

22. Лапина В.А., Донцов А.Е., Островский М.А. // Укр. биохим. журн. 1985. Т.57. №1. С.12.

23. Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Островский М.А. // Биохимия. 1986. Т.51. Вып.5. С.864.

24. Богданов Г.Н., Варфоломеев В.Н., Павловский И.В. и др. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 232. С. 494.

Поступила в редакцию 23.11.98.

УДК 577.15 + 543.544

*В.М.ШКУМАТОВ, С.Л.ОВСЯНКО, А.Л.РУДОЙ, В.А.АЛИНОВСКАЯ,
Т.Л.ЮРКШТОВИЧ, Ф.Н.КАПУЦКИЙ*

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА “ОСТАТОЧНОГО” α -ХИМОТРИПСИНА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА “ФЕРАНЦЕЛ”

The methods of the express control of the content α -chymotrypsin and determination of isoelectric points of the basic proteins are developed with use HPLC. The scheme of isolation "residual" α -chymotrypsin from a solution, which has stayed after an immobilization of the α -chymotrypsin and lincomycin on monocarboxycellulose, is offered.

Лекарственный препарат “Феранцел” представляет собой композицию из монокарбоксилцеллюлозы и нековалентно иммобилизованных на ней протеолитического фермента α -химотрипсина и антибиотика линкомицина. Препарат предназначен для лечения острых и хронических гнойно-воспалительных заболеваний и проходит в настоящее время клинические испытания [1]. В оптимизированных условиях одновременной равновесной иммобилизации установлено, что количества неадсорбированных α -химотрипсина (далее “остаточный” α -химотрипсин) и линкомицина составляют в зависимости от условий 10–15 и 10–20% соответственно от их содержания в исходных растворах. В условиях промышленного производства препарата “Феранцел” на Борисовском заводе лекарственных препаратов потери, прежде всего, дорогостоящего и дефицитного протеолитического фермента не будут оправданы.

Цель настоящей работы заключалась в разработке схемы извлечения “остаточного” α -химотрипсина из раствора после процесса иммобилизации его на монокарбоксилцеллюлозе. Для этого нами предложен метод экспресс-контроля содержания фермента высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) и проведены эксперименты по его выделению из раствора и очистке.

Материалы и методика

В работе использованы: химотрипсиноген А, полученный из поджелудочной железы крупного рогатого скота двукратной перекристаллизацией из сульфата аммония после разделения смеси проферментов по стандартной методике [2]; α -химотрипсин, набор белков-стандартов для определения изоэлектрической точки (в скобках даны значения рI) – ферритин (4,4), альбумин (4,7), β -лактоглобулин (5,34), кональбумин (5,9), миоглобин лошади (7,3), миоглобин кашалота (8,3), рибонуклеаза (9,45), цитохром с (10,65); додецилсульфат натрия, 2-меркаптоэтанол, кумасси голубой R-250 (“Serva”, Германия); α -химотрипсин (АО “Самсон”, Россия), ионообменная смола АВ-17-2М (Россия), катионообменный сульфопропил-сефадекс SP50 (“Pharmacia”, Швеция); набор реактивов для электрофореза в полиакриламидном геле – глицин, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (“Reanal”, Венгрия).

Гель-электрофорез в денатурирующих условиях проводили по методу [3]. Использовали 12%-й полиакриламидный гель. После проведения электрофореза гели помещали на 30 мин в 10%-ю трихлоруксусную кислоту, отмывали смесью: этиловый спирт–уксусная кислота–вода (5:1:5) и окра-

шивали 0,1%-м раствором кумасси голубого R-250 в 3,5%-м растворе HClO_4 .

Хроматографию низкого давления осуществляли с использованием автоматической системы "GradiFrac": программирующий коллектор фракций GradiFrac™, проточный УФ-монитор UV-1, фильтр 280 нм, градиентный смеситель PSV-50, перистальтический насос P-1 ("Pharmacia Biotech AB", Швеция) в режимах градиентного или изократического элюирования по заданным программам.

