



УДК 577.15.02

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ НА БИОСОВМЕСТИМЫХ
НОСИТЕЛЯХII. ИММОБИЛИЗАЦИЯ α -ХИМОТРИПСИНА НА ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНЕ

*Торчилин В. П., Тищенко Е. Г., Смирнов В. Н.,
Чазов Е. И.*

*Научно-исследовательский институт кардиологии им. А. Л. Мясникова
Академии медицинских наук СССР, Москва*

С целью создания биосовместимых и биорастворимых препаратов иммобилизованных ферментов для использования в медицине разработан способ получения ферментсодержащих поливинилпирролидоновых микрогранул, обладающих медленной растворимостью и заданной скоростью выделения фермента в окружающий раствор. В качестве модельного фермента использован α -химотрипсин. Получены образцы поливинилпирролидона, содержащие механически включенный фермент и фермент, сополимеризованный с винилпирролидоном после предварительного модифицирования производным ненасыщенной кислоты. Изучено влияние условий процесса на активность α -химотрипсина. Определено соотношение времен выделения фермента в раствор и полного растворения носителя. Изучено кинетическое поведение иммобилизованного и перешедшего в раствор α -химотрипсина в реакции гидролиза специфического субстрата — этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина.

В нашей предыдущей работе [1] был описан способ иммобилизации α -химотрипсина на модифицированных сефадексах с целью получения биосовместимых и биорассасывающихся препаратов иммобилизованных ферментов, предназначенных для использования в медицине. Круг соединений, пригодных в качестве биосовместимых носителей для иммобилизации ферментов, не ограничивается полисахаридами. В медицине хорошо известно парентеральное применение синтетических полимеров винилового ряда, например ПВП, поливинилового спирта и т. п. [2], потенциально пригодных для иммобилизации ферментов. Поскольку такие биосовместимые полимеры представляют собой весьма инертные вещества и практически не содержат реакционноспособных групп, задача иммобилизации на них ферментов химическими способами намного усложняется. Решением проблемы является получение ферментов, иммобилизованных включением в гель соответствующего полимера, и такой способ, особенно применительно к полиакриламидным гелям, в настоящее время хорошо разработан [3, 4]. Микрогранулированные образцы иммобилизованного фермента могут быть созданы путем использования для получения геля винилового полимера эмульсионной полимеризации.

Для химической иммобилизации на инертных виниловых полимерах фермент следует предварительно модифицировать, например, введением

Сокращения: ВП — винилпирролидон, ПВП — поливинилпирролидон, МБАА — *N,N'*-метилевбисакриламид.

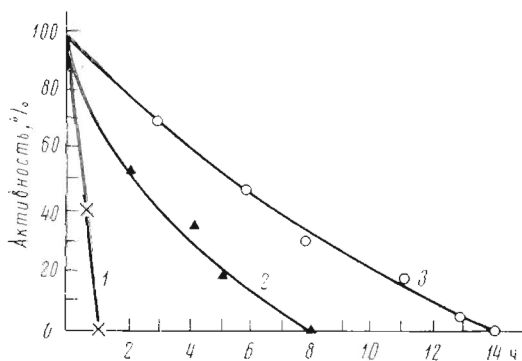


Рис. 1

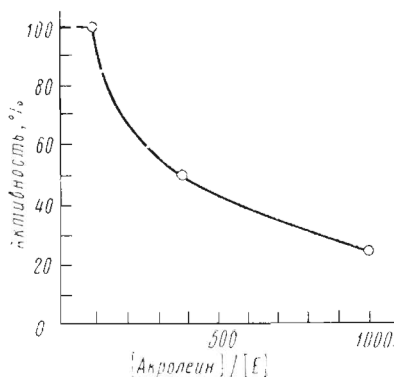


Рис. 2

Рис. 1. Инактивация α -химотрипсина ($5 \cdot 10^4$ М) в 0,05 М трис-буфере (рН 8,2) под действием фотооблучения при 25° (1), в присутствии в растворе 50% по весу ВП (2) и ПВП (3)

Рис. 2. Активность модифицированного α -химотрипсина в зависимости от количества акролеина, введенного в реакцию. Условия реакции: температура 0°, рН 8, концентрация фермента 10^{-4} М

в белок двойных связей с последующей сополимеризацией с виниловым мономером типа ВП. Для получения микросферических препаратов реакцию сополимеризации можно также проводить эмульсионным способом.

