



УДК 577.156.3.02

## МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ БИОСОВМЕСТИМЫМИ ПОЛИМЕРАМИ

### СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИПСИНА, КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННОГО С ВОДОРАСТВОРИМОЙ СМ-ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

*Кинстлер О. Б., Жагат Р. А.*

*Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

*Торчилин В. П.*

*Всесоюзный кардиологический научный центр  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Проведен синтез производных трипсина, модифицированных водорастворимой СМ-целлюлозой карбодимидным методом в трех модификациях, а также с использованием азидов СМ-целлюлозы. Изучено влияние комплексообразования в процессе модификации трипсина СМ-целлюлозой. Синтезированные производные трипсина практически полностью сохраняют активность как по низкомолекулярному, так и по растворимому и нерастворимому высокомолекулярным субстратам, но обладают значительно более высокой термостабильностью.

В последнее время при исследовании иммобилизованных ферментов все большее внимание уделяется изучению водорастворимых ферментных препаратов, полученных ковалентным связыванием ферментов с различными растворимыми полимерными носителями [1–3]. Такие препараты представляются перспективными для использования в процессах, связанных с превращением макромолекулярных или нерастворимых субстратов, когда гетерогенные препараты иммобилизованных ферментов оказываются при всех своих положительных свойствах бесполезными.

Особого внимания, по-видимому, заслуживают водорастворимые стабилизированные ферменты со стороны медицины, где в последние годы высокоэффективные и высокоспецифические ферментные препараты все шире начинают применяться в терапии многочисленных заболеваний, связанных с нарушением метаболизма высокомолекулярных субстратов. Отметим прежде всего такие распространенные заболевания, как тромбозы и их осложнения, атеросклероз и т. п., и применяемые для их терапии ферменты, прежде всего фибринолитики — фибринолизин, урокиназу, стрептокиназу и другие протеиназы, например трипсин и химотрипсин [4].

Как было показано в целом ряде исследований [5–7], модификация ферментов терапевтического действия растворимыми полимерами позволяет продлить время их активного функционирования в организме, уменьшить их токсичность и антигенность, сократить расход дорогостоящих ферментных препаратов. Однако создание стабилизированных ферментных препаратов медицинского назначения предусматривает использование как носителей, так и способов иммобилизации, исключающих возможные неблагоприятные побочные эффекты и отвечающих всем требованиям ме-

Влияние условий реакции взаимодействия трипсина и СМ-целлюлозы на состав и активность модифицированного трипсина

Препарат	Метод синтеза	Условия *		Связанный белок	
		I, M	pH	содержание, мг/мг препарата	активность, % от исходной
D1	Карбодимидный	0,1	6,5	0,30	~100
D2	»	0,8	6,5	0,28	~70
D3	Карбодимидный **	—	5,0	0,26	~100
A1	Азидный	—	8,8	0,32	~100

\* Бесовое соотношение трипсина к СМ-целлюлозе в реакционной смеси 1 : 2.

\*\* Метод с предварительной активацией карбодимидом СМ-целлюлозы.

дицины [8]. Весьма перспективными принято считать полисахаридные носители, в первую очередь растворимые декстраны, на которых выполнено большинство исследований в области ковалентно связанных с растворимыми носителями ферментов, используемых в медицине [9—11]. Не исключено, однако, что и другие соединения полисахаридной природы также окажутся хорошими носителями, тем более что в определенном смысле недостатком декстранов можно считать их сравнительно быструю утилизацию в организме. Производные целлюлозы, например, могут не претерпевать заметных изменений в физиологических условиях заметно дольше, а наличие большого набора реакционноспособных производных целлюлозы дает известную свободу выбора методов получения соответствующих препаратов.

В настоящей работе проведено изучение различных свойств препаратов трипсина, ковалентно связанного с помощью карбодимидного и азидного методов с водорастворимой СМ-целлюлозой.