ВЭЖХ проводили на хроматографической системе ("Shimadzu", Япония). В составе системы: жидкостной хроматограф LC-10AT VP, контроллер SCL-10A VP, градиентный смеситель FCV-10AL VP, дегазирующее устройство GT-154. Для регистрации оптического поглощения в диапазоне длин волн 210–600 нм использовали матрицу диодного излучения SPD-M10A VP. Процесс хроматографии (форма градиента, интегрирование площадей пиков, скорость подачи элюента) задавали программным обеспечением (CLASS-VP; "Shimadzu"). Использовали колонку (50×4,6 мм) с катионообменной смолой "Nucleogel SCX 1000-8/46", 7 мкм ("Machery-Nagel", Германия).

Результаты и их обсуждение

Разработка экспресс-контроля содержания α -химотрипсина методом ВЭЖХ. α -Химотрипсин является ярко выраженным основным белком с изoeлектрической точкой в районе pH 9,5. В связи с этим для аналитического контроля в варианте ВЭЖХ мы использовали широкопористый сильный катионообменник с привитыми остатками сульфоновой кислоты ($-(\text{CH}_2)_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na}$), специально адаптированный для разделения белковых макромолекул (Nucleogel SCX 1000-8/46). На рис.1а представлена хроматограмма разделения смеси белков с известными изoeлектрическими точками. Наличие интенсивно поглощающего гемового хромофора для миоглобинов и цитохрома с позволяло вести одновременную регистрацию и идентификацию при длинах волн 280 нм (ароматические аминокислоты) и 410 нм (область поглощения полосы Core). Как видно из рис.1а, в выбранных условиях (линейный градиент NaCl в 0,02 М фосфатном буфере, pH 6,0) достигается удовлетворительное разделение белков с pI более 6,0. Белки с pI ниже 6,0 (ферритин, альбумин, β -лактоглобулин) не адсорбировались на носителе и элюировались в свободном объеме колонки. Нами обнаружена линейная зависимость времени удержания белков-стандартов от значений pI в выбранных условиях хроматографии (рис.1б), свидетельствующая о том, что между носителем и глобулами белков не обнаруживаются других, кроме ионных, взаимодействий. Исходя из этих данных, этот носитель может быть применен в варианте ВЭЖХ для определения неизвестных изoeлектрических точек ряда щелочных белков как альтернативный методу изoeлектрического фокусирования в присутствии амфолитов. В дальнейшем для более тонкого разделения нами использован экспоненциальный градиент NaCl в 0,02 М фосфатном буфере, pH 6,0, что позволило разделить химотрипсиноген А и α -химотрипсин. Это подтверждает представление о конформационных изменениях молекулы белка в процессе его активации, связанном с выщеплением двух дипептидов Thr-Asp и Arg-Ser из молекулы предшественника с образованием активного α -химотрипсина, и сопровождающихся, как нами установлено, изменением соотношения свободных NH_2 - и COOH -групп поверхностно-локализованных аминокислотных остатков.

Гель-электрофорез двух коммерческих образцов α -химотрипсина ("Serva", АО "Самсон") в денатурирующих условиях после восстановления дисульфидных связей позволил установить идентичность молярного распределения цепей В и С и наличия в обоих образцах минорных примесей химотрипсиногена и неохимотрипсиногена (данные не приведены).

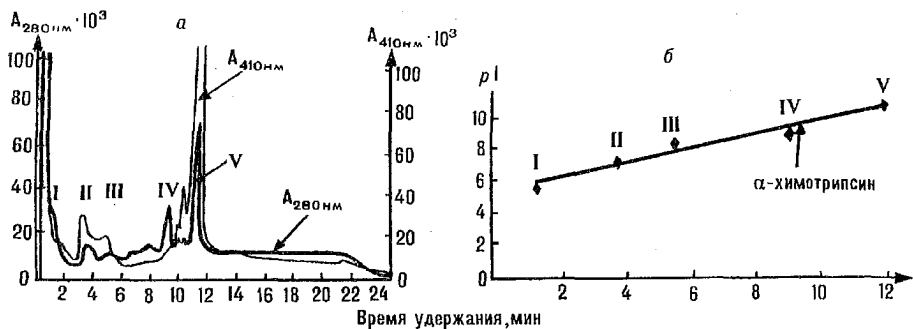


Рис.1. Разделение смеси белков с известными изоэлектрическими точками:

