



УДК 577.156.02

КОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
С АНТИТЕЛАМИ

Богачева Т. И., Москвичева И. В., Рутковская В. Н.,
Москвичев Б. В., Тершин И. М.

Кафедра молекулярной биотехнологии Ленинградского
технологического института и.м. Ленсовета, Ленинград

Проводили ковалентное связывание трипсина и террилитина с IgG-глобулинами, выделенными из крови кроликов, иммунизированных тонкой суспензией фибрина. Модифицированные протеиназы сохраняли 30—40% исходной катенолитической активности, обладали более высокой молекулярной массой, чем нативные ферменты. Связывание с антителами приводило к ослаблению взаимодействия протеиназ с ингибиторами плазмы крови и к увеличению их фибринолитической активности в несколько раз.

Поиск эффективных фибринолитических средств является важной проблемой современной медицины. Для растворения фибрина, одного из главных компонентов тромба, используют различные протеолитические ферменты [1]. Однако применение нативных ферментов в терапевтических целях, как правило, недостаточно эффективно из-за их быстрой инактивации под действием защитных систем организма и малой специфичности по отношению к объекту воздействия — фибрину. В последние годы все чаще в качестве лекарственных препаратов используют модифицированные ферменты [2]. Модификация с помощью полимеров позволяет снизить инактивацию фермента в физиологических условиях, в частности ослабить их взаимодействие с ингибиторами крови [3].

Решение проблемы создания фибринолитических препаратов на основе протеиназ, модифицированных полимерами, осложняется свойствами фибрина, представляющего собой нерастворимый белок с высокой молекулярной массой. Как свидетельствует накопленный экспериментальный опыт, связывание с полимерными матрицами обычно заметно снижает сродство ферментов к высокомолекулярным субстратам [4]. Для того чтобы скомпенсировать этот, по-видимому, неизбежный эффект, необходимо проводить модификацию протеиназ полимерами, способными к специфическому связыванию с фибрином. Таким свойством обладают антитела, образующиеся в крови животных в процессе иммунизации фибрином.

Протеолитические ферменты, трипсин (КФ 3.4.2.1.4) и террилитин (комплекс протеиназ, продуцируемый грибом *Asp. terricola*), ковалентно связывали с фракцией иммуноглобулинов IgG, выделенных из крови кроликов, иммунизированных тонкой суспензией фибрина. Подвижность модифицированных ферментов при ТСХ в геле сефадекса G-200 была близка к подвижности голубого декстрана с M 2 000 000 и в несколько раз пре-

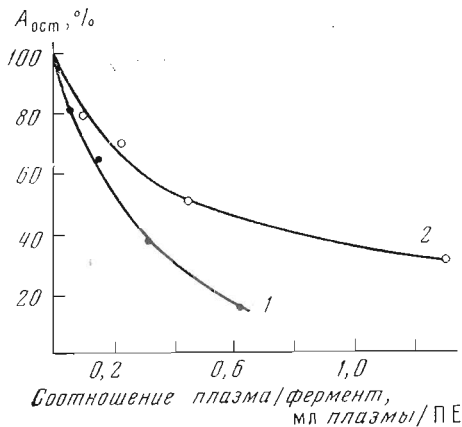


Рис. 1

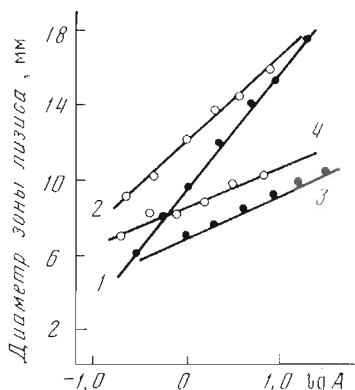


Рис. 2

Рис. 1. Ингибирование нативного (1) и модифицированного (2) трипсина плазмой крови человека. Концентрация трипсина 0,41 и 0,29 ПЕ/мл соответственно

Рис. 2. Гидролиз фибриновых пленок нативными (1, 3) и модифицированными (2, 4) трипсином (1, 2) и трипсином (3, 4)

вышла подвижность нативных ферментов ($R_{I(\text{нат})} \approx 0,3$), что указывало на увеличение молекулярной массы трипсина и трипсина при связывании с глобулинами. В процессе химической модификации сохранялось 30–40% исходной казеинолитической активности.

