



УДК 577.152.344.04

© 1994 Е. А. Марквичева, А. С. Бронин,
Н. Е. Кудрявцева, И. Ф. Кузькина *, И. И. Пашкин *,
Ю. Э. Кириш **, Л. Д. Руми, В. П. Zubov

НОВЫЙ МЕТОД ИММОБИЛИЗАЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ПОЛИМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЯХ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;*

**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова;*

***Физико-химический институт им. Л. Я. Карпова, Москва*

Ключевые слова: трипсин, карбоксипептидаза В, иммобилизация, обратимо термоосаждаемый полимер, поли-N-винилкапролактан.

Разработан новый одностадийный метод иммобилизации ферментов в композиционных гелях на основе биоинертного обратимо термоосаждаемого полимера — поли-N-винилкапролактама (ПВК). Оптимизированы условия включения протеолитических ферментов в гели. При этом получены полимерные гранулы, в которых активности карбоксипептидазы В и трипсина составляют соответственно 80 и 90% от исходных. Показано, что иммобилизованные ферменты активны в широком диапазоне рН и температур. Полимерные гранулы с включенными в них ферментами успешно использованы в процессе получения человеческого инсулина из рекомбинантного проинсулина.

Метод иммобилизации ферментов путем включения их в полимерный гель привлекателен своей простотой, возможностью проведения процесса в «мягких» условиях (в интервале физиологических температур и рН), а также возможностью варьировать состав и структуру полимерной матрицы. В настоящее время в качестве матриц используются как природные материалы, в частности полисахариды, так и синтетические полимеры: полиакриламид, полиметакрилаты, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон и др. [1]. Однако степень включения ферментов в полимерный гель и соответственно относительная ферментативная активность иммобилизованных препаратов обычно получаются недостаточно высокими. Так, активность трипсина, включенного в полиакриламидный гель, составляет только 23% [2], а в гидрогели на основе поливинилового спирта — 70% [3] от активности фермента в растворе. Что касается карбоксипептидазы В, то в литературе не описана иммобилизация этого фермента в гидрогелях; известно, однако, что фермент крайне неустойчив в нативной форме и иммобилизация общепринятыми методами приводит к полной его инактивации.

Применение иммобилизованных в гидрогелях ферментов в различных биотехнологических процессах, в частности в процессе получения инсулина из рекомбинантного проинсулина или для полусинтетического синтеза инсулина человека, может существенно снизить стоимость полученного гормона благодаря

Имобилизация трипсина и карбоксипептидазы В в гидрогелях

Фермент	Состав полимерного матрикса	Соотношение полимерных составляющих комплексного геля, мг/мг/мг	Относительная активность иммобилизованного фермента, %	Соотношение фермент/ПВК, мг/г	Размер гранул, мм	
Трипсин нативный	Альгинат	—	8	—	0,1—0,5	
	ПВК	—	20	22,0/1,0	2,0—3,0	
	ПВК/альгинат	2,5/1,0	25	22,0/1,0	0,1—1,0	
	ПВК/альгинат/ПОЛАР-2	2,5/1,0/0,03	35	22,0/1,0	0,2—1,0	
	ПВК/альгинат/ПОЛАР-2	2,5/1,0/0,03	85	10,5/1,0	0,2—1,0	
стабилизированный	ПВК/альгинат/ПОЛАР-2	2,5/1,0/0,03	45	15,5/1,0	0,2—1,0	
	ПВК/альгинат/ПОЛАР-2	2,5/1,0/0,03	90	11,5/1,0	0,2—1,0	
Карбоксипептидаза В	нативная	ПВК/альгинат	2,5/1,0	25	20,0/1,0	0,2—1,0
		ПВК/альгинат	2,5/1,0	40	13,0/1,0	0,2—1,0
	стабилизированная	ПВК/альгинат/ПОЛАР-2	2,5/1,0/0,03	40	14,5/1,0	0,3—1,2
		ПВК/альгинат/ПОЛАР-2	2,5/1,0/0,03	80	8,0/1,0	0,3—1,2

стабильности иммобилизованных ферментов и возможности их многократного использования. До настоящего времени в литературе не описано способов получения инсулина при помощи иммобилизованных в полимерных носителях ферментов.

