



УДК 577.156.3.02

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ НА БИОСОВМЕСТИМЫХ  
НОСИТЕЛЯХIV. МОДИФИКАЦИЯ  $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА ВОДОРАСТВОРИМЫМИ  
СОПОЛИМЕРАМИ ВИНИЛОВОГО РЯДА. ОЦЕНКА ДОСТУПНОСТИ  
ИММОБИЛИЗОВАННОГО РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ  $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА  
ДЛЯ БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА*Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Тищенко Е. Г.,  
Ильина Е. В., Смирнов В. Н., Чазов Е. И.**Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва*

Проведен синтез водорастворимых и биосовместимых сополимеров винилпирролидона и акриламида с акриловой кислотой и модификация полученными сополимерами  $\alpha$ -химотрипсина с помощью активации карбоксильных групп носителя водорастворимым карбодимидом. Показано, что в определенных условиях могут быть получены водорастворимые препараты, содержащие до 500 мг фермента на 1 г сополимера. При этом фермент практически полностью сохраняет свою активность и обладает повышенной термостабильностью. Указано на особую роль электростатического комплексообразования в процессе модификации фермента. Проведена сравнительная количественная оценка способности  $\alpha$ -химотрипсина, иммобилизованного на медленно- и быстро-растворимых носителях, взаимодействовать с белковым ингибитором.

В опубликованных ранее работах [1—3] нами были рассмотрены некоторые вопросы получения и изучения препаратов иммобилизованных ферментов, представляющих потенциальную ценность для медицинской практики. При этом наряду с биорассасывающимися препаратами иммобилизованных ферментов [1, 2] были описаны и водорастворимые их производные, полученные модификацией фермента частично окисленными альдегидсодержащими водорастворимыми декстранами [3]. Важность получения водорастворимых стабилизированных ферментов применительно к медицинской практике не вызывает сомнений, так как только в растворимом состоянии ферменты лекарственного назначения способны воздействовать на высокомолекулярные субстраты; в первую очередь это относится к ферментам фибринолитического действия [4].

В этом плане модификация ферментов производными декстранов, несмотря на удачное сочетание жесткости и реакционной способности макромолекул последних, не снимает вопроса о долговременной стабилизации фермента, так как полисахаридная матрица достаточно быстро разрушается под действием ферментов организма [5, 6]. Поэтому особый интерес представляют работы, посвященные модификации ферментов водорастворимыми синтетическими полимерами, которые должны обладать стойкостью к воздействию биологической среды и одновременно быть биологически инертными. К настоящему времени уже опубликован целый ряд работ по иммобилизации ферментов на синтетических водорастворимых поли-

Зависимость количества связанного  $\alpha$ -химотрипсина от типа носителя и условий реакции модификации

Носитель	Реакционная среда при модификации		Связанный фермент, мг/г носителя	Сохранение активности, %
	I	pH		
СП-30	0,1	7,1	500	100
	1,0	7,1	400	80
	0,1	9,4	400	—
СП-10	0,1	7,1	500	95
	1,0	7,1	200	—
	0,1	9,4	325	80
СП-2	0,1	7,1	280	85
	1,0	7,1	240	—
СПВ-1	0,1	7,1	200	—
	1,0	7,1	180	80

мерах и сополимерах [7—10]. При этом авторы использовали ангидридсодержащие сополимеры, аминокислотсодержащие сополимеры и полимеры, активируемые для взаимодействия с ферментами глутаровым альдегидом.

Весьма перспективными для применения в медицине представляются полимеры на основе винилпирролидона и отчасти акриламида, не содержащие высокореакционноспособных групп [11]. Однако это одновременно служит и препятствием для химического связывания с ними биологически активных соединений.

Мы попытались использовать для стабилизации  $\alpha$ -химотрипсина сополимеры винилпирролидона или акриламида с акриловой кислотой, карбоксильные группы которой могут благодаря активации карбодимидом взаимодействовать с аминокислотными группами белка.

Для модификации  $\alpha$ -химотрипсина методом радикальной сополимеризации были синтезированы сополимеры акриламида и акриловой кислоты, содержащие 2% (СП-2), 10% (СП-10) и 30% (СП-30) акриловой кислоты, а также сополимер винилпирролидона с акриловой кислотой (СПВ-1), содержащий ~1% (по весу) акриловой кислоты.

