
ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО
КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

гл.ас.инж. Михаил Неделчев Камбуров

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

**ПРЕЧИСТВАНЕ НА АПРОТИНИН С ПОМОЩТА НА
АФИНИТЕТНИ СОРБЕНТИ НА ОСНОВАТА НА ХИТОЗАН И
ТРИПСИН**

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност
„Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни
вещества”

Научно жури:

1. Чл.кор.проф.дбн Иван Иванов
2. Проф.д-р Любов Йотова
3. Проф.д-р Емилия Найденова
4. Доц.д-р Геновева Начева
5. Доц.д-р Тамара Пайпанова

София, 2013

Дисертационния труд е изложен на 136 страници, включва 48 фигури, 11 таблици и 14 схема. Цитирани са 150 литературни източника. Резултатите са отразени в 4 научни публикации и 1 патент.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на катедра „Биотехнология” при Химикотехнологичен и металургичен университет-София, състояло се на 15.10.2012г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 11.02.2013 г. от 14 часа в зала 424, сграда „А” на Химикотехнологичния и металургичен университет-София. Материалите са на разположение на интересувашите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда ”А” на ХТМУ.

Използвани съкращения

Ch-L	Хитозан с вискозитет < 200mPa.s
Ch-H	Хитозан с вискозитет > 400 mPa.s
КПИ-Казъл	Кисел панкреатичен инхибитор тип „Казъл”
БПИ-Кунитц	Базичен панкреатичен инхибитор тип „Кунитц”
БПТИ	Базичен панкреатичен трипсинов инхибитор
ПИЕ	Протеиназна инхибиторна единица
ИЕ	Имобилизирани ензими
ПАВ	Повърхностно активно вещество
GA	Глутаров алдехид
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
CTI	Corn trypsin inhibitor
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CLEC	Cross-linked enzyme crystals
CLEA	Cross-linked enzyme aggregates
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
FDUV	First derivative UV
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
BAPNA	N _α -Benzoyl- DL-arginine-4-nitroanilide
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
DD	Degree of deacetylation
DLS	Dynamic Light Scattering
SEC	Size-exclusion chromatography
MWCO	Molecular weight cutoffs
SEM	Scanning electron microscopy

ВЪВЕДЕНИЕ

Пречистването на белтъците на основата на сродството им към различни вещества като метод е известен от няколко десетилетия и се развива интензивно, паралелно с постиженията на имобилизираните към неразтворими носители ензими. Тези две направления се развиват съвместно благодарение на постиженията на Axen и Porath и използваните от тях поръозни хидрофилни носители (агароза и декстран) за ковалентно свързване на ензими. Постиганията им са предпоставка и за създаването на новото направление „Инженерна ензимология“, което включва: получаване, пречистване, имобилизиране и приложение на ензими в различен тип реактори. Иmobилизирането на ензимите значително разширява потенциала на тяхното приложение, освен за практически цели те се използват и като модели за изучаване влиянието на микрообкръжението върху каталитичната реакция чрез методологията на афинитетната хроматография.

Използването на афинитетни лиганди е съвременна техника за пречистване на целеви молекули, тъй като чрез нея може да се намали броя на хроматографските етапи в процедурите за пречистване. Иmobилизирането на афинитетни лиганди към неразтворими носители може да бъде мощен инструмент при изолирането на протеини от многокомпонентни смеси. Афинитетната хроматография е уникален метод за пречистване на биомолекули, който се основава на биологичната им функция или индивидуалната им химична структура и способността им да образуват стабилни, специфични и обратими комплекси. Тази техника може да се използва, за да се разделят активни биомолекули от денатурирани и за изолиране на чисти вещества, присъстващи при ниска концентрация в големи обеми. Методът се характеризира с високи стойности на: селективност, разделяне и капацитет. Пречистването може да бъде в порядъка на няколко хиляди пъти и с много високи добиви.

