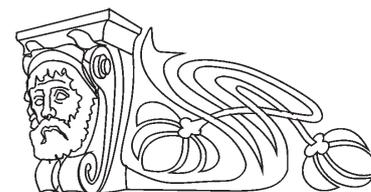




УДК 547.964.4

Комплексообразование производных полимиксина В₁ с гепарином

В. В. Шалыгина, Е. Н. Власова, Е. П. Ананьева, С. В. Гурина



Шалыгина Виолетта Владимировна, кандидат химических наук, младший научный сотрудник лаборатории гидрофильных полимеров, Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, shalygina@hq.macro.ru

Власова Елена Николаевна, научный сотрудник лаборатории спектроскопии полимеров, Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Lab7<spectra@imc.macro.ru

Ананьева Елена Петровна, кандидат биологических наук, заведующий кафедрой микробиологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, elena.ananieva@pharminnotech.com

Гурина Светлана Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, svetlana.gurina@pharminnotech.com

Методом соосаждения в водных растворах при нейтральном значении pH изучено взаимодействие производных полимиксина В₁ с гепарином натрия. Проведено их сравнение с исходным немодифицированным антибиотиком, и с исходным антибиотиком в растворе соответствующего, ковалентно с ним несвязанного, полимера. Установлено, что для немодифицированного антибиотика интенсивное осаждение наблюдается при 10-кратном молярном избытке пептида по основанию (предполагаемый моль гепарина 12 000–16 000; полимиксина В₁ основания – 1150), температуре 37 °С и низкой ионной силе раствора. Обнаружено, что для исследованных производных, полученных путем модификации полимиксина В₁ по аминокетам синтетическими водорастворимыми полимерами, количество осадка при одинаковом значении pH и ионной силе при любых соотношениях пептид – гепаринат натрия существенно меньше и не зависит от температуры эксперимента. Методом ИК-спектроскопии подтверждено, что в комплексообразовании участвуют как карбоксильные, так и сульфамидные группы гепарина. Выявлены различия в характере взаимодействия гепарината натрия с исходным пептидом и его производными. Наблюдаемая более низкая аффинность связывания гепарином производных полимиксина В₁ по сравнению с исходным антибиотиком, по-видимому, обусловлена снижением плотности локализации положительного заряда в их молекуле в результате модификации по -NH₂ группам.

Ключевые слова: гепаринат натрия, пептиды, полимиксин В₁, химическая модификация, гепарин-индуцированный осадок.

Поступила в редакцию: 04.12.2019 / Принята: 25.12.2019 / Опубликовано: 01.06.2020

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-2-157-162>

Введение

Полимиксины составляют большую группу полипептидных антибиотиков с молекулярной массой около 1000, продуцируемых штаммами *Bacillus polymyxa* и родственными микроорганизмами [1]. Полимиксины довольно токсичны и поэтому применяются лишь ограниченно при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными микроорганизмами с множественной устойчивостью к другим классам антибиотиков [2–5].

Однако за последние десятилетия накоплен значительный положительный опыт по синтезу их искусственных аналогов и химической модификации свободных аминокетам данных пептидов различными химическими реагентами. Отмечаются различные положительные изменения в биологических и в физико-химических свойствах модифицированных антибиотиков по сравнению с исходной субстанцией [6, 7].

Ранее нами также сообщалось об изменениях в физико-химических свойствах, антимикробной активности и токсичности у полимиксина В₁, модифицированного некоторыми синтетическими растворимыми полимерами [8]. В настоящей работе изучено взаимодействие полимиксина В₁ и его конъюгатов полимер–антибиотик с гепарином, полианионным полисахаридом используемым в медицине в качестве антикоагулянта прямого действия [9].

Материалы и методы

В качестве источника гепарина использовали его тетранатриевую соль (Na₄Hep), выделенную из фармацевтического препарата для инъекций (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) и дополнительно очищенную от сопутствующих низкомолекулярных добавок методом гелефильтрации на колонне с Сефадекс G-10 и лиофильно высушенную.

В качестве исследуемых образцов использовали сульфат полимиксина В₁ (кат. № ALX-380-040-G005, Enzo Life Sciences, Switzerland) и его конъюгаты с водорастворимым сополимером винилового спирта и содержанием ПМВ₁ – основания 20 мас.% (I), и полиглутаровым альдегидом (II) с содержанием ПМВ₁ – основания 30 мас.% [10, 11].



