



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.156.3.02

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ
НА БИОСОВМЕСТИМЫХ НОСИТЕЛЯХ,
МОДИФИКАЦИЯ α -ХИМОТРИПСИНА ГЕПАРИНОМ*Торчилин В. П.**Всесоюзный кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва*

В настоящее время наука об иммобилизованных ферментах представляет собой целую отрасль современной биохимии [1,2]. Очевидно, что в медицине иммобилизованные ферменты находят самое широкое применение, в том числе и для целей терапии. Однако требования, палагаемые медициной, резко уменьшают число носителей для иммобилизации или модификации, потенциально пригодных для парэнтерального применения. Поэтому поиск новых носителей, отвечающих всем фармакологическим правилам, — задача чрезвычайно актуальная. Усилия исследователей направлены при этом на создание максимально инертных, биodeградируемых и легко выводимых из организма материалов [3,4]. Строго говоря, это всего лишь паллиатив, так как в процессе лечения в организм все равно предполагается вводить балластное вещество.

Несомненно больший интерес представляло бы использование для иммобилизации «терапевтических» ферментов носителей, самих по себе обладающих полезной биологической активностью или каким-либо образом усиливающих действие связанного с ним фермента. Однако, по нашим сведениям, подобные примеры в литературе отсутствуют. Принимая во внимание, что терапия тромболитическими ферментами обычно проводится на фоне гепаринизации, мы впервые попытались осуществить иммобилизацию модельной протеазы α -химотрипсина на природном антикоагулянте — гепарине.

Наличие в макромолекуле гепарина свободных карбоксильных групп позволило нам осуществить его ковалентное связывание с ϵ -аминогруппами лизиновых остатков молекулы фермента через стадию активации водорастворимым карбодимидом. Гель-хроматография реакционной смеси позволила выделить фракцию фермента, ковалентно связанного с гепарином, содержащую, по данным спектрофотометрических измерений, до 100 мг фермента на 1 г носителя. Ферментативная активность этой фракции составляет ~90% от расчетной.

Нами были изучены некоторые свойства полученного конъюгата. В таблице приведены параметры каталитического гидролиза специфического субстрата — этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина под действием нативного и иммобилизованного α -химотрипсина. Видно, что кинетиче-

Некоторые свойства α -химотрипсина, ковалентно связанного с гепарином

Препарат	Препараты каталитического гидролиза Ас-Тур-ОEt		$k_{\text{инг}}$, нМ, при ингибировании соевым ингибитором	$\text{pH}_{\text{опт}}$	Сохранено активности за 6 ч (37°, pH 8,2)
	K_m , мМ	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹			
α -Химотрипсин на гепарине	1,30	80	1,2	9,0	80%
	1,00	160	1,2	8,0	3%

ские параметры для связанного фермента изменяются незначительно. Некоторое понижение $k_{\text{кат}}$ и смещение $\text{pH}_{\text{опт}}$ объясняются близостью отрицательно заряженной матрицы, как это наблюдалось и в случае иммобилизации α -химотрипсина на синтетических карбоксилсодержащих носителях [5].

При изучении ингибирования связанного фермента белковым ингибитором трипсина из соевых бобов оказалось, что для связанного фермента удается достичь 100% ингибирования, при этом и константа ингибирования остается постоянной (см. таблицу). Таким образом, можно надеяться, что связывание с гепарином не вызовет заметных изменений активности фермента по отношению к высокомолекулярным субстратам, что особенно важно при тромболитической терапии, когда субстратом является высокомолекулярный фибрин.

Как видно из данных таблицы, связанный с гепарином фермент приобретает повышенную устойчивость к температурной инактивации: за время, когда нативный α -химотрипсин полностью инактивируется, связанный сохраняет ~80% активности.

Таким образом, допустимо предположение, что при использовании гепарина в качестве носителя можно получать водорастворимые препараты иммобилизованных ферментов, обладающих практически неизменными каталитическими свойствами и повышенной устойчивостью к температурной инактивации.

Экспериментальная часть

В работе использовали кристаллический бычий α -химотрипсин (КФ 3.4.4.5), гепарин и специфический субстрат Ас-Тур-ОEt (Koch-Ligcht, Англия), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид — ЭДК (Sigma, США). Остальные реактивы — продукты производства «Союзреактив» (СССР).

Связывание фермента с гепарином проводили растворением 25 мг гепарина в 10 мл фосфатного буфера (pH 7,0), добавлением 25 мг ЭДК и затем 20 мг фермента и инкубацией в течение 20 ч при 4°. Несвязанный фермент отделяли гель-хроматографией на сефадексе G-75. Элюирование проводили фосфатным буфером (pH 8,2) с ионной силой 1 М (NaCl), необходимой для отделения электростатически сорбированного фермента. Связанный белок определяли спектрофотометрически при 280 нм. Каталитическую активность образцов α -химотрипсина определяли по начальной скорости гидролиза Ас-Тур-ОEt при pH 7,5 и 25° на pH-стате ТТТ-1с (Radiometer, Дания). Температурную инактивацию изучали при концентрации активных центров 0,3 мкМ и 37° в фосфатном буфере (pH 8,2). Ингибирование модифицированного и нативного α -химотрипсина соевым ингибитором изучали при концентрации активных центров 0,3 мкМ, 25° и pH 7,0, используя в качестве субстрата Ас-Тур-ОEt с начальной концентрацией 10^{-2} М в 0,1 М KCl. Соответствующие константы рассчитывали в координатах Лайнувера — Берка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Immobilized Enzymes (1976) Methods in Enzymology (Mosbach K., ed.), v. 44, Acad. Press, N. Y.—San Francisco—London.
2. Имобилизованные ферменты (1976) Березин И. В., Антонов В. К., Мартышек К., ред., МГУ.
3. Chang T. M. S. (1976) in Methods in Enzymology (Mosbach K., ed.), v. 44, pp. 676—698, Acad. Press, N. Y.—San Francisco—London.
4. Dillon J. G., Wade C. W. R. (1976) Biotechnol. Bioeng., 18, 133—139.
5. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Тищенко Е. Г., Ильина Е. В., Смирнов В. В., Чазов Е. П. (1976) Биоорган. химия, 2, 1687—1694.

Поступило в редакцию
31.X.1977

ENZYME IMMOBILIZATION ON BIOCOMPATIBLE CARRIERS. α -CHYMOTRYPSIN MODIFICATION WITH HEPARIN

TORCHILIN V. P.

*All-Union Cardiology Research Center, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow*

The preparation and some properties are described of the heparin-bound α -chymotrypsin obtained via heparin activation with water-soluble carbodiimide. The immobilized enzyme has virtually unchanged kinetic characteristics towards low or high molecular weight substrates. It is supposed that such enzyme preparations may find a wide range of applications in medicine.