Цель настоящего исследования — разработка нового одностадийного «мягкого» метода включения протеолитических ферментов (трипсина и карбоксипептидазы В) в гидрогели на основе поли-N-винилкапролактама и исследование возможности использования иммобилизованных ферментов при гидролизе рекомбинантного человеческого проинсулина.

ПВК является новым синтетическим водорастворимым биоинертным, обратимо термоосаждаемым в физиологическом интервале температур полимером; принадлежит к классу N-виниламидов. Ранее нами было показано, что ПВК имеет уникальные для биотехнологии свойства: 1) способность формировать гидрогели при повышении температуры раствора полимера от 20 до 37—40° С и 2) способность к комплексообразованию с различными биологическими объектами (белками [4], клетками [5]). Представлялось перспективным изучить возможность использования вышеперечисленных свойств ПВК для включения ферментов (и особенно нестабильной и дорогостоящей карбоксипептидазы В) в полимерные гранулы.

Для иммобилизации были использованы гели как на основе одного полимера — альгината кальция (далее — альгинат) или ПВК, так и композиционные полимерные матрицы (ПВК-альгинат). Из таблицы видно, что активность иммобилизованного трипсина зависела от типа и состава полимерной матрицы, а также от соотношения ПВК/фермент. В «классический» альгинатный гидрогель практически не удавалось включить фермент: относительная активность иммобилизованного трипсина составляла 7% от исходной. В гель ПВК трипсин включался практически количественно (в супернатанте оставалось 5—10% фермента). Однако активность иммобилизованного фермента составляла только 20—25% от исходной. Вероятно, это можно объяснить наличием диффузионных ограничений, имеющих место при использовании гранул размером 2—3 мм. Получить же гранулы меньших размеров было невозможно из-за большой вязкости раствора ПВК (M_v 900 000, минимальная концентрация полимера, необходимая для формирования гранул, составляла 6—8%). В подобранных экспериментальным путем

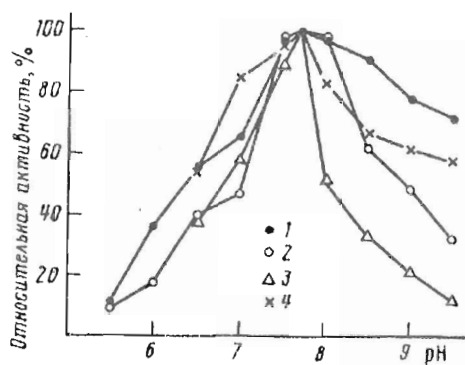


Рис. 1. Зависимость активности ферментов, иммобилизованных в ПВК-альгинатном геле, от pH. Ферменты: трипсин нативный (1) и стабилизированный (2), карбоксипептидаза В нативная (3) и стабилизированная (4). Состав геля см. в таблице

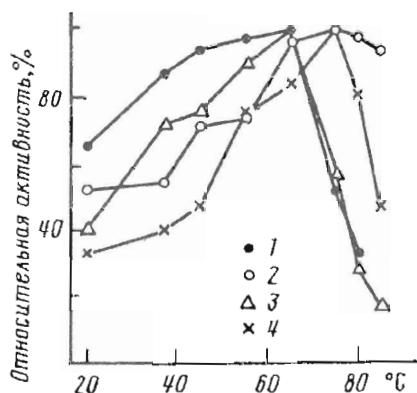


Рис. 2. Зависимость активности ферментов, иммобилизованных в ПВК-альгинатном геле, от температуры. Ферменты: трипсин нативный (1) и стабилизированный (2), карбоксипептидаза В нативная (3) и стабилизированная (4). Состав геля см. в таблице

