

УДК 541.64:547.96
©Коллектив авторов

КОНЬЮГАТЫ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ С БЕЗЛИГАНДНЫМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА

*Е.А. Зеленуга¹, Р.Б. Пономарева², В.М. Коликов³, В.Д. Паутов³,
Т.В. Шевелева³, М.Л. Медведев⁴, Т.М. Третьяк⁵, О.Н. Терпеловская¹.*

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, 690022
Владивосток, проспект 100-летия Владивостока 159; тел.: (4232) 31-16-51;
эл. почта: riboc@stl.ru.;

²Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург;

³Санкт-Петербургский Политехнический Университет, Санкт-Петербург;

⁴Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург;

⁵Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино.

Получены конъюгаты панкреатической РНКазы, сывороточного альбумина человека (САЧ) и безлигандного сывороточного альбумина человека (БЛСАЧ). Методом поляризованной люминесценции определено число гидрофобных мест связывания как на исходном САЧ, так и на БЛСАЧ, а с привлечением данных потенциометрического титрования сделан вывод о преимущественной роли дополнительных электростатических связей при взаимодействии РНКазы с САЧ. Сравнение ферментативной активности САЧ- и БЛСАЧ-конъюгатов, а также двух методик их получения показало, что использование БЛСАЧ в качестве олигомерного носителя и предложенной нами методики комплексообразования белков с их последующей соконденсацией наиболее предпочтительно. Обнаружено, что, в отличие от исходного фермента, конъюгаты проявляют активность в отношении двунитевой РНК. Трансферазная активность в крови кроликов при внутривенном введении конъюгатов РНКазы сохраняется на уровне 30-40% в течение 4 суток по сравнению с 20 минутами при введении немодифицированного фермента. Показана высокая антивирусная активность конъюгатов БЛСАЧ-РНКазы при однократном введении мышам, зараженным вирусами гриппа А и гриппа В.

Ключевые слова: панкреатическая РНКазы, сывороточный альбумин человека, конъюгат, пролонгация, двунитевая РНК.

ВЕДЕНИЕ. Задача создания высокоэффективных противовирусных средств широкого спектра действия особенно актуальна в настоящее время в связи с распространением и многообразием вирусных инфекций. В медицинской практике уже показана эффективность применения панкреатической рибонуклеазы (РНКазы) при лечении опасных вирусных заболеваний центральной нервной системы [1], в экспериментах на животных продемонстрирована способность панкреатической и бактериальной 7Р РНКаз угнетать репродукцию целого ряда РНК-содержащих вирусов. При использовании ферментов в качестве лекарственных препаратов необходимо учитывать такие факторы, как продолжительность действия, сохранение фермента в кровотоке и защита его от разрушающих ферментативных воздействий организма-реципиента. Эту проблему можно решить с помощью иммобилизации ферментов на синтетических

или модифицированных природных носителей [2]. Однако, защита не должна быть абсолютной, так как в этом случае могут возникнуть трудности с выведением препарата из организма, если применять синтетический носитель с большим молекулярным весом, или, в некоторых случаях - тенденцией к накоплению в отдельных органах [3]. Поэтому возникает вопрос о безопасном для организма-реципиента носителе с некоторыми "принципиальными" свойствами. С другой стороны, при химической модификации всегда надо помнить о сохранении активности; здесь опасны не только локальные химические реакции в области активного центра, но и реакции, подавляющие аллостерическое регулирование, а в худшем случае - приводящие к денатурации, "неразличимой" привычными физико-химическими методами.

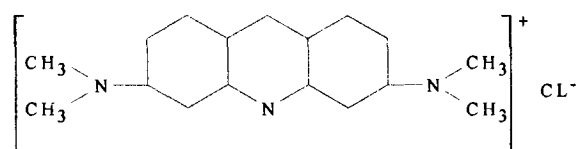
Вопрос о положении организма-донора (продуцента), а, следовательно, и фермента на филогенетическом древе важен не только тем, насколько близким к инфицирующим факторам (микробам и вирусам) должен быть вводимый фермент, чтобы терапевтический эффект был значительным, но и насколько далек (или близок) от высшего организма, в который он вводится, принимая во внимание нежелательный иммунный отклик организма на чужеродный белок.

