



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.156

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ПРОТЕИНАЗ В ПРЕПАРАТАХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М

Вица Г. В., Филатова Т. Н., Каверзнева Е. Д.

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Имеются указания на присутствие в препаратах иммуноглобулинов G [1, 2] и M [3], не отделяющихся при очистке эндогенных протеиназ. Целью данной работы явилась отработка условий получения для структурных исследований свободного от эндогенных протеиназ препарата IgM_{Андр}, выделенного по методу [4], по без лиофильной сушки промежуточной сульфатно-аммонийной фракции.

Исследован процесс фрагментации IgM_{Андр} под действием эндогенных протеиназ при pH 6,4; 7,5; 8 и температурах 18 и 37°С. Как установлено с помощью хроматографии на сефарозе 4В, в этих условиях от IgM_{Андр} отделяется фрагмент меньшего молекулярного веса (рис. 1). При 37°С расщеплялось до 50% IgM_{Андр}, а при 18°С действие этих протеиназ на IgM_{Андр} было незначительно (таблица). При хранении IgM_{Андр} в замороженном виде в течение длительного времени протеинолиз практически отсутствовал (рис. 1). Выход IgM_{Андр} при инкубации при pH 6,4 и 7,5 был меньше, чем при pH 8 (таблица). Это следует объяснить усиливающимся процессом агрегации IgM_{Андр} при этих значениях pH.

Исследовано ингибирование фрагментации IgM_{Андр} под действием эндогенных протеиназ (таблица). Установлено, что в препарате IgM_{Андр} отсутствуют кислые протеиназы типа катепсина, так как пепстатин фрагментацию IgM_{Андр} не ингибировал. Ингибирование наблюдалось в присутствии основного панкреатического ингибитора трипсина (Gordox, ВНР, Trasylol, ФРГ), ε-аминокапроновой кислоты и орнитина.

С целью установления природы протеиназ, присутствующих в IgM_{Андр}, и поиска возможности их отделения IgM_{Андр} хроматографировали на колонках с бромциан-сефарозой 4В с ковалентно пришитыми к ней ингибитором трипсина и орнитином (соответственно IT- и орнитин-сефароза), а также через колонку с АН-сефарозой с ковалентно пришитым к ней ингибитором трипсина и химотрипсина из фасоли (ITC-сефароза) [5, 6].

Выход IgM_{Андр} (по данным гель-хроматографии) после его инкубации в течение 4 сут без ингибиторов и в присутствии ингибиторов [IgM_{Андр}] 0,8–3,5 мг/мл

°С	pH	Ингибитор (60 моль на 1 моль IgM _{Андр})	Выход IgM _{Андр} , %
37	6,4	Без ингибитора	53
37	7,5	»	53,3
37	8	»	74,3
18	6,4	»	95,6
18	8	»	95,5
37	8	Основной панкреатический ингибитор трипсина	95,9
37	8	ε-Аминокапроновая кислота	93,5
37	8	Орнитин	85,2
37	8	Пепстатин	77,6

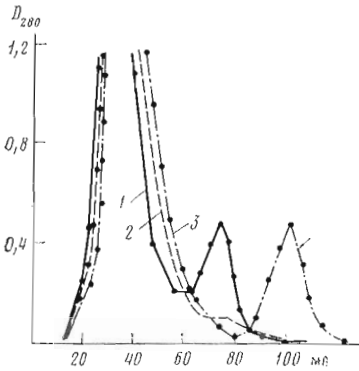


Рис. 1

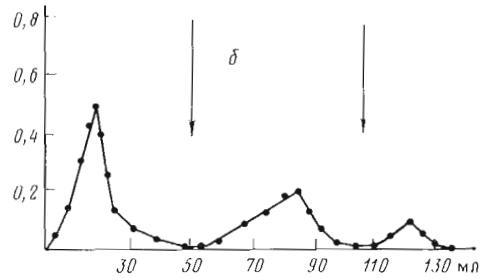
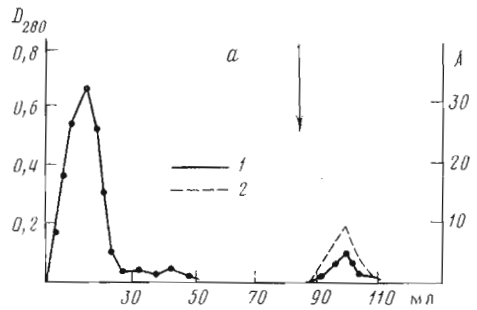


