



УДК 546.284'397 : 577.112.083 : 543.544

ХЛОРАНГИДРИДСОДЕРЖАЩИЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ НОСИТЕЛИ  
ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ*Иванов А. Е., Жигис Л. С., Чеховских Е. А.,  
Решетов П. Д., Zubov В. П.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Путем прививки сополимеров N-винилпирролидона и акрилоилхлорида на  $\gamma$ -аминопропилсилированное пористое стекло получены хлорангидридсодержащие композиционные носители для связывания биоспецифических лигандов. Сравнением полученных носителей с оксидсодержащими носителями, синтезированными химической модификацией пористого стекла  $\gamma$ -глицидоксипропилтриэтоксисиланом, показано, что использование полимерно-модифицированных носителей позволяет получать сорбенты с меньшей неспецифической адсорбцией белков. Аффинной хроматографией нейраминидазы вируса гриппа с использованием *n*-аминофенилоксамиповой кислоты в качестве лиганда показано, что композиционные носители позволяют получать фермент с более высокой удельной активностью (3–4-кратной) по сравнению с препаратом, полученным на носителе второго типа.

Интенсивное внедрение методов препаративной хроматографии в биотехнологию делает все более актуальной разработку новых хроматографических сорбентов. Наиболее подходящими для осуществления крупномасштабных хроматографических процессов и для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии являются химически модифицированные пористые кремнеземы, обладающие высокой механической прочностью, проницаемостью для макромолекул биополимеров и устойчивостью к действию микроорганизмов и ферментов. Химическая модификация позволяет значительно снизить характерную для кремнезёмов сильную неспецифическую адсорбцию белков и, кроме того, ввести в состав сорбента реакционноспособные группы для закрепления специфического лиганда. Модифицирование обычно проводят путем обработки поверхности кремнезёмов кремнийорганическими реагентами [1, 2]. Одним из самых распространенных реагентов, используемых для этой цели, является  $\gamma$ -глицидоксипропилтриэтоксисилан [3]. Наличие в составе соответствующих носителей реакционноспособных эпокси групп делает возможной иммобилизацию на них как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных соединений [4]. В то же время остаточные эпокси группы можно путем гидролиза в кислой среде легко превратить в диольные [3], образующие на поверхности кремнезёма адсорбционно-инертное по отношению к большинству биополимеров покрытие.

Альтернативным путем модификации поверхности является прививка к ней гидрофильных полимеров [5–7]. Ранее было показано, что прививка сополимеров N-винилпирролидона и акрилоилхлорида на пористое стекло, предварительно модифицированное  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисиланом, позволяет получать сорбенты как для аффинной, так и для гель-проникающей хроматографии биополимеров [8]. В настоящей работе проводится сравнение указанного полимерно-модифицированного носителя с носителем, полученным обработкой стекла  $\gamma$ -глицидоксипропилтриэтоксисиланом, по параметрам удельного содержания реакционноспособных групп, по неспецифической адсорбции белков и эффективности достигаемого аффинно-хроматографического разделения. В качестве объекта для выделения методом аффинной хроматографии была выбрана нейраминидаза

Сокращение: АРОА – *n*-аминофенилоксамиповая кислота.