Поскольку желателен носитель белковой природы, то удобнее всего здесь сывороточные альбумины с их ярко выраженной транспортной функцией и умеренной иммуногенностью. Ранее на системе бактериальная РНКазы 7Р-САЧ мы показали возможность получения белковых конъюгатов, обладающих высокой ферментативной активностью [4]. В настоящей работе метод применен к другому ферменту - панкреатической РНКазе, проведено сравнение активностей конъюгатов, полученных в одинаковых условиях по двум разработанным нами методикам при использовании в качестве белкового носителя как донорского САЧ, так и после снятия с него лигандов, безлигандного САЧ (БЛСАЧ). Ввиду того, что БЛСАЧ оказался предпочтительным носителем, мы провели дальнейшее изучение его свойств для выяснения причин более эффективного связывания им РНКазы, в частности, исследовали его гидрофобность, а также изучили свойства конъюгатов БЛСАЧ-РНКазы.

МЕТОДИКА. В работе использовали панкреатическую РНКазу производства Санкт-Петербургского завода медпрепаратов, дополнительно очищенную гельхроматографией на сефадексе G-75, донорский САЧ Санкт-Петербургского НИИЭМ им. Л. Пастера, диализованный против воды и высушенный лиофильно, глутаровый альдегид (ГА) фирмы "Reanal" (Венгрия), очищенный перегонкой в вакууме, акридиновый оранжевый (АО) фирмы "Serva" (Германия).

РНКазу с люминесцентной меткой (РНКазу-ЛМ) получали реакцией 9-антриметилизоцианата с аминогруппами белка по способу, описанному в работе Краковяка и др. [5,6]. Введена одна метка на 8 молекул РНКазы.

Долю связанных альбумином молекул РНКазы определяли методом поляризованной люминесценции (ПЛ), используя РНКазу-ЛМ [7]. Гидрофобность определяли методом ПЛ с акридиновым оранжевым (АО) в качестве люминесцентного индикатора [8]:



Поскольку АО взаимодействует с неполярными участками макромолекулы, доля связанного АО пропорциональна числу гидрофобных участков. Измерение проводили при длине волны 535 нм.

Долю связанных люминесцентных молекул оценивали по соотношению (1):

КОНЬЮГАТЫ РНКАЗЫ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

$$Q_{\text{связ}} = \left(\frac{1}{P_1} - \frac{1}{P} \right) \cdot \frac{1}{P_2} / \left(\left(\frac{1}{P_1} - \frac{1}{P_2} \right) \cdot \frac{1}{P} \right) \quad (1), \quad \text{где:}$$

P_1 - поляризованная люминесценция свободных люминесцирующих молекул,

P_2 - поляризованная люминесценция люминесцирующих молекул, полностью связанных с молекулами альбумина, P - поляризация люминесценции исследуемого раствора.

Трансферазную активность определяли по методу [9] и выражали в условных единицах оптической плотности (A_{260}) кислоторастворимых продуктов расщепления РНК. Количество белка определяли нефелометрически с ТХУ [10]. РНКазную активность по отношению к двунитевой РНК определяли по методу [11]. Молекулярные массы (ММ) конъюгатов определяли с помощью метода Ds-Na-электрофореза в полиакриламидном геле, градуировку проводили по стандартным наборам реперных белков фирмы "Serva" в интервале ММ 18,5 - 330 кДа.

Конъюгаты РНКазы и альбумина получали по двум методикам.

Методика I. К 2%-му раствору САЧ добавляли по каплям на холоду 0,6% раствор глутарового альдегида (ГА) в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4 при молярном соотношении ГА : САЧ равно 20. Через 30 мин добавляли раствор РНКазы в том же буфере. Молярное соотношение РНКазы:САЧ было 5,4. Реакцию останавливали через 30 мин добавлением KCNH_4 .

Методика II. К 2% раствору САЧ сразу после его растворения, учитывая изменения в растворе, которые претерпевает БЛСАЧ [4], добавляли раствор РНКазы в молярном соотношении компонентов РНКазы: САЧ 5,4. Комплексообразование проводили при слабом перемешивании в течение 30 минут, затем добавляли ГА и через 30 мин KCNH_4 . Для получения меченого по тритию конъюгата использовали $\text{KB}[^3\text{H}]_4$. Продукты реакции разделяли методом гельхроматографии на колонке с ультрагелем АСА-44 (рис.1).

Для снятия лигандов с САЧ использовали предложенный нами метод взаимодействия с сильным анионитом АВ-17-8, имеющим гидрофобную полистирольную матрицу [4]. Для сравнения также получали обезжиренный САЧ по двум известным методикам [12]: выдерживанием САЧ в течение 5 часов в водном растворе HCl при pH 3 с последующей нейтрализацией раствора NaOH , центрифугированием и взаимодействием с активированным углем Norit A.