Апротининът е протеиназен инхибитор, който се съдържа в някои органи на едър рогат добитък (панкреас, черен дроб, бял дроб, паротидни жлези и др.). Използва се като терапевтично средство за лечение при остри панкреатити, хеморагичен шок, фибринолитични кръвоизливи и за намаляване на кръвозагубите при някои хирургични интервенции. Пречистването на апротинина с цел приложението му като

фармацевтично средство изисква комбинирането на различни методи до постигане на много висока чистота. Класическите хроматографски методи в допълнение с афинитетната хроматография са методите, чрез които апротининът се пречиства при лабораторни и промишлени условия. Афинитетните сорбенти за пречистването му се основават на ковалентно имобилизиран трипсин върху неразтворими матрици на основата на синтетични или природни полимери.

Хитозанът, който се получава от един от най-разпространените природни биополимери – хитин, е продукт с много области на приложение. Хитозанови макро-, микро- и наночастици са обект на изследване за приложението им за имобилизиране на ензими, като носители на лекарства, в системи за контролирано освобождаване на антибиотици, противотуморни препарати, белтъци, пептиди, ваксини. и др. Молекулната маса и степента на деацетилиране на хитозана са факторите, отговорни за свойствата на получените гелни структури. Според някои автори хитозанът е идеалният носител за имобилизиране на ензими поради неговите свойства: хидрофилност, биосъвместимост, биodeградируемост и др. Хитозанови частички се получават с помощта на различни методи (утаяване в алкална среда, емулсионен метод и др.), а гелната им структура се стабилизира чрез йонно omрежване с натриев триполифосфат или с помощта на omрежващи бифункционални реагенти.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертационна работа е да се получат афинитетни сорбенти на основата на хитозан като неразтворим носител и трипсин и да се изследва възможността за приложението им за получаване на апротинин за клинично приложение.

За изпълнението на тази цел си поставихме следните конкретни задачи:

1. Да бъдат подбрани и охарактеризирани подходящи за целите на изследването хитозанови продукти.
2. Да се подберат оптимални условия (метод на получаване, концентрация на хитозана и др.) за формуване на макро- и микрохитозанови гелни частички и да се изследва структурата им чрез микроскопски методи.
3. Да се изследва процеса на ковалентното омрежване на гелните частички с глутаров алдехид и да се определи оптималният излишък на бифункционалния омрежващ агент.
4. Да бъде осъществена имобилизация на трипсин върху макро- и микрохитозанови частички и пълно охарактеризиране на получените афинитетни сорбенти.
5. Да се предложи стратегия за пречистване на апротинин при лабораторни условия.
6. Да се разработи технология за пречистване на апротинин при промишлени условия.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Изследвания върху охарактеризирането на хитозан.

1.1. Определяне на молекулната маса на хитозан.

Хитозанът като биополимер се характеризира с голяма молекулна маса, която варира в зависимост от източниците и методите за получаването му. Молекулната маса на нативния хитин обикновено е по-голяма от един милион g/mol, докато търговските хитозанови продукти са от 100,000 до 1,200,000 g/mol. Високата температура, разтвореният кислород и други физически и химически въздействия може да доведат до намаляване на молекулната маса на хитозана. Така например при температура над 280°C, термичното му разграждане води до бързо деполимеризиране, процес който се наблюдава и в присъствието на силни киселини.

Молекулната маса на хитозана може да се определи чрез различни методи като гел-хроматография, DLS и вискозиметрия. Повече от 30 години реологията на хитозанови разтвори са обект на много изследвания, в т.ч. и влиянието на степента на деацетилиране, вида на разтворителя, pH и йонната сила на буферите върху вискозитета им. Kasaai обобщава някои от тях и в зависимост от свойствата на изследваните проби хитозан (молекулна маса и степен на деацетилиране) авторите подбират условията (температура, pH и μ) за вискозиметричното измерване, а също и определят константите K и a . Morris et al. определят граничния вискозитет на проби хитозан, а чрез SEC определят молекулните им маси. Чрез комбиниране възможностите на двата метода са определени стойностите на степенния показател от уравнението на Mark– Houwink $a = 0,95$ и коефициента $K = 7,4 \cdot 10^3 \text{ ml.g}^{-1}$. При използване на 0,2 М ацетатен буфер с pH 4,3 като разтворител авторите определят граничния вискозитет – 17,65 dl/g, а молекулната маса - $425 \cdot 10^3 \text{ g/mol}$.

