



УДК 577.15

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ НА БИОСОВМЕСТИМЫХ
НОСИТЕЛЯХ.I. ИММОБИЛИЗАЦИЯ α -ХИМОТРИПСИНА
НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЕФАДЕКСАХ*Горчилин В. П., Бобкова А. С., Смирнов В. Н.,
Чазов Е. И.**Научно-исследовательский институт кардиологии им. А. Л. Мясникова
Академии медицинских наук СССР, Москва*

С целью получения биосовместимых и биорастворимых препаратов иммобилизованных ферментов для использования в медицине разработан метод получения альдегидпроизводных сефадексов, обладающих медленной растворимостью — от нескольких дней до нескольких недель. Изучены свойства синтезированных носителей: содержание реакционноспособных групп, УФ-спектры их растворов, скорости растворения в зависимости от pH среды и температуры, а также от содержания альдегидных групп в носителе. На ряде полученных носителей проведена иммобилизация α -химотрипсина. Изучено влияние на процесс иммобилизации времени реакции, температуры, количества добавленного фермента на единицу веса носителя и содержания реакционноспособных групп в носителе. Определено соотношение времен выделения иммобилизованного фермента в окружающую среду и полного растворения носителя. Показано, что переходящий в раствор иммобилизованный фермент по своему кинетическому поведению практически не отличается от нативного, но обладает повышенной термостабильностью.

Можно полагать, что одной из областей широкого применения иммобилизованных ферментов в ближайшее время станет медицина, поскольку в настоящее время ферменты успешно применяются в терапии ряда заболеваний [1—3]. Одной из важнейших задач при использовании ферментных лекарственных препаратов является создание высокой локальной концентрации соответствующего фермента в зоне поражения (когда речь идет о заболевании какого-либо отдельного органа или его части). Обычно применяемое парентеральное введение не позволяет избирательно в заданном месте достичь высоких концентраций лекарственных препаратов из-за равномерного их распределения по всему организму. Для увеличения концентрации ферментного препарата в пораженном органе необходимо повысить общую его концентрацию в организме, а это, как правило, невозможно вследствие вредных побочных явлений. Возможным путем разрешения этого противоречия могло бы явиться создание микрочастиц ферментсодержащего полимера, вводимых непосредственно в мышечную ткань или капиллярную сеть пораженного органа и медленно рассасывающихся там с выделением фермента. Это позволило бы создать высокую локальную концентрацию последнего в требуемом месте без заметного увеличения его концентрации в организме в целом. Естественно, что полимерный носитель должен пред-

ставлять собой инертный, биосовместимый материал, например, на основе полисахаридов или некоторых виниловых полимеров типа поливинилпирролидона, способный к связыванию фермента по механизму механического включения или химического присоединения. Развитый в настоящее время Чангом и соавт. [4, 5] способ микрокапсулирования ферментов представляется в этом плане малоперспективным, так как, во-первых, капсулированный фермент недоступен для высокомолекулярных субстратов, например фибрина, а во-вторых, оболочка капсулы, как правило, представляющая собой полиамид, вряд ли сможет принять участие в метаболизме и удалиться из организма к моменту прекращения лечения.

Данная работа посвящена созданию биорассасывающихся материалов на основе модифицированного сефадекса — производного природного полисахарида декстрана и получению в качестве модели препаратов α -химотрипсина, иммобилизованного на синтезированных носителях.

К настоящему времени ряд ферментов иммобилизован с помощью реакции сшивания диальдегидами, например глутаровым альдегидом [6, 7], а также взаимодействием с полиальдегидами, полученными частичным окислением полисахаридов — целлюлозы, сефадекса и сефарозы [8—11]. Протекающая в процессе иммобилизации реакция между ϵ -аминогруппами лизиновых остатков белковой цепи и альдегидными группами носителя с образованием шиффовых оснований [12, 13] приводит к прочному связыванию фермента с матрицей. Подобного рода процесс описан и для получения некоторых лекарственных препаратов пролонгированного действия ковалентным связыванием с альдегидпроизводными декстрана [14, 15].