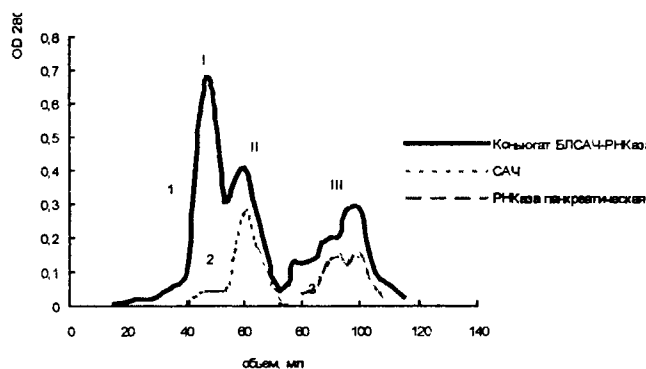


Рисунок 1

Разделение конъюгатов БЛСАЧ-РНКазы методом ГПХ на ультрагеле АСА-44 (1,6 x 50 см), элюция раствором 0,05 М Na-фосфатного буфера pH 7,4 (1). Профили элюции САЧ (2) и панкреатической РНКазы (3).

Экстракцию лигандов проводили в системе CHCl_3 : CH_3OH (2 : 1) в течение 10 мин., добавляли 0,2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и смесь центрифугировали 10 мин. при 10000g. Хлороформную фракцию упаривали в вакууме досуха при 40°C под N_2 и растворяли в 0,2 мл CHCl_3 ; 5 мкл полученного раствора анализировали методом хроматографии в тонком слое силикагеля [13].

Анализ жирных кислот проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках силикагеля толщиной 0,25 мм в системе серпый эфир : гексан : соляная кислота (7:13:0,2). Неполарные липиды разделяли в системе петролейный эфир : этиловый эфир : уксусная кислота (80:20:1), а полярные - в системе хлороформ : метанол : вода (80:35:5). Полосы проявляли 0,7% $K_2Cr_2O_7$ в 55% H_2SO_4 при нагревании до 250°C в течение 30 мин.

Для определения времени циркуляции полученных конъюгатов в организме их вводили однократно внутримышечно или в краевую вену уха кролика в количестве, соответствующем по ферментативной активности 0,5 мг РНКазы на 1 кг веса животного. Пробы крови отбирали через определённые промежутки времени (от 15 мин до 10 суток) и определяли в плазме трансферазную активность как указано выше.

Опыты по определению распределения конъюгатов по органам проводили на крысах Вистар массой 180-200 г. Меченый по тритию [3H] препарат вводили однократно в хвостовую вену животного и через определённые промежутки времени крыс декапитировали, извлекали печень, лёгкое, мозг, отбирали пробы крови. Мозг очищали от оболочек и сосудов, органы гомогенизировали в 0,1 М трис-НСl буферном растворе (рН 7,0), центрифугировали 15 мин при 12000g. Все операции проводили при +4°C. В надосадочной жидкости определял трансферазную активность и измеряли радиоактивность, используя сцинтилятор ЖС-8 для счёта в растворе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Известно, что интенсивная лигандная нагрузка молекул СА вызывает изменение их структуры и связывающей способности [14-16]. Методом поляризованной люминесценции проведено сравнение эффективности связывания молекул РНКазы сывороточным альбумином при разных способах освобождения его от лигандов. На рисунке 2А представлены кривые зависимости доли связанных молекул РНКазы-ЛМ от мольного соотношения САЧ : РНКазы в растворе. Очевидно, что способ снятия лигандов существенно влияет на способность альбумина связывать РНКазу. Изменение концентрации взаимодействующих компонентов при сохранении их мольного соотношения не привело к изменениям $Q_{связ}$. Мы определили, что различие значений $Q_{связ}$ для системы РНКазы - САЧ зависит прежде всего от числа участков связывания РНКазы в альбуминах разных образцов. Наибольшей связывающей способностью обладает образец БЛСАЧ, полученный с помощью анионита АВ-17-8, который был нами выбран для дальнейшей работы. Его гидрофобность оценивали методом ПЛ с помощью люминесцентного индикатора АО и сопоставляли с гидрофобностью исходного САЧ. Число мест связывания пропорционально числу гидрофобных мест посадки. На рисунке 2Б представлена зависимость доли связанного АО от его концентрации для исходного САЧ, БЛСАЧ и БЛСАЧ через год хранения. Доля связанного с БЛСАЧ акридинового оранжевого, а, следовательно, и гидрофобность БЛСАЧ меньше, чем исходного белка и не изменяется при хранении в течение года. Падение $Q_{связ}$ с увеличением концентрации АО обусловлено, вероятно, уменьшением числа вакантных мест связывания по мере их занятости индикатором. Построение графика Скэтчарда [17] дает возможность оценить константы связывания и число мест посадки АО. Для исходного САЧ константа связывания $K_{САЧ-АО} = 0,9 \cdot 10^5$ л/моль и число мест посадки $N_{САЧ} = 10^5$ моль/л, а для БЛСАЧ соответствующие значения: $K_{БЛСАЧ-АО} = 10^5$ л/моль и $N_{БЛСАЧ} = 0,6 \cdot 10^5$ моль/л. Как видно, константы связывания гидрофобного АО отличаются незначительно, однако, число гидрофобных мест посадки САЧ после снятия лигандов несколько уменьшается. Поскольку ранее методом потенциометрического титрования нами было показано существенное увеличение числа титруемых групп на альбумине в результате снятия лигандов [4], то увеличение эффективности связывания РНКазы безлигандным САЧ, вероятно, объясняется в основном электростатическими взаимодействиями.

