

*М.В. Шевель, С.В.Верева, К.Б.Н.*

## **АВТОПОВРЕЖДЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ПУТИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ**

*Институт биохимии им.А.В.Палладина НАН Украины, Киев*

**П**обочные эффекты, свойственные многим лекарственным препаратам, могут рассматриваться как разновидность токсического действия. Такие эффекты исключают либо ограничивают применение огромного числа биологически активных веществ. Среди терапевтических средств широкого спектра действия и назначения особое место принадлежит препаратам на основе биологически активных белков. Отличительная черта соединений этой группы — зависимость функциональной активности от соответствия конформационной структуры молекулы. Обеспечение правильной укладки (фолдинга) белка, синтезируемого *de novo*, и защита нативной структуры от денатурирующего воздействия разнообразных физико-химических факторов в процессе очистки и выделения составляют сложную и далекую от разрешения проблему технологии белковых препаратов. Столь же сложный комплекс проблем связан с иммунологической стороной применения белков в качестве лекарственных препаратов внутримышечного и, в особенности, внутривенного введения [1,2]. Проблема иммуногенности вводимого белка существенно обостряется способностью белковых молекул к необратимым структурным перестройкам, обусловленным образованием новых внутри- и межмолекулярных связей как следствия отличия молекулярного окружения белковых молекул в составе получаемых препаратов от нативного. Формирование подобной необратимо денатурированной примеси ведет к определенному снижению удельной активности препарата, но если для белков, предназначенных для использования *in vitro*, примесь нескольких процентов инактивированной изоформы не составляет

особой проблемы и может быть компенсирована введением соответствующих поправок в расчетные формулы аналитических и тестовых методов, то для фармацевтических препаратов она составляет существенную проблему, заслуживающую особого рассмотрения. Независимо от уровня иммуногенности исходной нативной формы вводимого белка, присутствие примеси изоформ, так или иначе денатурированных вследствие образования новых внутри- и межмолекулярных связей, неизбежно вызовет соответствующую реакцию иммунной системы. Последующее развитие аутоиммунной реакции на исходную изоформу более чем вероятно, поскольку увеличение иммуногенности пептидных антигенов вследствие конъюгации с белками-носителями общеизвестно и относится к классическим методам иммунологии [3-5]. Развитие иммунного ответа на вводимые препараты не только снижает эффективность их терапевтического действия [1], но и чревато развитием непредсказуемых последствий аутоиммунного, аллергического и анафилактического характера [2,6].

Предлагаемый обзор представляет собой попытку обобщения данных о молекулярных механизмах постпрепарационных автоповреждений белковых препаратов и путей их предотвращения.

Формирование нативной структуры и поддержание белковой молекулы в функционально активной форме представляет собой исключительно сложный и динамичный процесс, опосредованный сложнейшим комплексом внутри- и межмолекулярных взаимодействий, так или иначе задействованных в поддержании активной структуры белка [7]. Поддержание соответствия молекулярного окружения белковой

молекулы условиям исходной биологической среды составляет важнейшую предпосылку для сохранения активного конформационного состояния. Естественно, что изменение таких условий приводит к более или менее существенному сдвигу динамического равновесия конформационных состояний белка в сторону формирования молекулярных форм, более соответствующих изменившемуся окружению. Подобные трансформации зачастую сопровождаются рутинными технологическими процедурами, существенно влияя на качество конечного продукта. Так, сывороточный альбумин человека формирует агрегаты даже при прокачивании белкового раствора плунжерным насосом [8], а антитромбин человека, в зависимости от условий обработки формирует как минимум две мономолекулярные денатурированные формы [9], либо образует димеры, состоящие из активной и латентной форм ингибитора [10]. Образование нерастворимых агрегатов любых сколь угодно сложных белков в ходе лиофильной сушки было и остается постоянной проблемой приготовления и сбережения белковых препаратов. Можно до бесконечности перечислять случаи труднообъяснимой инактивации белковых препаратов, однако без учета общих структурных особенностей, присущих множеству разнообразных белковых молекул, невозможно ни понять молекулярные механизмы этих нежелательных процессов, ни осознать тяжесть последствий, ни предусмотреть практические пути их предотвращения.