Исследования проводили методом соосаждения при температурах 20° С и 37° С [12]. Ионную силу растворов устанавливали с помощью хлорида натрия. Скорость и степень преципитации контролировали спектрофотометрически по увеличению рассеяния света при длине волны 350 нм.

ИК-спектры комплексов снимали на спектрометре «Vertex-70» фирмы «Bruker» с применением микроприставки однократно нарушенного полного внутреннего отражения «Pike» (призма с углом 45° из материала ZnSe). При регистрации спектров нарушенного полного внутреннего отражения вводили поправку, учитывающую глубину проникновения излучения в зависимости от длины волны.

Результаты и их обсуждение

Известно, что взаимодействие гепарина с белками и пептидами может сопровождаться образованием только растворимых комплексов, равновесно сосуществующих с исходными реагентами; растворимых комплексов, осаждающихся при изменении физических факторов среды (напри-

мер, при понижении температуры среды); либо нерастворимых комплексов (преципитатов) [13].

В экспериментах с сульфатом полимиксина В₁ максимальное рассеяние света во всех экспериментальных условиях развивалось уже в течение первых 20–30 минут. Гепарин-индуцированный осадок представлял собой хорошо различимые и крупные дискретные частицы. Массовое соотношение компонентов в самостоятельно выпавшем, промытом и высушенном комплексе составило 1:1. Как видно из данных, приведенных на рис. 1, а, б, для исходного антибиотика интенсивность образования нерастворимого комплекса прямо пропорциональна концентрации препарата по основанию и достигает насыщения при его содержании 400–500 мкг/мл. Изменение температуры реагирующей системы с 20 до 37° С приводит к резкому увеличению скорости осаждения комплекса ПМВ₁-гепарин. Ионная сила раствора оказывает противоположное влияние на этот процесс. При повышении ионной силы раствора количество нерастворимого осадка значительно снижается.

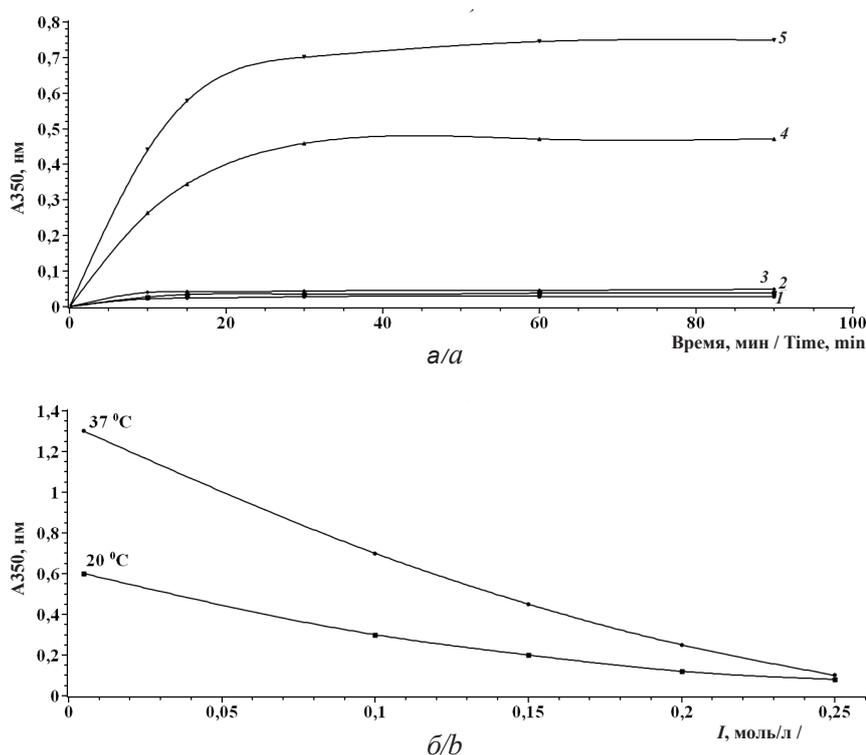


Рис. 1. Зависимость интенсивности осаждения комплекса ПМВ₁ – Na₄Геп: а – от концентрации пептида по основанию (1 – 50, 2 – 100, 3 – 150, 4 – 300, 5 – 500 мкг/мл, I = 0,005 моль/л, pH = 6,87,2, T = 20° С); б – от температуры и ионной силы раствора (C_{ПМВ1} = 250 мкг/мл, C_{Геп} = 50 мкг/мл, pH = 6,8–7,2)