Сывороточный альбумин человека выполняет в организме транспортную функцию; будучи выделенным из организма, он несет на себе жирные кислоты,

КОНЬЮГАТЫ РНКАЗЫ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

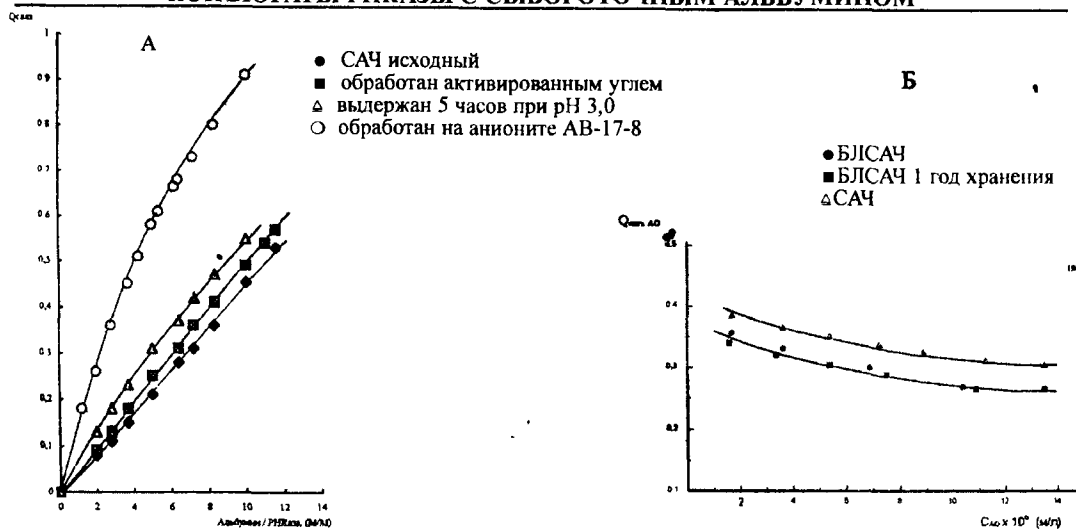


Рисунок 2

А. Зависимость доли молекул РНКазы-ЛМ, связанных молекулами САЧ - ($Q_{св}$) от мольного соотношения САЧ/РНКазы для исходного САЧ и освобожденного от лигандов по нескольким методикам. Б. Зависимость доли связанного АО от его концентрации для исходного САЧ, БЛСАЧ и БЛСАЧ через год хранения при концентрации ССА = 1 мг/мл.