Для получения биорассасывающихся альдегидсодержащих носителей нами был выбран сефадекс. Этот выбор был обусловлен тем, что, во-первых, сефадекс представляет собой сшитый биосовместимый полисахарид — декстран [16], а во-вторых, процесс разрушения микросфер сефадекса в организме может ускоряться под действием декстраназы, которая, как показано в работе [17], присутствует в различных тканях человеческого организма. Кстати, один из способов получения водорастворимого стабилизированного α -химотрипсина заключается в действии декстраназы на сефадекс, содержащий иммобилизованный циангалогенидным способом фермент [18].

В результате периодатного окисления сефадекса нами были получены его альдегидсодержащие производные — альдегид-сефадексы (АС) с различным числом альдегидных групп на 100 элементарных звеньев декстрана. Выбор соответствующих условий окисления приводил к получению АС без разрушения гранул исходного сефадекса. Для исследований были выбраны АС на основе сефадекса G-25*, содержащие 16 (АС-16), 25 (АС-25), 36 (АС-36), 39 (АС-39) и 44 (АС-44) альдегидных групп на 100 звеньев декстрановой цепи.

Изучение полученных продуктов показало, что по мере увеличения степени окисления АС приобретают способность к медленному растворению в водных буферных растворах. При этом их растворение не проходит через стадию неограниченного набухания (как для несшитого высокомолекулярного декстрана). В воде или водном буфере с рН 7—9 вначале происходит одинаковое набухание сефадекса и АС (для последнего оно завершается в 1,2—1,5 раза быстрее), после чего начинается медленное понижение уровня АС вследствие перехода в раствор верхних, а затем последующих слоев его гранул — по типу шелушения луковицы.

Химизм реакции периодатного окисления сшитых полисахаридов, содержащих в шивке атомы кислорода и оксигруппы, исключительно сложен, зависит от условий реакции [19] и в нашем случае не поддается

* Выбор в качестве носителя сефадекса марки G-25 определялся тем, что для экспериментов *in vivo* размеры гранул препарата в набухшем состоянии не должны превышать 80 мкм, чтобы не травмировать капилляры.

Зависимость растворимости АС разных степеней окисления от условий^{1*}.
в весовых % от исходной загрузки
 Условия опыта: навеска 100 мг АС в 30 мл растворителя, температура 37°, умеренное перемешивание

Растворитель	АС-25				АС-36				АС-44			
	2 ч	6 ч	24 ч	48 ч	2 ч	6 ч	24 ч	48 ч	2 ч	6 ч	24 ч	48 ч
Н ₂ O (бидист.) рН 6,0	0	1	1,5	3	0	1	2	4	1	3	5	9
Фосфатный буфер, рН 7,4	2	4	11	20	4	8	17	35 ^{2*}	10	15	30	70
Фосфатный буфер, рН 8,2	5	10	18	35 ^{3*}	8	14	25	55 ^{4*}	20	30	60	100
Трис-НСl-буфер, рН 8,2	1	2	4	6	1	4	8	15	5	8	12	25

^{1*} Для упрощения таблицы в нее не внесены данные о зависимости растворимости АС от температуры. Отметим, однако, что эта зависимость проявляется очень сильно. Так, например, в фосфатном буфере (рН 8,2) при 20° за 24 ч растворяется 8% АС-25 и 20% АС-44, а при 2° — не более 2% АС-25 и ~ 6–7% АС-44. Аналогичное падение растворимости с понижением температуры наблюдается для всех образцов АС во всех опробованных растворителях.

^{2*} Время полного растворения ~7 сут.

^{3*} Время полного растворения 4,5 сут.

^{4*} Время полного растворения 3,5 сут.