Fig. 1. Dependence of the precipitation intensity of the polymyxin B₁ – Na₄Hep complex: а – on the base peptide concentration (1 – 50, 2 – 100, 3 – 150, 4 – 300, 5 – 500 µg/ml, I = 0.005 mol/L, pH = 6.87.2, T = 20° С); б – on the temperature and ionic strength of the solution (S_{ПМВ1} = 250 µg / ml, S_{Геп} = 50 µg/ml, pH = 6.8–7.2)



Дальнейшие исследования конъюгатов полимиксина В₁ и полимиксина В₁ в присутствии свободных полимеров типа I и II проводили в дистиллированной воде с рН = 6,8–7,2 при concentra-

ции пептида по основанию – 250 мкг/мл, концентрации гепарината натрия – 50 мкг/мл. Результаты сравнительных измерений, выполненные при различных температурах, представлены на рис. 2, а, б.

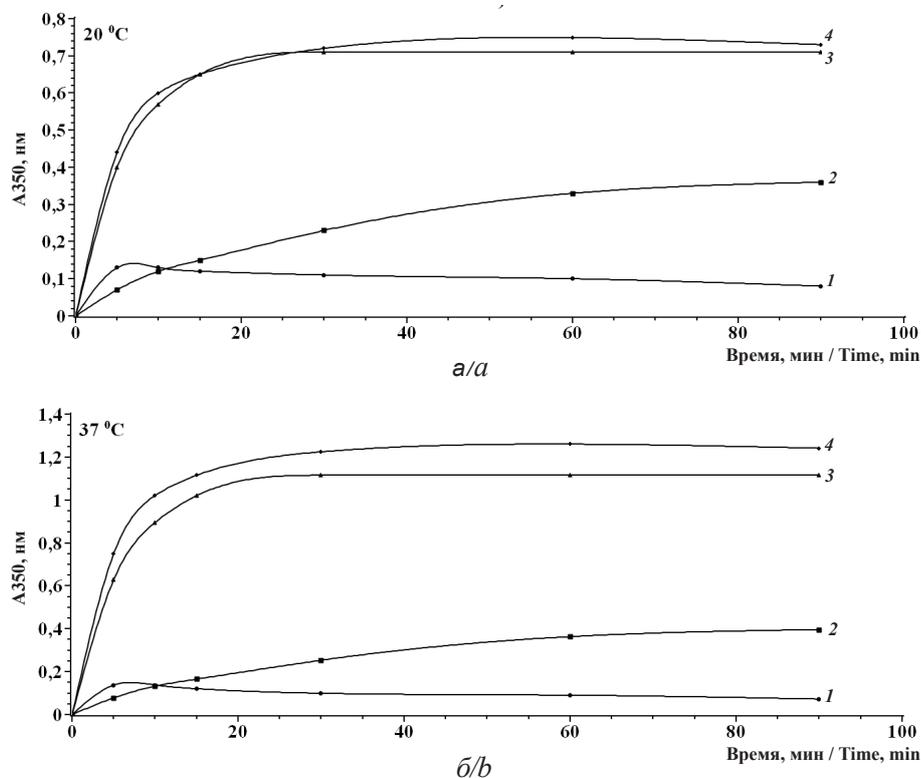


Рис. 2. Интенсивность осаждения комплексов с Na₄Hep во времени при различных температурах: а – 20° С, б – 37° С. Условия в тексте. 1 – соединение II, 2 – соединение I, 3 – ПМВ₁ в присутствии полимера типа II, 4 – ПМВ₁ в присутствии полимера типа I
Fig. 2. The intensity of precipitation of complexes with Na₄Hep in time at various temperatures: а – 20° С, б – 37° С. Conditions in the text. 1 – compound II, 2 – compound I, 3 – polymyxin B₁ in the presence of a type II polymer, 4 – polymyxin B₁ in the presence of a type I polymer

Как видно из полученных данных, ни водорастворимый поливиниловый спирт (полимер типа I), ни восстановленный полиглутаровый альдегид (полимер типа II) соосаждителями для полимиксина В₁ не являются и не препятствуют его взаимодействию с гепарином натрия. Концентрационные, временные и температурные зависимости в присутствии данных полимеров идентичны исходному антибиотику. Однако ковалентное присоединение полимеров к аминокетогруппам полипептида оказывает значительное влияние на процесс его взаимодействия с гепарином натрия. Комплексообразование Na₄Hep с производным I протекает медленнее и менее интенсивно по сравнению с исходным ПМВ₁, не зависит от температуры эксперимента, образовавшиеся микрочастицы комплекса долго остаются во взвешенном состоянии, самосто-

ятельно не оседая. Соединение II реагирует с Na₄Hep быстрее, образуя коллоидный раствор, в котором не различаются отдельные дискретные частицы. Процесс также не зависит от температуры эксперимента. При повышении ионной силы раствора уже до 0,1 моль/л помутнение в реакционной смеси визуально не наблюдается.

