



УДК 577.157.2.072+543.544

## СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ ИНГИБИТОРОВ ТРОМБИНА В АФФИННЫХ АДсорбЕНТАХ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГИДРОФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ

*Грачева Н. А., Ужинова Л. Д., Куриц А. Л.,  
Платэ Н. А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

На основе синтетических гидрофильных полимеров синтезированы и исследованы аффинные адсорбенты для тромбина человека, содержащие в качестве биоспецифических лигандов структурные аналоги ингибиторов этого фермента. Лиганды различаются длиной метиленовой «ножки», химической природой связывающей реакционной группы, а также природой концевой группы. Доказана высокая селективность связывания тромбина некоторыми адсорбентами, оценены их адсорбционные характеристики по тромбину. Показано, что для эффективной аффинной хроматографии тромбина на таких адсорбентах существенным являются структура матрицы адсорбента и молекулы лиганда — аналога ингибитора тромбина. С помощью этих адсорбентов удается получить препарат тромбина активностью до 2500 NIH ед. тромбина/мг.

Одним из основных вопросов аффинной хроматографии, основанной на избирательности взаимодействия лиганда, иммобилизованного в полимерную матрицу, и активного белка является подбор специфического лиганда. Эффективность действия аффинных адсорбентов весьма существенна при выделении и очистке биологически активных веществ. Химическая природа и строение аффинного лиганда, его доступность, распределение в матрице адсорбента, а также природа и структура самой матрицы адсорбента, являющейся рабочей средой для лиганда, приобретают в данном случае решающее значение.

Препараты тромбина человека (КФ 3.4.21.5) — протеин серинового класса — обычно содержат большое количество примесей, инактивирующих как эстеразную, так и свертывающую активность этого фермента. Даже после очистки на ионообменных смолах тромбин остается загрязненным сложными компонентами или просто неактивным белком [1], и это снижает удельную активность препаратов.

В работе [2] было установлено, что конкурентные ингибиторы трипсина — производные бензиламина и бензамидина — подавляют активность тромбина. В работе [3] экспериментально доказано наличие неполярного связывающего участка на молекуле тромбина вблизи его активного центра. Ароматическая часть ингибитора удерживается ферментом за счет гидрофобных связей, причем заместители в ароматическом кольце влияют на силу этого гидрофобного взаимодействия, тем самым изменяя ингибирующий эффект (вероятно, поэтому *n*-хлорбензиламин в 50 раз более сильный обратимый ингибитор тромбина, чем бензиламин). Особая чувствительность тромбина среди других сериновых протеиназ к специфиче-

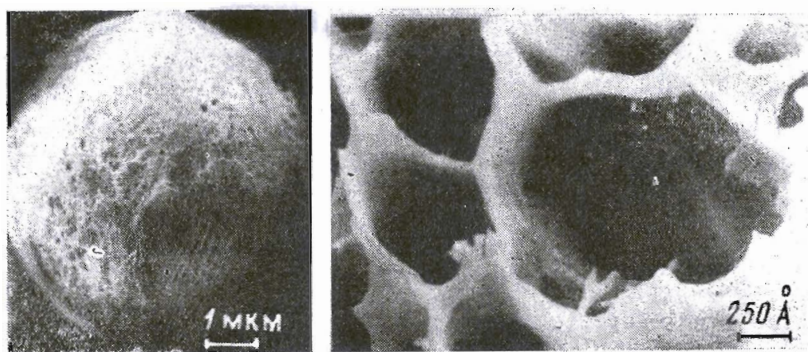
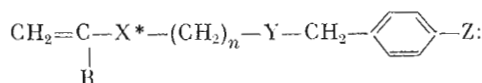


Рис. 1. Электронно-микроскопические фотографии лиофильно высушенных образцов адсорбента (гранула и фрагмент структуры)

ским гидрофобным взаимодействиям была продемонстрирована в работе [4] на примере прочного связывания человеческого и бычьего тромбина агароза-6-аминокапроил-*n*-хлорбензиламидом. Аминогруппа *n*-хлорбензиламина в данном случае ацилирована, поэтому связывание тромбина лигандом не может быть объяснено через взаимодействие аминогруппы ингибитора и карбоксильной группы аминокислоты Asp-199 вблизи активного центра тромбина. По-видимому, связывание определяется строением и свойствами гидрофобного участка ингибитора, а именно *n*-хлорбензильного радикала. С целью подтверждения этого предположения нами были синтезированы мономеры-лиганды (I)–(VI).