однозначной интерпретации. Медленная скорость растворения АС, по-видимому, обусловлена стабилизацией структуры большим числом водородных связей, что вполне вероятно для системы, содержащей большое количество карбонильных и оксигрупп. То, что именно водородные связи вносят основной вклад в стабилизацию структуры и формы гранул АС и замедляют их растворение, подтверждается поведением АС в нагретых буферных растворах или в растворах мочевины при любых температурах. В этих случаях набухаемость АС возрастает в зависимости от условий в 3–8 раз по сравнению с необработанным сефадексом, что вызвано дестабилизацией структуры гранул в результате разрушения водородных связей под действием температуры или мочевины.

Нами было проведено детальное исследование растворимости образцов АС-25, АС-36 и АС-44 в зависимости от времени, температуры, рН и природы растворителя. Полученные результаты сведены в таблицу. Из данных таблицы следует, что на растворимость АС сильно влияют все изученные факторы: растворимость заметно увеличивается с увеличением степени окисления сефадекса, с повышением температуры и рН раствора, а при одинаковом значении рН зависит от состава среды — фосфатный буфер (рН 8,2) растворяет АС гораздо быстрее, чем трис-НСl-буфер того же рН. Особый интерес в свете поставленных задач представляет растворимость АС в фосфатном буфере (рН 7,4), до известной степени моделирующем кровь — природный фосфатсодержащий буферный раствор со значением рН 7,4. Изменяя степень окисления исходного сефадекса (т. е. количество альдегидных групп в АС), представляется возможным регулировать время растворения носителя в весьма широких пределах — от нескольких дней до нескольких недель. Это позволяет для каждого конкретного случая выбрать носитель с требуемым временем растворения.

Проведенные нами опыты с сефадексами марок G-75 и G-150 показали, что их окислением растворимые производные могут быть получены еще быстрее, чем для G-25 (в 3 и 6 раз соответственно). При этом для одинаковых степеней окисления растворимость АС возрастает в ряду G-25 — G-75 — G-200. Так, например, АС-39 на основе G-75 полностью растворяется за 12 ч в фосфатном буфере (рН 8,2) при 37°, а АС-39 на основе G-150 —

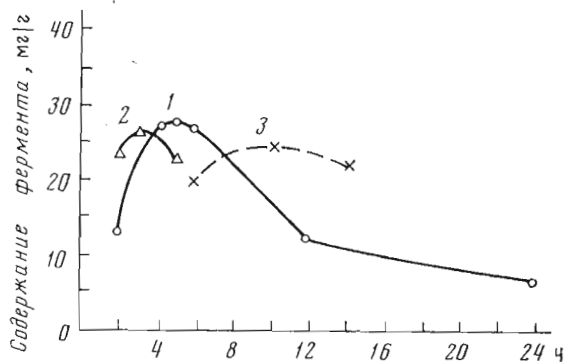


Рис. 1. Содержание иммобилизованного химотрипсина (мг/г носителя) в зависимости от времени реакции иммобилизации: 1 — AC-39 при 2°; 2 — AC-39 при 15°; 3 — AC-25 при 2°. Условия реакции: фосфатный буфер (рН 8,2), 10 мг фермента на 100 мг AC, объем реакционной смеси 20 мл, интенсивное перемешивание

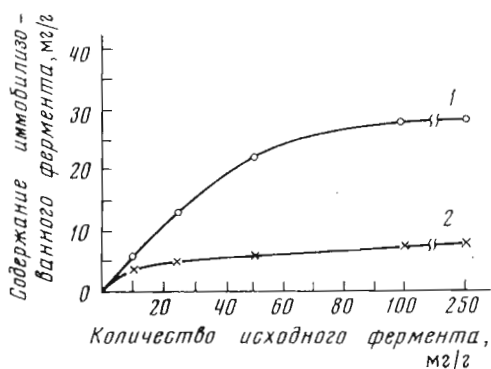


Рис. 2. Зависимость содержания иммобилизованного химотрипсина (1) и иммобилизованного активного химотрипсина (2) от исходного количества фермента в реакционной смеси (мг/г носителя). Условия реакции: фосфатный буфер (рН 8,2), носитель AC-39, температура 2°, время реакции 5 ч, объем реакционной смеси 20 мл, 100 мг носителя, интенсивное перемешивание

за 4 ч. Это свидетельствует о том, что в появлении растворимости у образцов AC большую роль играет не только окисление самих декстрановых цепей, но и окислительное разрушение шивок.