Влияние концентрации полианиона во всех случаях (рис. 3) носит экстремальный характер, достигая максимума осаждения при массовом соотношении поликатион : полианион = 1:1. При значительном избытке полианиона в реагирующей системе преобладает образование растворимых комплексов.

Для выявления характера взаимодействий между гепарином и ПМВ₁ и его производными комплексы были выделены в твердом виде и ис-

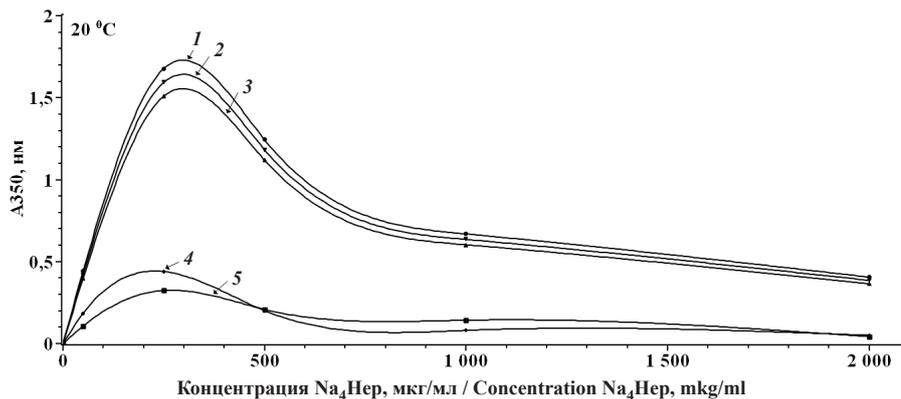


Рис. 3. Зависимость интенсивности осаждения комплексов от концентрации Na_4Hep : 1 – PMV_1 , 2 – PMV_1 + полимер I, 3 – PMV_1 + полимер II, 4 – соединение I, 5 – соединение II
Fig. 3. Dependence of the precipitation intensity of the complexes on the concentration of Na_4Hep : 1 – polymyxin B₁, 2 – polymyxin B₁ + polymer I, 3 – polymyxin B₁ + polymer II, 4 – compound I, 5 – compound II

следованы методом ИК-спектроскопии. Комплекс $\text{PMV}_1 - \text{Na}_4\text{Hep}$ осаждали из дистиллированной воды при концентрациях пептида и Na_4Hep в растворе 500 мкг/мл. Реакционную смесь выдерживали в течение 120 мин при комнатной температуре до полного осаждения частиц, осадок отфильтровывали, промывали дистиллированной водой и лиофильно высушивали. Комплекс $\text{PMV}_1 - \text{соединение I}$ выделяли из реакционной смеси, содержащей 2000 мкг/мл соединения I (400 мкг/мл по основанию) и 400 мкг/мл Na_4Hep . Реакционную смесь выдерживали в течение 120 мин при комнатной температуре, охлаждали и центрифугировали, надосадочную жидкость осторожно удаляли и осадок лиофильно высушивали. Комплекс $\text{PMV}_1 - \text{соединение II}$ выделяли из реакционной смеси, содержащей 1500 мкг/мл соединения II (450 мкг/мл по основанию) и 450 мкг/мл Na_4Hep . Реакционную смесь выдер-

живали в течение 120 мин при комнатной температуре, замораживали и лиофильно высушивали.

Из спектров комплексов методом прямого вычитания спектров сульфата PMV_1 и его конъюгатов получали разностный спектр входящей в состав комплекса натриевой соли гепарина и сравнивали его со спектром чистого Na_4Hep (рис. 4). Для идентификации взаимодействия использовали основные характеристические полосы гепарина: 1610 и 1415 cm^{-1} – валентные асимметричные и симметричные колебания связи C=O в карбоксилатной группе; 1220 и 1150 cm^{-1} – асимметричные и симметричные валентные колебаниям связи O=S=O сульфамидной группы; максимум при 989 cm^{-1} соответствует валентным асимметричным колебаниям связи C-O-C (простой эфир); слабые полосы поглощения в области 910 и 800 cm^{-1} принадлежат асимметричным и симметричным валентным колебаниям связи S-O-C.

