



УДК 577.15

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ НА БИОСОВМЕСТИМЫХ
НОСИТЕЛЯХIII*. ИММОБИЛИЗАЦИЯ α -ХИМОТРИПСИНА НА РАСТВОРИМЫХ ДЕКСТРАНАХ*Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Смирнов В. Н.,
Чазов Е. И.**Научно-исследовательский институт кардиологии им. А. Л. Мясникова
Академии медицинских наук СССР, Москва*

С целью получения ферментных препаратов пролонгированного действия для применения в медицине проведена иммобилизация модельного фермента α -химотрипсина на растворимых декстранах, активированных введенным альдегидными группами. Для выделения иммобилизованного α -химотрипсина использовали гель-хроматографию на сефадексе G-75. Изучена кинетика гидролиза иммобилизованным ферментом специфического субстрата — этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина. Показано, что в соответствующих условиях могут быть получены препараты, содержащие до 90 мг активного фермента на 1 г носителя; при этом иммобилизованный фермент практически полностью сохраняет каталитическую активность и по кинетическим параметрам почти не отличается от нативного, но обладает повышенной устойчивостью при нагревании.

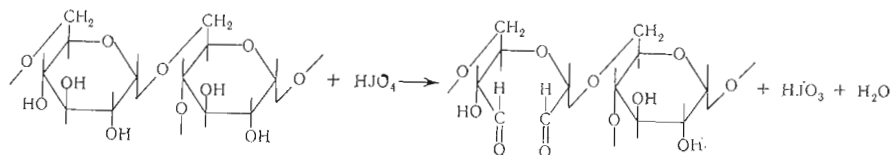
В предыдущих работах серии [1, 2] описаны препараты иммобилизованных ферментов, обладающие медленной растворимостью и заданной скоростью выделения стабилизированного фермента в окружающую среду. Такого рода препараты представляются полезными для создания лекарственных депо непосредственно в ткани или капиллярной сети пораженного органа, например в миокарде. Однако в настоящее время в медицине широко применяются некоторые, в первую очередь тромболитические, ферменты, вводимые непосредственно в кровоток. Продление времени активного функционирования таких ферментов в организме — чрезвычайно важная задача. К тому же общие принципы стабилизации ферментов в водорастворимом состоянии могут оказаться весьма полезными и для получения других биологически активных веществ, например гормонов пролонгированного действия.

Естественный путь требуемой стабилизации ферментных препаратов, особенно тех, которые предназначены действовать на нерастворимые субстраты, — это их иммобилизация на водорастворимых носителях. Проведено большое количество работ по получению и изучению свойств водорастворимых иммобилизованных ферментов. Для получения их исследователи применяли растворимые синтетические полимеры и сополимеры [3—5], природные полимеры полисахаридной природы [6, 7], а также модифи-

* Сообщение II см. [1].

цировали ферменты N-карбоксиангидридами аминокислот [8]. Поскольку эффективная стабилизация может быть достигнута лишь при использовании достаточно жестких по сравнению с ферментом матриц, к которым фермент присоединен более чем одной ковалентной связью [9], наиболее перспективным нам кажется применение водорастворимых декстранов, молекулы которых сравнительно легко поддаются модификации и обладают достаточной жесткостью в растворе. Кроме того, декстрановые матрицы не просто биологически инертны, но способны расщепляться в организме с образованием легко выводимых низкомолекулярных продуктов [12]. Хотя применение декстранов и их производных для иммобилизации ферментов известно достаточно давно, до сих пор большинство исследователей придерживается традиционной схемы активации полисахаридных носителей действием бромциана [10]. Однако этот способ не лишен целого ряда недостатков: он довольно дорог, не слишком прост экспериментально и, что весьма нежелательно для медицины, связан с использованием исключительно токсичных промежуточных соединений. В последнее время начали появляться работы по иммобилизации ферментов на полисахаридных носителях, активированных окислительным введением альдегидных групп, способных легко взаимодействовать с ϵ -аминогруппами лизина белковой цепи с образованием лиффовых оснований, которые с целью упрочения связи белок — матрица могут быть дополнительно восстановлены, например, действием боргидрида натрия [1, 11]. Этот способ прост и не требует применения высокотоксичных агентов.