Полученные результаты позволяют утверждать, что окислением сефадексов в соответствующих условиях могут быть получены микросферические носители, обладающие медленной растворимостью в водных буферных растворах, содержащие реакционноспособные альдегидные группы и пригодные для иммобилизации ферментов.

Для выяснения способности полученных образцов AC связывать ферменты были проведены модельные эксперименты с α -химотрипсином.

Первым вопросом, на который следовало дать ответ, был вопрос об оптимальном времени иммобилизации, так как одновременно с процессом фиксации фермента на поверхности носителя (проницаемость сефадекса G-25 недостаточна для свободной диффузии фермента во всем объеме носителя, этим объясняется фиксация α -химотрипсина только в поверхностных слоях гранулы AC) происходит процесс перехода ферментсодержащего поверхностного слоя в раствор, что приводит к получению препарата с малым содержанием активного фермента.

На рис. 1 представлена зависимость содержания иммобилизованного α -химотрипсина от времени реакции при постоянной температуре и постоянных количествах нативного фермента и носителя, вводимых в реакцию. Кривые проходят через максимумы, положения которых зависят от степени окисления сефадекса, температуры реакции и концентрации фермента в растворе — уменьшение степени окисления сдвигает положение максимума в область больших времен, повышение температуры или концентрации фермента — в область меньших времен. Полученные данные указывают на то, что начиная с определенного момента большая часть химотрипсина связана с перешедшими в раствор фрагментами АС, а на поверхности микросфер носителя задерживается меньшая часть фермента.

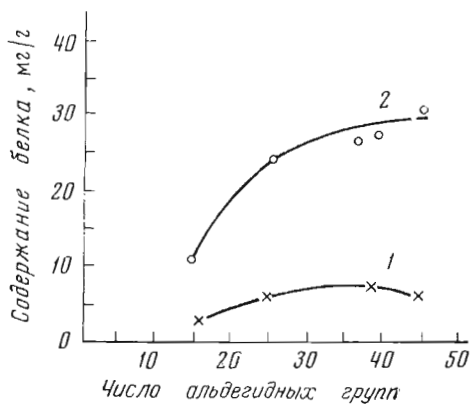


Рис. 3

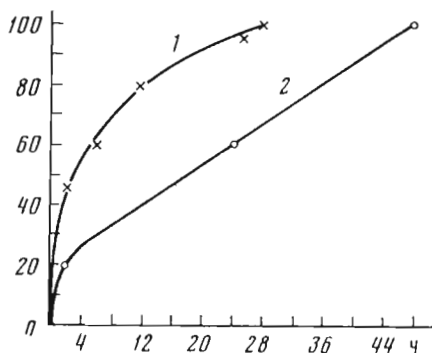


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость содержания связанного (1) и активного химотрипсина (2) от числа альдегидных групп на 100 звеньев носителя. Условия реакции: см. подпись к рис. 2, время реакции — время связывания максимального количества химотрипсина

Рис. 4. Зависимость количества перешедшего в раствор активного химотрипсина (1) и АС (2) в весовых % от времени. Условия опыта: фосфатный буфер (рН 8,2), температура 37°, 50 мг химотрипсина на АС-44 в 100 мл буфера, умеренное перемешивание

Знание подобных зависимостей для каждого конкретного случая позволяет получать образцы с заданным содержанием активного фермента или белка в целом.