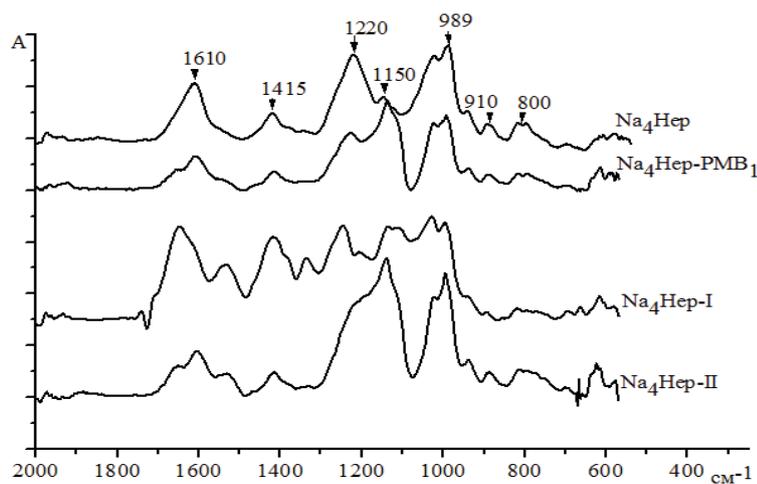


Рис. 4. ИК-спектры чистого гепарината натрия и в составе комплексов
Fig. 4. IR spectra of pure sodium heparinate and as part of complexes



Как видно из рис. 4, разностный спектр гепарината натрия, входящего в состав комплексов, носит индивидуальный характер и отличается от ИК-спектра исходной соли. Наблюдается смещение и изменение интенсивности полос поглощения всех функциональных групп – COONa, -SO₃H, -NSO₃H гепарината натрия.

Таким образом, присоединенные к пептиду гидроксилсодержащие полимеры не исключили полностью взаимодействие между активными центрами модифицированного антибиотика и гепарина, но значительно его ослабили.

Результаты, полученные в рамках настоящего исследования, наряду с другими известными в этой области исследованиями, подтверждают возможность сохранения антимикробной активности антибиотиков – полипептидов при их химической модификации по аминокетам с одновременным изменением их биологических и физико-химических свойств и могут быть использованы в дальнейших исследованиях по их совершенствованию.