При изучении процесса связывания фермента с синтезированными полимерными носителями было показано, что количество связанного фермента на единицу веса сополимера сильно зависит от значения ионной силы и pH среды иммобилизации (табл. 1). Возможно, что в данном случае на протекании реакции сказывается электростатическое взаимодействие между макромолекулами фермента и носителя. Факт образования электростатических комплексов между белками и синтетическими полиэлектролитами достаточно подробно описан в литературе [12—14], однако этот процесс пока еще не пытались использовать с целью улучшения процесса связывания ферментов с носителями при иммобилизации. Данные табл. 1 свидетельствуют, что невысокие ионные силы и значения pH, при которых носитель и фермент заряжены противоположно, приводят к связыванию значительных количеств фермента (до 500 мг белка на 1 г сополимера) и к практически полному сохранению его активности. Это не должно вызывать удивления, если представить себе, что предварительное комплексообразование приводит к фиксации на носителе фермента в его активной конформации, а последующее сшивание компонентов комплекса с помощью водорастворимого карбодимида только дополнительно стабилизирует ее. Предположение, что после обработки карбодимидом весь фермент ковалентно связывается с носителем, доказывается невозможностью разделения продукта на исходные компоненты даже после сильного

повышении ионной силы среды, тогда как без обработки карбодимидом такое повышение полностью разрушает комплекс в результате экранирования зарядов компонентов комплекса ионами низкомолекулярного электролита. Естественно, что повышение ионной силы среды иммобилизации, исключая стадию предварительного комплексообразования, уменьшает и количество связываемого фермента. Аналогичный эффект вызывает и проведение реакции при таких значениях pH, когда носитель и фермент заряжены одноименно.

Данные табл. 1 свидетельствуют также, что эффект предварительного электростатического комплексообразования играет роль лишь при достаточно высоком содержании ионогенных групп в носителе — для СП-2 и СПВ-1 количество связанного белка практически не зависит от величины ионной силы реакционной среды. При этом повышение содержания ионогенных групп выше определенной величины уже не влияет на максимальное связывание белка; в этом случае процесс связывания начинает зависеть от стерических факторов. В изученном нами случае электростатическое комплексообразование вносит свой вклад в процесс модификации фермента, когда содержание акриловой кислоты в сополимере-носителе находится в интервале 2—40 % (по весу).

При изучении кинетических параметров реакции гидролиза специфического субстрата — этилового эфира N-ацетил-L-тирозина — под действием модифицированного  $\alpha$ -химотрипсина было показано, что наличие или отсутствие стадии электростатического комплексообразования практически не сказывается на значении соответствующих констант. Как следует из данных табл. 2, независимо от содержания акриловой кислоты в сополимере  $K_m$  и  $k_{кат}$  для модифицированных образцов  $\alpha$ -химотрипсина практически одинаковы и лишь незначительно отличаются от значений, полученных при исследовании нативного фермента. При этом некоторое ухудшение связывания субстрата с модифицированным ферментом можно отнести за счет стерических затруднений, а понижение  $k_{кат}$  мы связываем с локальным понижением pH среды вблизи активного центра фермента из-за близости ионизованных карбоксильных групп носителя. Это кажется тем более вероятным, что повышение ионной силы, вызывающее экранирование зарядов носителя, приводит к повышению значения  $k_{кат}$  (табл. 2).

Изучение процесса термонактивации модифицированного фермента (рисунок) показало, что по сравнению с нативным модифицированный фермент обладает значительно более высокой стойкостью к действию повышенной температуры. Кроме того, термостабильность фермента, модифи-