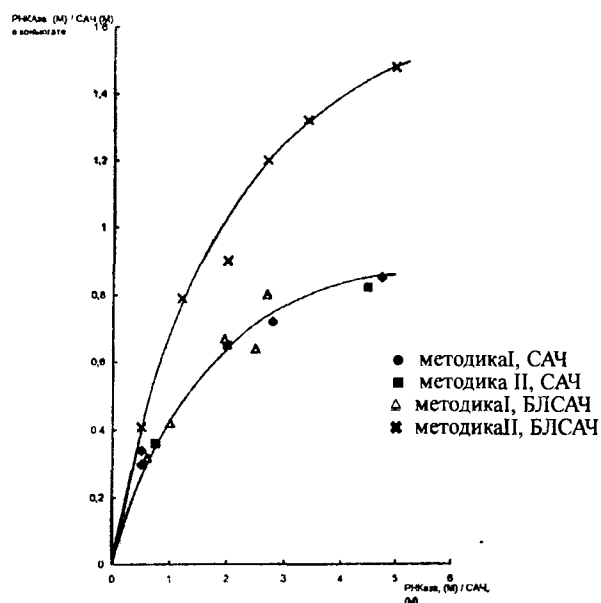


Рисунок 3

Зависимость трансферазной активности конъюгатов, полученных по различным методикам, выраженной в М РНКазы на 1 М САЧ, от исходного соотношения компонентов.

билирубин, пиридоксаль-фосфат, лекарственные препараты и другие вещества различной природы [18]. Мы провели экстракцию связанных с САЧ и БЛСАЧ лигандов. Методом тонкослойной хроматографии на силикагеле показано, что липиды и фосфолипиды практически отсутствовали в образцах БЛСАЧ, тогда как в образцах САЧ они составляли порядка 80% и 15% соответственно от общего количества экстрагированных лигандов. Мольное соотношение свободных жирных кислот, среди которых преобладали линолевая, олеиновая, стеариновая и пальмитиновая составляло 2,2 М на 1 М САЧ и 0,03 М на 1 М БЛСАЧ.

Для того, чтобы использовать энергию мест связывания, освобожденных от лигандов, в качестве первой стадии взаимодействия БЛСАЧ с РНКазой мы провели