Наша работа посвящена получению и изучению некоторых свойств модельного фермента α -химотрипсина, иммобилизованного на водорастворимых декстранах, предварительно модифицированных окислительным введением реакционноспособных альдегидных групп по схеме



Процесс фиксации ферментов на альдегидсодержащих носителях (преимущественно нерастворимых), изученный довольно подробно, показал свою широкую пригодность [13—16]. Периодатным окислением фармацевтических декстранов с M 35 000—50 000 нами получены их производные, содержащие в среднем 22 альдегидные группы на 100 декстрановых звеньев. При более высокой степени окисления заметно падает растворимость продуктов модификации — вероятно, в результате увеличения гидрофобности макромолекул.

Изучение зависимости количества иммобилизованного фермента от содержания нативного фермента в реакционной смеси показывает (рис. 1), что при концентрации нативного фермента, превышающей 500 мг/г растворимого альдегидсодержащего декстрана, количество связанного α -химотрипсина практически не меняется. Полученное оптимальное соотношение нативного фермента и носителя почти на порядок выше, чем в случае использования гетерогенного носителя [1], что представляется вполне естественным, если принять во внимание относительно большую доступность реакционноспособных групп растворимого носителя. Те же причины приводят по крайней мере к 3-кратному возрастанию количества иммобилизованного фермента, достигающего на растворимом носителе величины 90—100 мг активного белка на 1 г носителя (против 25—30 мг/г для гетерогенного носителя).

Для оценки кинетических характеристик и стабильности иммобилизованного фермента необходимо отделить его от нативного фермента. Эта

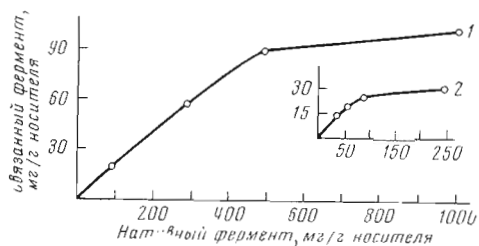


Рис. 1. Зависимость количества связанного фермента от количества нативного фермента в реакционной смеси. Носитель: 1 — растворимый декстран, 2 — модифицированный сефадекс [1]

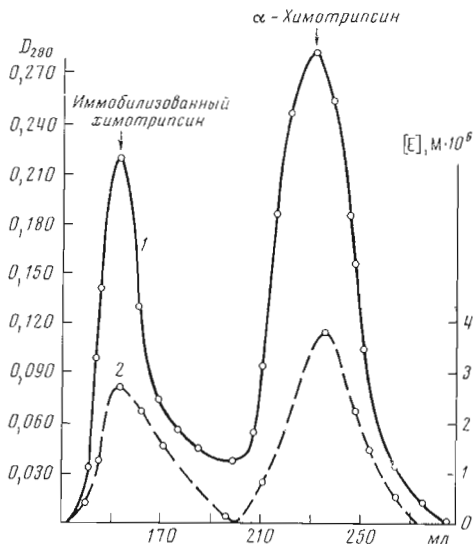


Рис. 2. Хроматография смеси иммобилизованного и нативного α -химотрипсина на сефадексе G-75 после реакции иммобилизации: 1 — оптическая плотность раствора белка при 280 нм, 2 — концентрация активного фермента в элюате, определенная по методу [18]

задача, не представляющая затруднений в случае использования нерастворимых носителей, осложняется в случае растворимых носителей и, следовательно, растворимых продуктов иммобилизации. Для разделения реакционной смеси мы воспользовались методом гель-хроматографии на сефадексе G-75. При этом иммобилизованный фермент элюировался с колонки значительно раньше нативного (рис. 2). За процессом разделения следили спектрофотометрически, определяя как общее количество белка во фракциях, так и количество активного фермента [18]. Показано, что поглощение белка при 280 нм не маскируется поглощением окисленных декстранов, максимум которого приходится на 220 нм, и иммобилизация не сказывается на удельной активности фермента — 58 и 60% соответственно для нативного и иммобилизованного фермента.