а – регистрация при длине волны 280 нм (жирная линия) и при длине волны 410 нм (тонкая линия). I – кональбумин 5,9; II – миоглобин лошади 7,3; III – миоглобин кашалота 8,3; IV – рибонуклеаза 9,45; V – цитохром с 10,65; б – калибровочный график определения изоэлектрической точки щелочных белков. Условия хроматографии: колонка "Нуклеогель SCX 1000-8/46", раствор А – 0,02М калий-фосфатный буфер (рН 6,0), раствор Б – 0,02М калий-фосфатный буфер (рН 6,0) + 0,5 NaCl. Линейный градиент раствора Б в течение 15 мин, скорость элюирования 1 мл/мин, объем пробы – 20 мкл

Это позволило нам, используя в качестве стандарта α -химотрипсин ("Serva", Германия, удельная активность 47 международных единиц на 1 мг белка), разработать метод количественного определения фермента с использованием ВЭЖХ (рис.2). Линейная зависимость площади пика от количества нанесенного на колонку α -химотрипсина (определяемого по поглощению белка с применением коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{282 \text{ нм}} = 51300$) в диапазоне 10–120 мкг позволяет рекомендовать метод ВЭЖХ для экспресс-контроля содержания α -химотрипсина в процессе получения лекарственного средства "Феранцел".

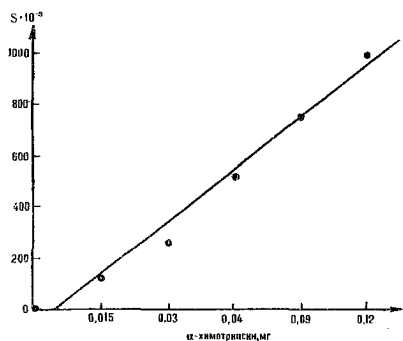


Рис.2. Калибровочный график определения содержания α -химотрипсина методом ВЭЖХ

Стабильность "остаточного" α -химотрипсина. Для разработки схемы выделения "остаточного" α -химотрипсина необходимо оценить вклад различных механизмов инактивации фермента в процессе достаточно продолжительного времени (4 ч) иммобилизации белка при комнатной температуре при нейтральных значениях рН среды, а также учесть вспомогательные и основные процедуры при его выделении и очистке. Для проявления каталитического действия α -химотрипсина (и для стабилизации конформации активного центра и глобулы фермента в целом) наиболее существенны следующие функциональные группы:

оксиметильная группа Ser-195, имидазольная группа His-57, карбоксильная группа Asp-102, α -аминогруппа N-концевого Ile-16 цепи В, карбоксильная группа Asp-194. Карбоксильная группа Asp-194 образует ионную пару с положительно заряженной α -аминогруппой Ile-16, карбоксильная группа Asp-102, экранированная от растворителя остатками His-57, Ile-99, Ser-214 и Trp-215, образует водородную связь с атомом азота имидазольного кольца His-57 [4]. Если стабилизация иммобилизованного α -химотрипсина достигается многоточечным взаимодействием свободных NH_2 -групп белка с монокарбоксилцеллюлозой [5–7], то в отношении "остаточного" α -химотрипсина в растворе действуют основные факторы инактивации: температурная и рН-инактивация, связанная с "разворачиванием – неправильным свертыванием" глобулы фермента [8], а также автолиз, скорость которого может быть снижена при уменьшении концентрации фермента, температуры (до 5°C) и рН среды. При рН 3,7–5,2 α -химотрипсин неактивен, что связано с формированием димера белка, образующегося в результате взаимодействия между α -карбоксильной групп-

пой СООН-концевого остатка Туг-146 цепи В одной молекулы фермента и имидазольной группой His-57 другой молекулы [9–11].