оптимальных условиях были получены композиционные ПВК-альгинатные гели с активностью фермента до 200—230 МЕ/г ПВК. Следует отметить, что введение в матрицу ПВК альгината позволило уменьшить размер гранул за счет снижения вязкости полимерного раствора и вместе с тем повысить механическую прочность полученных гелей. Для предотвращения диффузии комплекса ПВК—фермент из гранул после снижения температуры от 40° С до комнатной в полимерную матрицу вводили ПОЛАР-2 (полимер из класса сульфосодержащих ароматических полиамидов). ПОЛАР-2 образует с ПВК интерполимерный комплекс, аналогичный комплексу поливинилпирролидон—ПОЛАР-2 [6], который не растворяется при снижении температуры. Введение ПОЛАР-2 в полимерную матрицу способствовало сохранению активности иммобилизованных трипсина и карбоксипептидазы В (соответственно до 4 мес и 45 сут при комнатной температуре).

Оптимальное соотношение ПВК/фермент, найденное экспериментально, позволило увеличить относительные активности иммобилизованных нативных трипсина и карбоксипептидазы В с 35 до 85 и с 25 до 40% соответственно (см. таблицу).

Другой подход к увеличению активности иммобилизованного фермента состоял в том, чтобы «удержать» фермент в геле за счет его предварительной стабилизации сополимером N-винилпирролидона и диэтилацеталя акролеина. Метод получения стабилизированных трипсина и карбоксипептидазы В описан в работах [7, 8].

Далее были изучены активности включенных в композиционный ПВК-альгинатный гель (ПВК/альгинат/ПОЛАР-2) нативных и стабилизированных ферментов в зависимости от pH (рис. 1) и температуры (рис. 2). Максимальная активность для обеих форм трипсина наблюдалась при pH 7,5, а для карбоксипептидазы В — при pH 7,6. Таким образом, иммобилизация ферментов не влияла на оптимальное значение pH, при этом иммобилизованные ферменты сохраняли активность в широком диапазоне pH.

Иммобилизация ферментов в геле привела к сохранению активности в широкой области температур — вплоть до 65 и 75° С для нативных и стабилизированных форм соответственно (рис. 2). В то же время для стабилизированного трипсина, не иммобилизованного в гель, инактивацию наблюдали уже при 55° С [8].

Гранулы с включенными в них ферментами были использованы для ферментативного гидролиза рекомбинантного проинсулина человека с образованием инсулина, при этом была показана принципиальная возможность многократного использования иммобилизованных ферментов. Анализ продуктов гидролиза проинсулина проводили методом ВЭЖХ (рис. 3).