При дальнейшем изучении свойств иммобилизованного фермента мы попытались выяснить, влияет ли на свойства фермента нередко применяемое для предотвращения гидролитического расщепления связи фермент — носитель восстановление оснований Шиффа боргидридом натрия до вторичных аминогрупп. С этой целью во всех дальнейших исследованиях мы использовали параллельно три препарата: нативный фермент, иммобили-

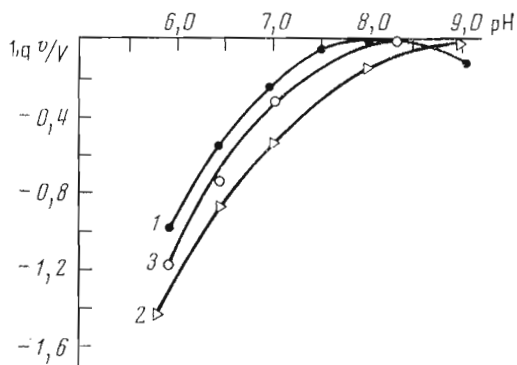


Рис. 3. Зависимость начальной скорости гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина от pH для нативного α -химотрипсина (1), иммобилизованного «восстановленного» α -химотрипсина (2), иммобилизованного α -химотрипсина в «не-восстановленной» форме (3)

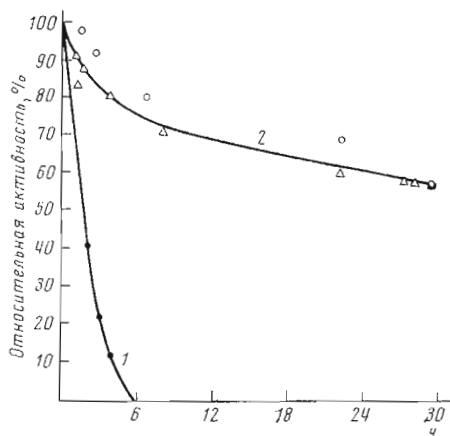


Рис. 4. Термоинактивация (37° , pH 8,25) нативного α -химотрипсина (1), «восстановленной» (светлые кружки) и «не-восстановленной» (треугольники) (2) форм иммобилизованного α -химотрипсина во времени

зованный на альдегидсодержащем декстране фермент и иммобилизованный фермент, впоследствии обработанный боргидридом натрия, так называемый восстановленный препарат. При этом предварительно было показано, что восстановление боргидридом натрия практически не сказывается ни на удельной активности иммобилизованного α -химотрипсина, ни на качестве разделения иммобилизованного и нативного ферментов на сефадексе.

Кинетические параметры иммобилизованного α -химотрипсина мы определяли в реакции гидролитического расщепления специфического субстрата — этилового эфира N-ацетил-L-тирозина. Из данных таблицы следует, что ни сама иммобилизация, ни последующее восстановление не оказывают никакого влияния на кинетические характеристики α -химотрипсина: константа Михаэлиса во всех случаях остается практически постоянной, а различия в величинах $k_{кат}$, на наш взгляд, можно объяснить наличием в непосредственной близости от активного центра фермента объемной макромолекулы матрицы, затрудняющей подход субстрата к активному центру. Однако эти различия не настолько велики, чтобы на их основании можно было делать определенные выводы.