Нами установлено, что α -химотрипсин при концентрации 0,3 мг/мл (исходный раствор для иммобилизации) в течение 3 сут при температуре 15–20°C теряет функциональную активность по гидролизу казеина на 8–10%. По данным ВЭЖХ, содержание химотрипсина падает также на 10% с одновременным увеличением содержания низкомолекулярных продуктов автолиза. При этом первоначально имеет место расщепление пептидных связей белка по нескольким положениям в районе полипептидной цепи В (данные гель-электрофореза в денатурирующих условиях), хотя в нейтральных буферных смесях эти продукты гидролиза, которые можно считать промежуточными пептидными продуктами ограниченной протеолитической модификации, остаются ассоциированными (данные ВЭЖХ).

После завершения иммобилизации α -химотрипсина и линкомицина (в течение 4 ч при температуре 15–20°C) концентрация "остаточного" α -химотрипсина в растворе составляет около 30 мкг/мл, что резко уменьшает скорость автолиза белка при нейтральных значениях рН. В то же время известно, что инактивация α -химотрипсина в сильно разбавленных растворах происходила в результате контактов с твердой поверхностью различных носителей. При этом автолиз не наблюдался и, следовательно, снижение активности связано с необратимыми конформационными изменениями белка, катализируемыми твердой поверхностью [12].

Стадии выделения и выход "остаточного" α -химотрипсина

Стадии выделения	V, мл	[ϵ]*, мг/л	Суммарный белок, мг	Выход, %
1. Исходный раствор после иммобилизации	1000	0,032	32,0	100
2. АВ-17-2М	1100	0,025	27,5	86
3. Ультра-фильтрация	115	0,195	22,4	70
4. SP-сефадекс	10	1,92	19,2	60

Примечание: * — определение содержания α -химотрипсина методом ВЭЖХ.

Схема выделения и очистки α -химотрипсина. Процесс одновременной иммобилизации α -химотрипсина и линкомицина сопровождался частичным высвобождением в раствор низкомолекулярных фрагментов полимерного носителя, имеющих в составе глюкуроновую кислоту, которая в условиях равновесного

процесса адсорбции препятствовала ионогенному взаимодействию α -химотрипсина с носителем. Одновременное содержание в среде линкомицина гидрохлорида и основания создавало буферную систему с достаточно высокой ионной силой, что также приводило к неполной сорбции белка. Попытки провести одностадийное выделение фермента колоночной хроматографией с использованием различных катионообменников (карбоксиметилцеллюлоза, карбоксиметил-сефадекс, сульфопропил-сефадекс) в силу указанных обстоятельств оказались неэффективными. Поэтому для выделения и очистки "остаточного" α -химотрипсина нами использовано сочетание методов удаления низкомолекулярных примесей хроматографией на анионообменнике АВ-17-2М и ультрафильтрации через фильтры РМ-10 с ключательной хроматографией на катионообменнике сульфопропил-сефадекс SP50 в 0,05 М ацетатном буфере, рН 4,5. Количественные показатели по схеме выделения приведены в таблице. Потери белка на стадии АВ-17-2М составляют около 10%, что является удовлетворительным при работе с разбавленными белковыми растворами. Потери на стадии ультрафильтрации составляли около 7%, что связано с необратимой сорбцией фермента на поверхности ультрафильтрационных мембран. Потери на стадии хроматографии составляют около 20% — это удовлетворяет общим процедурам колоночной хроматографии относительно незначительного количества белка (процесс выделения "остаточного" α -химотрипсина отработывался на 30–50 мг белка с концентрацией 30–50 мкг/мл). Общий выход α -химотрипсина, по данным ВЭЖХ, составляет 60%, по данным определения активности — 68%. В условиях промышленного процесса удельные потери

на отдельных стадиях не должны увеличиться, что приведет в конечном итоге к повышению общего выхода α -химотрипсина. На рис.3 приведены результаты контроля методом ВЭЖХ содержания α -химотрипсина в процессе выделения и очистки, сопровождавшихся 50–100-кратным концентрированием белка и его отделением от линкомицина и низкомолекулярных примесей белковой природы (пептиды, аминокислоты).