Традиционно считается, что обратимо денатурированные белки при переводе их в соответствующую среду восстанавливают исходную конформацию. Однако следует отметить, что процесс обратимой денатурации не только способствует сближению отдельных реакционноспособных групп, экспозиции ранее скрытых аминокислотных остатков и связей, повышению степени напряженности последних, что суммарно не только меняет общую молекулярную динамику белковой молекулы, но ведет и к образованию новых ковалентных связей [11]. Обусловленная плотным стерическим контактом высокая локальная плотность отдельных реакционно-

пособных групп позволяет говорить об особом, предферментативном, характере протекающих при этом внутри- и межмолекулярных реакций, проходящих как в растворе, так и в обезвоженных препаратах. Ввиду очевидной практической важности молекулярные трансформации лиофилизированных препаратов вызывают особый интерес и наиболее изучены. С одной стороны, лиофилизация белков создает возможности их хранения в течение приемлемого для лекарственных препаратов времени. С другой же стороны, перевод высокоструктурированных и динамичных молекул в условия, ничего общего с нативными не имеющими, ведет к существенным изменениям их конформации [12]. Доказан двустадийный характер этого процесса, включающего конформационные изменения и ковалентную конъюгацию [13]. Подобные процессы описаны для различных форм в той или иной мере обезвоженных белков: аморфных, стеклющихся и кристаллических [13,14]. Описано несколько молекулярных механизмов формирования ковалентных агрегатов лиофилизированных белков. При наличии в белке свободных SH-групп (бычий сывороточный альбумин, рекомбинантный альбумин человека) возможен тиол-дисульфидный обмен с образованием новых межмолекулярных дисульфидных связей [15,16]. При отсутствии свободных тиолов (инсулин) ковалентная агрегация может происходить вследствие  $\beta$ -элиминирования с асимметрическим расщеплением исходной дисульфидной связи и последующим образованием дегидроаланина и тиоцистеина. Дегидроаланин может взаимодействовать с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина, образуя ковалентную связь, тиоцистеин же расщепляется с образованием SH-групп, способных к тиол-дисульфидному обмену [16]. Переамилирование остатков аспарагина или глутамина  $\epsilon$ -аминогруппами лизина или N-концевыми аминогруппами других белковых молекул описано для случаев ковалентной агрегации лиофилизированных препаратов рибонуклеазы А [17], рекомбинантного соматотропина быка [18] и инсулина [19]. Ковалентная агрегация лиофилизированных белков может рассматриваться как частный и крайний случай трансформации

сложных макромолекул в абсолютно нефизиологических условиях. Естественно, что скорость подобного процесса определяется молекулярным окружением белковой молекулы. Степень гидратированности является важнейшим фактором, определяющим динамику ковалентной агрегации лиофилизированного белка [11] и носит выраженный колоколообразный характер: по мере увеличения гидратированности белка скорость агрегации сначала резко возрастает, выходит на плато и столь же резко падает [15,16]. Предполагается, что на восходящей ветви зависимости инкорпорированные молекулы воды увеличивают конформационную подвижность белков и диффузию реагирующих соединений, а также непосредственно участвуют в процессах повреждения белков. На нисходящей же части кривой сказывается влияние эффектов разведения и регидратации белковых молекул [20]. Не менее показательны и молекулярные трансформации растворенных белков при существенном отличии условий раствора от нативных. Так, плазминоген человека под влиянием кислой среды (рН 4 и менее) формирует агрегаты, практически нерастворимые в нейтральной среде [21]. Присутствие минорных высокомолекулярных примесей составляет своего рода визитную карточку этого довольно крупного (92 кДа) и прошитого 24 дисульфидными связями белка [22]. Для белков, находящихся в растворе, возрастает роль формирования новых внутримолекулярных связей. Так, ингибитор карбоксипептидазы из картофеля в присутствии денатурантов и тиолсодержащих соединений формирует от 9 до 14 различных мономолекулярных изомеров [23,24]. Формирование агрегатов сопровождается инкубацией растворенного фибриногена при низкой температуре, повышенной или пониженной ионной силе, присутствии чужеродных соединений. Такая агрегация носит выраженный зависимый от времени характер с выходом на максимум на третьи сутки без сколько-нибудь существенного последующего накопления агрегированной формы [25], что может рассматриваться как свидетельство равновесного характера ассоциативно-диссоциативного процесса. С другой стороны, боль-