	R	<i>n</i>	Y	Z
(I)	H	0	Нет	Cl
(II)	CH <sub>3</sub>	6	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{NH}- \end{array}$	Cl
(III)	CH <sub>3</sub>	6	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{O}- \end{array}$	Cl
(IV)	CH <sub>3</sub>	11	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{O}- \end{array}$	Cl
(V)	CH <sub>3</sub>	11	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{NH}- \end{array}$	H
(VI)	CH <sub>3</sub>	11	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{O}- \end{array}$	H

\* X — связывающая реакционная группа.

Все соединения были синтезированы нами впервые по специально разработанным методикам. Вещества очищены хроматографически, идентифицированы методом элементного анализа и ИК-спектроскопии, определены температуры плавления. Подробности синтеза будут опубликованы отдельно.

Путем раскрытия двойной связи лиганды были иммобилизованы в гидрофильную инертную полимерную матрицу.

Для полученных аффинных адсорбентов не характерна неспецифическая сорбция плазменных белков, которая обычно высока для активированной по общепринятым методикам агарозы [5].

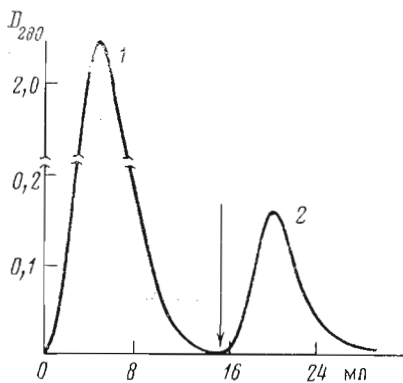


Рис. 2

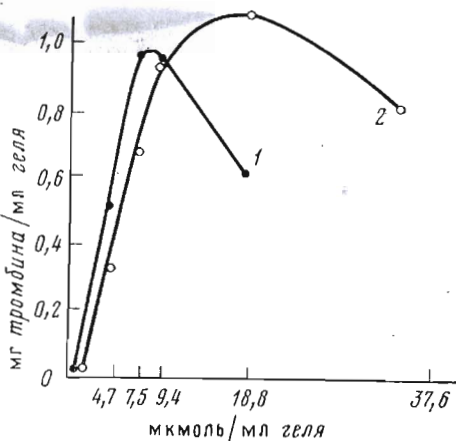


Рис. 3

Рис. 2. Очистка тромбина на катионообменнике IRC-50 (условия см. «Экспер. часть»): пик 1 — неактивный белок; пик 2 — тромбин. Стрелкой указан момент смены буфера

Рис. 3. Емкость аффинных адсорбентов с лигандами (IV) — 1 и (II) и (III) — 2 в зависимости от содержания лиганда

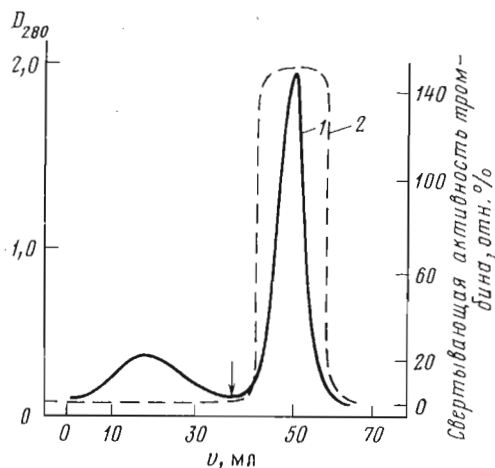


Рис. 4

Рис. 4. Очистка тромбина на аффинном адсорбенте (II): 1 — контроль по поглощению, 2 — свертывающая активность тромбина (%) относительно активности продажного препарата тромбина в растворе той же величины поглощения. Стрелкой указан момент смены буфера