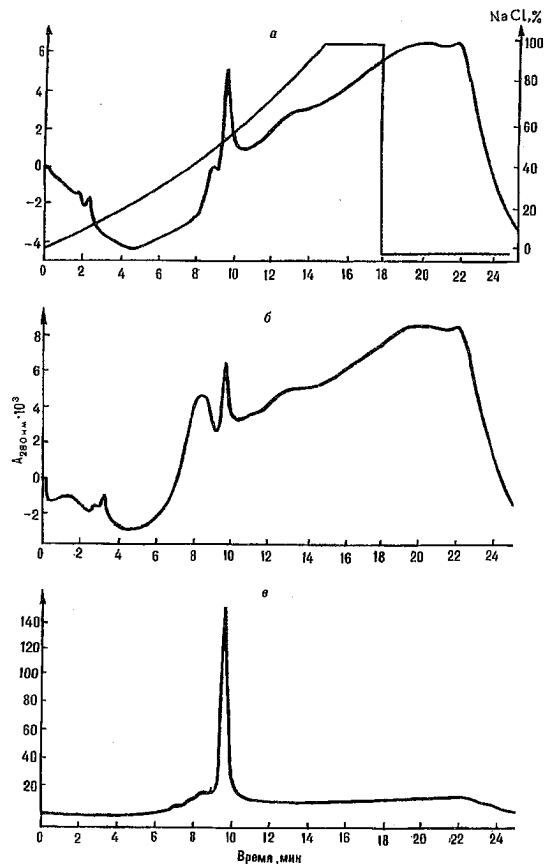


Рис.3. Анализ степени чистоты и количественное определение α -химотрипсина, оставшегося после получения лекарственного препарата "Феранцел":

а – исходный раствор "остаточного" α -химотрипсина; б – фракция после стадии на АВ-17-2М; в – фракция после колоночной хроматографии на SP-сефадексе. Условия хроматографии аналогичны условиям, приведенным на рис.1

С использованием ВЭЖХ разработаны методы экспресс-контроля содержания α -химотрипсина и определения изоэлектрических точек щелочных белков. Относительно низкая концентрация исходного белка для иммобилизации (на уровне 0,3 мг/мл) и "остаточного" после иммобилизации в растворе α -химотрипсина (примерно 0,03 мг/мл) способствовали снижению интенсивности процессов автолиза фермента до низкомолекулярных пептидов и аминокислот. Схема выделения "остаточного" α -химотрипсина включала анионообменную хроматографию на колонке с АВ-17-2М, ультрафильтрацию и катионообменную хроматографию на колонке с сульфопропил-сефадексом SP50. В условиях производства процесса получения препарата "Феранцел" удельные потери при выделении целевого белка будут существенно уменьшены, что сделает процесс выделения α -химотрипсина более рентабельным. В то же время длительность процедуры очистки и многостадийность цикла выделения целевого продукта требуют доработки метода с

применением принципов аффинной хроматографии.

1. Алиновская В.А., Юркштович Т.Л., Стельмах В.А., Островидова Г.У. // Лекарственные препараты на основе модифицированных полисахаридов. Мн., 1998. С.53.
2. Laskowski M. // Methods in Enzymology / Eds. S.P.Colowick, N.O.Kaplan. New York, 1955. Vol.2. P.16.
3. Weber K., Osborn N. // J. Biol. Chem. 1969. Vol.244. P.4406.
4. Blou D.M. // The Enzymes / Ed. P.D.Boyer. New York; London, 1971. Vol.3. P.185.
5. Юркштович Т.Л., Капуцкий Ф.Н., Алиновская В.А. // Коллоид. журн. 1989. №3. С.1169.
6. Юркштович Т.Л., Алиновская В.А., Капуцкий Ф.Н. // Изв. АН БССР. Сер.хим.наук. 1989. №3. С.27.
7. Мартинек К., Березин И.В. // Успехи химии. 1980. Т.49. №5. С.737.
8. Losano P., De Diego T., Iborra J.L. // Eur.J. Biochem. 1997. Vol.248. №1. P.80.
9. Ikeda K., Kunugi S., Ise N. // J.Biochem. (Tokyo). 1982. Vol.92. №2. P.541.
10. Gilleland M.J., Bender M.L. // J.Biol.Chem. 1976. Vol.251. №2. P.498.
11. Murthy B.S., Pandit M.W. // Biochim.Biophys.Acta. 1990. Vol.1041. №3. P. 285.
12. Oshima G. // J.Biol.Macromol. 1989. Vol.11. №1. P.43.