шая продолжительность времени как агрегирования, так и ренатурации мономерной формы при переводе белка в нормальные условия позволяют усомниться в нековалентном характере образуемых фибриногеном ассоциатов. Не менее показательны и молекулярные трансформации денатурированных изоформ ингибитора карбоксипептидазы из картофеля: при переводе белка в нормальные условия изомерные формы не ренатурируют, а пребывают в состоянии равновесия с нативной изоформой [21,22]. Последнее обстоятельство позволяет говорить об индуцируемом характере подобных трансформаций. Известно, что формирование  $\beta$ -амилоидов — нерастворимых ассоциатов с доминирующей долей  $\beta$ -укладки — сопровождается многими нейродегенеративными заболеваниями, однако в условиях *in vitro* присутствие  $\beta$ -структурированной матрицы индуцирует алмиллоидирование ряда белков, никак не связанных с какими-либо фолдинговыми заболеваниями [26]. Многие очищенные белки в растворе формируют амилоиды спонтанно. В частности, классическим амилоидогенным белком считается инсулин, что придает рассматриваемой проблеме особую остроту [27].

Приведенные данные позволяют заключить, что очистка и сколько-нибудь продолжительное хранение белковых препаратов как в растворе, так и в обезвоженном состоянии сопряжены с риском формирования стабильных моно- и олигомерных изоформ, существенно отличных от исходной молекулярной формы. В случае, если функциональные группы подобной изоформы в той или иной мере сохраняют исходную конформацию, возможно сохранение какого-то подобия функциональной активности исходного белка, однако о полноценном участии подобного белкового образования в сколько-нибудь сложном регуляторном процессе говорить не приходится. Тяжесть же иммунологических последствий формирования подобных примесей в белковых препаратах медикаментозного назначения не поддается даже приблизительной оценке. Понятно, что при рассмотрении вопроса о клиническом применении подобного рода препаратов проблема предотвращения формирования новых меж- и

внутримолекулярных связей принимает особую остроту.

Практическая важность вопроса о мерах по предотвращению или торможению постпрепарационных автоповреждений белков очевидна. Использование глубокого охлаждения ограничено возможностью использования дорогостоящего и не всегда доступного оборудования. В контексте рассмотренных молекулярных механизмов становится очевидным, что лиофилизация белковых препаратов лишь замедляет, но не останавливает прохождение ассоциативных процессов. Теми же механизмами объясняется и наблюдаемое при необоснованном выборе режима интенсивной сушки формирование нерастворимых агрегатов. В качестве паллиативной меры может быть предложено применение дорогостоящей, но эффективной, техники глубокого обезвоживания белковых препаратов. Агрегативная инактивация препаратов лабильных белков, обусловленная абсорбцией атмосферной влаги при отборе образцов из общей массы, хорошо известна биохимикам и также может быть отнесена к осязаемым недостаткам лиофилизации. Явное несоответствие мизерности количества абсорбированной влаги и глубины степени инактивации белка может быть объяснено сложным характером процесса, включающего быстрое формирование высокогидратированного поверхностного слоя с последующим распространением индуцируемой агрегации вглубь белковой массы. По-видимому, схожим образом объясняется и непредсказуемость последствий смешения белковых препаратов различных партий наработки. Естественно, что достоверность результатов проводимых с такого рода препаратами биохимических, а тем более медико-биологических исследований представляется более чем дискуссионной.

