modification of the inhibitor during the co-immobilization was shown to increase ten-fold the inhibition constant in its reaction with trypsin.