Список литературы

1. Антибиотики-полипептиды : Структура, функция и биосинтез / под ред. Н. С. Егорова. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1987. 264 с.
2. Щетинин Е. В. Полимиксины – новый взгляд на известные антибиотики // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2, № 3. С. 68–73.
3. Nation R. L., Li J., Cars O., Couet W., Dudley M. N., Kaye K. S., Mouton J. W., Paterson D. L., Tam V. N., Theuretzbacher U., Tsuji B. T., Turnidge J. D. Framework for optimization of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus // Lancet Infect. Dis. 2015. Vol. 15, № 2. P. 225–234. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70850-3
4. Zakuan Z. D., Suresh K. Rational use of intravenous polymyxin B and colistin: A review // Med. J. Malaysia. 2018. Vol. 73, № 5. P. 351–359.
5. Tsuji B. T., Poque J. M., Zavascki A. P., Paul M., Daikos G. L., Forrest A., Giacobbe D. R., Viscogli C., Giamarellou H., Karaiskos I., Kaye D., Mouton J. W., Tam V. H., Thamilkittul V., Wunderink R. G., Li J., Nation R. L., Kaye K. S. International Consensus Guidelines for the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti – infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP) // Pharmacotherapy. 2019. Vol. 39, № 1. P. 10–39. DOI: 10.1002/phar.2209
6. Birkenmeier G., Nicklisch S., Pockelt C., Mossie A., Steger V., Glaser C., Hauschildt S., Usbeck E., Huse K., Sack U., Bauer M., Schafer A. Polymyxin B – Conjugated α₂-Macroglobulin as an Adjunctive Therapy to Sepsis: Modes of Action and Impact on Lethality // J. Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2006. Vol. 318, № 2. P. 762–771. DOI: 10.1124/jpet.106.104265
7. Zhao J., Cheah S-E., Roberts K. D., Nation R. L., Thompson P. E., Velkov T., Du Z., Johnson M. D., Li J. Transcriptional analysis of the activity of a novel polymyxin against *Staphylococcus aureus* // mSphere. 2016. Vol. 1, № 4. P. e00119-16. DOI: 10.1128/mSphere.00119-16
8. Ананьева Е. П., Гайдукова В. А., Каравалева А. В., Шалыгина В. В. Сравнительная оценка антимикробной активности полимерных конъюгатов полимиксина В₁ // Проблемы медицинской микологии. 2018. Т. 20, № 2. С. 47–48.
9. Mulloy B., Hogwood J., Gray E., Lever R., Page C.P. Pharmacology of Heparin and Related Drugs // Pharmacol. Rev. 2016. Vol. 68, № 1. P. 76–141. DOI: 10.1124/pr.115.011247
10. Шалыгина В. В., Власова Е. Н., Гайдукова В. А., Ананьева Е. П., Панарин Е. Ф. Модификация полимиксина В₁ водорастворимыми функциональными сополимерами винилового спирта // Журнал общей химии. 2018. Т. 88, № 6. С. 1014–1019. DOI: 10.1134/S1070363218060233
11. Шалыгина В. В., Власова Е. Н., Ананьева Е. П., Гайдукова В. А. Синтез, физико-химические свойства и противомикробная активность конъюгатов полимиксина В₁ с полиглутаровым альдегидом // Хим.- фарм. журн. 2019. Т. 52, № 2. С. 42–46. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-2-42-46
12. Stathakis N. E., Mosesson M. W. Interactions among Heparin, Cold – Insoluble Globulin, and Fibrinogen in Formation of the Heparin – Precipitable Fraction of Plasma // J. Clin. Invest. 1977. Vol. 60, № 4. P. 855–865. DOI: 10.1172/JCI108840
13. Conrad H. E. Heparin – Binding Proteins. San-Diego : Academic Press, 1998. 553 p.

Образец для цитирования:

Шалыгина В. В., Власова Е. Н., Ананьева Е. П., Гурина С. В. Комплексообразование производных полимиксина В₁ с гепарином // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2020. Т. 20, вып. 2. С. 157–162. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-2-157-162>



Complexation of Polymyxin B₁ Derivatives with Heparin

V. V. Shalygina, E. N. Vlasova, E. P. Anan'eva, S. V. Gurina

Violetta V. Shalygina, <https://orcid.org/0000-0001-5511-1398>, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, 31 Bolshoy pr., Saint Petersburg 199004, Russia, shalygina@hq.macro.ru

Elena N. Vlasova, <https://orcid.org/0000-0002-4644-0445>, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, 31 Bolshoy pr., Saint Petersburg 199004, Russia, Lab7<spectra@imc.macro.ru

Elena P. Anan'eva, Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, 14 Professor Popov St., Saint Petersburg 197376, Russia, elena.ananieva@pharminnotech.com

Svetlana V. Gurina, Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, 14 Professor Popov St., Saint Petersburg 197376, Russia, svetlana.gurina@pharminnotech.com

The method of coprecipitation from aqueous solutions at a neutral pH value was used to study the interaction of polymyxin B₁ derivatives with sodium heparinate. They were compared with the initial unmodified antibiotic and with the initial antibiotic in a solution of the corresponding polymer, covalently unbound with it. It was observed that intense precipitation for an unmodified antibiotic took place at a 10-fold molar excess of the peptide by the base (the expected mole of heparin is 12000–16000, polymyxin B₁ base – 1150), the temperature of 37° C and the low ionic strength of the solution. It was found that for the examined derivatives obtained by modifying polymyxin B₁ at amino groups with synthetic water-soluble polymers, the amount of precipitate at the same pH level and ionic strength at any peptide-sodium heparinate ratios was significantly less and did not depend on the temperature during the experiment. Using IR spectroscopy it was confirmed that both carboxyl and sulfamide groups of heparin were involved in complexation. Differences in the nature of the interaction of sodium heparinate with the initial peptide and its derivatives were revealed. The observed lower affinity of heparin binding to polymyxin B₁ derivatives compared to the initial antibiotic was apparent due to decrease in the density of positive charge localization in their molecule as a result of modification of -NH₂ groups.

Keywords: sodium heparinate, peptides, polymyxin B₁, chemical modification, heparin-induced precipitate.