Настоящая работа посвящена получению образцов ПВП, содержащих α -химотрипсин, включенный в полимерные гранулы механически, сополимеризацией после обработки фермента акролеином либо комбинированным способом, а также изучению свойств полученных препаратов.

Очевидно, что как механическое включение α -химотрипсина в гранулы ПВП в процессе полимеризации, так и сополимеризация модифицированного химотрипсина с ВП должны проводиться в мягких условиях, не вызывающих инактивации фермента. Поэтому во всех случаях образцы ферментсодержащего ПВП мы получали эмульсионной фотополимеризацией ВП в масле путем облучения ртутной лампой при комнатной температуре. Однако фотоиницирование даже при обычных температурах способно вызывать частичную инактивацию фермента. Для оценки степени инактивации α -химотрипсина в условиях полимеризации нами было предварительно проведено изучение скорости его инактивации под действием фотооблучения в растворе, а также в присутствии растворенных ВП и ПВП в концентрациях, соответствующих реакционным условиям. Полученные результаты (рис. 1) свидетельствуют о стабилизирующем влиянии высоких концентраций мономера и полимера на фермент, что находится в соответствии с литературными данными [5]. Это позволяет надеяться, что за время проведения реакции фотополимеризации (порядка 6 ч) активность иммобилизуемого α -химотрипсина снизится на величину не более 50% исходной, а поскольку других потерь фермента при данном способе иммобилизации не происходит, то получаемые препараты должны обладать весьма высокой активностью.

Кроме того, необходимо было выяснить, как влияет модифицирование фермента акролеином на его каталитическую активность. Для этого исследовалась зависимость активности модифицированного α -химотрипсина от количества введенного в реакцию акролеина, образующего с аминоклупами белка Шиффовы основания (рис. 2). Из рисунка видно, что избыток акролеина, вплоть до 100-кратного, не вызывает падения активности фермента, в то время как дальнейшее увеличение его количества приводит к постепенному падению активности до 25% исходной при 1000-кратном молярном избытке акролеина, вызываемому, вероятно, на-

рушением нативной структуры фермента при слишком глубокой модификации. Очистка модифицированного α -химотрипсина диализом от избытка акролеина и низкомолекулярных продуктов реакции и последующее концентрирование разбавленного раствора фермента на роторном испарителе приводит к разделению фермента на две фракции, одна из которых выпадает в осадок, не теряя при этом своей каталитической активности, а другая, также обладающая активностью, остается в растворе. Бромометрический метод определения числа двойных связей показал, что осадок содержит от 9 до 14, а растворимый препарат — от 4 до 8 ненасыщенных групп на молекулу α -химотрипсина. Следовательно, такое модифицирование молекулы α -химотрипсина заметно понижает его растворимость, но практически не сказывается на активности. При этом как растворимый, так и нерастворимый препараты образуют в ВП тонкую суспензию и успешно вступают в реакцию сополимеризации.

При наиболее простом методе иммобилизации — механическом включении α -химотрипсина в гель ПВП в процессе сополимеризации ВП со сшивающим агентом — в мономер (ВП) может быть введено до 30% по объему водного раствора α -химотрипсина. Скорость растворения образующихся образцов ПВП, как и скорость выхода из него в окружающую среду фермента, представляется возможным регулировать путем изменения концентрации сшивающего агента в полимеризационной смеси. В качестве сшивающего агента обычно используют МБАА. Варьирование концентрации МБАА от 0,1 до 1,0% по весу относительно веса ВП позволяет получить набор образцов ПВП с растворимостью от нескольких дней до практически нерастворимых (табл. 1). Однако диффузия фермента из гранул носителя во внешнюю среду, хотя и замедляется с увеличением степени сшивки, происходит с заметной скоростью даже при 1%-ной сшивке, так как, по-видимому, размер ячеек получаемого полимерного геля больше размеров молекулы фермента. Сам же носитель после полного выхода из него фермента еще довольно долго не переходит в раствор или вообще не растворяется, что нежелательно в плане поставленной задачи. Единственное преимущество таких препаратов α -химотрипсина перед нативным ферментом может заключаться в том, что вышедший из гранул носителя фермент некоторое время будет находиться в окружении также перешедших в раствор поливинилпирролидоновых фрагментов носителя, что, вероятно, заметно повысит устойчивость фермента [5].