Использование ионогенных полимерных матриц для иммобилизации ферментов открывает широкие возможности для варьирования свойств получаемых ферментных препаратов. Ранее было показано, что в определенных условиях возможно образование предреакционного электростатического комплекса фермент—носитель, в результате чего с носителем удастся связать больше, чем обычно, количества фермента с меньшими потерями активности и с заметным повышением термостабильности продукта [12]. В настоящем случае при смешивании водных растворов СМ-целлюлозы и трипсина (при pH 6,5 и ионной силе  $I$  0,1 M) в начальный период можно наблюдать кратковременную опалесценцию раствора. Подобное явление отсутствует в растворе с высокой ионной силой ( $I$  0,8 M), при которой заряды макромолекул экранированы низкомолекулярными электролитами. По нашему мнению, наличие опалесценции раствора в первом случае может быть обусловлено образованием полимерного комплекса СМ-целлюлозы с трипсином. Проверка этого предположения проведена нами при сравнении трех процедур ковалентной фиксации трипсина на СМ-целлюлозе карбодимидным методом—соответственно препараты D1, D2 и D3 (см. табл. 1 и «Экспериментальную часть»). Препараты D1 и D2 получены после введения карбодимиды в реакционную смесь, содержащую трипсин и носитель, в то время как препарат D3 получен при предварительном действии карбодимиды на СМ-целлюлозу с последующим добавлением трипсина к активированному носителю. Различие в условиях синтеза препаратов D1 и D2 заключается в величине ионной силы буферных растворов, используемых при модификации (см. табл. 1).

Анализ продуктов, полученных при ковалентной модификации трипсина водорастворимой СМ-целлюлозой в присутствии карбодимиды (препа-

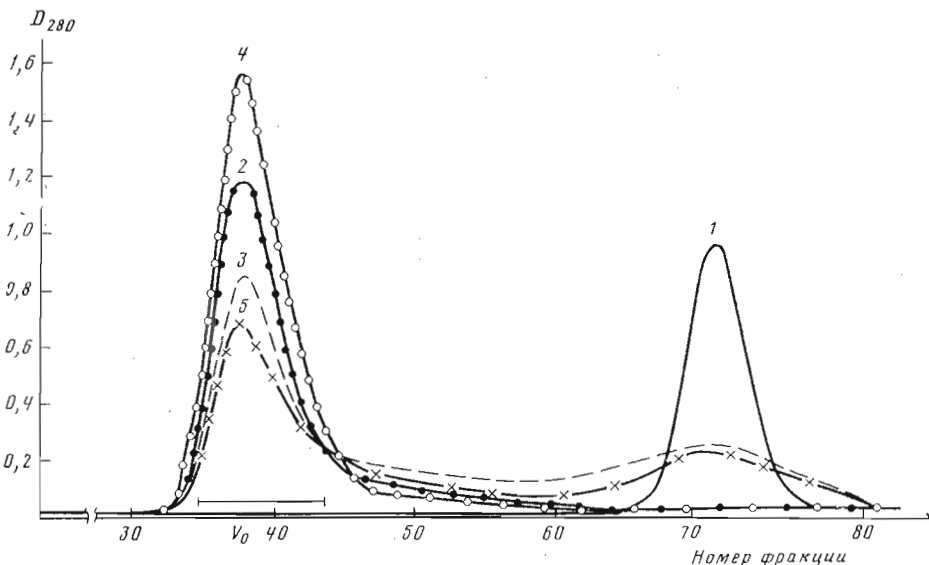


Рис. 1. Хроматография на сефадексе G-100 (колонокка 2,6×70 см) нативного трипсина (1) и препаратов трипсина, модифицированного СМ-целлюлозой, карбодимидным методом при  $I$  0,1 М (2, препарат Д1), при  $I$  0,8 М (3, препарат Д2), с предварительной активацией карбодимидом карбоксильных групп СМ-целлюлозы (4, препарат Д3), а также азидным методом (5, препарат А1). Объем фракций 3 мл, скорость элюции 0,5 мл/мин. Отмечены фракции, используемые для дальнейшей работы

раты Д1 — Д3), показал (рис. 1), что при карбодимидном способе фиксации фермента наиболее полное связывание белка с СМ-целлюлозой (при использованном соотношении реагентов) происходит только для препарата Д1, т. е. в случае с «предварительным комплексобразованием» фермента с водорастворимым носителем.