Таблица 2

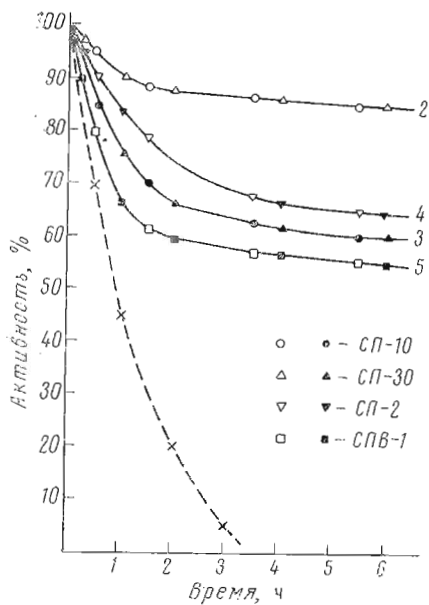
Кинетические параметры гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина под действием модифицированного  $\alpha$ -химотрипсина

Носитель	$K_m \cdot 10^3$ , М	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>	pH <sub>опт</sub>
СП-30	1,2	60 *	8,5
СП-10	1,2	50	8,5
СП-2	1,3	60	8,5
СПВ-1	1,2	80	8,5
Нативный фермент	1,0	160	8,0

Во всех случаях использовали препараты, полученные при модификации фермента в среде с ионной силой 0,1 и pH 7,1, т.е. при наличии предреакционного комплексообразования. Кинетические измерения также проводили в среде с ионной силой 0,1, pH 7,0.

\* Повышение значения ионной силы реакционной среды гидролиза с 0,1 до 1,0, как и в других случаях, вызывает повышение  $k_{кат}$  до 140 с<sup>-1</sup> (объяснение см. текст).

цированного через стадию комплексообразования, заметно выше, чем у фермента, модифицированного без комплексообразования. Это не удивительно, так как в результате комплексообразования должно происходить предварительное сближение реакционноспособных групп фермента и носителя, обеспечивающее после обработки КДИ большее число ковалентных связей фермент — носитель, чем в отсутствие комплексообразования. В результате, как показано ранее [15, 16], термостабильность иммобилизованного фермента возрастает.



Термоинактивация препаратов модифицированного и нативного  $\alpha$ -химотрипсина: 1 — нативный фермент; 2 — модифицированный СП-10 и СП-30 при значении ионной силы реакционной среды 0,1; 3 — модифицированный СП-10 и СП-30 при значении ионной силы реакционной среды 1,0; 4 — модифицированный СП-2 при значении ионной силы реакционной среды 0,1 и 1,0; 5 — модифицированный СПВ-1 при значении ионной силы реакционной среды 0,1 и 1,0 (светлые знаки отвечают ионной силе 0,1, темные — 1)

Характерно, что термостабильность препаратов на основе СП-2 или СПВ-1 одинакова независимо от комплексообразования. Это подтверждает предположение, что при малом содержании ионогенных групп в носителе комплексообразование не происходит даже в благоприятных условиях.

Существенную роль в стабилизации фермента играет повышение жесткости макромолекулы матрицы в результате отталкивания избыточных одноименных зарядов. Это доказывается тем, что при повышении ионной силы экранируются заряды матрицы, в результате чего возникают условия, способствующие свертыванию макромолекулы в статистический клубок; это приводит к тому, что термостабильность модифицированного фермента становится менее отличной от термостабильности нативного фермента при том же значении ионной силы среды.

Таким образом, на основании данных, представленных в табл. 1 и 2, а также на рис. 1, можно сделать два вывода. Во-первых, при использовании для модификации ферментов водорастворимых сополимеров инертного и реакционноспособного мономеров природа инертного мономера особого значения не имеет (свойства препаратов на основе СП-2 и СПВ-1 практически не различаются), а эффективность носителя определяется природой и содержанием реакционноспособного сомономера. Во-вторых, создание соответствующих условий взаимодействия носителя и фермента может позволить в качестве предварительной стадии реализовать электростатическое комплексообразование белка и носителя, что приводит к связыванию больших, чем обычно, количеств фермента с практически полным сохранением его активности и с заметным повышением стабильности.