Для получения препарата с близкими временами выхода в раствор фермента и растворения самого носителя был выбран иной путь, а именно сополимеризация модифицированного акролеином α -химотрипсина с ВП. Однако попытка провести сополимеризацию с ВП без сшивающего агента к полному успеху не привела. Хотя нами и были получены препараты, выделявшие фермент во внешнюю среду с той же скоростью, с какой ПВП переходил в раствор (поскольку фермент сам стал частью полимерной решетки), их гранулы обладали недостаточно хорошими механическими свойствами — липкостью, гигроскопичностью и т. п., что объясняется, по-видимому, слишком малым молекулярным весом продукта и слабыми сшивающими свойствами модифицированного фермента. Невозможность достижения высокой степени полимеризации и получения прочной трехмерной решетки в этом случае мы объясняем обрывом реакции полимеризации на молекулах модифицированного химотрипсина из-за плохой доступности гидрофобных радикалов, содержащих $C=C$ -группы.

С целью преодоления этого затруднения мы и в этом случае вводили в реакцию сополимеризации не только модифицированный фермент, но и сшивающий агент — МБАА, присутствие которого предотвращало преждевременное прекращение реакции полимеризации. И действительно, нам удалось получить образцы сополимеров α -химотрипсина с ВП, обладающие хорошими механическими свойствами и выделяющие в окружающую среду фермент одновременно с рассасыванием частицы самого полимерного

Таблица 1

Скорость вымывания α -химотрипсина из образцов ферментсодержащего ПВП

Способ иммобилизации	% сшивки	Активный фермент в растворе (% от исходного содержания в образце) за время, ч			Время полного растворения носителя, сут
		5	20	50	
Механическое включение	0,3	25	63	100	2—3
	0,6	19	44	81	>10
	1,0	11	27	64	Нерастворим
Сополимеризация	0,3	36	61	86	~3
	0,6	25	50	75	>5
	1,0	—	25	37	~14
Комбинированный способ	0,4	16	20	32	~5
	0,6	12	18	25	>14
	1,0	—	12	18	Нерастворим

Условия эксперимента: навеска 500 мг ферментсодержащего ПВП в 50 мл 0,05М трис-НСl-буфера (рН 8,2), 25°, содержание белка в каждом образце ~ 20 мг, содержание активного фермента ~ 8 мг.

Таблица 2

Кинетические характеристики ферментсодержащих препаратов ПВП

Способ иммобилизации	% сшивки	Удельная активность, мг/г ПВП		K_m , М	
		гетерогенный образец	образец после растворения	гетерогенный образец	образец после растворения
Механическое включение	0,6	2	14	$1,8 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}
Сополимеризация	0,6	9	10	10^{-2}	10^{-3}
Комбинированный способ	0,6	7	11	$3 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$

Условия эксперимента: температура 25°, общее содержание белка в образцах около 30 мг/г ПВП.

Условия растворения приведены в табл. 1.

носителя. При этом, как и следовало ожидать, скорость выхода фермента в раствор была заметно меньше, чем в случае препаратов, содержащих фермент, механически включенный в гель (табл. 1). Тем не менее в принципе растворимость (независимо от времени полного растворения) образцов, содержащих сополимеризованный фермент, выше растворимости образцов с включенным ферментом. Например, ПВП с включенным ферментом и с 1% сшивки вообще нерастворим, а ПВП с той же степенью сшивки, но содержащей около 2% по весу сополимеризованного модифицированного α -химотрипсина, растворяется в течение 12—14 дней. Таким образом, можно утверждать, что включение фермента в гель ПВП по механизму сополимеризации до известной степени разрушает структуру последнего, повышая его способность к растворению.

Необычный результат был получен при проведении комбинированного способа иммобилизации фермента, когда в полимеризационную систему вводили одновременно ВП, МБАА, α -химотрипсин и модифицированный фермент, причем два последних компонента в равных количествах. Скорость выделения α -химотрипсина из образца в этом случае ожидалась

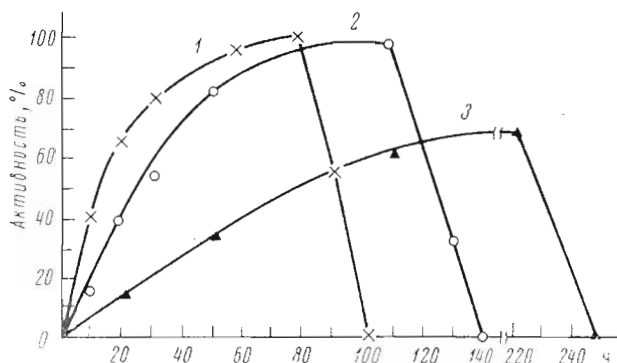


Рис. 3. Изменение ферментативной активности надосадочной жидкости растворяющихся образцов ферментсодержащего ПВП во времени (за 100% принят максимум отмеченной активности). Условия опыта приведены в табл. 1. 1 — α -химотрипсин, включенный в гель ПВП с 0,6% шивки, 2 — α -химотрипсин, сополимеризованный с ВП в присутствии 0,6% шивки, 3 — образец, полученный комбинированным способом с 0,6% шивки