На рис. 1 приведена также выходная кривая гель-хроматографии продуктов взаимодействия азиды СМ-целлюлозы и трипсина (препарат А1), из которой следует, что азидный метод также позволяет осуществить полное связывание белка с СМ-целлюлозой. Следует отметить, что присутствие нековалентно связанного трипсина в синтезированных таким образом препаратах исключено благодаря применению при гель-хроматографии высокой ионной силы ( $I$  0,5) элюирующего раствора, разрушающей нековалентные межмакромолекулярные связи белка с полимерной матрицей.

Как видно из табл. 1, полученные препараты трипсина характеризуются сохранением практически полной активности фермента.

Чтобы охарактеризовать ферментные свойства различных препаратов модифицированного трипсина, мы изучили процесс гидролиза ими специфического низкомолекулярного субстрата трипсина — этилового эфира *N*- $\alpha$ -бензил-*L*-аргинина.

Как видно из табл. 2, значения  $K_{m(\text{наж})}$  для производных трипсина, полученных разными методами, мало различаются между собой и в 1,5—2 раза превосходят значения  $K_{m(\text{наж})}$  для нативного трипсина. Это вполне понятно, если учесть создаваемые матрицей СМ-целлюлозы пространственные затруднения для взаимодействия активного центра трипсина с субстратом.

Некоторое понижение  $k_{\text{кат}}$  для модифицированных СМ-целлюлозой препаратов трипсина, полученных карбодимидным методом, может быть объяснено близостью отрицательно заряженной матрицы к активному центру фермента. Подобный эффект достаточно хорошо известен [12—13]. В препарате, полученном азидным методом, где, вероятно, имела место некоторая деструкция СМ-целлюлозы на предварительных стадиях получе-

Таблица 2

**Кинетические параметры гидролиза Vz-Arg-OEt  
препаратами трипсина, модифицированного СМ-целлюлозой  
рН 7,51, [S] 2–100 мМ, 20° С**

Препарат трипсина	$k_{кат}, c^{-1}$	$K_m^{-1}(каж), мМ$
Нативный	11,6±0,2	0,95±0,25
Д1	9,0±0,2	2,21±0,92
Д2	8,6±0,1	1,51±0,36
А1	11,8±0,1	2,18±0,63

Таблица 3

**Равновесные константы взаимодействия трипсина  
и его модифицированных СМ-целлюлозой производных  
с панкреатическим ингибитором трипсина**

Препарат трипсина	$K_i 10^4, M$	Препарат трипсина	$K_i 10^4, M$
Нативный	16±2,5	Д2	1,01±0,34
Д1	3,64±0,84	А1	1,37±0,81

ния водорастворимого азида, подобное влияние носителя выражено в меньшей степени.

Таким образом, модификация трипсина СМ-целлюлозой позволяет получить препараты фермента, которые по своим свойствам мало отличаются от нативного фермента в реакции превращения низкомолекулярного субстрата.

Существенной характеристикой препаратов иммобилизованных ферментов является их стабильность по отношению к термической денатурации. Нами был изучен процесс термоденатурации полученных различными способами препаратов ковалентно связанного с СМ-целлюлозой трипсина в сравнении с нативным ферментом. Предварительно было показано, что в области исследованных концентраций активного фермента ( $\sim 10^{-5}$  М) термоинактивация трипсина является реакцией первого порядка, т. е. понижение активности не может быть отнесено за счет автолиза.

Исследование тепловой денатурации исходного трипсина и его модифицированных СМ-целлюлозой производных в условиях, близких к физиологическим (0,1 М фосфатный буфер, 37° С, рН 7,4), показало значительно более высокую термостабильность модифицированных препаратов (рис. 2).

Как видно из рис. 2, препарат А1, полученный по азидному методу, термостабильнее соответствующих производных, синтезированных карбодимидным методом. Это, возможно, объясняется реализацией большего числа ковалентных связей белок — СМ-целлюлоза в случае азидного метода модификации. Действительно, титрование аминокрупп модифицированных белков при помощи 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты [14] показало, что в препаратах Д1 и Д2 титруется  $\sim 80\%$  от доступных в нативном трипсине аминокрупп, а в препарате А1 — только  $\sim 47\%$ .