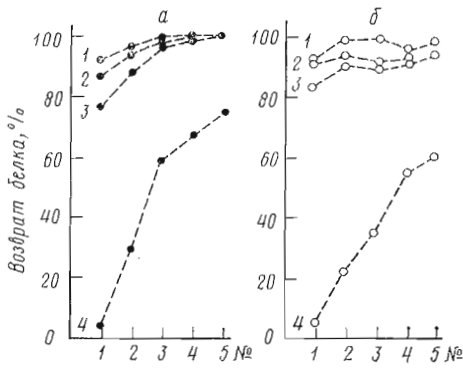


Рис. 1

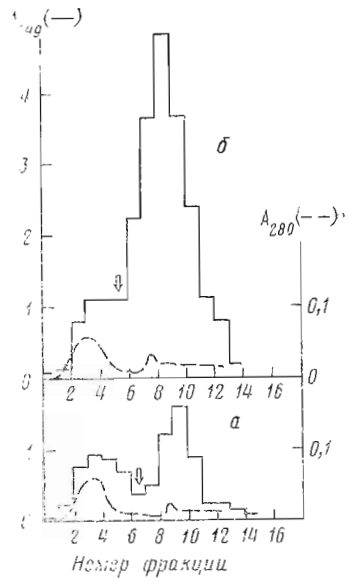


Рис. 2

Рис. 1. Определение неспецифической адсорбции альбумина (а) и химотрипсина (б) на полученных сорбентах: 1 — носитель Б, привитой сополимер с  $M$  35 000; 2 — носитель Б, привитой сополимер с  $M$  7700; 3 — носитель А с привитыми диольными группами; 4 — немодифицированное пористое стекло

Рис. 2. Аффинная хроматография нейраминидазы вируса гриппа В. а — сорбент на основе носителя А; б — сорбент на основе носителя Б. Пунктир —  $A_{280}$ , сплошная линия —  $A_{549}$  (определение нейраминидазной активности по методике [15]). Стрелка указывает на смену буфера (см. «Экспер. часть»)

вируса гриппа, а в качестве биоспецифического лиганда — *n*-аминофенил-оксиминовая кислота, являющаяся ингибитором нейраминидаз и использованная ранее для выделения того же фермента на сефарозе 4В [9]. Оптимизация выделения индивидуальной нейраминидазы представляет собой важную самостоятельную задачу, поскольку этот белок является поверхностным антигеном вируса гриппа и может быть использован для приготовления моноспецифических сывороток и диагностикумов. В связи с этим разработка твердокаркасных аффинных сорбентов для выделения нейраминидазы представляется особенно актуальной.

Синтезированный путем обработки  $\gamma$ -глицидоксипропилтриэтоксисиланом эпоксидный носитель (А) содержал 85 мкмоль эпокси-групп/г носителя, в то время как хлорангидридные носители (Б), полученные в результате прививки сополимеров *N*-винилпирролидона и акрилоилхлорида с молекулярной массой 7700 и 35 000 — соответственно 60 и 160 мкмоль СОСI-групп/г носителя. Результаты испытаний на неспецифическую адсорбцию, проведенные с гидролизованным до диола носителем А и для носителя Б (в форме 2-оксипетиламида), представлены на рис. 1. Как видно, оба варианта химической модификации стекла позволяют значительно снизить неспецифическую адсорбцию белков по сравнению с исходным пористым стеклом. В то же время было найдено, что неспецифическая адсорбция альбумина на носителе, покрытом полимерным модификатором, в несколько раз меньше, чем на носителе с диольными группами (0,1—0,2 мг/г против 0,55 мг/г сорбента). При этом адсорбционные свойства полученных полимерно-модифицированных носителей довольно слабо зависят от молекулярной массы привитого сополимера и соответствующего количества иммобилизованных 2-оксипетиламидных и пирролидоновых групп. Близкие свойства этих носителей свидетельствуют о том, что даже относительно короткие макромолекулы сополимеров *N*-винилпирролидона и акрилоилхлорида, привитые на поверхность аминопропилсилилирован-

ного пористого стекла, способны образовывать адсорбционно-инертное по отношению к белкам покрытие. Это особенно важно для получения сорбентов с порами малого диаметра, так как применение сополимеров с большой молекулярной массой может в этом случае приводить к частичной закупорке пор кремнезема. Как видно из рис. 1, при излучении неспецифической адсорбции хитотрипсина характер взаимного расположения адсорбционных кривых, полученных для носителей А и Б в инертной форме, совпадает с найденным для альбумина. Таким образом, как по отношению к альбумину — кислому белку, так и по отношению к основному хитотрипсину ( $pI=8,8$  [10]) предлагаемый полимерсодержащий носитель Б является более адсорбционно-инертным, чем диольный. Обработка стекла полимером с большей молекулярной массой позволяет получить несколько более инертный носитель, одновременно содержащий и большее количество реакционноспособных групп для иммобилизации лиганда (см. рис. 1). Поэтому в дальнейшей работе был использован сополимер с молекулярной массой 35 000.

