

А. М. Сахаров¹, Ф. П. Сидельковская¹, З. Н. Нысенко¹, Н. А. Кравченко²,
Г. Б. Беркенгейм²

ВОДОРАСТВОРИМЫЙ ПОЛИМЕР НА ОСНОВЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И N-(2,3-ЭПОКСИПРОПИЛ)- α - ПИРРОЛИДОНА

¹ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва;

² Челюстно-лицевой госпиталь для ветеранов войн Комитета здравоохранения г. Москвы

В медицинской практике находят применение синтетические и природные макромолекулярные соединения [1, 2]. Среди них широкую известность получил поливинилпирролидон (ПВП) [1–4], которому присвоено международное название Поливидон [2]. Последний обладает уникальным сочетанием таких ценных свойств, как гидрофильность, отсутствие токсичности, высокая способность образовывать различной структуры комплексы, в том числе с лекарственными веществами и токсинами. В силу этого ПВП служит основой таких высокоэффективных отечественных препаратов дезинтоксикационного действия как Гемодез, Энтеродез, кроме того, он входит в состав лекарственных форм препаратов Циннаризин, Фотрин, Андекалин, Ортофен и др. Существенное ограничение для применения ПВП в медицине накладывает то обстоятельство, что его фракции с молекулярной массой выше 40000–50000, частично откладываясь в некоторых тканях, не выводятся полностью из организма. Для ПВП, как полимера карбоцепного, в организме человека отсутствуют системы, способные обеспечивать биодеградацию его на более мелкие частицы. В указанных нами примерах используется ПВП со средней величиной молекулярной массы 8000–10000. В то же время во многих жизненных ситуациях важно иметь фармакологические средства, обладающие вышеуказанными свойствами, привносимыми наличием фрагментов пирролидона, и имеющие одновременно большую величину молекулярной массы (например, для пролонгации действия лекарств). Наиболее перспективным и целесообразным способом синтеза таких высокомолекулярных соединений является введение указанного гетероцикла в структуру боковых цепей природных макромолекул, способных к ферментативной деградации и участию в процессах метаболизма. До наших работ сведения о подобных полимерах пирролидона в литературе отсутствовали.

В данной статье представлены результаты исследования реакции человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) с производным пирролидона — N-(2,3-эпоксипропил)- α -пирролидоном (ЭПП). Некоторые данные об этом процессе изложены в [5].

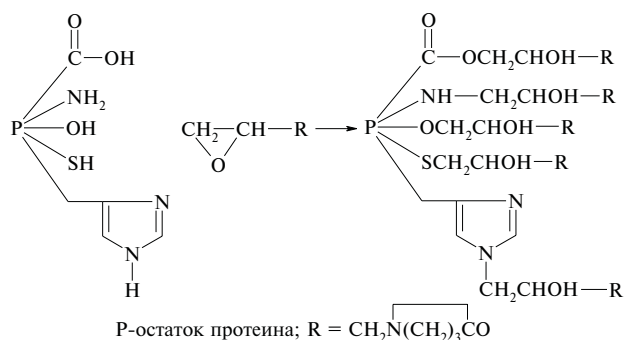
Ранее были описаны реакции ЧСА и некоторых энзимов с окисью этилена, окисью пропилена и др. [6, 7]. Взаимодействие белков с эпоксидами, имеющими при оксирановом цикле азотсодержащие гетероциклы, известно не было.

Реакция ЧСА с ЭПП проводилась в водном растворе в нейтральной, щелочной и кислой средах при ком-

натной температуре. Реакцию альбумина с ЭПП в нейтральной среде выполняли при различных концентрациях эпоксида. Действие ЭПП на белок в присутствии щелочи или кислоты осуществляли, варьируя концентрации последних при постоянном соотношении белок/ЭПП.

Полученные новые модификации ЧСА характеризовали по средневесовой молекулярной массе (Mw), элементному и аминокислотному составу. О степени модификации белка судили по величине Mw и содержанию серы, обусловленному наличием серусодержащих аминокислот. Ход процесса и чистоту продукта контролировали методом ТСХ. После апробирования ряда элюентных систем в качестве оптимальной была выбрана система пиридин – этилацетат – вода – уксусная кислота.