Следует отметить также несколько более высокую термостабильность препарата Д1 в сравнении с препаратом Д2. Это, на наш взгляд, также служит подтверждением того, что в условиях низкой ионной силы происходит комплексообразование трипсина с СМ-целлюлозой, способствующее многоточечному связыванию белка с матрицей, фиксируемому ковалентным сшиванием под действием карбодимида.

Из многочисленных работ по биохимии иммобилизованных ферментов известно, что при сохранении или даже улучшении многих важных харак-

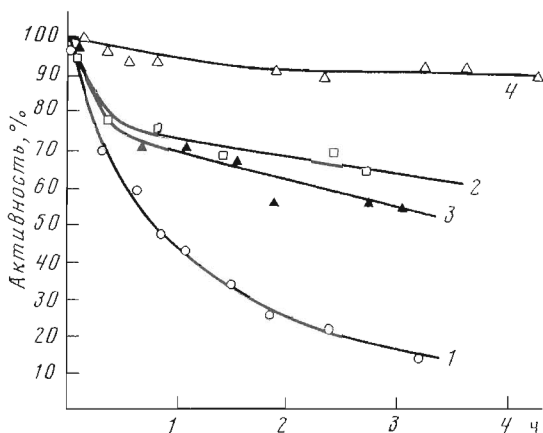


Рис. 2. Термоинактивация (37° С, рН 7,4) препаратов трипсина: нативного (1), Д1 (2), Д2 (3) и А1 (4). Концентрация активного фермента 5 мкМ

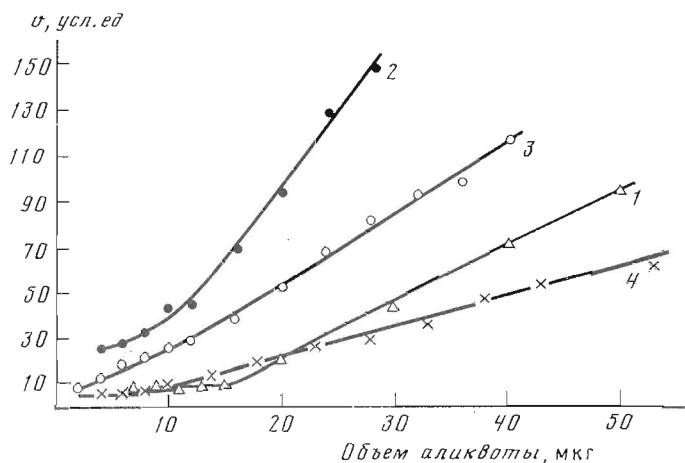


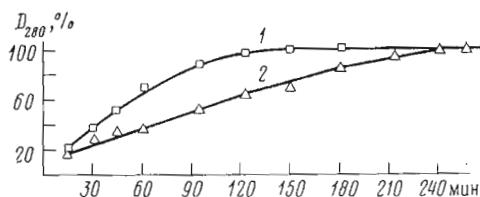
Рис. 3. Титрование панкреатического ингибитора трипсина аликвотами раствора нативного трипсина (1) и его модифицированных препаратов Д1 (2), Д2 (3) и А1 (4). Условия: [S] 10 мМ; рН 7,51; I 0,1 М (KCl); 20° С; объем титруемого раствора 10 мл; [I]<sub>0</sub> 8,65·10<sup>-8</sup> (1) и 9,81·10<sup>-7</sup> М (2-4); [E] 1,01·10<sup>-5</sup> (1), 1,12·10<sup>-5</sup> (2), 7,32·10<sup>-6</sup> (3) и 1,16·10<sup>-5</sup> (4)

теристик нередко ухудшается способность фермента взаимодействовать с макромолекулярными субстратами [15]. В тех случаях, когда иммобилизованный фермент, например тромболитического действия, предназначен для воздействия именно на макромолекулярные субстраты, это крайне нежелательно. Хорошим показателем сохранения или изменения этой способности белка при модификации может служить характер взаимодействия модифицированного фермента с высокомолекулярным белковым ингибитором.