По подобна стратегия El-hefian et al. охарактеризират хитозан: с HPLC- определят $M_w = 7,9 \cdot 10^5 \text{ g/mol}$, а с вискозиметър тип „Ubbelohde” определят $[\eta] = 28,213 \cdot 10^2 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. Средната молекулна маса на хитозан, изолиран от Laka et al. е изчислена на $900 \cdot 10^3 \text{ g/mol}$. Авторите използват като разтворител 0.5 М AcOH – 0.2 М NaOAc, а стойностите за K и a са $3,5 \cdot 10^{-4}$ и съответно - 0.76.

С помоща на капилярен вискозиметър тип *Ubbelohde* е отчетено времето (s) за изтичане на хитозановите разтвори при 25°C и резултатите се усредняват от 3

последователни измервания. Изчислените вискозитети: $\eta_{\text{отн.}}$, $\eta_{\text{ред.}}$, $\eta_{\text{сп.}}$, са представени в табл. 1. Резултатите от нея са използвани за построяването на зависимостите на Huggins ($\eta_{\text{сп.}}/c = [\eta] + k_H[\eta]^2 c$) (фиг.1).

Таблица 1. Стойности на $\eta_{\text{отн.}}$, $\eta_{\text{сп.}}$ и $\eta_{\text{ред.}}$ за проби хитозан Ch-L и Ch-H.

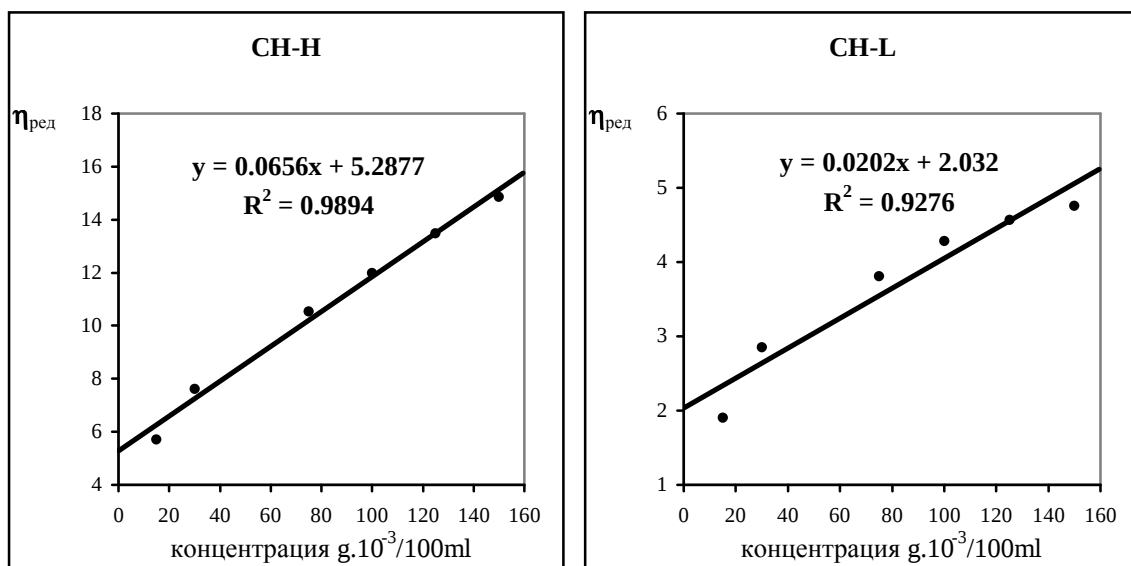
Проба	C [g .10 ⁻³ /100mL]	$\eta_{\text{отн.}}$	$\eta_{\text{сп.}}$	$\eta_{\text{ред.}}$
Ch-L	150	1,714	0,714	4,762
	125	1,571	0,571	4,571
	100	1,429	0,429	4,286
	75	1,286	0,286	3,810
	30	1,086	0,086	2,857
	15	1,029	0,029	1,905
Ch-H	150	3,229	2,229	14,857
	125	2,686	1,686	13,486
	100	2,200	1,200	12,000
	75	1,790	0,790	10,537
	30	1,229	0,229	7,619
	15	1,086	0,086	5,714