промежуточной между скоростями выделения включенного и сополимеризованного фермента. Однако эксперимент показал (табл. 1), что она заметно ниже скорости выделения не только включенного, но и сополимеризованного α -химотрипсина. Причины этого явления до конца неясны. При любом способе иммобилизации скорость выхода фермента в раствор, как и скорость растворения носителя, можно регулировать в весьма широких пределах, изменяя концентрацию шивающего агента, а также, до известной степени, количество смешиваемого с мономером перед полимеризацией водного раствора фермента или модифицированного фермента. Это может привести к созданию набора ферментсодержащих препаратов с заданными скоростями растворения и выделения фермента в окружающий раствор.

Иммобилизация α -химотрипсина по всем перечисленным способам практически полностью предотвращает инактивацию фермента в результате автолиза, позволяя получать препараты с высоким содержанием активного фермента — до 50 мг на 1 г носителя. Тем не менее после полного перехода в раствор α -химотрипсин претерпевает достаточно быструю инактивацию в результате автолиза (рис. 3), который, однако, протекает медленнее, чем в растворе чистого α -химотрипсина, не содержащего дополнительно растворенного полимера (в данном случае ПВП). (Наличие автолиза доказывается тем, что реакция инактивации имеет второй порядок по ферменту.) Таким образом, присутствие полимера в растворе фермента замедляет его фотоинактивацию и процесс автолиза.

Нами было проведено изучение каталитических свойств полученных препаратов иммобилизованного α -химотрипсина как в гетерогенном состоянии, так и после полного перехода фермента в раствор в реакции гидролиза специфического субстрата — этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина. Одновременно оценивалась концентрация активного фермента в гетерогенном образце и в растворе методом титрования активных центров фермента *n*-нитрофениловым эфиром триметилуксусной кислоты. Полученные результаты (табл. 2) позволяют сделать выводы о поведении фермента в иммобилизованном состоянии и о некоторых свойствах ферментсодержащих гранул ПВП. Так, например, для α -химотрипсина, иммобилизованного механическим включением в полимерный гель, при переходе из гетерогенного состояния в гомогенное коллоид Милхаэлиса практически не меняется, тогда как концентрация активного фермента в растворе по сравнению с суспензией полимерных гранул возрастает примерно в 7 раз. Этот факт свидетельствует о том, что процесс катализа на грануле кон-

тролируется внутренней диффузией, т. е. практически весь субстрат претерпевает превращение в поверхностных слоях носителя, а внутренние слои обеднены субстратом. Иными словами, в процессе реакции на грануле работает не весь фермент. Такой выход хорошо согласуется с теоретическими представлениями, развитыми в работе [6]. После полного выхода из носителя в раствор весь сохранивший активность фермент принимает участие в превращении субстрата. При этом изменения кинетических констант у включенного α -химотрипсина практически не происходит — K_m не изменяется, что свидетельствует о сохранении активной конформации фермента, включенного в достаточно рыхлый гель ПВП. По-иному выглядит картина для модифицированного α -химотрипсина, сополимеризованного с ВП: при переходе из гетерогенного состояния в гомогенное количество активного фермента остается практически постоянным, а константа Михаэлиса уменьшается на порядок. Это означает, что связывание на ферменте, химически включенном в трехмерную полимерную решетку, заметно ухудшается. Постоянство количества активного α -химотрипсина в гетерогенном и гомогенном препаратах мы объясняем тем, что полимерный гель, содержащий сополимеризованный фермент, обладает более рыхлой структурой — большим размером пор, чем гель, содержащий включенный фермент, а это улучшает диффузию субстрата во внутренние области полимерной гранулы и позволяет всему активному ферменту принимать участие в каталитическом превращении субстрата. Однако скорость диффузии недостаточна высока, чтобы обеспечить высокую концентрацию субстрата в микроокружении фермента, что приводит к повышению наблюдаемой величины K_m . При переходе в раствор это затруднение снимается и K_m становится равной таковой для нативного фермента. Для комбинированного образца иммобилизованного α -химотрипсина мы, естественно, получаем некую среднюю картину.