Электронно-микроскопические фотографии (рис. 1) дают общее представление о строении матриц адсорбентов в набухшем состоянии. Было показано, что в поры матрицы проникают даже молекулы синего декстрана с  $M 2 \cdot 10^6$ . Это означает, что большинство белков с  $M 3 \cdot 10^4 - 3 \cdot 10^5$  не испытывает существенных затруднений при диффузии в матрицах синтезированных адсорбентов. Следовательно, селективность и эффективность связывания тромбина должны определяться природой иммобилизованного лиганда и его доступностью для фермента.

Аффинной хроматографии растворов тромбина (коммерческий препарат) на синтезированных адсорбентах предшествовала его очистка на катионообменнике амберлит IRC-50 [6]. Это необходимая стадия, поскольку содержание активного тромбина в коммерческом препарате очень низко (5–10%, или 30 NIH ед. тромбина/мг), а как известно [7], для систем с низким сродством лиганд — фермент ( $K_1 10^{-3}$  моль/л) для эффективной аффинной хроматографии критическим параметром является концентрация как иммобилизованного лиганда (не менее 10 мкмоль/мл геля), так и фермента в хроматографическом растворе ( $\geq 10^{-5}$  M). Кроме того, коммерческий препарат тромбина загрязнен ингибиторами фермента, которые мешают аффинному связыванию и снижают эффективность его очистки. Хроматографическая очистка на катионообменнике (рис. 2) позволила повысить активность исходного препарата тромбина в 40 раз и получить препарат с активностью 1370 NIH ед. тромбина/мг относительно

**Некоторые свойства аффиных адсорбентов, содержащих  
в качестве лиганда аналоги ингибитора (I)–(VI)**

Лиганд — аналог ингибитора	Содержание лиганда в адсорбенте, мкмоль/мл	Удельный объем набухания*, мл/г сухого адсорбента
(I)	18,8	20
(II)	4,7	20
	9,4	—
(III)	18,8	20
	37,6	18
(IV)	9,4	—
	18,8	18
(V)	18,8	18
	9,4	—

\* Фосфатный буфер, pH 7,4.

внутреннего лабораторного стандарта Lot-VI (Бельгия) (см. «Экспериментальную часть»).

В таблице приведены некоторые свойства синтезированных аффиных адсорбентов, содержащих указанные выше лиганды. Адсорбционные характеристики адсорбентов оценивали методом колоночной хроматографии. На колонке с адсорбентом, содержащим в качестве аффиного лиганда аналог (I), тромбин не задерживается и элюируется тем же буферным раствором, который использовали для нанесения образца на колонку. Структура аналога ингибитора (I) такова, что при иммобилизации за счет раскрытия двойной связи ингибитор оказывается, по-видимому, слишком близко расположенным к макромолекулам матрицы и не проявляет своего сродства к ферменту из-за стерических препятствий, создаваемых микроокружением вблизи гидрофильной матрицы адсорбента. Поэтому проявление активности аффиными лигандами (II), (III), (IV), в которых ингибитор фермента удален от двойной связи «ножкой» в 6 и 11 метиленовых звеньев соответственно, говорит о необходимости стерической доступности ингибитора при проведении эффективной хроматографии.