Зависимостите за хитозан Ch-H са представени на фиг.1-А, а зависимостите за хитозан Ch-L на фиг.1-Б. Чрез екстраполиране на $\eta_{\text{сп.}}/c$ при концентрация равна на нула са отчетени съответните отрезки, които представляват граничния вискозитет на хитозановите проби при съответния разтворител и условията на измерването (температура, диаметър на капилярката и др.). Отрезите на горните графики съответсват на стойностите на граничните вискозитети на двете проби както следва:

- за Ch – L $[\eta] = 2,032 \text{ dl/g}$;
- за Ch – H $[\eta] = 5,2877 \text{ dl/g}$;

За изчисляване на молекулните маси с помощта на уравнението на Mark– Houwink: $[\eta] = K.M^a$ стойностите за K и a ($K = 15,7.10^{-5} \text{ dL/g}^{-1}$ и $a = 0,79$) са взимствани от Kasaai et al. Изчислените молекулни маси са както следва:

- за Ch – L: $M_w = 160.10^3 \text{ g/mol}$;
- за Ch – H: $M_w = 538.10^3 \text{ g/mol}$;



А

Б

Фиг.1. Графични зависимости на Huggins за проби хитозан: А - Ch-H и Б - Ch-L.

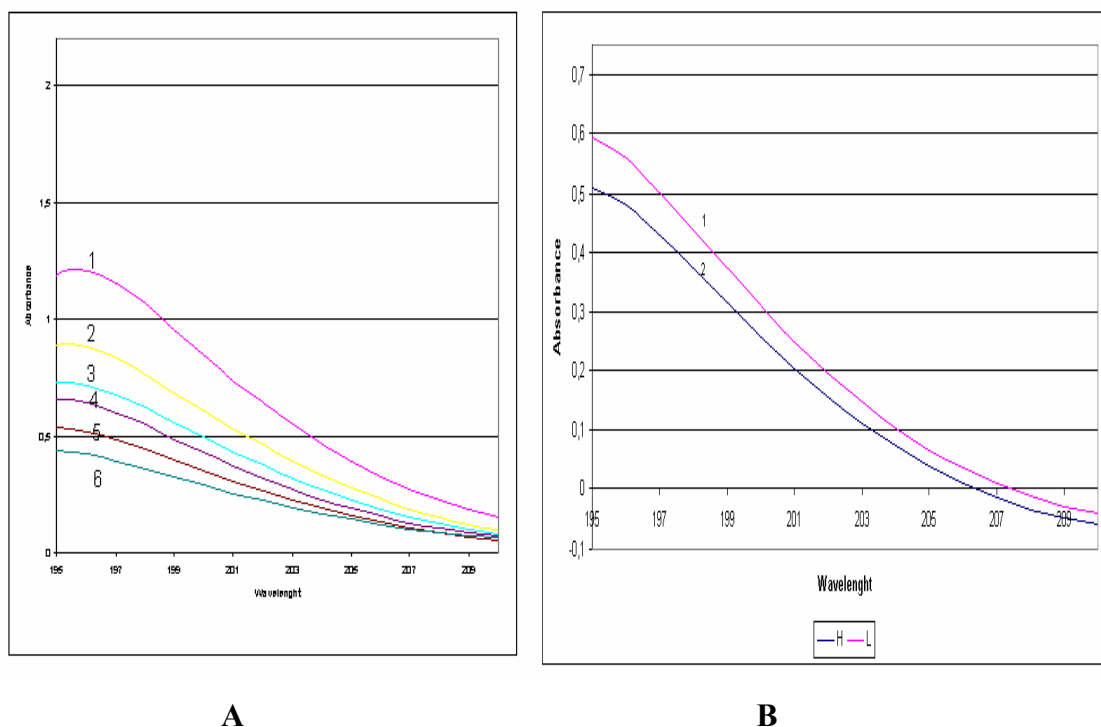
1.2. Определяне степента на деацетилиране на хитозан.