В настоящей работе мы попытались ответить еще на один вопрос, который не затрагивался в предыдущих работах [1—3]. Как уже отмечалось,

Торможение активности различных препаратов иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина под действием белкового ингибитора из бобов сои

Носитель	$K_i$ ( $\cdot 10^9$ ), определенная при предельной концентрации ингибитора $8 \cdot 10^{-9}$ М	Остаточная ферментативная активность (%) при предельной концентрации ингибитора $6 \cdot 10^{-6}$ М
СПВ-1	5	5
СП-10	2	0 *
СП-30	1,5	0 **
Альдегид-декстран [3]		
невосстановленная форма	7,8	25
восстановленная форма	2,2	15
Альдегид-сефадекс [1]		
в твердом состоянии	Не определяется	95
после перевода в раствор	Не определяется из-за методических трудностей	50
Нативный $\alpha$ -химотрипсин	1,2	0

\* Концентрация ингибитора  $2 \cdot 10^{-8}$  М.\*\* Концентрация ингибитора  $10^{-9}$  М.

большинство ферментов, предназначенных для применения в медицине, должны воздействовать на макромолекулярные субстраты. Мы же, как правило, для оценки каталитической активности иммобилизованных ферментов использовали синтетические низкомолекулярные субстраты (этиловый эфир *N*-ацетилтирозина). С целью более правильной оценки применимости предлагаемых нами [1—3] препаратов был изучен процесс ингибирования всех синтезированных препаратов иммобилизованного или модифицированного  $\alpha$ -химотрипсина под действием белкового ингибитора трипсина из бобов сои. При этом были определены значения константы ингибирования при определенной концентрации ингибитора и остаточная активность в препарате, которую не удается ингибировать даже очень высокими концентрациями ингибитора. На наш взгляд, полученные результаты (табл. 3) могут качественно характеризовать способность того или иного препарата взаимодействовать с природными высокомолекулярными субстратами.

Полученные результаты необходимо обсудить с учетом следующих моментов. В случае использования для модификации фермента водорастворимых синтетических сополимеров константа ингибирования и предельная глубина ингибирования практически совпадают с аналогичными величинами для нативного фермента. Лишь в препарате на основе СПВ-1 даже при высоких концентрациях ингибитора сохраняется незначительная остаточная активность. В случае же препаратов с большим содержанием акриловой кислоты (СП-10 и СП-30) удается достичь полного ингибирования (для препарата на основе СП-10 требуется для полного торможения активности более высокая концентрация ингибитора). Из этого следует, что модификация фермента водорастворимыми сополимерами значительно повышает его стабильность, но практически не влияет на способность фермента взаимодействовать с макромолекулярными субстратами; в то же время повышение содержания содержания ионогенного мономера в сополимере облегчает ингибирование.

При использовании для модификации фермента водорастворимых альдегидсодержащих декстранов [3] выявляется различие в ингибировании препаратов с невосстановленной и восстановленной связями фермент — но-

ситель (имеется в виду восстановление шиффовых оснований действием боргидрида натрия). Оказалось, что активность обоих препаратов в выбранных условиях ингибируется не полностью, вероятно, вследствие стерических препятствий, создаваемых более жесткой, чем макромолекула синтетического полимера, макромолекулой декстрана. Тем не менее в случае невосстановленного препарата константа ингибирования выше, а ингибирование протекает менее глубоко. Этот факт можно объяснить тем, что при восстановлении шиффовых оснований в модифицированном ферменте одновременно переходят в оксигруппы и избыточные карбонилы носителя, что уменьшает его гидрофобность и облегчает взаимодействие с белковым ингибитором. Таким образом, различия «восстановленного» и «невосстановленного» препаратов, которые не удалось установить при использовании низкомолекулярных субстратов, проявляются при использовании высокомолекулярного ингибитора. Этот результат указывает на возможные пути улучшения создаваемых ферментных препаратов.

Особую важность представляло изучение процесса ингибирования фермента, иммобилизованного на альдегидсефадексах, способных к медленному растворению с одновременным выделением в окружающую среду стабилизированного фрагментом носителя активного фермента [1]. Такие препараты, на наш взгляд, могли бы найти применение для создания в организме локальных депо, обеспечивающих доставку в течение длительного времени активного фермента (в первую очередь фибринолитических ферментов) к требуемому месту. Поскольку в организме присутствует большое количество природных высокомолекулярных ингибиторов (антистрептокиназы, антифибринолизины и т. п.), особую важность приобретает задача сохранения фермента в активном состоянии до момента его перехода с гранулы носителя в окружающую среду. Полученные нами результаты представляются в этом плане весьма обнадеживающими: низкомолекулярным субстратом удается полностью оттитровать активный  $\alpha$ -химотрипсин на грануле носителя до перехода фермента в раствор, при использовании же высокомолекулярного ингибитора активность иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина до перехода фермента в раствор не блокируется вообще, так как фермент недоступен для ингибитора. Однако по мере растворения ферментсодержащих гранул (использовали носитель с полным временем растворения  $\sim 48$  ч) в растворе через сутки от начала растворения удалось ингибировать до 50% ферментативной активности.