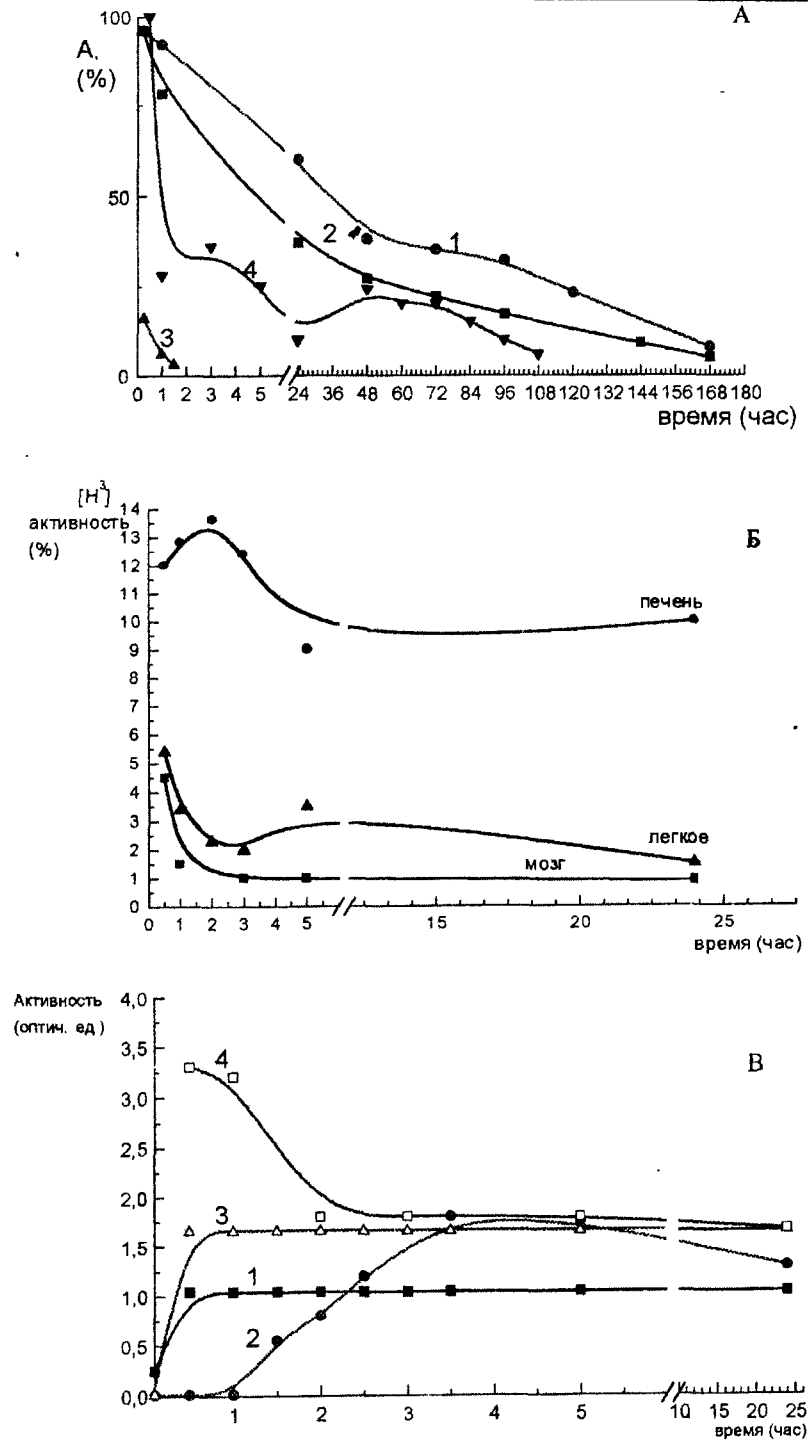


Рисунок 4

А. Динамика изменений трансферазной активности в плазме крови кроликов при однократном внутривенном введении конъюгатов БЛСАЧ-РНКаза в дозе, соответствующей 0,5 мг фермента на 1 кг веса животного: конъюгат ММ 68-95 кДа (1), конъюгат ММ 220-350 кДа (2), панкреатическая РНКаза (3), и при внутримышечном введении конъюгата ММ 68-95 кДа в дозе, соответствующей по активности 5 мг фермента на 1 кг веса - (4). Б. Динамика проявления радиоактивности в % от введенного на 1 г ткани при однократном внутривенном введении меченого по тритию конъюгата БЛСАЧ-РНКаза ММ 68-95 кДа. В. Динамика трансферазной активности при однократном внутривенном введении конъюгата БЛСАЧ-РНКаза в 1 г мозга: 1-68-95 кДа, 2-220-350 кДа; и 1 мл плазмы крови: 3-250-350 кДа, 4-68-95 кДа.

КОНЬЮГАТЫ РНКАЗЫ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

комплексообразование, а затем сшивку образовавшегося поликомплекса глутаровым альдегидом (методика II). Для сравнения нами были получены конъюгаты БЛСАЧ по предложенной нами ранее методике I [19], состоящей в получении олигомера САЧ и последующем присоединении к нему фермента. Кроме того, были получены конъюгаты по двум методикам с использованием в качестве носителя САЧ без снятия с него лигандов. Результаты измерения ферментативной активности полученных конъюгатов в пересчете на количество молей присоединенного фермента представлены на рисунке 3 (исходя из предположения, что удельная активность РНКазы в результате реакции не изменяется). Наибольшей активностью обладают конъюгаты, полученные с БЛСАЧ по методике II (рис. 3). Активности конъюгатов, полученных по методике I как с САЧ, так и с БЛСАЧ, а также полученных по методике II с САЧ, практически совпадают и оказываются значительно ниже. Таким образом, для получения конъюгатов с высокой ферментативной активностью можно рекомендовать безлигандный альбумин в качестве носителя и одновременно методику, состоящую в получении поликомплекса БЛСАЧ и фермента и последующей соконденсации белков с помощью ГА.

Полученные конъюгаты разделяли методом гельпроникающей хроматографии на колонке с ультрагелем АСА-44 (рис. 1) и определяли ММ компонентов во фракциях I и II методом Ds-Na-электрофореза в ПААГ. Результаты приведены в таблице. Из данных о ММ конъюгатов, их ферментативной активности и удельной активности фермента проведена оценка молекулярного состава компонентов. Результаты аналогичны полученным для системы БЛСАЧ- РНКазы 7Р [4].

Известно, что димеры РНКазы обладают повышенной противоопухолевой активностью [20,21]. Этот факт связывают со способностью димеров РНКаз разрушать двунитевую РНК, содержание которой в опухолевых клетках повышено по сравнению с нормальными клетками. Активность димеров РНКазы по отношению к двунитевой РНК примерно в 400 раз выше, чем мономеров. Важно было выяснить, обладают ли полученные нами конъюгаты активностью в отношении двунитевой РНК. Из данных таблицы видно, что конъюгаты проявляют активность в отношении двунитевой РНК, причем наиболее высокомолекулярная фракция I (рис. 1) показала очень высокую активность в отношении двунитевой РНК.

Таблица. Молекулярная масса и ферментативная активность конъюгатов панкреатической РНКазы с БЛСАЧ в отношении двунитевой РНК.