В результате иммобилизации АРОА на эпоксидном и хлорангидридном носителях и последующего превращения непрореагировавших реакционноспособных групп в адсорбционно-инертную форму были получены сорбенты, содержащие соответственно 40 и 35 мкмоль АРОА/г сорбента. Результаты аффинной хроматографии гликопротеинов вируса гриппа представлены на рис. 2. Из приведенных данных следует, что, как и предполагалось, при хроматографии смеси гемагглютинаина и нейраминидазы на полученных аффинных сорбентах происходит специфическое связывание нейраминидазы. Характерно, что полнота этого связывания примерно одинакова для обоих сорбентов, так как количество несвязавшегося фермента во фракциях гемагглютинаина 1—6 в обоих случаях составляет 8—12% от исходного. Неполное связывание нейраминидазы вируса гриппа В наблюдалось ранее при аффинной хроматографии на АРОА-глицилглицилтирозин-сефарозе [9].

Следует отметить, что из двух аффинных сорбентов, испытанных в настоящей работе, сорбент на основе носителя А сконструирован так, что между поверхностью кремнезема и иммобилизованным лигандом расположена гидрофильная промежуточная группа длиной в 8 атомов, которая, как указано в работе [11], принципиально необходима для эффективного связывания белка с иммобилизованным лигандом. В то же время в сорбенте, полученном на основе носителя Б, лиганд отделен от полимерной цепи промежуточной группой из двух атомов углерода. Одинаковая полнота связывания нейраминидазы обоими сорбентами при близком содержании лиганда свидетельствует о том, что за счет конформационной подвижности привитых макромолекул полимера остатки АРОА способны образовывать комплексы с ферментом так же прочно, как и остатки АРОА, иммобилизованные на стекле через промежуточную группу силана.

Существенное различие между свойствами двух полученных сорбентов проявилось в активностях препаратов очищенной нейраминидазы. Препарат фермента, полученный на сорбенте, модифицированном привитым сополимером, обладает в 3—4 раза большей активностью, чем препарат, полученный на сорбенте с АРОА, иммобилизованной через эпоксигруппы. Вероятнее всего, это обусловлено относительной «гибкостью» полимерного покрытия, содержащего значительное количество петель привитых макромолекул, экспонированных в раствор и содержащих остатки иммобилизованного ингибитора. Указанная структура привитого полимера была подтверждена специальными экспериментами, показавшими, что при хемосорбции сополимера N-винилпирролидона и акрилоилхлорида с молекулярной массой 35 000 на  $\gamma$ -аминопропилсилилированном стекле отношение количества СОСi-групп, вступивших в реакцию ацилирования, к остаточным СОСi-группам составило 0,08. Можно предположить, что конформационные изменения, происходящие в молекуле фермента при разрушении его комплексов с лигандом в условиях аффинной элюции, будут в большей степени сбалансированы конформационной гибкостью привитых полимерных цепей, чем в случае жесткого закрепления лиганда на остатках си-

лана. В результате десорбированный фермент в большей степени сохраняет свою активность.

Сорбенты, содержащие иммобилизованную на привитом сополимере АРОА, были успешно использованы нами и для выделения очищенных препаратов мембранных гликопротеинов вируса гриппа А (данные не приведены). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что сорбенты на основе пористых кремнезёмов, модифицированных поверхностно-привитыми полимерами, обладают слабой неспецифической адсорбцией белков и способны обеспечивать удовлетворительные выходы разделяемых биополимеров.