Received: 04.12.2019 / Accepted: 25.12.2019 / Published: 01.06.2020

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

References

1. N. S. Egorova, ed. *Antibiotiki-polipeptidy: Struktura, funkciya i biosintez*. [Antibiotics-Polypeptides: Structure, function, and biosynthesis]. Moscow, Izd-vo Mosk. un-ta, 1987. 264 p. (in Russian).
2. Shchetinin E. V. Polymyxins – New Approaches to the old Antimicrobial. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemoterapy*, 2000, vol. 2, no. 3, pp. 68–73 (in Russian).
3. Nation R. L., Li J., Cars O., Couet W., Dudley M. N., Kaye K. S., Mouton J. W., Paterson D. L., Tam V. N., Theuretzbacher U., Tsuji B. T., Turnidge J. D. Framework for optimization of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *Lancet Infect. Dis.*, 2015, vol. 15, no. 2, pp. 225–234. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70850-3
4. Zakuan Z. D., Suresh K. Rational use of intravenous polymyxin B and colistin: A review. *Med. J. Malaysia*, 2018, vol. 73, no. 5, pp. 351–359.
5. Tsuji B. T., Poque J. M., Zavascki A. P., Paul M., Dzikos G. L., Forrest A., Giacobbe D. R., Viscoli C., Giamarelou H., Karaiskos I., Kaye D., Mouton J. W., Tam V. H., Thamlikitkul V., Wunderink R. G., Li J., Nation R. L., Kaye K. S. International Consensus Guidelines for the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti – infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy*, 2019, vol. 39, no. 1, pp. 10–39. DOI: 10.1002/phar.2209
6. Birkenmeier G., Nicklisch S., Pockelt C., Mossie A., Steger V., Glaser C., Hauschildt S., Usbeck E., Huse K., Sack U., Bauer M., Schafer A. Polymyxin B – Conjugated α_2 -Macroglobulin as an Adjunctive Therapy to Sepsis: Modes of Action and Impact on Lethality. *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006, vol. 318, no. 2, pp. 762–771. DOI: 10/1124/jpet.106.104265
7. Zhao J., Cheah S.-E., Roberts K. D., Nation R. L., Thompson P. E., Velkov T., Du Z., Johnson M. D., Li J. Transcriptional analysis of the activity of a novel polymyxin against *Staphylococcus aureus*. *mSphere*, 2016, vol. 1, no. 4, pp. e00119-16. DOI: 10.1128/mSphere.00119-16
8. Anan'eva E. P., Gajdukova V. A., Karavaeva A. V., Shalygina V. V. Comparative evaluation of antimicrobial activity of polymyxin B₁ polymeric conjugates. *J. Problems in Medical Mycology*, 2018, vol. 20, no. 2, pp. 47–48 (in Russian).
9. Mulloy B., Hogwood J., Gray E., Lever R., Page C. P. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. *Pharmacol. Rev.*, 2016, vol. 68, no. 1, pp. 76–141. DOI: 10.1124/pr.115.011247
10. Shalygina V. V., Vlasova E. N., Gaydukova V. A., Anan'eva E. P., Panarin E. F. Modification of Polymyxin B₁ by Water – Soluble Functional Copolymers of Vinyl Alcho. *Russian J. of General Chemistry*, 2018, vol. 88, no. 6, pp. 1194–1198. DOI: 10.1134/S1070363218060233
11. Shalygina V. V., Vlasova E. N., Anan'eva E. P., Gaydukova V. A. Synthesis, physicochemical properties, and antimicrobial activity of polymyxin B₁ conjugates with polyglutaraldehyde. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2019, vol. 53, no. 2, pp. 134–138. DOI: 10.1007/S11094-019-01967-4
12. Stathakis N. E., Mosesson M. W. Interactions among Heparin, Cold – Insoluble Globulin, and Fibrinogen in Formation of the Heparin – Precipitable Fraction of Plasma. *J. Clin. Invest.* 1977, vol. 60, no. 4, pp. 855–865. DOI: 10.1172/JCI108840
13. Conrad H. E. *Heparin – Binding Proteins*. San-Diego, Academic Press, 1998. 553 p.

Cite this article as:

Shalygina V. V., Vlasova E. N., Anan'eva E. P., Gurina S. V. Complexation of Polymyxin B₁ Derivatives with Heparin. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2020, vol. 20, iss. 2, pp. 157–162 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-2-157-162>