Нами было проведено сравнительное изучение ингибирования трипсина и его производных, модифицированных СМ-целлюлозой, панкреатическим ингибитором трипсина. Для определения констант ингибирования  $K_i$  был использован метод ферментного титрования, подробно описанный в работе [16]. Полученные результаты приведены в табл. 3 и на рис. 3.

Уменьшение значений  $K_i$  для препаратов модифицированного трипсина, по нашему мнению, также следствие влияния отрицательно заряжен-

Рис. 4. Растворение фибринового сгустка растворами нативного (1) и модифицированного (препарат Д1) трипсина (2). Ось ординат — изменение поглощения раствора, показывающее накопление в нем низкомолекулярных продуктов деградации сгустка



ной матрицы СМ-целлюлозы, способствующего повышению эффективной концентрации панкреатического ингибитора (основного белка с  $pI$  10,5 [17]). В целом, как следует из данных по ингибированию панкреатическим ингибитором, трипсин после ковалентной фиксации на СМ-целлюлозной матрице должен сохранять высокую активность и по водорастворимому высокомолекулярному субстрату.

Еще более интересным является изучение взаимодействия препаратов модифицированного фермента с природным субстратом, особенно с тем, на который этот или подобные ферментные препараты должны действовать в реальных условиях. С этой целью нами был изучен процесс лизиса модельного фибринового сгустка под действием препарата Д1 в сравнении с действием нативного трипсина.

Данные, приведенные на рис. 4, показывают, что процесс лизиса фибринового сгустка в присутствии модифицированного СМ-целлюлозой водорастворимого трипсина протекает лишь в 2 раза медленнее, чем в присутствии активного нативного трипсина в той же концентрации, а время полного лизиса также увеличивается не более чем в 2 раза. Сохранение столь высокой активности модифицированным ферментом при резком увеличении его термостабильности свидетельствует о перспективности фибринолитических препаратов, полученных модификацией протеолитических ферментов методом их ковалентной фиксации на водорастворимой СМ-целлюлозе.

### Экспериментальная часть

В работе использовали этиловый эфир  $N$ - $\alpha$ -бензоил- $L$ -аргинина, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, панкреатический ингибитор трипсина — препараты фирмы «Sigma» (США). Содержание активного фермента в препарате трипсина, определенное титрованием активных центров [18], составляло 88% от веса препарата.

СМ-целлюлоза — водорастворимый препарат со степенью полимеризации, определенной вискозиметрически [19, 20], равной 73,6, что соответствует средневискозиметрической молекулярной массе  $\bar{M}_v = 16\,930$ . Степень замещения СМ-целлюлозы карбоксиметильными группами — 0,8 (определена осаждением уранильной соли СМ-целлюлозы [21] и потенциметрическим титрованием [22]). Остальные соли, реактивы и компоненты буферных растворов — препараты аналитической степени чистоты.

*Модификация трипсина СМ-целлюлозой карбодимидным методом. Препараты Д1 и Д2.* К охлажденному раствору 52 мг (0,25 ммоль элементарных звеньев) СМ-целлюлозы в 8 мл 0,01 М фосфатного буфера, рН 6,5, 1 0,1 (Д1) или 0,8 М (NaCl) (Д2) добавляли охлажденный раствор 25 мг трипсина в 2 мл 0,01 М фосфатного буфера, рН 6,5, и перемешивали 1 ч при 0–4° С. Затем добавляли охлажденный раствор 102 мг карбодимиды в 2 мл того же буфера и продолжали перемешивание при той же температуре еще 20 ч.

*Препарат Д3.* 52 мг СМ-целлюлозы растворяли в 6 мл  $H_2O$  и рН раствора доводили 1 н. HCl до 4,4. Раствор охлаждали до 0–4° С, добавляли охлажденный раствор 102 мг (0,5 ммоль) карбодимиды в 2 мл  $H_2O$  и перемешивали 30 мин при 0–4° С. После этого добавляли 25 мг трипсина в

2 мл охлажденного 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,4, и продолжали перемешивание в течение 20 ч при 0—4° С.