Из рис. 3 видно, что с увеличением содержания лиганда емкость гелей по ферменту проходит через максимум как в случае лигандов (II), (III), так и в случае лиганда (IV). Наиболее правдоподобным объяснением наблюдаемой зависимости является предположение об ассоциации гидрофобных радикалов лигандов при набухании адсорбентов в водных растворах, в результате чего часть лигандов становится недоступной для связывания фермента. Различие в положении максимумов кривых на рис. 3 объясняется, очевидно, тем, что ассоциация наступает при тем меньшем содержании лиганда в геле, чем более он гидрофобен («ножка» в 11 метиленовых групп лиганда (IV) более гидрофобна по сравнению с цепочкой из 6 метиленовых звеньев лигандов (II) и (III)). Мы показали (см. рис. 3), что замена *n*-хлорбензиламина (лиганд (II)) на *n*-хлорбензиловый спирт (лиганд (III) и (IV)) при синтезе лигандов не приводит к изменению емкости получаемых адсорбентов по ферменту. Следовательно, сродство тромбина к лиганду определяется исключительно структурой *n*-хлорбензильного радикала, специфичной гидрофобному месту на молекуле рассматриваемого фермента. Кроме того, гидрофобная «ножка», отделяющая аффишную частицу от полимерной матрицы, вносит дополнительный вклад в связывание тромбина за счет сил гидрофобного взаимодействия. С исследованных нами адсорбентов тромбин не элюируется растворами с высокой ионной силой, но сравнительно легко смывается менее полярным раствором (буфером, содержащим 25% диоксана). При нанесении образца раствора тромбина, предварительно очищенного на амберлите IRC-50, на колонку, содержащую 18,8 мкмоль лиганда (II) /мл геля, около 45% не-

активного белка выходит с колонки даже до ее промывки элюирующим агентом. Это свидетельствует о высокой степени очистки, достигаемой на аффинном адсорбенте, которая приводит к увеличению активности тромбина в 1,5 раза (получается препарат активностью 2500 NIH ед. тромбина/мг) (рис. 4).

Связывание тромбина из раствора 0,3 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 8) на адсорбентах, содержащих в качестве лигандов аналоги ингибитора (V) и (VI), не происходит, что указывает на важную роль хлора в *n*-положении к бензильному радикалу в проявлении биоспецифической сорбции тромбина исследуемыми лигандами.

Таким образом, особенности строения «гидрофобного кармана» вблизи каталитического центра тромбина позволяют успешно использовать в качестве аффинных лигандов на этот фермент структурные аналоги его ингибиторов.

### Экспериментальная часть

Использовали коммерческий препарат тромбина человека (ЦНИИГПК, Москва) в ампулах по 250 ед. активности тромбина в каждой. Удельную активность тромбина определяли по тромбиновому времени — времени свертывания 0,1 мл 0,3% раствора фибриногена (Sigma, США, M 340 000) под действием 0,1 мл исследуемого раствора тромбина при 37° С, рН 7,4, и выражали в единицах NIH (международных единицах, определяющих активность стандартных препаратов тромбина, выпускаемых Отделением биологических стандартов (National Institute of Health, Bethesda)). Для этого использовали калибровочную кривую, отражающую зависимость времени свертывания фибриногена в присутствии стандартного тромбина (Lot-VI), любезно предоставленного проф. Ж. Сметсом и д-ром М. Де Мель (Лувенский университет, Бельгия), которым авторы выражают благодарность. Концентрацию растворов тромбина определяли по поглощению в УФ-области ( $\epsilon_{280}^{1\%}$  1,95 для чистого тромбина) на спектрофотометре «Руче Unicam SP8-100» (Англия).

Очистку коммерческого препарата тромбина на катионообменнике амберлит IRC-50 (ФРГ) проводили согласно работе [6]. Продажный препарат тромбина (30 NIH ед. тромбина/мг) в количестве 50 мг в 1,5 мл 0,05 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 7,0) наносили на колонку (1,5×19 см) с IRC-50, уравновешенным тем же буфером, и промывали 15 мл 0,05 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,0. Элюцию тромбина проводили 15 мл 0,3 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 8,0. Скорость потока 4 мл/ч. Объем собираемых фракций 2 мл. Фракции, соответствующие пику тромбина (см. рис. 2), были объединены и диализованы в течение 12 ч против 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -буфера (рН 8,0), а затем лиофильно высушены. Удельная активность тромбина, полученного с амберлита IRC-50, равна 1370 NIH ед. тромбина/мг, выход по тромбину около 100%.