Объект	Активность в условных оптических единицах	Увеличение активности (раз)	Молекулярная масса, Да	Предполагаемый мольный состав конъюгата
РНКазы исходная	0,075	-	13 700	Свободная РНКазы
РНКазы модифицированная*)	0,330	4,4	13 700-27 400	1-2 М РНКазы
Конъюгат БЛСАЧ-РНКазы: Фракция I	13,5	170	220 000 и более	2 М САЧ +6 М РНКазы 3 М САЧ + 1 М РНКазы
Фракция II	1,35	18	68 000 81 000	Свободный САЧ 1 М САЧ +1 М РНКазы
			95 000	1 М САЧ +2 М РНКазы

Примечание: *) РНКазы из фракции III (рис. 1)

При внутривенном введении конъюгатов панкреатическая РНКазы-БЛСАЧ в дозах, соответствующих по активности РНКазы 0,5 мг/кг веса животного, наблюдается пролонгация трансферазной активности в плазме крови кроликов (рис. 4 А). Кривая 1 - усредненная кривая трансферазной активности в плазме при введении конъюгатов ММ 68-95 кДа и 200 кДа. Уровень трансферазной активности несколько ниже при введении более высокомолекулярного конъюгата (кривая 2). Вероятно, тримеры САЧ, в отличие от его мономеров и димеров,

являются нефизиологичными и, следовательно, конъюгаты большой молекулярной массы вызывают усиление ответа организма - реципиента на молекулярном уровне. Активность внутривенно введенной свободной РНКазы обнаруживается только в течение 20-30 минут (кривая 3), в то время как при введении конъюгатов активность сохраняется на уровне 30-40% от исходной в течение 4 суток.

При использовании конъюгата ММ 68-95 кДа трансферазная активность в плазме крови проявляется не только при внутривенном, но и при внутримышечном введении препарата (рис. 4А, кривая 4), и сохраняется более двух суток на уровне 25% от введенной. При внутримышечном введении конъюгатов ММ 220 кДа и более увеличения трансферазной активности не обнаружено в крови кролика в течение 4 суток.

Вопрос о возможности проникновения конъюгата через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) имеет большое значение в свете возможности лечения ряда нейровирусных инфекций, поскольку ГЭБ ограничивает поступление веществ большой молекулярной массы из кровотока в паренхиму мозга. Наши предположения о том, что БЛСАЧ является не только удачным носителем для пролонгации действия фермента в организме, но и будет способствовать прохождению последнего через ГЭБ, несмотря на относительно высокую молекулярную массу препарата оправдались. Эксперименты на крысах показали, что при внутривенном введении конъюгатов также наблюдается пролонгация действия препарата на достаточно высоком уровне в таких органах, как печень, легкое, мозг по крайней мере в течение суток (рис. 4Б). Следует отметить, что введение конъюгата ММ 68-95 кДа позволяет получить стабильно высокий уровень активности, в то время как конъюгат с ММ более 220 кДа имеет более выраженную динамику проявления активности в паренхиме мозга (рис. 4В), что может быть связано на начальном этапе с трудностями прохождения через ГЭБ вследствие высокой молекулярной массы, а позднее с проявлением латентной активности, которая высвобождается в процессе постепенного протеолиза конъюгата в организме, как показано нами ранее на модели конъюгата БЛСАЧ-РНКазы 7Р [4].

Конъюгаты РНКазы БЛСАЧ проявили высокую противовирусную активность в экспериментах на мышках, зараженных вирусом гриппа. При внутривенном введении животным конъюгатов БЛСАЧ- РНКазы в дозе, соответствующей по активности 4-20 мкг фермента на мышку, показатель $\Delta \lg LD_{50}$ (изменение логарифма 50%-ой летальной дозы вируса в опыте с препаратом по сравнению с контрольным опытом, когда вводили физиологический раствор) увеличивается на 1,8 lg и, что особенно важно, препарат активен в эксперименте не только против вирусов гриппа А : грипп А/РР/18/34/(HON1), грипп А/Виктория/3/72(H3N2), но и против вируса гриппа В : грипп В/Lee/40.