### Экспериментальная часть

В работе использовали макропористое стекло МПС-2000 ВГХ отечественного производства.  $\gamma$ -Аминопропилтриэтоксисилан марки АГМ-9 и  $\gamma$ -глицидоксипропилтриэтоксисилан марки ТС-1 отечественного производства перегоняли в вакууме ( $110^\circ\text{C}$ , 1 мм рт. ст.). Моноэтаноламин перегоняли в вакууме ( $71\text{--}73^\circ\text{C}$ , 20 мм рт. ст.). *N*-Винилпирролидон технический перегоняли в вакууме ( $119^\circ\text{C}$ , 2 мм рт. ст.) в присутствии *m*-фенилендиизоцианата. Акрилоилхлорид получали из акриловой кислоты и бензоилхлорида (т. кип.  $72\text{--}74^\circ\text{C}$ ). В работе использовали также кумасси бриллиантовый голубой G-250 (Serva, ФРГ), цетилтриметиламмонийбромид (Sigma, США) и луброл РХ (Sigma, США).

АРОА получали по методике [12], т. пл.  $280^\circ\text{C}$ .

Концентрацию  $\text{NH}_2$ -групп в аминопропилсилилированном стекле определяли с *o*-фталевым диальдегидом так, как описано в работе [8].

Концентрацию эпоксигрупп в носителе А рассчитывали по данным элементного анализа на углерод.

Количество иммобилизованной АРОА находили спектрофотометрически ( $\epsilon_{226} 2300$ ) после растворения навески сорбента в плавиковой кислоте и последующего разбавления дистиллированной водой.

Количество привитых хлорангидридных групп в носителе Б определяли методом потенциометрического титрования  $2,5 \cdot 10^{-2}$  М КОН на рН-метре «рН-340».

Активность нейраминидазы определяли по методике [13].

Концентрацию белка в растворе устанавливали с помощью окрашивающего кумасси бриллиантовым голубым G-250 [14].

*Получение носителей с  $\text{NH}_2$ - и эпоксигруппами* проводили путем обработки макропористого стекла (30 г) 2% раствором соответственно  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана и  $\gamma$ -глицидоксипропилтриэтоксисилана в 200 мл сухого толуола при  $80\text{--}90^\circ\text{C}$  в течение 16 ч. Затем стекло промывали 3-кратными объемами ацетона, воды, ацетона, эфира и сушили 6–8 ч в вакууме при  $150^\circ\text{C}$ . Полученные носители содержали 97 мкмоль/г  $\text{NH}_2$ -группы ( $\text{NH}_2$ -стекло) и 85 мкмоль/г эпоксигруппы (носитель А).

*Сополимеры *N*-винилпирролидона и акрилоилхлорида* получали путем проведения радикальной полимеризации мономеров в диоксане (среднечисленная молекулярная масса ( $M_n$ ) образующегося сополимера 35 000) и в смеси диоксан — четыреххлористый углерод 1 : 1 ( $M_n=7700$ ) при концентрации обоих мономеров 1 М, в токе аргона при  $60^\circ\text{C}$ , инициатор — азобисизобутиронитрил. Реакцию сополимеризации прекращали при 10–15% конверсии мономеров, после чего отгоняли акрилоилхлорид на роторном испарителе. Полученные сополимеры имеют эквивалентное соотношение мономерных звеньев, проявляющих значительную тенденцию к чередованию [15].

Молекулярные массы ( $M_n$ ) сополимеров определяли гель-хроматографией, после обработки сополимеров этаноламином и превращения хлорангидридных групп в 2-оксипетиламидные, на колонке с гелем TSKHW-55F (Toyo Soda, Япония) в системе этиловый спирт — вода, 4 : 1. Калибровку колонки предварительно проводили по этиленгликолевым стандартам (Loba Chemie, Австрия).

*Для синтеза хлорангидридсодержащих носителей (носитель Б)* к 200 мл полученного дегазированного 2–3% раствора сополимера (см. выше) при-

бавляли при перемешивании 30 г сухого  $\text{NH}_2$ -стекла и выдерживали при  $20^\circ\text{C}$  и перемешивании в течение 1 ч, после чего промывали на пористом фильтре 3-кратным объемом диоксана. Количество привитых хлорангидридных групп составляет 160 и 60  $\mu\text{моль/г}$  для сополимеров с  $M_n$  35 000 и 7700 соответственно. Для перевода в инертную форму 30 г носителя А выдерживали 2 ч в 200 мл 0,01 М  $\text{HCl}$ , а носитель Б (30 г) — 2 ч в 2% растворе моноэтаноламина в сухом диоксане при  $20^\circ\text{C}$ .