Для аффинной хроматографии тромбина на синтезированных адсорбентах колонку (4 мл) с соответствующим адсорбентом (таблица) уравновешивали 0,3 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 8,0) буфером и наносили раствор (1 мг/мл) очищенного на IRC-50 тромбина в том же буфере до насыщения колонки ферментом. Для промывки колонки использовали 15 мл 0,3 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 8,0) и 20 мл раствора, содержащего 2 М NaCl и 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 8,0). Элюцию тромбина проводили 20 мл 25% раствора диоксана в 0,75 М NaCl с 75 мкМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 8,0). Скорость элюции 6 мл/ч. Диоксан удаляли гель-фильтрацией через сефадекс G-25 в 0,75 М NaCl с 75 мкМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 8,0). Удельная активность полученного тромбина 2500 NIH ед./мг, выход по тромбину 90%. Все процедуры с ферментом выполняли в силиконированных стеклянных колонках и пробирках, чтобы избежать адсорбции высокоочищенного тромбина, при 4° С.

Электронно-микроскопические исследования проводили на растровом электронном микроскопе HSM-2 (Hitachi, Япония). Образцы набухших в:

дистиллированной воде сшитых адсорбентов лиофильно сушили, наносили на покровное стекло с коллодиевой подложкой и напыляли золотом до образования проводящего слоя.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Rosenberg R., Waugh D.* Multiple bovine thrombin components.— *J. Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 19, p. 5049–5056.
2. *Markwardt F., Landmann H., Walsmann P.* Comparative studies on the inhibition of trypsin, plasmin and thrombin by derivatives of benzylamidine.— *Eur. J. Biochem.*, 1968, v. 6, № 4, p. 502–506.
3. *Berliner L., Lee Shen J.* Physical evidence for an apolar binding site near the catalytic center of human  $\alpha$ -thrombin.— *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 21, p. 4622–4626.
4. *Tompson A.* High affinity binding of human and bovine thrombins to *p*-chlorobenzylamido- $\epsilon$ -aminocaproyl agarose.— *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 422, № 1, p. 200–209.
5. *Jost R., Miron T., Wilchek M.* The mode of adsorption of proteins to aliphatic and aromatic amines coupled to cyanogen bromide-activated agarose.— *Biochim. et biophys. acta*, 1974, v. 362, № 1, p. 75–82.
6. *Rasmussen P.* Purification of thrombin by chromatography.— *Biochim. et biophys. acta*, 1955, v. 16, № 1, p. 157–158.
7. *Туркова Я.* Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980, с. 20–26.

Поступила в редакцию  
11.II.1981  
После переработки  
20.III.1981

#### USE OF THE STRUCTURAL ANALOGS OF THROMBIN INHIBITORS FOR AFFINITY ADSORBENTS ON THE BASIS OF SYNTHETIC HYDROPHILIC POLYMERS

GRACHEVA N. A., UZHINOVA L. D., KURTZ A. L., PLATE N. A.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The affinity adsorbents for human thrombin (EC 3.4.21.5) bearing biospecific ligands of the structure similar to that of thrombin inhibitors were synthesized and investigated. Ligands differ by the length of methylene arm, chemical nature of the group responsible for the inhibitor attachment to the main chain, and by the nature of the end group. A high selectivity of adsorbents for thrombin was proved and their binding characteristics were estimated. It was shown that the structure of ligating inhibitor analog, as well as the structure of the polymer matrix, are essential for effective affinity chromatography of thrombin. Using this approach, thrombin possessing 2500 NIH clotting units per mg of enzyme can be prepared.