Препараты трипсина, модифицированного СМ-целлюлозой, выделяли гель-хроматографией на колонке К 26/70 (Pharmacia, Швеция), наполненной сефадексом G-100. Элюент — 0,01 М фосфатный буфер, рН 7,4, 1,05 М (NaCl). Содержание белка во фракциях оценивали измерением поглощения при 280 нм на спектрофотометре 4 (Perkin — Elmer, США). Фракции, содержащие белок и выходящие со свободным объемом колонки ( $V_0$ ), обессоливали диализом против дистиллированной воды и подвергали лиофильной сушке.

*Модификация трипсина СМ-целлюлозой азидным методом (препарат А1). Метилловый эфир СМ-целлюлозы.* 5 г свежесажженной и инклюзиванной метанолом СМ-целлюлозы в кислотной форме суспендировали в 200 мл абсолютного метанола и обрабатывали эфирным раствором, который содержал 8-кратный избыток диазометана. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при 20° С. Основную массу продукта отделяли фильтрованием, а низкомолекулярные продукты после упаривания фильтрата до объема 5—10 мл осаждали ацетоном. Осадки объединяли и промывали на фильтре ацетоном. Выход 4,6 г.

*Гидразид СМ-целлюлозы.* 4,6 г метилового эфира СМ-целлюлозы растворяли в 200 мл гидразингидрата и выдерживали 6 сут при 38° С. Раствор упаривали до сиропообразной консистенции и полимер осаждали этанолом. Последующую очистку гидразида СМ-целлюлозы осуществляли 5-кратным его переосаждением из водного раствора этанолом. Полученный продукт лиофильно высушивали. Выход 4,4 г.

*Азид СМ-целлюлозы.* 62,5 мг (0,25 ммоль элементарных звеньев) гидразида СМ-целлюлозы растворяли в 6 мл  $H_2O$ , охлаждали до 0—4° С и добавляли охлажденную 6 н. HCl (0,62 мл, 3,75 ммоль) и раствор 87,5 мг (1,25 ммоль)  $NaNO_2$  в 3 мл  $H_2O$ . Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0—4° С. Водорастворимый азид СМ-целлюлозы осаждали медленным выливанием реакционной смеси в 200 мл охлажденного ацетона, выделяли центрифугированием при 18 000 об/мин в течение 30 мин, промывали на фильтре охлажденным ацетоном и немедленно использовали. Выход 50 мг.

*Препарат А1.* 25 мг трипсина растворяли в 10 мл охлажденного 0,05 М боратного буфера, рН 9,0, и добавляли 50 мг азиды СМ-целлюлозы. Реакционную смесь с рН 8,8—8,9 перемешивали 20 ч при 0—4° С. Модифицированный трипсин выделяли, очищали и сушили так же, как и при карбодимидном способе получения.

Количество белка, связанного с СМ-целлюлозой, определяли по модифицированному методу Лоури [23], используя калибровочный график, построенный для трипсина в присутствии СМ-целлюлозы.

Количество активного фермента в исходном трипсине и его производных определяли титрованием активных центров трипсина *n*-нитрофениловым эфиром *n'*-гуанидинобензойной кислоты [18] с использованием двухлучевого спектрофотометра «Spectronic 210 UV» (Shimadzu, Япония).

Определение свободных аминогрупп в трипсине и его производных, связанных с СМ-целлюлозой, проводили титрованием 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой [14].

Эстеразную активность препаратов трипсина определяли по начальной скорости гидролиза  $Bz-Arg-OEt$  методом потенциометрического титрования на рН-стате ТТТ-60 (Radiometer, Дания). Объем раствора 5 мл,  $[S]=2 \cdot 10^{-3}-10^{-1}$  М,  $I$  0,1 (KCl), 20° С. Кинетические параметры после линеаризации в координатах  $S/v - S$  рассчитывали методом наименьших квадратов.