Параметры каталитического гидролиза этилового эфира N-ацетил-*L*-тирозина

Катализатор	$K_m \cdot 10^3, M$	$k_{кат}, c^{-1}$	$pH_{опт}$	$pK_{налк}$
Нативный α -химотрипсин	1,09	160	8,0	6,90
Иммобилизованный на альдегидсодержащем декстране α -химотрипсин:				
невосстановленная форма	1,30	100	8,5	7,35
восстановленная форма	0,90	117	9,0	7,05

Исследование зависимости начальной скорости гидролиза этилового эфира N-ацетил-*L*-тирозина от pH для обеих форм иммобилизованного фермента — восстановленной и невосстановленной — показало (см. рис. 3 и таблицу), что оптимум pH по сравнению с нативным ферментом при одних и тех же условиях несколько смещен в щелочную область; соответственно различаются и значения $pK_{налк}$. Это может объясняться изменением электростатического окружения активных участков молекулы фермента из-за присутствия молекулы носителя.

Таким образом, можно заключить, что иммобилизация α -химотрипсина на альдегидсодержащих декстранах с последующим восстановлением связи фермент — матрица или без восстановления не оказывает заметного воздействия на кинетические характеристики фермента. Иммобилизованный фермент практически на 100% сохраняет свою каталитическую активность.

Нами было проведено также изучение процесса термоинактивации обеих форм иммобилизованного α -химотрипсина в сравнении со скоростью термоинактивации нативного фермента при той же концентрации активных центров. Предварительно было показано, что механическое смешение фермента с растворимым декстраном того же молекулярного веса и в той же концентрации не оказывает практически никакого термостабилизирующего эффекта. Из данных, представленных на рис. 4, следует, что при температуре 37° (температура человеческого тела) обе формы иммобилизованного α -химотрипсина, практически не различаясь между собой, обладают термостабильностью заметно большей, чем нативный фермент. Так, например, на глубине инактивации ~30% константа скорости инактивации иммобилизованного фермента на 1,5 порядка меньше константы инактивации для нативного фермента. Если при концентрации активного фермента 10^{-5} M нативный фермент претерпевает полную инактивацию за время не более 6 ч, то активность иммобилизованного фермента составляет до 58% относительно начальной даже по истечении 28 ч. При температуре 60°, когда нативный фермент полностью инактивируется за время около 4 мин, иммобилизованный фермент даже через 40 мин сохраняет до 10% исходной активности. Кроме того, здесь можно говорить и о замедлении автолиза в результате стерических затруднений, создаваемых присоединенной к ферменту объемной молекулой носителя.

Результаты исследования свидетельствуют о принципиальной возможности получения высокоактивных препаратов иммобилизованных ферментов, обладающих повышенной термостабильностью и неизменными кинетическими характеристиками, при использовании биосовместимых водорастворимых носителей, например, на основе полисахаридов.

Экспериментальная часть

Для получения альдегидпроизводных водорастворимый декстран с M 35 000—50 000 (NBC, США) подвергали окислению действием иодной кислоты в течение 16 ч при 25°. Реакцию прекращали добавлением раство-

ра иодистого калия в соляной кислоте. Продукт осаждали метанолом, высушивали ацетоном и определяли степень окисления по иодному числу [17].

Для иммобилизации α -химотрипсин (Koch-Light Laboratories, Англия) с удельной активностью 58%, определенной по методу [18], смешивали с альдегидсодержащим декстраном (20 мг в 10 мл раствора) в 0,05 М фосфатном буфере, pH 8,25, и вели иммобилизацию при 4° в течение 16 ч. Восстановление оснований Шиффа проводили добавлением NaBH_4 с последующим разложением его избытка подкислением смеси до pH 3.

Связанный α -химотрипсин отделяли от нативного геле-фильтрацией на колонке с сефадексом G-75 (рис. 2). Скорость элюирования 0,7 мл/мин.

Количество иммобилизованного белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм (для α -химотрипсина $\epsilon_{280} \sim 50\,000$), а количество иммобилизованного активного фермента — титрованием активных центров α -химотрипсина *n*-нитрофенилтриметилацетатом при 400 нм [18].