Ввиду широкого разнообразия белковых структур возможность выработки какой-либо универсальной стратегии сохранения белковых препаратов представляется маловероятной [11]. Однако понимание молекулярных механизмов автоповреждения белков позволяет обосновать ряд методических подходов, основанных на стабилизации исходной конформации белка, предотвращении тесного межбелкового

контакта и подавлении нежелательных химических реакций. Выбор тех или иных методов и их применение как по отдельности, так и в комплексе, представляет собой важную практическую задачу, решаемую соответственно с индивидуальными особенностями того или иного белка. Так, весьма эффективный подход к решению проблемы стабилизации белковых препаратов состоит в использовании разного рода наполнителей, препятствующих межбелковому контакту, обеспечивающих молекулярное окружение, в той или иной мере имитирующее нативное, и блокирующих протекание нежелательных химических реакций. В качестве наполнителей обычно используют гидрофильные соединения полимерной [15,28,29] или углеводной природы [30]. В ряду наполнителей углеводной природы особую внимания заслуживает трегалоза, значительно превосходящая многие углеводы по гидратному объему и, как следствие, способности обеспечения требуемого эффекта разбавления [30]. Присутствие в сформированном стеклообразном матриксе молекул воды не только способствует имитации нативного окружения белковой молекулы, но и подавляет формирование ковалентных связей, обусловленных переамидированием остатков аспарагина и глутамина [19]. Схожий протекторный эффект достигается формированием белок-содержащих гелевых композиций на основе хитозана — деацилированного производного хитина [31]. Наравне с достигаемой защитой от межбелковой конъюгации, немаловажное достоинство белок-содержащих гелевых линейных и поперечно-сшитых структур состоит в регулируемости скорости высвобождения белка в раствор, позволяющее получать медикаментозные препараты с различной динамикой поступления в организм активной белковой составляющей [32].

Использование солей-стабилизаторов относится к традиционным подходам увеличения сохранности белковых препаратов [33]. Не менее эффективный подход основан на увеличении термодинамической стабильности белковой молекулы вследствие связывания ею комплекментарных лигандов [34]. Так, препараты плазминогена человека лиофилизируют из буферных систем,

содержащих лизин — лиганд лизин-связывающих участков плазминогена, препараты же лизоцима эффективно стабилизируют этиловым эфиром аргинина [35]. По-видимому, существенный запас стабильности многих белковых препаратов заключен в возможности их применения в форме проформ (проферментов, профакторов и т.п.), как правило значительно более устойчивых, чем активированные белки [36].

Блокирование химических реакций формирования новых меж- и внутрибелковых ковалентных сшивок составляет важнейшее условие стабилизации белковых препаратов. Так, S-алкилирование Cys-34 альбумина эффективно препятствует тиол-дисульфидному обмену и стабилизирует белок, хранимый при высокой температуре и влажности, а также транспортируемый в составе полимерных матриксов [11,15,28]. Поскольку ионогенные группы сохраняют ионизированное состояние после лиофилизации белка, то протонированное состояние тиоловых групп эффективно блокирует реакцию тиол-дисульфидного обмена [15,16,37]. Для белков, не содержащих свободных тиолов, но подверженных  $\beta$ -элиминированию с последующим дисульфидным обменом, понижение pH раствора перед лиофилизацией уменьшает вероятность обоих процессов, существенно повышая стабильность лиофилизированного препарата. Окисление свободных тиолов достигается введением в раствор каталитических количеств ионов меди [38]. Особую группу подходов составляют реакции, направленные на блокирование процессов, инициируемых альдегидными группами. Вопрос стабилизации формируемых белковых препаратов со всей остротой встал при разработке методов получения токсоеидов — используемых для получения одноразовых вакцин химически модифицированных производных соответствующих токсинов [39, 40]. Сукцинирование остатков лизина эффективно предотвращало влагоиндуцируемую агрегацию формируемых дифтерийного и столбнячного токсоеидов [39,40]. Стабилизирующий эффект достигался и при введении в препарат малых количеств сорбитола, блокировавшего реакционную способность

шиффовых оснований, а также при восстановлении лабильных связей цианборгидридом [11, 39]. Восстановление реакционноспособных ненасыщенных связей давно и успешно применяется в методах иммуноферментного анализа [41] и, по-видимому, целесообразно и для случая иммобилизации ферментов в стандартной системе белок-носитель — глутаровый альдегид [42,43].