Эпоксидное кольцо ЭПП может реагировать с различными группами белка согласно схеме:



Раскрытие оксиранового кольца ЭПП при действии соединений, содержащих NH- или OH-группы описано в [8, 9].

Экспериментальная химическая часть

ТСХ проведена на пластинах Silufol UV-254 (Чехия) в системе пиридин – этилацетат – вода – уксусная кислота, 3 : 5 : 2 : 1, визуализация пятен осуществлена обработкой хлором, затем смесью *o*-толидин – йодистый калий. ЧСА (фирма Reanal, Венгрия), Mw 73000, S 2,66%. ЭПП синтезирован по методике, описанной в [10]. Mw образцов исходного и модифицированного ЧСА была определена на аналитической ультрацентрифуге (МОМ, Венгрия, модель 3170) по методу Арчибальда при использовании глицинового буфера (буфер Гли), pH 8,53. Аминокислотный состав модифицированных образцов ЧСА в сравнении с исходным определяли на анализаторе аминокислот Биотроник

ЛЦ-4010 после гидролиза 6 н. HCl при 105 °С в течение 48 ч.

Реакцию N-(2,3-эпоксипропил)- α -пирролидона с ЧСА проводят в условиях, аналогичных описанным в [6]. В раствор 1,64 г ЧСА в 100 мл дистиллированной воды при комнатной температуре вносят 4,23 г ЭПП и оставляют стоять на 96 ч. Затем добавляют ацетон (3-кратный объем) при 0 ... -5 °С, оставляют на сутки в холодильнике, выпавший осадок отфильтровывают, растворяют в минимальном количестве воды, повторно осаждают прибавлением ацетона, отфильтровывают, высушивают в вакууме при комнатной температуре. Выход модифицированного ЧСА в расчете на исходный составляет 97 %, содержание S — 1,85 %, Mw — 100000. На ТСХ отсутствуют пятна, отвечающие низкомолекулярным соединениям. Результаты опытов, проведенных в нейтральной, кислой и щелочной средах, суммированы в табл. 1. Данные аминокислотного анализа представлены в табл. 2.

Экспериментальная биологическая часть

Острую токсичность (ЛД₅₀) синтезированной модификации ЧСА, содержащей в боковых цепях фрагменты пирролидона, изучали на белых беспородных мышах обоего пола массой 18–22 г при однократном брюшинном введении. Хроническую токсичность определяли трехкратным подкожным введением препарата также белым беспородным мышам обоего пола массой 18–22 г.

Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 1 и 2, взаимодействие ЭПП с альбумином протекает в водном растворе при комнатной температуре в нейтральной, щелочной и кислой

средах без предварительной активации функциональных групп белка.

При проведении синтеза в нейтральной среде с увеличением концентрации ЭПП степень модификации возрастает. При осуществлении процесса в кислой и щелочной средах четкие закономерности не наблюдались. В целом, на основании данных элементного анализа (по убыванию содержания серы) можно отметить, что с ростом концентрации кислоты или щелочи степень модификации альбумина реакцией с ЭПП увеличивается.

Новые производные альбумина, характеризующиеся наличием в боковых цепях пирролидоновых фрагментов, растворимы в воде в отличие от полученных ранее взаимодействием ЧСА с окисями этилена, пропилена и др. [6]. Молекулярная масса синтезированных в данной работе модифицированных белков не превышает молекулярную массу исходных белков более, чем на 40 %, что указывает на присоединение ограниченного количества ЭПП к функциональным группам белка.

Для продуктов реакции, проведенной в нейтральной и щелочной средах, был выполнен анализ аминокислотного состава. Показано, что в изучаемом процессе участвуют, в основном, лизин (NH₂-группа), серин (ОН-группа), гистидин (NH-группа). Эти данные подтверждают факт химического взаимодействия ЧСА с ЭПП.