Раствор иммобилизованного фермента концентрировали на ротормом испарителе с последующим диализом против бидистиллята.

Активность α -химотрипсина определяли на pH-стате TTTId («Radio-meter», Дания) по реакции с этиловым эфиром *N*-ацетил-*L*-тирозина при pH 7, начальной концентрации субстрата 10^{-2} М в 0,1 М KCl, температуре ячейки 25°. pH-Зависимость гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина определяли при концентрации субстрата 10^{-2} М, в 0,1 М KCl, при 25°. Термостабильность иммобилизованных препаратов изучали при 37 и 60° в фосфатном буфере, pH 8,25 и концентрации активного фермента 10^{-5} М.

В процессе работы использовали коллектор фракций (ЛКВ, Швеция) и спектрофотометр СФ-16.

ЛИТЕРАТУРА

1. Торчилин В. П., Бобкова А. С., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) Биоорганическая химия, 2, 116—124.
2. Торчилин В. П., Тищенко Е. Г., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) Биоорганическая химия, 2, 399—405.
3. Goldstein L. (1972) Anal. Biochem., 50, 40—46.
4. Goldstein L. (1973) Biochim. et biophys. acta, 315, 1—17.
5. Pecht M. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 46, 2054—2061.
6. Marshall J. J., Rabinowitz M. L. (1975) Arch. Biochem. and Biophys., 167, 777—779.
7. Foster R. L. (1975) Experientia, 31, 7, 772—773.
8. Glazer A. N., Bar-Eli A., Katchalski E. (1962) J. Biol. Chem., 237, 1832—1838.
9. Мартыняк К., Клибанов А. М., Чернышева А. В., Березин И. В. (1975) Докл. АН СССР, 223, 233—236.
10. Porath J., Axen R., Ernback S. (1967) Nature, 215, 1491—1492.
11. Royer G. R., Liberatore F. A., Green G. M. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 64, 478—484.
12. Cargill W. H., Bruner H. O. (1951) J. Pharmacol. and Exp. Ther., 103, 339.
13. Sanderson C. J., Wilson D. V. (1971) Immunology, 20, 1065.
14. Epton R., McLaren J. V., Thomas T. H. (1971) Biochem. J., 123, 21—22.
15. Van Leemputten E., Horisberger M. (1974) Biotechnol. and Bioeng., 16, 997—1003.
16. Habeeb A. S. F. A. (1967) Arch. Biochem. and Biophys., 119, 264—268.
17. Справочник по аналитическому контролю в производстве искусственных и синтетических волокон (1957) с. 42, Гизлегпром, М.
18. Bender M. L., Begue-Canton M. R., Bleakeley R. L., Brubacher L. J., Feder J., Gunter C. R., Kezdy F. J., Killheffer J. V., Marshall T. H., Miller C. G., Roeske R. W., Stoops J. R. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 88, 5890—5913.

Поступила в редакцию
4.II.1976

IMMOBILIZATION OF ENZYMES ON BIOCOMRATIBLE CARRIERS.
III. α -CHYMOTRYPSIN IMMOBILIZATION ON SOLUBLE DEXTRAN

TORCHILIN V. P., REIZER I. L., SMIRNOV V. N.,
CHAZOV E. I.

*A. L. Myasnikov Cardiology Research Institute,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

In order to obtain enzyme preparations with prolonged action for medical applications, immobilization of the model enzyme - α -chymotrypsin on soluble dextran activated by introducing of aldehyde groups has been performed. Immobilized α -chymotrypsin has been isolated by Sephadex G-75 gel chromatography. The kinetics have been studied of the hydrolysis of specific substrate, N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester, by the immobilized enzyme. It has been shown that under appropriate conditions one can obtain the preparations containing up to 90 mg of the active enzyme per g of the carrier. Immobilized enzyme retains practically 100% activity, has unchanged kinetic characteristics but possesses higher thermostability.