С другой стороны, химическая модификация отдельных аминокислотных остатков не может не оказывать влияния на конформацию белка, обуславливая тем самым возможность формирования новых ковалентных внутри- и межмолекулярных связей. То же формилирование столбнячного и дифтерийного токсинов инициирует агрегацию

белка с образованием отличающихся между собой по стабильности и реакционной способности ковалентных связей [39,44]. Исследование молекулярных механизмов образования иницируемых формальдегидом химических связей показало как зависимость динамики процесса от степени гидратированности препаратов, так и участие в этом процессе промежуточных высоко-реакционных Шиффовых оснований [39]. По-видимому, схожими процессами обусловлена и относительно быстрая инактивация ферментов, иммобилизованных на поверхности биосенсорных датчиков в системе сывороточный альбумин — глутаровый альдегид [42,43], равно как и неудачные попытки затормозить агрегацию белка введением в

препарат глюкозы или глицерина: вместо ожидавшегося торможения скорость агрегации резко возросла [33]. Последние явления хорошо объяснимы таутомерией глюкозы и способностью глицерина образовывать примеси альдегидов, что обосновывает целесообразность использования в качестве наполнителей ди- и олигосахаридов.

Суммируя изложенный материал, можно заключить, что проблемы, обусловленные автоповреждением белковых препаратов, выходят далеко за рамки биотехнологии и медицины и требуют для своего успешного разрешения как понимания механизмов молекулярных трансформаций, так и учета структурных особенностей каждого конкретного белка.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schellekens H., Casadevall N. Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences // *J.Neurol.* — 2004. — 251, Suppl 2: II. — P.4-9.
2. MacLennan S., Barbara J. Risks and side effects of therapy with plasma and plasma fractions // *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* — 2006. — 19, N 1. — P.169-189.
3. Harlow E., Lane D. Immunization / in: *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. — P.53-137.
4. Скок М.В., Денисюк П.В., Комиссаренко С.В. Некоторые физико-химические свойства нативного и полимеризованного глутаровым альдегидом цитохрома с миокарда лошади // *Укр.биохим.журн.* — 1982. — 54, № 5 — С.497-501.
5. Скок М.В., Комиссаренко С.В., Васильева Г.А., Федорова Н.Е., Евстигнеева Р.П. Радиоиммунологический анализ цитохрома с лошади. Локализация антигенных детерминант // *ДАН СССР.* — 1983. — 270, № 5. — С.1259-1264.
6. Persaud D., Barranco-Mendoza A. Bovine serum albumin and insulin-dependent diabetes mellitus. Is cow's milk still a possible toxicological agent of diabetes // *Food and Chem.Toxicol.* — 2004. — 42, N 5. — P.707-714.
7. Демченко А.П. Люминисценция и динамика структуры белков. — Киев: "Наукова думка", 1988. — 280 с.
8. Gomme P., Tatford O., Johnson A., Bertolini I. Investigating the effect of pumping on plasma products // *Plasma product Biotechnology Meeting*, May 9th-12th, 2005, Crete, Greece. — P.29.