Таким образом, соконденсация с сывороточным альбумином приводит к пролонгации ферментативной активности, проявляющейся в живом организме при внутривенном введении конъюгата, не только в случае бактериальной РНКазы. Использование в качестве носителя фермента БЛСАЧ вместо САЧ в сочетании с предложенной нами методикой комплексообразования белков с последующей их соконденсацией дает возможность получить более высокоактивные конъюгаты. Впервые показано, что в конъюгатах появляется новое свойство по сравнению с исходным ферментом - активность в отношении двунитевой РНК, что особенно актуально в антиопухолевой терапии. Конъюгаты проявляют в эксперименте высокую активность как в отношении вируса гриппа А, так и вируса гриппа В.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Сичко Ж.И., Клиорин А.И. (1983) Воен.-мед. журнал, **10**, 29-30.
2. Veronese F.M., Morpurgo M. (1999) Farmaco, **54**, 497-516.
3. Seymour L.W., Ulbrich K., Strahalm J., Kopecek J., Duncan R. (1990) Biochem. Pharmacol., **39**, 1125-1131.

КОНЬЮГАТЫ РНКАЗЫ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

4. Пономарева Р.Б., Зелепуга Е.А., Илларионова Н.Г. и др. (1994) Прикл. биохим. и микробиол., **30**, 88-93.
5. Краковяк М.Г., Луцник В.Б., Сычева Е.А. и др. (1986) Высокомолек. соед., **28**, 289-294.
6. Краковяк М.Г., Сычева Е.А., Шевелева Т.В. и др. (1989) Высокомолек. соед., А 31, № 1, 117-122.
7. Ануфриева Е.В., Демьяненко Т.Ф., Красильников В.Н. и др. (1980) Тезисы докл. Всес. конф. "Химия пищевых веществ. Свойства и использование биополимеров в пищевых продуктах.", Москва, с.21.
8. Ануфриева Е.В., Краковяк М.Г., Громова Р.А. и др. (1991) ДАН СССР, **319**, 895-898.
9. Anfinsen C.B., Redfield R.R. (1954) J. Biol. Chem., **207**, 201
10. Vera J.C. (1988) Anal. Biochem, **174**, 87-196.
11. D'Allessio G., Zofra S., Libonatti M. (1972) FEBS Lett., **24**, 355-358.
12. Peters T.H. (1985) Adv. Prot. Chem., **37**, 161-247.
13. Peters T.H., Jr. Reed R.G. (1978) Proc. FEBS Meeting. Colloq. B9, **50**, 11-20
14. Бендер К.И., Луцевич Н.Ф., Луцевич Л.Н., Купчиков В.В. (1990) Фармакол. токсикол., **53**, 72-80.
15. Honore B. (1990) Pharmacol. Toxicol., **66**, 1-26.
16. Иванов А.И., Сарницкая В.В., Короленко Е.А. и др. (1996) Биохимия, **61**, № 5, 903-911.
17. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. (1980) Флуоресцентные зонды исследования биол. мембран, Наука.
18. Motreff M.R., Blaton V., et al. (1970) J. Biochem., **68**, 369-377.
19. Горячева Л.К., Пономарева Р.Б., Кузнецова Н.П. и др. (1989) Высокомолек. соединения., **31**, 17-21
20. Блехман Г.И. (1983), Успехи соврем. биол., **95**, 181-187.
21. Винна И.А., Карсакевич А.С. (1989) Тез. докл. Всес. итог. конф. "Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование", Рига, с.45-48.

Поступила 12.11.2001

CONJUGATES OF PANCREATIC RIBONUCLEASE AND LIGAND -FREE HUMAN SERUM ALBUMIN.

E.A. Zelepuga¹, R.B. Ponomareva², V.M. Kolikov³, V.D. Pautov², T.V. Sheveleva², M.L. Medvedev⁴, T.M. Tretyak⁵, O.N. Terpelovskaya⁵.

¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Vladivostok;

²Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg;

³St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg;

⁴Military-Medical Academy, St. Petersburg;

⁵Institute of theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Puschino.

Conjugates of pancreatic RNase and ligand-free human serum albumin (LFHSA) have been obtained. The number of hydrophobic binding sites both for initial HSA and LFHSA has been determined by the polarised luminescence method. Interaction between RNase and HSA involves additional electrovalent linkage. Unlike initial enzyme, conjugates exhibit activity toward double-strand RNA. After intravenous injection, transferase activity of unmodified enzyme remains in the blood during 20 min., whereas 30-40% of this activity is detected at the fourth day after administration of RNase conjugates. A single dose administration of LFHSA-RNase conjugates exhibited high antiviral activity in mice, infected with influenza A and influenza B viruses.

Key words: pancreatic RNase, human serum albumin, conjugates double-strand RNA