Для времени иммобилизации максимального количества белка нами была изучена зависимость содержания связанного и активного химотрипсина от исходной концентрации фермента (рис. 2; для других времен зависимости имеют подобный вид, но общие предельные количества связанного и активного химотрипсина меньше). Эта зависимость свидетельствует о том, что влияние количества свободного фермента в реакционной среде на количество связанного химотрипсина (и на количество связанного активного химотрипсина) проявляется только при сравнительно небольших концентрациях фермента. Начиная с содержания в реакционной среде свободного фермента в количестве 50 мг/г носителя, зависимость менее выражена. Полученный результат представляет определенную ценность, поскольку позволяет выяснить, какое минимальное количество нативного фермента следует при данных условиях ввести в реакцию для получения высокоактивного препарата. Это дает возможность избежать непроизводительных затрат фермента в процессе иммобилизации.

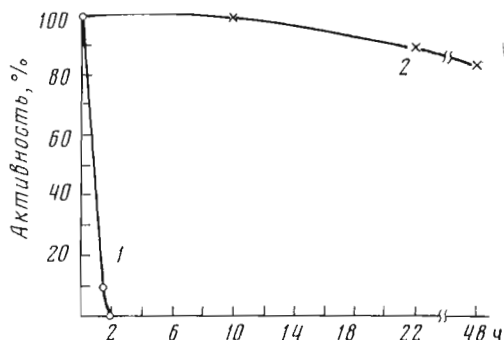
Как следует из рис. 2, с повышением общего количества связанного фермента его удельная активность понижается. Это хорошо согласуется с данными работы [20].

Нами был также изучен вопрос о том, как зависит количество связанного фермента от степени окисления сефадекса или, иными словами, от

числа альдегидных групп в АС. Из данных рис. 3 следует, что при переходе от АС-16 к АС-44 общее количество иммобилизованного химотрипсина возрастает, причем это возрастание наиболее заметно на начальном участке кривой. Этот факт свидетельствует о том, что для посадки максимального количества фермента на АС существует некое оптимальное значение содержания альдегидных групп в АС, превышение которого не приводит к возрастанию количества иммобилизованного фермента из-за того, что определенная часть свободных альдегидных групп носителя экранирована ферментом, связавшимся с носителем. В этом случае дальнейшее окисление АС может сказываться только на скорости его растворения.

Иной вид имеет зависимость связанного активного химотрипсина от степени окисления АС: количество активного фермента возрастает от АС-16

Рис. 5. Инактивация нативного химотрипсина (1) и растворенного химотрипсина на АС-39 (2) во времени. Условия опыта: фосфатный буфер (рН 8,2), температура 37°, химотрипсин на АС-39, концентрации ферментов 10^{-4} М



к АС-39, а затем несколько падает к АС-44. Это падение можно объяснить возникновением слишком большого числа химических связей между аминокруппами фермента и альдегидными группами носителя, приводящим к некоторым конформационным нарушениям у ряда молекул иммобилизованного фермента, вызывающим его инактивацию. Полученный результат позволяет выбрать оптимальную степень окисления сефадекса, обеспечивающую связывание максимального количества активного химотрипсина.

Таким образом, результаты опытов позволяют в широких пределах направленно варьировать как растворимость инертной биосовместимой полимерной матрицы, так и количество связанного на ней активного фермента. В наших условиях наиболее активный препарат, содержащий 25 мг связанного белка на 1 г носителя, с удельной активностью порядка 30%, может быть получен при проведении иммобилизации в течение 5 ч на АС-39 при количестве нативного фермента в растворе 100 мг на 1 г носителя.

Следующим шагом в изучении полученных ферментсодержащих препаратов было изучение освобождения фермента во времени, кинетических свойств и термостабильности иммобилизованного химотрипсина.