Таким образом, предложенные нами приемы иммобилизации ферментов на биосовместимых носителях, обладающих медленной или быстрой растворимостью в водных средах, позволяют получать высокоактивные ферментные препараты с повышенной стабильностью и с практически неизменными кинетическими характеристиками как по низко-, так и по высокомолекулярным субстратам.

### Экспериментальная часть

Кристаллический бычий  $\alpha$ -химотрипсин — препарат Олайнского завода химических реактивов. В соответствии с результатами титрования активных центров фермента по методу [17] содержание активного  $\alpha$ -химотрипсина в препарате составляло 50%. Акриламид, винилпирролидон, акриловая кислота, персульфат аммония, этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина — препараты фирмы Koch-Light (Англия). Водорастворимый 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид — препарат фирмы Sigma (США). Белковый ингибитор трипсина из соевых бобов — препарат фирмы Reanal (Венгрия).

Водорастворимые сополимеры акриламида или винилпирролидона и акриловой кислоты с различным содержанием последней получали радикальной сополимеризацией в водных растворах при использовании в ка-

честве инициатора персульфата аммония. Для получения сополимеров с разным содержанием акриловой кислоты состав мономерной смеси акриламида и акриловой кислоты рассчитывали с использованием констант сополимеризации 1,38 и 0,36 соответственно, а в случае винилпирролидона и акриловой кислоты — 0,15 и 1,3 соответственно [18]. Во всех случаях реакцию проводили при 60° в течение 4 ч. Содержание акриловой кислоты в сополимерах определяли методом ИК-спектроскопии по поглощению карбоксильных групп при 1720 см<sup>-1</sup>; используя прибор UR-20 (ГДР).

Модификацию  $\alpha$ -химотрипсина полученными сополимерами проводили с помощью карбодимида: 40 мг носителя растворяли в 10 мл фосфатного буфера с pH 7,1 и ионной силой 0,1 или 1,0. К раствору добавляли при перемешивании 20 мг фермента в 1 мл того же буфера, а затем 5 мг карбодимиды в 1 мл того же буфера. Реакцию модификации проводили в течение 6 ч при 4°. Связанный и несвязанный фермент разделяли на колонке (60 × 2,5 см) с сефадексом G-75. Элюирование проводили фосфатным буфером с соответствующим значением pH и ионной силой со скоростью 0,7 мл/мин. За процессом разделения следили спектрофотометрически по поглощению при 280 нм (белок) и при 400 нм (выделение *n*-нитрофенола в результате титрования активных центров фермента *n*-нитрофенилтриптаминацетатом). Измерения проводили на спектрофотометре марки Turner (США).

Кинетические свойства модифицированного и нативного  $\alpha$ -химотрипсина изучали с помощью pH-стата TTT-1c фирмы Radiometer (Дания), используя в качестве субстрата этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина. Условия реакции: pH 7,0, температура ячейки 25°, начальная концентрация субстрата 10<sup>-2</sup> М. Температурную инактивацию нативного и модифицированного фермента проводили при 2·10<sup>-6</sup> М концентрации активных центров, температуре 37°, в фосфатном буфере pH 7,1 и при различных значениях ионной силы. Начальную скорость гидролиза субстрата периодически измеряли в вышеописанных условиях.