Степента на деацетилиране е важна характеристика на хитозана, тъй като от нея зависят физикохимичните и имунологичните му свойства, биоразградимостта и др. Докладвани са различни методи за определяне на DD: нинхидринов метод, потенциометрично титруване, инфрачервена спектроскопия, ядрено-магнитен резонанс и първа производна на UV-спектрофотометрия.

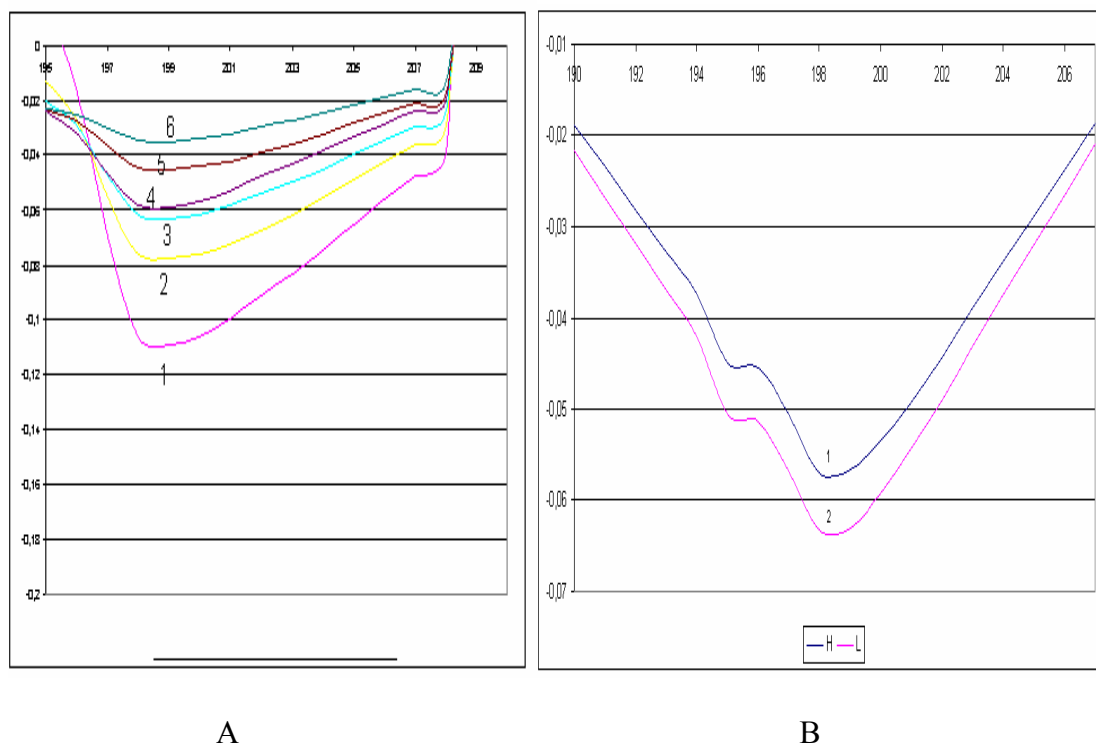
1.2.1. Определяне на DD чрез FDUV.

Разтворите на N-ацетилглюкозамина и на хитозановите проби се спектрофотометрират на UV-спектрофотометър в диапазон 195 до 210 nm. Получените спектри (фиг.2-A) с помощта на софтуерната програма Spekwin 32 са представени във вид на първа производна на фиг.3-A. От първите производни са отчетени стойностите на $dA/d\lambda$ при съответните концентрации на N-ацетилглюкозамин и е построена калибрационна зависимост.