На рис. 4 представлены зависимости выделения химотрипсина в раствор от времени в сравнении с растворимостью самой матрицы. Из приведенных данных следует, что для образца химотрипсина на АС-44 время полного выделения фермента в раствор составляет ~ 24 ч или примерно половину времени полного растворения всей микросферы. При этом как для химотрипсина, связанного с выходящими в раствор фрагментами матрицы, так и для самой матрицы небольшая скорость растворения характерна для начального периода.

Проведенные испытания показали, что такое соотношение времен полного выхода фермента в раствор и полного времени растворения матрицы имеет место для всех образцов химотрипсина на основе сефадекса G-25. Это служит дополнительным подтверждением того, что фермент выходит

в раствор связанным с фрагментом матрицы, поскольку скорость его накопления в растворе лимитируется скоростью растворения матрицы.

В том случае, когда матрица полностью проницаема для фермента, время выхода фермента совпадает со временем растворения самой матрицы. Это означает, что фермент ковалентно связан с декстрановыми цепями по всей микросфере носителя. Такой результат был получен нами для образца фермента на АС-39 на основе сефадекса марки G-150, для которого время растворения носителя, как и время выхода всего связанного химотрипсина в раствор, составляет ~ 4 ч.

При изучении свойств химотрипсина на АС, полностью перепедшего в раствор, обнаружился очень интересный факт: удельная активность иммобилизованного фермента резко возросла. Так, например, для образца фермента на АС-39, содержащего 29 мг связанного белка на 1 мг носителя, из которых активны лишь ~ 8 мг (см. рис. 2), после его полного перевода в растворенное состояние количество активного химотрипсина, определенное титрованием активных центров, возросло до 21 мг (при этом общее количество белка в растворе по-прежнему составляло ~ 30 мг/г носителя). Это свидетельствует о том, что в гетерогенном состоянии не весь иммобилизованный фермент, сохранивший активность в процессе иммобилизации, проявляет ее — по-видимому, вследствие стерических затруднений. Переход иммобилизованного фермента в раствор «уравнивает в правах» все сохранившие активность молекулы фермента. Это позволяет утверждать, что истинные потери активности при иммобилизации очень малы и препарат содержит заметное количество активного фермента в «законсервированном» состоянии. Полученный результат очень важен при медицинском применении подобных препаратов: содержащийся на носителе активный фермент не сразу вступит в работу, что могло бы привести к нежелательным последствиям, а только после перехода в раствор.

Изучение кинетических констант гидролиза сложноэфирной связи *n*-нитрофенилацетата химотрипсином на АС (после полного перехода фермента и матрицы в раствор) и нативным ферментом в тех же условиях показало, что значения K_m , k_2 и k_3 для них полностью совпадают и хорошо согласуются с данными работы [21]: $K_m = 12 \cdot 10^{-4}$ М, $k_2 = 3,8$ с⁻¹, $k_3 = 7 \cdot 10^{-3}$ с⁻¹. Аналогичное совпадение величин кинетических констант иммобилизованного растворенного и нативного фермента между собой и со значениями, приведенными в работе [22], обнаружено и при гидролизе сложноэфирной связи *n*-нитрофенилтриметилацетата: $K_m = 15 \cdot 10^{-4}$ М, $k_2 = 0,4$ с⁻¹, $k_3 = 1,7 \cdot 10^{-4}$ с⁻¹. При этом значения кинетических констант для химотрипсина, связанного с АС, в обоих случаях практически не зависят ни от степени окисления носителя, ни от количества связанного фермента.