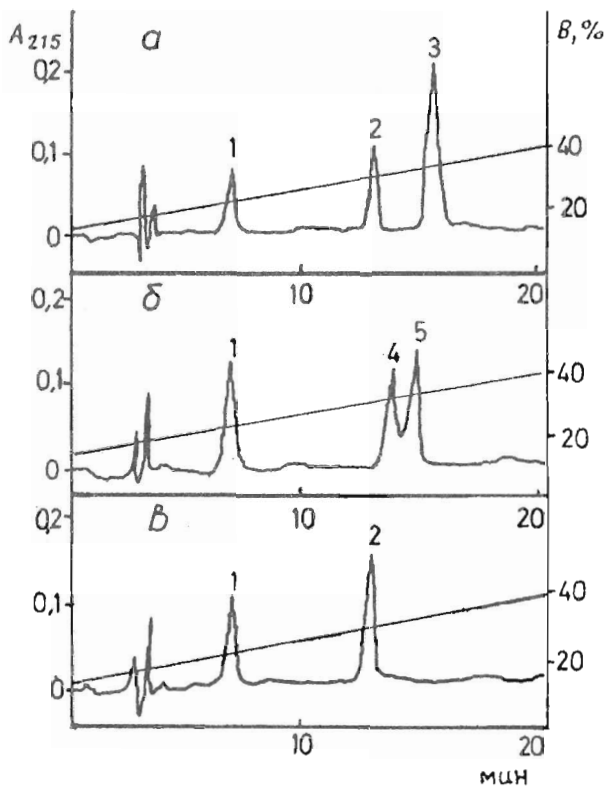


Рис. 3. ВЭЖХ контрольных образцов С-пептида, рекомбинантного инсулина и проинсулина (а), продуктов гидролиза проинсулина иммобилизованным трипсином (б) и продуктов последовательного гидролиза проинсулина иммобилизованными трипсином и карбоксипептидазой В (в). 1 — С-пептид, 2 — инсулин, 3 — проинсулин, 4, 5 — промежуточные продукты гидролиза проинсулина. Условия хроматографии см. в «Экспер. части»

Таким образом, был разработан простой метод включения протеолитических ферментов в композиционные гидрогели на основе ПВК и показана принципиальная возможность использования полученных иммобилизованных препаратов для ферментативного гидролиза рекомбинантного проинсулина. Разработанный метод может быть использован для иммобилизации широкого спектра ферментов с целью их дальнейшего применения в различных биотехнологических процессах.

Экспериментальная часть

В работе использовали альгинат натрия (Bellco), а также ПВК (M_r 900 000) и ПОЛАР-2 (M_r 25 000), полученные в МИТХТ им. М. В. Ломоносова, карбоксипептидазу В (КФ 3.4.21.4), 100 МЕ/мг («Биолар», Латвия). Трипсин (КФ 3.4.17.2; 22 МЕ/мг); стабилизированные карбоксипептидаза В и трипсин (25 и 11 МЕ/мг соответственно) были любезно предоставлены Российским научно-исследовательским технологическим институтом антибиотиков и ферментных препаратов (Санкт-Петербург). Рекомбинантный проинсулин был получен в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН.

Иммобилизация ферментов в гелях. 0,5—1 мл раствора фермента (10 мг/мл) добавляли либо к 4—5 мл 2% раствора альгината натрия (для получения альгинатных гранул), либо к 2—3 мл 10% раствора ПВК (для получения гранул ПВК), либо (в случае композиционных гелей) к смеси растворов полимеров (оптимальные соотношения ПВК/альгинат натрия/ПОЛАР-2 приведены в таблице). Полученную смесь через шприц по каплям вводили в 2% раствор CaCl_2 (в случае ПВК-альгинатного геля раствор подогревали до 40° С для того, чтобы обеспечить термоосаждение комплекса ПВК—фермент в момент образования геля; альгинатные гранулы получали при комнатной температуре) или в 0,5%

раствор резорцина (40° С) при получении геля ПВК. Для получения гранул размером 0,1—1,0 мм использовали специальный прибор, в котором отрыв капель с кончика иглы шприца происходил под давлением воздуха (рис. 4).

Активность трипсина и карбоксипептидазы В определяли, используя в качестве субстратов *Bz-Arg-OEt* и *Bz-Gly-Arg*, как описано в работе [10], причем в случае иммобилизованных ферментов к аликвоте гранул (0,1 мл плотного осадка) добавляли раствор соответствующего субстрата. Для сохранения прочности гранул с использованием альгината к раствору субстрата добавляли 1% CaCl_2 .

Ферментативный гидролиз проинсулина осуществляли, пропуская по замкнутому циклу со скоростью 1 мл/мин раствор проинсулина (0,6 мг/мл) в 50 мМ трис- HCl -буфере, рН 7,5, содержащем 1% CaCl_2 , через колонку, заполненную гранулами с иммобилизованными ферментами (37° С, 25 мин). Анализ реакционной смеси (пробы по 20 мкл) проводили методом ВЭЖХ на колонке Beckman (4,6 мм×25 см, 5 мкм) в системе буферов А и В: А — 10% CH_3CN , 0,1% ТФА в воде, В — 0,1% ТФА в CH_3CN . Использовали градиент от 15 до 40% буфера В за 20 мин. Скорость потока 1 мл/мин.