Ингибирование нативного, модифицированного и иммобилизованного различными способами  $\alpha$ -химотрипсина (при концентрации активных центров 10<sup>-8</sup> М) белковым ингибитором из соевых бобов проводили при 25° и pH 7. В качестве субстрата использовали этиловый эфир ацетилтирозина в концентрациях 10<sup>-2</sup>, 5·10<sup>-3</sup> и 2,5·10<sup>-3</sup> М. Концентрацию ингибитора варьировали от 10<sup>-9</sup> до 6·10<sup>-6</sup> М. Изменение начальной скорости гидролиза субстрата в присутствии ингибитора определяли с помощью pH-стата. Константу ингибирования вычисляли в координатах Лайнуивера — Берка, при этом линейная зависимость была выявлена при концентрациях ингибитора от 10<sup>-9</sup> до 8·10<sup>-9</sup> М.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горчилин В. И., Бобкова А. С., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) Биоорганическая химия, 2, 116—124.
2. Горчилин В. И., Тищенко Е. Г., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) Биоорганическая химия, 2, 399—405.
3. Горчилин В. И., Рейзер И. Л., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) Биоорганическая химия, 2, 1252—1258.
4. Вольф М., Раусбергер К. (1976) Лечение ферментами, с. 56—59, «Мир», М.
5. Ammon R. (1963) Enzymologia, 25, 245—251.
6. Preobrazhenskaya M. E., Minakova A. L., Rosenfeld E. L. (1974) Carbohydr. Res., 38, 267—277.
7. Казанская Н. Ф., Кост О. А. (1975) Биоорганическая химия, 1, 1332—1336.
8. Westman T. L. (1969) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 35, 313—317.
9. Goldstein L. (1973) Biochim. et biophys. acta, 315, 1—17.
10. Pecht M. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 46, 2054—2061.
11. Рабинович И. М. (1971) Применение полимеров в медицине, «Медицина», Л.
12. Стрельцова З. А., Браудо Е. Е., Толстогозов В. Б. (1975) Биоорганическая химия, 1, 267—272.

13. Стрельцова З. А., Шведас В. К., Максименко А. В., Клесов А. А., Браудо Е. Е., Толстогузов В. Б., Березин И. В. (1975) Биоорг. химия, **1**, 1464—1469.
14. Мустафаев М. П., Царева Е. А., Евдаков В. И. (1975) Высокомол. соед., **17**, 2226—2230.
15. Мартинек К., Клибанов А. М., Чернышева А. В., Березин И. В. (1975) Докл. АН СССР, **223**, 233—236.
16. Мартинек К., Гольдмахер В. С., Клибанов А. М., Торчилин В. П., Смирнов В. Н., Чазов Е. И., Березин И. В. (1976) Докл. АН СССР, **228**, 1468—1471.
17. Bender M. L., Begue-Canton M. R., Bleakeley R. L., Brubacher L. J., Feder J., Gunter C. R., Kezdy F. J., Killheffer J. V., Marschall T. H., Miller C. G., Roske R. W., Stoops J. R. (1964) J. Amer. Chem. Soc., **88**, 5890—5913.
18. Сополимеризация (1971) (под ред. Хэм Д.) с. 488, «Химия», М.

Поступила в редакцию  
13.V.1976

**ENZYME IMMOBILIZATION ON BIOCOMPATIBLE CARRIERS.  
IV.  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN MODIFICATION WITH WATER-SOLUBLE  
VINYLIC COPOLYMERS. ESTIMATION OF  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN, IMMOBILIZED  
BY DIFFERENT METHODS, ACCESSIBILITY FOR PROTEIN INHIBITOR**

TORCHILIN V. P., REIZER I. L., TISCHENKO E. G.,  
IL'INA E. V., SMIRNOV V. N., CHAZOV E. I.

*All-Union Scientific Research Center of Cardiology, Moscow*

Water-soluble and biocompatible copolymers of vinylpyrrolidone and acrylamide with acrylic acid were synthesized.  $\alpha$ -Chymotrypsin was modified with these copolymers through an activation of the latter by water-soluble carbodiimide. It was shown that under certain conditions one can obtain water-soluble preparations containing up to 500 mg of enzyme per gram of polymer. The enzyme retains almost 100% activity and shows enhanced thermostability. The electrostatic complexing was inferred to play an important role in the process of modification. A capability to interact with the protein inhibitor was estimated for  $\alpha$ -chymotrypsin immobilized either on slow or rapidly soluble carriers.