В поведении нативного и связанного растворенного фермента существует, однако, заметное различие, заключающееся в повышенной термостабильности связанного химотрипсина по сравнению с нативным. На рис. 5 приведены зависимости скорости инактивации связанного растворенного и нативного химотрипсина той же концентрации от времени при 37° — температуре человеческого тела. Термостабильность связанного фермента заметно превосходит устойчивость нативного: если последний в условиях эксперимента полностью инактивируется по истечении 2 ч, то для связанного заметного падения активности не наблюдается даже по истечении 48 ч. Этот факт не только свидетельствует о возможности продления времени работы фермента, закрепленного на фрагменте растворимой матрицы, *in vivo*, но и лишней раз подтверждает, что химотрипсин переходит в раствор с АС не в свободном виде, а ковалентно связанным с растворимым осколком матрицы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности получения медленно растворяющихся носителей, способных к иммобилизации заметных количеств ферментов, которые по мере разрушения носителя выделяются в окружающую среду ковалентно связанными

с осколками носителя. При этом не происходит изменений в кинетических свойствах фермента, но заметно повышается его термостабильность. Все это может иметь большое значение при создании иммобилизованных ферментов, предназначенных для введения в организм на биосовместимых носителях.

Экспериментальная часть

Для получения АС исходный сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция) подвергали периодатному окислению действием йодной кислоты или периодата натрия в течение 20 мин — 24 ч при температурах 2—25° в темноте или на свету. Реакцию окисления останавливали добавлением смеси йодистого калия и соляной кислоты или промыванием гипосульфитом. Продукт высушивали ацетоном.

Степень окисления исходного сефадекса определяли по йодному числу [23].

Гранулометрический состав продукта контролировали под микроскопом. Просеиванием была выделена фракция АС с размером гранул в диаметре 5—20 мкм.

УФ-спектроскопическое исследование растворов АС показало наличие интенсивного пика при 220 нм, отнесенного нами к поглощению карбонильных групп. У декстрана в растворе поглощения в этой области не наблюдается. Наличие пика поглощения у АС позволило построить калибровочные кривые для АС разных степеней окисления и по ним определять скорость растворения разных АС и их концентрации в соответствующих растворах, когда проводились эксперименты по изучению растворимости АС от различных условий.

Иммобилизацию α -химотрипсина проводили перемешиванием соответствующего носителя с различными количествами фермента в фосфатном буфере, рН 8,2 (выше значения pI химотрипсина, чтобы избежать протонирования аминогрупп) при 2° в течение различного времени.

Количество связанного белка определяли по разности количества белка, введенного в реакцию и ушедшего с промывными водами, за присутствием белка в которых следили спектрофотометрически при 280 нм.

Отмывку препарата иммобилизованного фермента проводили порциями по 20 мл (на 100 мг носителя), 100 мл фосфатного буфера (рН 8,2), 100 мл 1М NaCl, 100 мл 0,001 н. HCl, снова 100 мл фосфатного буфера (рН 8,2), 100 мл бидистиллята, 100 мл смеси ацетон—вода (1 : 1) и 100 мл ацетона. Предварительно было показано, что промывание химотрипсина ацетоном практически не вызывает потери ферментативной активности.

Для иммобилизации использовали α -химотрипсин производства Олайнского завода химреактивов с содержанием активного фермента 72%, определенным титрованием активных центров *n*-нитрофениловым эфиром триметилуксусной кислоты [24]. Этот же способ титрования активных центров применяли и для определения количества фермента, переходящего в раствор с носителя.

Скорость выделения фермента в растворе и скорость растворения самого носителя изучали в фосфатном буфере (рН 8,2) при температуре 37° в термостатированном шейкере фирмы «Gallenkampf» (США). Раствор отделяли от осадка центрифугированием на медицинской центрифуге при 3000 об/мин.

Кинетические свойства стабилизированного и нативного химотрипсина изучали спектрофотометрически при 400 нм по скорости выделения *n*-нитрофенола при гидролизе сложноэфирной связи субстратов *n*-нитрофенилацетата и *n*-нитрофенилтриметилацетата. Субстраты вводили в реакционную смесь в виде растворов в ацетонитриле, концентрация которого в кювете не превышала 0,5% по объему. Для сравнения использовали кювету с тем же трис-HCl-буфером (рН 7, 9), не содержащим фермента.