Авторы выражают благодарность Ю. Федотову за синтез полимера ПОЛАР-2 и предоставление образцов для проведения настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Введение в прикладную энзимологию. Иммобилизованные ферменты/Ред. И. В. Березин и К. Мартинек. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1982. С. 75—83.
2. Johanson A. C., Mosbach K. // *Biochim. et biophys. acta.* 1974. V. 370. P. 339—347.
3. Yasui T., Ichihara Y. // *Japan pat.* № 7553583. 1975.
4. Кири Ю. Э., Галаев И. Ю., Карапунтадзе Т. М., Марголин А. Л., Шведас В. К. // *Биотехнология.* 1987. Т. 3. № 2. С. 184—189.
5. Markvicheva E. A., Kuzkina I. F., Pashkin I. I., Plechko T. N., Kirsh Yu. E., Zubov V. P. // *Biotechnol. Techniq.* 1991. V. 5. № 3. P. 223—226.
6. Кири Ю. Э., Федотов Ю. А., Пузина Н. А., Артемов Д. Е., Януль Н. А., Некрасова Т. Н. // *Высокомолекуляр. соединения.* 1991. Т. 33А. № 5. С. 1127.
7. Балцера Д. Ю., Иванова Г. П., Москвичев Б. В., Донецкий И. А., Каратеева Р. И., Изотова Е. Н. Способ получения иммобилизованного трипсина: А. с. 1482199 СССР. Заявка № 4245570 от 13.05.87.
8. Изотова Е. Н. Изучение сорбционных и каталитических свойств модифицированных протеиназ в зависимости от молекулярно-массовых характеристик полимера-модификатора. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 1992. С. 11.
9. Иванова Г. П., Таратина Т. М., Балцера Д. Ю., Гибиетис Я. Я., Москвичев Б. В. Способ стабилизации ферментов: А. с. 1524481 СССР. Заявка № 4347621 от 21.12.87.
10. Кудрявцева Н. Е., Руми Л. Д., Жигис Л. С., Вульфсон А. Н., Мальцев К. В., Zubov V. P. // *Хим.-фармацевт. журн.* В печати.

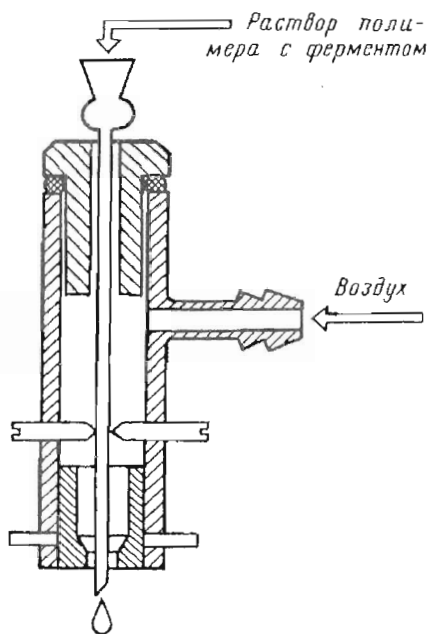


Рис. 4. Прибор для получения гранул с иммобилизованными ферментами

*E. A. Markvicheva, A. S. Bronin, N. E. Kudryavtseva, I. F. Kuzkina **,
*I. I. Pashkin**, *Yu. E. Kirsh***, *L. D. Rumsh, V. P. Zubov*

**A NOVEL METHOD FOR IMMOBILIZATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES
IN POLYMER HYDROGELS**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;*

** M. V. Lomonosov Moscow Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;*
*** L. Ya. Karpov Physico-Chemical Institute, Moscow*

A novel one-step method for enzyme immobilization in composite gels based on the thermally reversible polymer poly(N-vinylcaprolactam) was developed. Conditions for entrapment of trypsin and carboxypeptidase B in the gels were optimized. After immobilization, 80 and 90% of the original carboxypeptidase B and trypsin activities, respectively, were found to retain. Both immobilized enzymes were active in a wider pH and temperature range. The granules with entrapped enzymes were successfully applied to obtain human insulin from recombinant proinsulin.