Как следует из рис. 1, связывание трипсина с глобулинами приводит к ослаблению его взаимодействия с ингибиторами плазмы крови. Аналогичные результаты были получены нами при изучении ингибирования протеолитических ферментов, ковалентно связанных с инертным белком — сывороточным альбумином человека [3].

Сравнение фибринолитической активности нативных и модифицированных ферментов по методу Аструпа показало, что эффективность гидролиза фибрина в присутствии трипсина и трипсина, связанных с антигенами, выше, чем в присутствии нативных ферментов (рис. 2). В случае трипсина влияние химической модификации проявляется более ярко при снижении концентрации ферментов (рис. 2, 1, 2).

Таким образом, выбранный способ химической модификации трипсина и трипсина — связывание их на IgG к фибрину — позволяет увеличить стабильность протеиназ в присутствии ингибиторов плазмы крови и повысить их фибринолитическую активность.

Экспериментальная часть

В работе были использованы кристаллический трипсин (Spofa, ЧССР), трипсин отечественного производства, дополнительно очищенный диализом, бычий фибриноген и тромбин отечественного производства.

Приготовление фибрина. Смесь, содержащую 10 мг/мл фибриногена, 0,16 мг/мл тромбина и 0,02 М CaCl_2 в физиологическом растворе, инкубировали 2 ч при 20° С. Полученный фибрин растирали в гомогенизаторе до тонкой суспензии и промывали несколько раз физиологическим раствором. Концентрация фибрина в суспензии, использованной для иммунизации, составляла 10 мг/мл.

Иммунизировали кроликов весом 2,5–3 кг четырехкратно в течение 5 недель, подкожно с полным адьювантом Фрейнда и внутривенно. Общее количество введенного антигена составляло 40 мг на одного кролика. Антитела IgG выделяли из иммунных кроличьих сывороток методом ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 [5]. Препарат обессо-

ливали на сефадексе G-75. Полученные препараты IgG содержали 98—100% белка и сохраняли специфичность по отношению к фибрину и фибриногену по данным реакции непрямой гемагглютинации.

Связывание протеиназ с IgG с помощью глутарового альдегида, ТСХ полученных производных в геле сефадекса G-200, ингибирование нативных и модифицированных ферментов проводили как описано ранее [3]. Фибринолитическую активность измеряли по диаметру зон лизиса на стандартных фибриновых пластинах по методу Аструпа [6]. Протеолитическую активность (А) определяли по поглощению при 280 нм кислоторастворимых пептидов, образующихся в процессе гидролиза казеина [7]. За единицу протеолитической активности (ПЕ) принимали такое количество фермента, которое повышает поглощение раствора пептидов на 1,0 при инкубации с субстратом в течение 10 мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чазов Е. И., Лакин К. М. (1977) Антикоагулянты и фибринолитические средства, с. 225—235, «Медицина», М.
2. Gregoriadis G. (1977) *Nature*, 265, 407—411.
3. Богачева Т. И., Миргородская О. А., Москвичев Б. В. (1977) *Биохимия*, 42, 609—615.
4. Имобилизованные ферменты (1975) Березян И. В., Антонов В. К., Мартинек К., ред., с. 76—79, т. 2, изд-во МГУ.
5. Adinolfi M., Rose M. J., Mollinson P. Z., Polley M. J. (1966) *J. Exptl Med.*, 123, 951—969.
6. Баскова И. П. (1976) в сб.: Практикум по физиологической химии, с. 89—90, изд-во МГУ.
7. Богачева Т. И., Миргородская О. А., Москвичев Б. В. (1976) *Прикл. биохимия и микробиол.*, 12, 428—431.

Поступила в редакцию
17.VII.1979

После доработки
8.X.1979

COUPLING OF PROTEOLYTIC ENZYMES TO ANTIBODIES

BOGACHEVA T. I., MOSKVICHEVA I. V., RUTKOVSKAYA V. N.,
MOSKVICHEV B. V., TERESHIN I. M.

Lensoviet Leningrad Technological Institute, Leningrad

Trypsin and terrilytin were covalently bound to IgG globulins isolated from the serum of rabbits immunized with a fine suspension of fibrin. Both proteinases preserved 30-40% of initial caseinolytic activity after the coupling procedure and possessed higher molecular mass than the native enzymes. Coupling with antibodies resulted in a lowered affinity of trypsin and terrilytin for serum proteinase inhibitors and in several-fold increase in their fibrinolytic activity.