Пробите хитозан (Ch-L и Ch-H) са разтворени в 0.1 М оцетна киселина и се спектрофотометрират в диапазон 195 до 210 nm, резултатите са представени на фиг.2-B. Получените спектри са представени и като първи производни на фиг.3-B.



Фиг.2. UV-спектри на разтвори на N –ацетилглюкозамин (А) с концентрации: 1 - 40,7 $\mu\text{g/ml}$, 2- 30,5 $\mu\text{g/ml}$, 3- 24,4 $\mu\text{g/ml}$, 4-20,3 $\mu\text{g/ml}$, 5-17,4 $\mu\text{g/ml}$, 6-12,2 $\mu\text{g/ml}$ и UV- спектри на разтвори на хитозан (В) с концентрации: 1 - Ch- L -118 $\mu\text{g/ml}$, 2- Ch-H- 100 $\mu\text{g/ml}$.



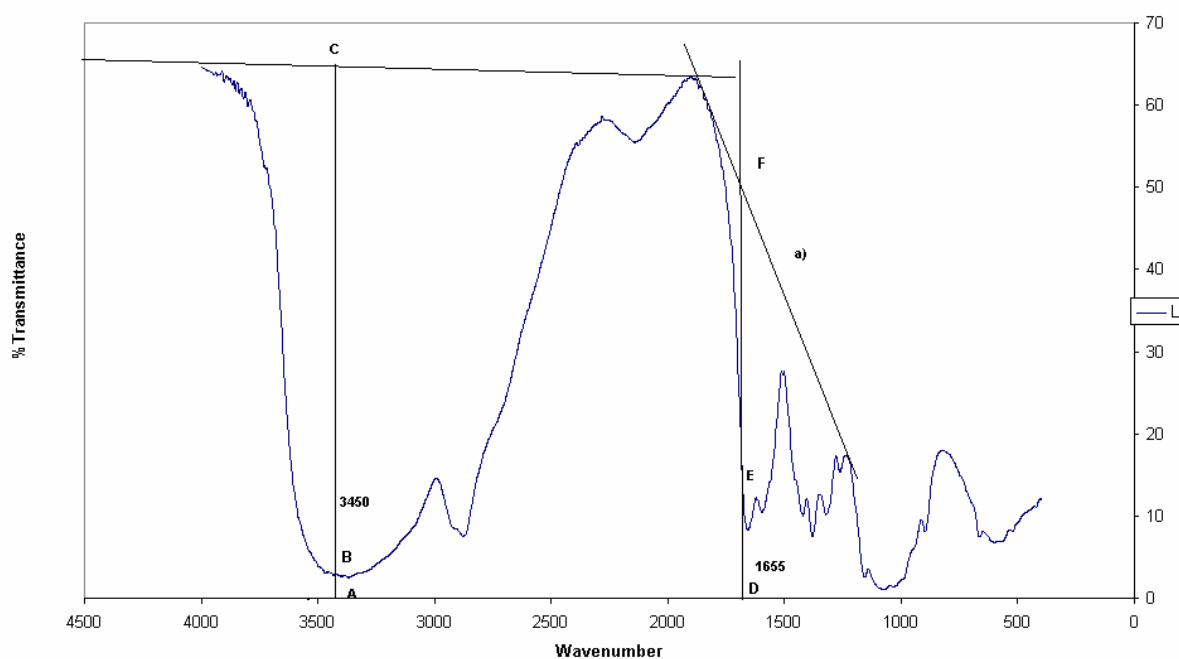
Фиг. 3. Първи производни на UV- спектри на: А - разтвори на N-ацетилглюкозамин и В - на хитозанови разтвори (1-Ch-H и 2-Ch-L).