*Определение неспецифической сорбции белков на носителях.* 1 г сорбента помещали в колонку (1×6,3 см) и уравнивали 0,05 М фосфатным буфером, pH 7,0, содержащим 0,1 М  $\text{KCl}$ . В качестве стандартов использовали бычий сывороточный альбумин (Calbiochem, США) и бычий  $\alpha$ -химотрипсин (Союзреактив). На колонку наносили 0,2 мл 0,5% раствора белка в том же буфере и элюировали со скоростью 0,5 мл/мин. В элюате (15–20 мл) определяли концентрацию белка и относили ее к концентрации того же белка в растворе, полученном путем разбавления 0,2 мл исходного раствора белка до объема элюата. Полученное процентное отношение представляет собой выход белка с колонки. Затем всю процедуру повторяли до тех пор, пока выход белка не становился равен 100% (см. рис. 1). Суммарное количество адсорбированного белка (мг) принимали за величину его неспецифической адсорбции на сорбенте.

*Иммобилизация АРОА.* 30 г носителя А выдерживали 24 ч с 2% раствором АРОА в 200 мл 0,1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , после чего промывали 0,01 М  $\text{HCl}$  и выдерживали 2 ч при  $20^\circ\text{C}$ . 30 г носителя Б ( $M_n$  35 000) обрабатывали 2 ч 200 мл 1% раствора АРОА в смеси диметилформамид — триэтиламин, 50 : 1, при  $20^\circ\text{C}$ , затем в реакционную смесь добавляли 0,5 г этаноламина и выдерживали еще 1 ч. Оба сорбента промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, ацетоном, эфиром и 2 ч сушили в вакууме при  $20^\circ\text{C}$ . Содержание АРОА в сорбенте на основе носителей А и Б — 35 и 40  $\mu\text{моль/г}$  соответственно.

*Получение мембранных гликопротеидов вируса гриппа.* В работе использовали вирус гриппа типа В, штамм В/Ленинград/489/80. Концентрирование и очистку вирусной суспензии из аллантоисной жидкости осуществляли по фильтрационно-хроматографической схеме [16]. Мембранные гликопротеиды получали путем обработки очищенной вирусной суспензии цетилтриметиламмонийбромидом с последующим ультрацентрифугированием при 40 000g в течение 1 ч по методике [17]. Суперпатаунт, содержащий в основном смесь гемагглютининов и нейраминидазы, разбавляли в 10–20 раз 0,05 М  $\text{Na}$ -ацетатным буфером (pH 6,8), 0,002 М  $\text{CaCl}_2$ , 0,002 М  $\text{EDTA}$ , 0,2% луброла РХ, 0,02% азида натрия и концентрировали до исходного объема на синтетической мембране Рипор МВ-I-IV с диаметром пор 50–100 Å (НПО «Биолар», Олайне) в приборе для ультрафильтрации ФМ-02 отечественного производства. Для более полной замены цетилтриметиламмонийбромидом на луброл РХ операцию «разбавление — концентрирование» повторяли три раза. Получали 60 мл раствора вирусных гликопротеидов, содержащего 0,4 мг белка на 1 мл.