Тепловую денатурацию препаратов трипсина изучали в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4, при  $[E] 5 \cdot 10^{-6}$  М. Пробы инкубируемого раствора трипсина и его производных, отобранные в различные моменты времени, охлаждали до 20° С и определяли их эстеразную активность (рис. 2).

Взаимодействие панкреатического ингибитора трипсина с препаратами нативного и модифицированного трипсина проводили методом титрования ингибитора ферментом [16] (рис. 3).

Исследование лизиса фибринового сгустка трипсином и препаратом Д1 модифицированного трипсина проводили по способу, разработанному во Всесоюзном кардиологическом научном центре Академии медицинских наук.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) *Биоорганическая химия*, 2, 1252–1257.
2. Marshall J. J., Rabinowitz M. L. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 1081–1087.
3. von Specht B. U., Brendel W. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, 484, 109–116.
4. Вольф М., Рансбергер К. (1976) *Лечение ферментами*, с. 50–55, «Мир», М.
5. Sherwood R. F., Baird J. K., Atkinson T., Wiblin C. N., Rutter D. A., Ellwood D. C. (1977) *Biochem. J.*, 164, 461–464.
6. Gringer L. G., Mather A. N. (1976) US Patent No 3980772.
7. Abuchowski A., McCoy J. R., Palczuk N. C., van Es T., Davis F. F. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 3582–3586.
8. Rejmanova P., Labsky J., Kapreck J. (1977) *Makromol. Chem.*, 178, 2159–2168.
9. Marshall J. J. (1978) *Trends in Biochem. Sci.*, 79, 79–83.
10. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Тещенко Е. Г., Ильина Е. В., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) *Биоорганическая химия*, 2, 1687–1694.
11. Marshall J. J., Humphreys J. D., Abramson S. L. (1977) *FEBS Lett.*, 83, 249–252.
12. Torchilin V. P., Tischenko E. G., Smirnov V. N. (1977) *J. Solid-Phase Biochem.*, 2, 19–29.
13. Torchilin V. P., Il'ina E. V., Streltsova Z. A., Smirnov V. N., Chazov E. I. (1978) *J. Biomed. Mater. Res.*, 12, 585–590.
14. Fields R. (1971) *Biochem. J.*, 124, 581–590.
15. Имобилизованные ферменты (1976) (Берзин И. В., Антонов В. К., Мартинек К., ред.), т. 2, с. 76–79, МГУ.
16. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Якубовская Р. И. (1979) *Биохимия*, 44, 3–17.
17. Chauvet J., Nouvel G., Acher R. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, 92, 200–206.
18. Chase T., Jr., Shaw E. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 29, 508–514.
19. Шатенштейн А. И., Вырский Ю. П., Правикова Н. А., Алиханов П. П., Жданова К. П., Изюмников А. Л. (1964) *Практическое руководство по определению молекулярных весов и молекулярно-весового распределения полимеров*, с. 11–20, «Химия», М.
20. Schurz J., Streizig H., Wurz E. (1956) *Monatsch. Chem.*, 87, 520–525.
21. Francis C. V. (1953) *Analyt. Chem.*, 25, 941–943.
22. Grosse L., Klaus W. (1972) *Z. Anal. Chem.*, 259, 195–203.
23. Hartree E. F. (1972) *Anal. Biochem.*, 48, 422–427.

Поступила в редакцию  
20.XI.1979

#### ENZYME MODIFICATION BY BIOCOMPATIBLE POLYMERS. A COMPARATIVE STUDY OF TRYPSIN DERIVATIVES COVALENTLY BOUND WITH WATER-SOLUBLE CM-CELLULOSE

KINSTLER O. B., ZHAGAT R. A., TORCHILIN V. P.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga; All-Union Cardiology Research Center, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Trypsin derivatives were synthesized by enzyme modification with water-soluble CM-cellulose using three versions of the carbodiimide method of CM-cellulose azide. The effects of complex formation in the course of modification were examined. The trypsin derivatives almost completely preserve the activity both towards low-molecular-weight and high-molecular-weight soluble or insoluble substrates, manifesting at the same time greatly enhanced thermostability as compared to the native enzyme.