9. Karlsson G. Pasteurization of antithrombin without generation of the prelatent form of antithrombin // *Protein Expression and Purification.* — 2004. — 35, N 2. — P.381-386.
10. Carrell R., Stein P., Fermi G., Wardell M. Biological implication of a 3? structure of dimeric antithrombin // *Structure.* — 1994. — 2, N 4. — P.257-270.
11. Костантино Г.Р., Швендеман С.Р., Лангер Р., Клибанов А.М. Повреждение препаратов лиофилизированных белков // *Биохимия.* — 1998. — 63, № 3. — С.422-429.
12. Griebenow K., Klivanov A. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — 92, N 24. — P.10969-10976.
13. Strickley R., Anderson B. Solid-state stability of human insulin. II. Effect of water on reactive intermediate partitioning in lyophilized from pH 2-5 solutions: stabilization against covalent dimer formation // *Pharm.Sci.* — 1997. — 86, N 6. — P.645-653.
14. Brande J., Hallund O., Sorensen E. Chemical stability of insulin. 5. Isolation, characterization and identification of insulin transformation products // *Acta Pharm.Nord.* — 1992. — 4, N 4. — P.223-232.
15. Liu W., Langer R., Klivanov A. // *Biotech.Bioeng.* — 1991. — 37. — P.177-184.
16. Costantino H., Langer R., Klivanov A. Aggregation of a lyophilized pharmaceutical protein, recombinant human albumin: effect of moisture and stabilization by excipients // *Biotechnology.* — 1995. — 13, N 5. — P.493-496.
17. Townsend M., DeLuca P. Nature of aggregates formed during storage of freeze-dried ribonuclease A // *J.Pharm.Sci.* — 1991. — 80, N 1. — P.63-66.
18. Hageman M., Bauer J., Possert P., Darrington R. Preformulation studies oriented toward sustained delivery of recombinant somatotropins // *J. Agric. Food. Chem.* — 1992. — 40. — P.348-355.
19. Strickley R., Anderson B. Solid-state stability of human insulin. I. Mechanism and the effect of water on the kinetics of degradation in lyophiles from pH 2-5 solutions // *Pharm.Res.* — 1996. — 13, N 8. — P.1142-1153.
20. Hageman M.J. (1992) in: *Stability of Protein Pharmaceuticals. Part A. Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation* (Ahern, T.J., Manning M.C., eds.), Plenum Press, N.Y. — P.273-309.
21. Wallen P., Wiman B. Characterization of human plasminogen. I. On the relationship between different molecular forms and found in purified preparations // *Bochem. Biophys. Acta.* — 1970. — 221, N 1. — P.20-30.
22. Sottrup-Jensen L., Claes H., Zajdel M., Petersen T., Magnusson S. The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and one "mini-plasminogen" (M.W. 38000) by elastase catalyzed specific limited proteolysis. / In: *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis* (Davidson V.F., Rowan R.H., Samama M.M., Desnoyers D.C. eds.), 1978, V. 3, p.191-209, Raven Press, N. — Y.
23. Chang J., Li L., Canals F., Aviles F. The unfolding pathway and conformational stability of potato carboxypeptidase inhibitor // *J.Biol.Chem.* — 2000. — 275, N 19. — P.14205-14211.
24. Marti-Renom M.A., Stote R., Querol E., Aviles F., Karpus M. Structures of scrambled disulfide forms of the potato carboxypeptidase inhibitor predicted by molecular dynamics stimulations