*Аффинную хроматографию* проводили на колонке (1,8×12 см) объемом 32 мл. В качестве сорбентов использовали носители А и Б, содержащие иммобилизованную АРОА. На колонку, уравниваемую 0,05 М  $\text{Na}$ -ацетатным буфером (см. выше), наносили 2,8 мг смеси гликопротеидов вируса гриппа в 7 мл того же буфера и инкубировали 40 мин. Элюцию гемагглютининов (фракции 1–6, рис. 2,  $\lambda$  280 нм) проводили указанным буфером, нейраминидазы — 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,2, содержащего 0,002 М  $\text{CaCl}_2$ , 0,002 М  $\text{EDTA}$ , 0,2% луброла РХ, 0,02% азида натрия (фракции 7–14, рис. 2). Фракцию нейраминидазы немедленно нейтрализовали 10% уксусной кислотой до pH 6,8–7,2. В полученных фракциях определяли нейраминидазную активность (см. рис. 2). Фракции 1–6, полученные при хроматографии на носителе Б (рис. 2б), содержали 2,1 мг белка; фракции 7–14 — 0,5 мг белка. При использовании носителя А (рис. 2а) фракции 1–6 содержали 1,9 мг белка, а фракции 7–14 — 0,5 мг белка.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Unger K. K., Becker N., Roumeliotis P. J. *Chromatogr.*, 1976, v. 125, № 1, p. 115-127.
2. Engelhardt H., Matches D. J. *Chromatogr.*, 1977, v. 142, № 1, p. 311-320.
3. Regnier F. US Patent № 3.983.299.
4. Mosbach K., Glad M., Larsson P. O., Ohlson S. In: *Affinity chromatography and related technique. Proceedings of the International symposium/Eds Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F.* Amsterdam: Elsevier, 1982, p. 201-206.
5. Kalal J., Tlustakova M. *Acta polymerica*, 1979, v. 30, p. 40-43.
6. Лариш В. И., Варламов В. П., Семенова Н. Н., Рогожин С. В. *Биохимия*, 1980, т. 45, вып. 9, с. 1597-1602.
7. А. с. 1061828 (СССР). Способ получения сорбента для очистки белков/Кадушиевичус В. А., Суджювене О. Ф., Песлякас И.-Г. И. Заявл. 1.03.82, № 3401897. Опубл. в Б. И., 1983, № 47.
8. Козлов Л. В., Сизой М. Н., Зинченко А. А., Лванов А. Е., Зубов В. П. *Биоорганическая химия*, 1984, т. 10, № 12, с. 1629-1639.
9. Phelan M. A., Mayner R. E., Bucher D. L. J. *Biol. Standart*, 1980, № 8, p. 233-242.
10. Rignetti P. G., Tudor G. J. *Chromatogr.*, 1981, v. 220, № 2, p. 115-194.
11. Cuatrecasas P. J. *Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 12, p. 3059-3065.
12. Koller R. G. *Ber.*, 1903, v. 36, № 1, p. 410-417.
13. Warren L. J. *Biol. Chem.*, 1959, v. 234, № 8, p. 1971-1975.
14. Spector T. *Anal. Biochem.*, 1978, v. 86, № 1, p. 142-146.
15. Nazhmidinov Sh., Turayev A. S., Usmanov Kh. U., Bazarbayev A. J. *Polym. Sci.*, 1973, v. 42, part 3, p. 1591-1599.
16. Хохлов А. С., Решетов П. Д., Жигис Л. С., Перадзе Т. В., Носков Ф. С., Крашенюк А. Н., Александров М. Л., Рейфман Л. С. и др. Производственный регламент № 210-81 «Получение вакцины противогриппозной инактивированной жидкой», МЗ СССР. М., 1980.
17. Bachmayer H. *Intervirology*, 1975, v. 5, p. 260-272.

Поступила в редакцию  
30.IV.1985

### CARBONYLCHLORIDE-CONTAINING COMPOSITIONAL MATRICES FOR IMMOBILIZATION OF BIOSPECIFIC LIGANDS

IVANOV A. E., ZHIGIS L. S., CHEKHOVSKYKH E. A.,  
RESHETOV P. D., ZUBOV V. P.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Carbonylchloride-containing compositional matrices for immobilization of biospecific ligands have been prepared by grafting copolymers of N-vinylpyrrolidone and acryloylchloride onto the surface of  $\gamma$ -aminopropylsilylated porous glass. These matrices were compared with epoxy-containing supports, synthesised by treatment of the porous glass with  $\gamma$ -glycidoxypopyltriethoxysilane. It was shown that the polymer-containing matrices yield sorbents with lower level of non-specific adsorption of proteins. In isolation of neuraminidase from the influenza virus with *p*-aminophenylloxamic acid as a ligand, the polymer-containing matrix gives preparates with 3-4 times higher specific activity as compared with epoxy-containing matrix.