Как показали биологические исследования, пирролидонил-содержащая модификация альбумина относится к классу малотоксичных веществ. Найдено, что острая токсичность (ЛД₅₀) не превышает 4 г/кг. При определении хронической токсичности также показано, что введение нового полимера животным не оказывает существенного влияния на их состояние.

Таблица 1
Условия и результаты опытов по проведению реакции алкилирования человеческого сывороточного альбумина N-(2,3-эпоксипропил)- α -пирролидоном

Образцы	Условия реакции		Продукты реакции		
	Концентрация г/100 мл H ₂ O		Выход, %*	S, %	Mw(буфер Гли) рН 8,53
	ЭПП	Другие реагенты			
1	4,8	–	97,0	1,85	100000
2	6,5	–	101,3	1,77	111000
3	10,0	–	103,5	1,62	129000
4	6,5	0,02 (NaOH)	100,0	1,80	105300
5	6,5	0,04 (NaOH)	103,5	1,16	108000
6	6,5	0,60 (уксусная кислота)	97,3	1,75	114300
7	6,5	0,75 (уксусная кислота)	96,8	1,45	145300
8	6,5	0,85 (уксусная кислота)	96,8	1,45	145000

* Выход определяли как отношение массы модифицированного альбумина к массе исходного ЧСА.

Таблица 2
Содержание важнейших аминокислот (моль/моль глицина) в исходном и модифицированном человеческом сывороточном альбумине (ЧСА)

Аминокислота	ЧСА	Модифицированный ЧСА (№№ образцов в соответствии с табл. 1)			
		1	2	3	4
Lys	8,47	4,43	4,32	2,78	3,65
His	2,24	1,22	1,37	1,66	2,06
Arg	233	1,97	2,67	1,80	2,28
Asp	5,80	4,87	4,17	4,54	4,75
Tre	2,63	2,29	2,61	2,56	2,35
Ser	2,14	1,39	1,38	1,38	1,47
Glu	7,04	5,44	6,54	6,54	6,33
Pro	3,43	2,00	2,42	1,94	1,82
Gly	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Ala	5,23	5,58	5,12	5,45	5,23
Cys	1,45	1,15	...	1,46	1,37
Val	3,39	3,17	3,72	3,40	3,06
Met	0,49	0,41	0,40	0,38	0,45
Leu	5,67	5,50	5,53	...	5,78
Tyr	1,41	1,43	1,46	1,84	1,41
Phe	2,35	2,36	2,72	2,70	2,67

Таким образом, реакцией N-(2,3-эпоксипропил)- α -пирролидона с человеческим сывороточным альбумином впервые синтезировано производное альбумина, содержащее в боковой цепи пирролидоновый цикл. Полученная модификация относится к классу веществ с низкой токсичностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая Волна, Москва (2000).
2. Регистр лекарственных средств России (РЛС), *Энциклопедия лекарств*, 8 изд., РЛС-2001, Москва (2001).
3. Ф. П. Сидельковская, *Химия N-винилпирролидона и его полимеров*, Наука, Москва (1970).
4. Ю. Э. Кирш, *Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды*, Наука, Москва (1998).
5. В. А. Пономаренко, Ф. П. Сидельковская, А. М. Сахаров и др., *Тез. докл. Российской конф. по актуальным вопросам службы крови и трансфузиологии*, С.-Петербург (1995), с. 265.
6. H. Frankel-Conrat, *J. Biol. Chem.*, **154**(1), 227 (1944).
7. I. Zemanova, J. Turkova, M. Capka, et. al., *Enzyme Microb. Technol.*, (July), **229**, 3 (1981).
8. Ф. П. Сидельковская, Н. А. Распевина, В. А. Пономаренко и др., *Изв. АН СССР, Сер. хим.*, № 4, 932 (1986).
9. Н. К. Кочетков, В. А. Пономаренко, Ф. П. Сидельковская и др., А.с. № 573016 СССР, *Бюл. изобрет.*, № 9 (1997).
10. Ф. П. Сидельковская, А. М. Сахаров, С. З. Тайц и др., *Хим.-фарм. журн.*, **34**(8), 33 (2000).

Поступила 27.05.02