- with constrains // *Proteins*. — 2000. — 40, N 3. — P.482-493.
25. Угарова Т.П., Михайловская Л.И., Горнищкая О.В. Агрегация молекул фибриногена в растворе // *Укр.биохим.журн.* — 1987. — 59, N 2. — С.9-17.
  26. Koga T., Taguchi K., Kogiso M., Kobuke Y., Kinoshita T., Higuchi M. Amyloid formation of native folded protein induced by peptide-based draft copolymer // *FEBS Lett.* — 2002. — 531, N 2. — P.137-140.
  27. Hua Q., Weiss M. Mechanism of insulin fibrillation // *J.Biol.Chem.* — 2004. — 279, N 20. — P.21415-21420.
  28. Costantino H., Shieh L., Klibanov A., Langer R. // *J.Control.Release.* — 1997. — 44. — P.255-261.
  29. Crofts G., Park T. Stability and release of bovine serum albumin encapsulated with poly(D,L-lactice-co-glycolide) microparticles // *J.Control.Release.* — 1997. — 44. — P.123-134.
  30. Sola-Penna M., Meyer-Fernandes J. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars // *Arch.Biochem.Biophys.* — 1998. — 360, N 1. — P.10-14.
  31. Kofuji K., Akamine H., Oshirabe H., et al. Retention and release behavior of insulin in chitosan gel beads // *J.Biomater.Sci.Polym.Ed.* — 2003. — 14, N 11. — P.1243-1253.
  32. Платэ Н.А., Валуев Л.И., Ульянова М.В. и др. Твердое инсулинсодержащее лекарственное средство // Патент Российской Федерации RU N 02117488 МКИ 6 A61K 38/28.
  33. Brande J., Landkjaer L. Chemical stability of insulin. 3. Influence of excipients, formulation, and pH // *Acta Pharm. Nord.* — 1992. — 4, N 3. — P.149-158.
  34. Novochatny V., Kudinov S., Privalov P. Domains of human plasminogen // *J.Mol.Biol.* — 1984. — 179, N 2. — P.215-232.
  35. Shiraki K., Kudou M., Nishikori S., et al. Arginine ethyl ester prevents thermal inactivation and aggregation of lysocyme // *Eur.J.Biochem.* — 2004. — 271, N 15. — P.3242-3247.
  36. Верьовка С.В. Спосіб перорального введення лікарських препаратів поліпептидної та білкової природи // Патент України N 66051A UA 7 A61 K 38/00, A61 K 47/30.
  37. Costantino H., Griebenow K., Mishra P., Langer R., Klibanov A. Fourier-transform infrared spectroscopic investigation of protein stability in the lyophilized form // *Biochim.Biophys.Acta.* — 1995. — 1253, N 1. — P.69-74.
  38. Costantino H., Langer R., Klibanov A. Moisture-induced aggregation of lyophilized insulin // *Pharm.Res.* — 1994. — 11, N 1. — P.21-29.
  39. Schwendeman S., Costantino H., Gupta R., Siber G., Klibanov A., Langer R. Stabilization of tetanus and diphtheria toxoids against moisture-induced aggregation. // *Proc.Natl.Acad. Sci. USA.* — 1995. — 92, N 24. — P.11234-11238.
  40. Schwendeman S., Costantino H., Gupta R., et al. Strategies for stabilising tetanus toxoid towards the development of a single-dose tetanus vaccine // *Dev.Biol.Stand.* — 1996. — 87. — P.293-306.
  41. Nakane P., Kawaoi A. Peroxydase labeled antibody. A new method of conjugation // *J.Histochem.Cytochem.* — 1974. — 22, N 12. — P.1084-1091.
  42. Shul'ga A., Sandrovsky A., Strikha V., Soldatkin A., Starodub N., El'skaya A. Overall characterization of ISFET-based glucose biosensor // *Sensors and Actuators B.* — 1992. — 10. — P.41-46.
  43. Royard S., Gorchkov D., Jdanova A., Jaffrezic-Renault N., Mertelet C., Soldatkin A., El'skaya A. Performance of urea-sensitive enzyme field effect transistors: influence of the storage conditions // *C.R.Acad.Sci.* — 1996. — 319, N 4. — P.257-262.
  44. Costantino H., Schwendeman S., Griebenow K., Klibanov A., Langer R. The secondary structure and aggregation of lyophilized tetanus toxoid. // *J.Pharm.Sci.* — 1996. — 85, N 12. — P.1290-1293.

*М.В.Шевель, С.В. Верьовка*

#### **АВТОУШКОДЖЕННЯ БІЛКОВИХ ПРЕПАРАТІВ: МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ТА ШЛЯХИ ЇХ ЗАПОБІГАННЯ**

Наведено узагальнені та систематизовані дані про молекулярні механізми автоушкодження білкових препаратів, зумовлені переходом зворотньої денатурації у незворотню внаслідок формування нових внутрішньо- та міжмолекулярних ковалентних зв'язків. Розглянуто практичні наслідки формування подібного роду домішок та шляхи запобігання їм.

*М.В.Шевель, С.В.Веревка*

#### **AUTODAMAGE OF PROTEIN PREPARATIONS: MOLECULAR MECHANISMS AND APPROACHES FOR PREVENTION**

The data on molecular mechanisms of protein autodamage upon keeping them in non-physiological conditions are represented. Practical consequences of these transformations as well as approaches for their prevention are discussed.