Термостабильность стабилизированного и нативного химотрипсина изучали в фосфатном буфере (рН 7, 4) при 37° с периодическим титрованием активных центров вышеописанным способом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Quioccho F. A., Richards F. M. (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 52, 833—839.
2. Chang T. M. S., Poznansky M. J. (1968) Nature, 218, 243—245.
3. Пат. ФРГ № 2059165 (1971) СА, 75, 95019у.
4. Chang T. M. S. (1969) Science Tools, 16, № 3, 33—39.
5. Chang T. M. S. (1971) Nature, 229, 117—118.
6. Avrameas S., Guilbert B. (1971) Biochimie, 53, 603—608.
7. Glassmeyer C. K., Ogle J. D. (1971) Biochemistry, 5, 786—792.
8. Sanderson C. J., Wilson D. V. (1971) Immunology, 20, 1061—1065.
9. Epton R., McLaren J. V., Thomas T. H. (1971) Biochem. J., 123, 21P.
10. Epton R., McLaren J. V., Thomas T. H. (1972) Carbohydr. Res., 22, 301—306.
11. Van Leemputten E., Horisberger M. (1974) Biotechnol. and Bioeng., 16, 997—1003.
12. Habeeb A. S. F. A. (1967) Arch. Biochem. Biophys., 119, 264—268.
13. Sundaram P. V., Hornby W. E. (1970) FEBS Letters, 10, 325—327.
14. Хомяков К. П., Пенезжик М. А., Вирник А. Д., Роговин З. А. (1965) Высокомолекул. соед., 7, 1030—1034.
15. Хомяков К. П., Вирник А. Д., Ушаков С. Н., Роговин З. А. (1965) Высокомолекул. соед., 7, 1035—1034.
16. Детерман Г. (1970) Гель-хроматография, стр. 33, «Мир», М.
17. Ammon R. (1963) Enzymologia, 25, 245—251.
18. Axen R. (1970) Biopolymers, 9, 401—406.
19. Хэм Д. (1967) в сб. Методы химии углеводов (под ред. Кочеткова Н. К.), стр. 478—483, «Мир», М.
20. Axen R., Ernback S. (1971) Eur. J. Biochem., 18, 351—360.
21. Bender M. L., Clement G. E., Kezdy F. J., d'A Heck H. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3680—3690.
22. Bender M. L., Kezdy F. J., Gynter G. R. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3714—3721.
23. Справочник по аналитическому контролю в производстве искусственных и синтетических волокон (1957), стр. 42, Гизлегпром, М.
24. Bender M. L., Begue-Canton M. L., Bleakeley R. L., Brubacher L. J., Feber J., Gunter C. R., Kezdy F. J., Killheffer J. V., Marshall T. H., Miller C. G., Roeske R. W., Stoops J. K. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 88, 5890—5913.

Поступила в редакцию
13.V.1975

ENZYME IMMOBILIZATION ON BIOCOMPATIBLE CARRIERS. I. IMMOBILIZATION OF α -CHYMOTRYPSIN ON MODIFIED SEPHADEXES

TORCHILIN V. P., BOBKOVA A. S., SMIRNOV V. N.,
CHAZOV E. I.

*Myasnikov Research Institute of Cardiology, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

To obtain biocompatible and biosoluble immobilized enzymes for medical application a method of preparation modified aldehyde-containing sephadexes has been developed. The carriers obtained are suitable for chemical immobilization of enzyme and have prolonged solubility ranging from days to weeks. The following properties of these carriers have been investigated: reactive groups content as depending on modification reaction conditions, rate of their solubility as depending on pH value, temperature and aldehyde groups content. A model enzyme, α -chymotrypsin, has been immobilized on some carriers obtained. The influence of reaction time, temperature, enzyme concentration and aldehyde groups content on immobilization process and properties of products have been studied. The correlation between solubility time of immobilized enzyme and of matrix has been established. Dissolved immobilized enzyme is shown to be kinetically identical to the native one, but has high thermostability.