Таким образом, использование для иммобилизации ферментов (по механизму включения в гель или сополимеризации) винилового мономера типа ВП позволяет получать препараты иммобилизованного фермента, способные к медленному растворению, скорость которого достаточно легко поддается регулированию, и к выделению во внешнюю среду активного фермента без изменения его кинетических характеристик.

Экспериментальная часть

Для иммобилизации использовали α -химотрипсин производства Олайнского завода химических реактивов (Латвия) с содержанием активного фермента 72% (определено титрованием активных центров *n*-нитрофениловым эфиром триметилуксусной кислоты по методу [7]).

Модифицирование α -химотрипсина проводили при pH 8 в растворе с концентрацией фермента 10^{-4} М при 0° медленным добавлением различных количеств очищенного акролеина или хлорангидрида акриловой кислоты при перемешивании в течение 2 ч. По окончании реакции реакционную смесь очищали диализом и концентрировали на роторном испарителе.

Для полимеризации использовали мономерный винилпирролидон фирмы «Koch-Light Laboratories» (Англия). Полимеризацию ВП осуществляли эмульсионным способом в силиконовом масле под действием облучения ртутной лампой РРК-4. Включение α -химотрипсина в ПВП проводили смешиванием до 100 мг фермента или модифицированного фермента в 2 мл воды с 5 мл перегнанного ВП и добавлением полученной смеси вместе с соответствующим количеством МБАА при интенсивном перемешивании к 20 мл силиконового масла. При комбинированном способе иммобилизации к мономерному ВП (5 мл) добавляли по 50 мг модифицированного и нативного α -химотрипсина. После 6 ч полимеризации полученный микросферический ферментсодержащий препарат отмывали от масла эфиром и высушивали на воздухе (размер гранул препарата можно регулировать

скоростью переменывания полимеризационной системы). Предварительно было показано, что ВП и эфир практически не вызывают потери активности α -химотрипсина в условиях эксперимента.

Количество фермента, включенного в ПВП и сохранившего активность, а также динамику его выхода из полимерных гранул определяли титрованием активных центров, скорость накопления ПВП в растворе — по изменению показателя преломления [8].

Скорость растворения полимерных гранул и скорость выхода из них фермента изучали в 0,05 М трис-НСI-буфере (рН 8,2), 25°, в термостатированном шейкере фирмы «Gallenkampi» (США). Раствор отделяли от осадка центрифугированием на медицинской центрифуге со скоростью 3000 об/мин.

Каталитическую активность иммобилизованного α -химотрипсина в гетерогенном состоянии и после перехода в раствор определяли при 25° на рН-стате типа ТТТ-1с фирмы «Radiometer» (Дания) с использованием специфического субстрата — этилового эфира и N-ацетил-L-тирозина*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Торчилин В. П., Бобкова А. С., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) Биоорган. химия, 2, 116—124.
2. Рабинович И. М. (1971) Применение полимеров в медицине, «Медицина», Л.
3. Gabriel O. (1971) Methods Enzymol., 22, 578—584.
4. Пат. Великобритании № 1238280 (1971).
5. O'Malley J. J., Ulmer R. W. (1973) Biotechnol. and Bioeng., 15, 917—921.
6. Березин И. В., Клыбанов А. М., Мартинек К. (1975) Успехи химии, 44, 17—47
7. Bender M. L., Begue-Canton M. L., Bleakeley R. L., Brubacher L. J., Feder 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.
8. Levy G. B., Caldas J., Ferdus D. (1952) Anal. Chem., 24, 1799—1803.

Поступила в редакцию
11.IX.1975

ENZYME IMMOBILIZATION ON BIOCOMPATIBLE CARRIERS.

II. IMMOBILIZATION OF α -CHYMOTRYPSIN ON POLYVINYLPIRROLIDONE.

TORCHILIN V. P., TISHCHENKO E. G., SMIRNOV V. N.,
CHAZOV E. I.

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

To obtain biocompatible and biosoluble immobilized enzymes for medical application, the method of preparation of enzyme containing polyvinylpyrrolidone microspheres with prolonged solubility and desired rate of enzyme secretion has been elaborated. As a model enzyme α -chymotrypsin has been used. The samples of polyvinylpyrrolidone have been obtained which contain entrapped and copolymerized enzyme. The effect of reaction conditions on activity of α -chymotrypsin has been studied. The correlation between dissolution time of the immobilized enzyme and the matrices has been found. The kinetics of the hydrolysis of N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester with the immobilized enzyme have been studied.

* Кинетические измерения проведены В. С. Гольдмахером.