С помощта на отчетените стойности от фиг.3-В за $dA/d\lambda$ за двете проби е определено съдържанието на N-ацетилглюкозамин: за хитозан Ch-L концентрацията на N-ацетилглюкозамин е 24 $\mu\text{g/ml}$, а за хитозан Ch-H, съответно 22 $\mu\text{g/ml}$. Степента на деацетилиране е изчислена и е както следва:

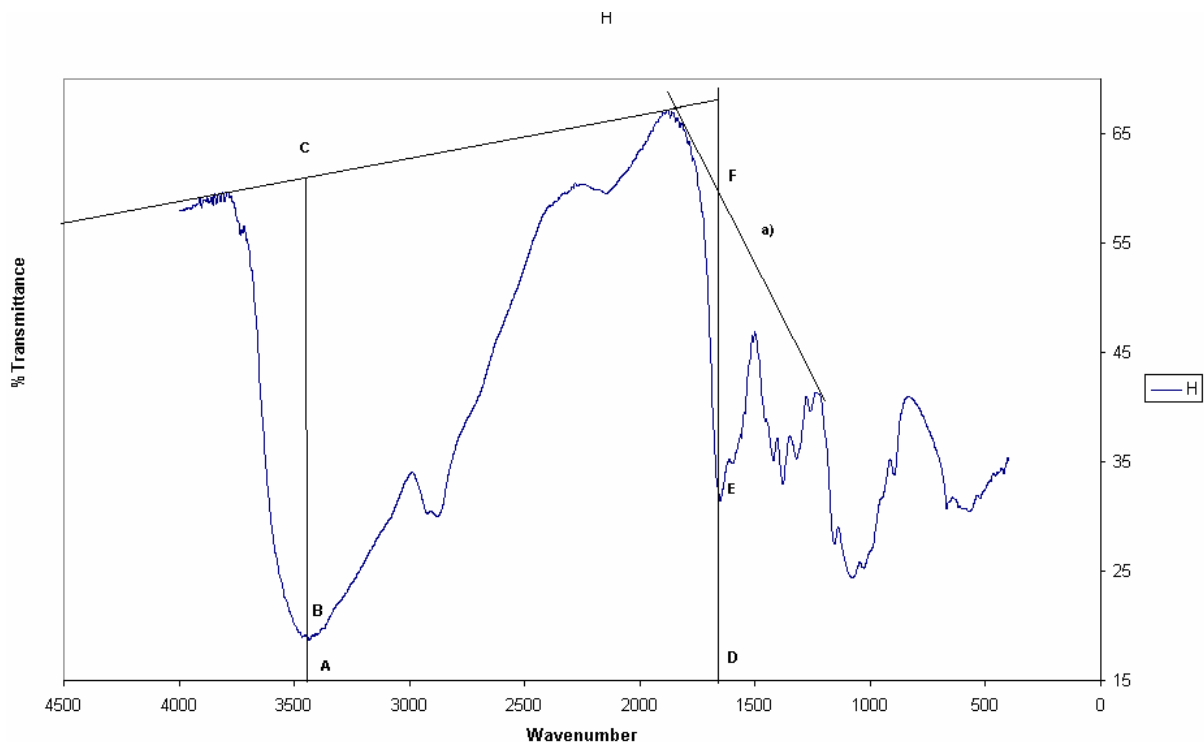
- за хитозан Ch-H DD = 78,0%
- за хитозан Ch-L DD = 89,7%

1.2.2. Определяне на DD чрез FTIR-спектроскопия.

FTIR като метод за оценка степента на DD има редица предимства и недостатъци. Първо, той е относително бърз и за разлика от другите спектроскопски методи няма изисквания за чистотата на пробата, но се налага използването на базова линия за отчитане стойностите на пропускливост или абсорбция. На второ място, подготовката на пробите, вида на използвания инструмент и условия може да повлияят на крайните резултати.



Фиг. 4. FTIR - спектър на хитозан Ch-L.



Фиг. 5. FTIR - спектър на хитозан Ch-H.