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография $IgM_{\text{Андp}}$ на сефарозе 6В (1,2×63 см) в 0,01 М трис-НСl-буфере, содержащем 0,3 М NaCl, рН 8, после инкубации в течение 4 сут при 37° С, рН 8 (1); после хранения в течение 1 года при -15° С (2) и после инкубации с основным панкреатическим ингибитором трипсина в течение 4 сут при 37° С, рН 8 (3). Пик, указанный стрелкой, соответствует ингибитору трипсина

Рис. 2. Хроматография $IgM_{\text{Андp}}$ на колонке (0,8×10 см) с ИТ-сефарозой и ИТС-сефарозой в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 8), содержащем 0,6 М NaCl; стрелкой указано начало элюции 0,01 М HCl, содержащей 0,5 М KCl (а), и на колонке с орнитин-сефарозой в 0,05 М трис-НСl, рН 7,5; стрелкой I обозначено начало элюции 0,5 М NaCl в том же буфере, стрелкой II — начало элюции 0,1 М ϵ -аминокапроновой кислоты (б). 1 — поглощение при 280 нм, 2 — протеолитическая активность (А), определенная по изменению поглощения при 253 нм раствора α -N-бензоил-L-аргинина за 1 мин

При хроматографии $IgM_{\text{Андp}}$ на ИТ-сефарозе в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 8, содержащем 0,6 М NaCl, выход $IgM_{\text{Андp}}$ с фронтом буфера составлял 90% (рис. 2а). При этом 0,01 М HCl с 0,5 М KCl вымывался небольшой белковый пик, в котором была определена трипсиновая активность (А) по гидролизу этилового эфира α -N-бензоил-L-аргинина и нитроанилида α -N-бензоил-L-аргинина. Результаты хроматографии $IgM_{\text{Андp}}$ на колонке с ИТС-сефарозой в тех же условиях были аналогичны (рис. 2а).

При пропускании $IgM_{\text{Андp}}$ через колонку с орнитин-сефарозой в 0,05 М трис-НСl (рН 7,5) 50% $IgM_{\text{Андp}}$ выходило без задержки, 48% $IgM_{\text{Андp}}$ вымывалось 0,5 М NaCl в этом же буфере, и 0,1 М ϵ -аминокапроновая кислота вымывала небольшой пик белка, в котором протеолитическая активность по синтетическим субстратам (см. выше) обнаружена не была. По всей видимости, это плазминоген [1] (рис. 2б).

Таким образом, показано, что в использованном препарате $IgM_{\text{Андp}}$ присутствует не отделившаяся при очистке протеиназа серпнивого типа. Подобраны ингибиторы, устраняющие фрагментацию $IgM_{\text{Андp}}$ под действием эндогенных протеиназ. Показана возможность получения для структурных исследований препарата $IgM_{\text{Андp}}$, свободного от эндогенных протеиназ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nabeb A. F. S. A., Francis R. D. Vox Sang, 1977, v. 32, № 3, p. 143-158.
2. Geller S., Wei S. C., Shuda G. K., Marcus D. M., Brewer C. F. Biochemistry, 1980, v. 19, № 15, p. 3614-3623.
3. Филатова Т. Н., Виха Г. В., Каверзнева Е. Д. Сб. Тез. докл. IV Всес. конф. «Методы получения и анализа биохимических препаратов». Рига, 1982, ч. 1, с. 105.

4. Ланук В. А., Шмакова Ф. В., Каверзнева Е. Д. Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 8, с. 1134-1139.
5. Affinity Chromatography (Principles and methods), 1980, Pharmacia, p. 15, 22, 69.
6. Мосолов В. В., Федуркина Н. В., Валуева Т. А. Биохимия, 1977, т. 42, вып. 7, с. 1201-1210.

Поступило в редакцию
18.V.1982

INHIBITION OF ENDOGENOUS PROTEASES IN THE PREPARATIONS OF MONOCLONAL IMMUNOGLOBULIN M

VIKHA G. V., FILATOVA T. N., KAVERZNEVA E. D.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Incubation of purified monoclonal IgM_{Andr} at 37° and pH 8,0; 7,5 or 6,4 causes its fragmentation due to endogenous proteases. The inhibitors of these proteases were found. The purified preparate IgM_{Andr} was shown to contain a serine-type protease. The possibility of purifying IgM_{Andr} devoid of endogenous proteases was demonstrated.