Инфракчервените спектри на хитозановите проби са снети в диапазон $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ и са представени на фиг.4 и 5. DD е изчислена с подхода предложен от Tanveer. Използвано е абсорбционното отношение A_{1655}/A_{3450} , отчетено с помоща на построяване на базова линия „a” и за двата FTIR - спектъра на хитозан: проба Ch-L на фиг. 4 и проба Ch-H на фиг. 5. Получените спектри са представени като зависимост на T% (пропускливост) от вълновото число (cm^{-1}). За изчисляване на A_{3450} и A_{1655} се използва уравнението на Буге-Ламберт-Бееер $A = -\lg T$ и неговото производно $A = 2 - \lg T\%$, когато пропускливостта се изразява в проценти.

- за хитозан Ch-L;

$$A_{3450} = [2 - \lg AB] - [2 - \lg AC] = [2 - \lg 6] - [2 - \lg 68] = 1,22 - 0,17 = 1,05$$

$$A_{1655} = [2 - \lg DE] - [2 - \lg DF] = [2 - \lg 13] - [2 - \lg 50] = 0,89 - 0,30 = 0,59$$

За хитозан Ch-L. е изчислена DD = 57,7 %.

- за хитозан Ch-H;

$$A_{3450} = [2 - \lg AB] - [2 - \lg AC] = [2 - \lg 19] - [2 - \lg 60] = 0,72 - 0,22 = 0,5$$

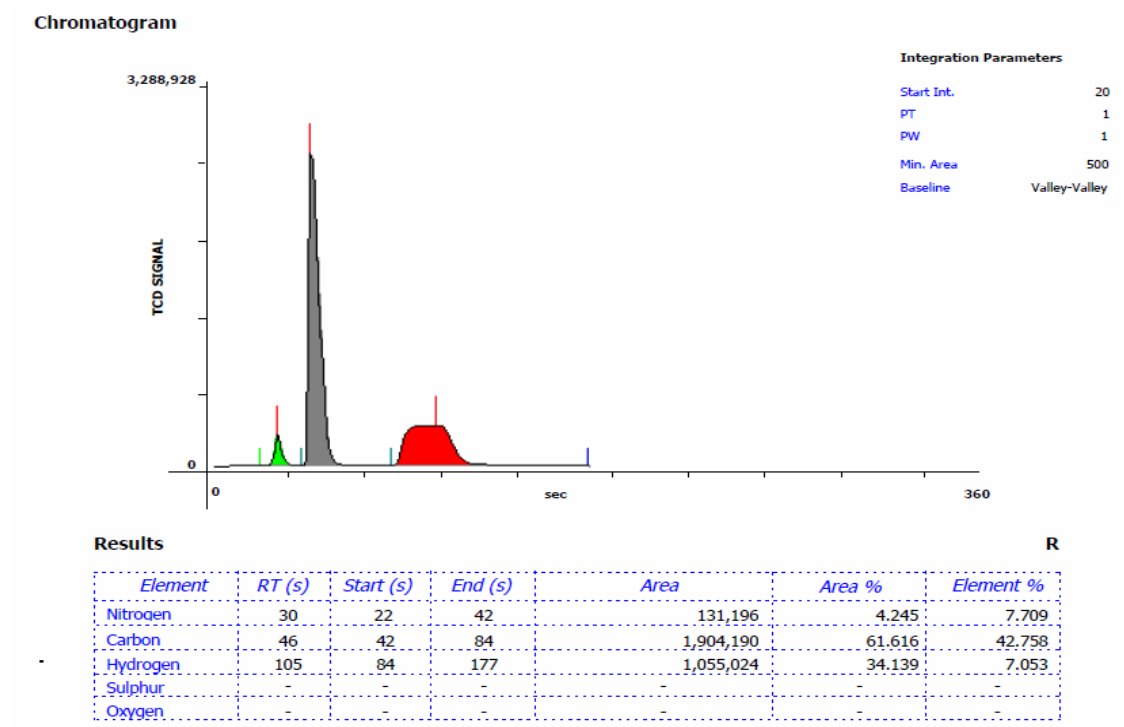
$$A_{1655} = [2 - \lg DE] - [2 - \lg DF] = [2 - \lg 32] - [2 - \lg 58] = 0,49 - 0,24 = 0,25$$

За хитозан Ch-H е изчислена DD = 62,4 %.

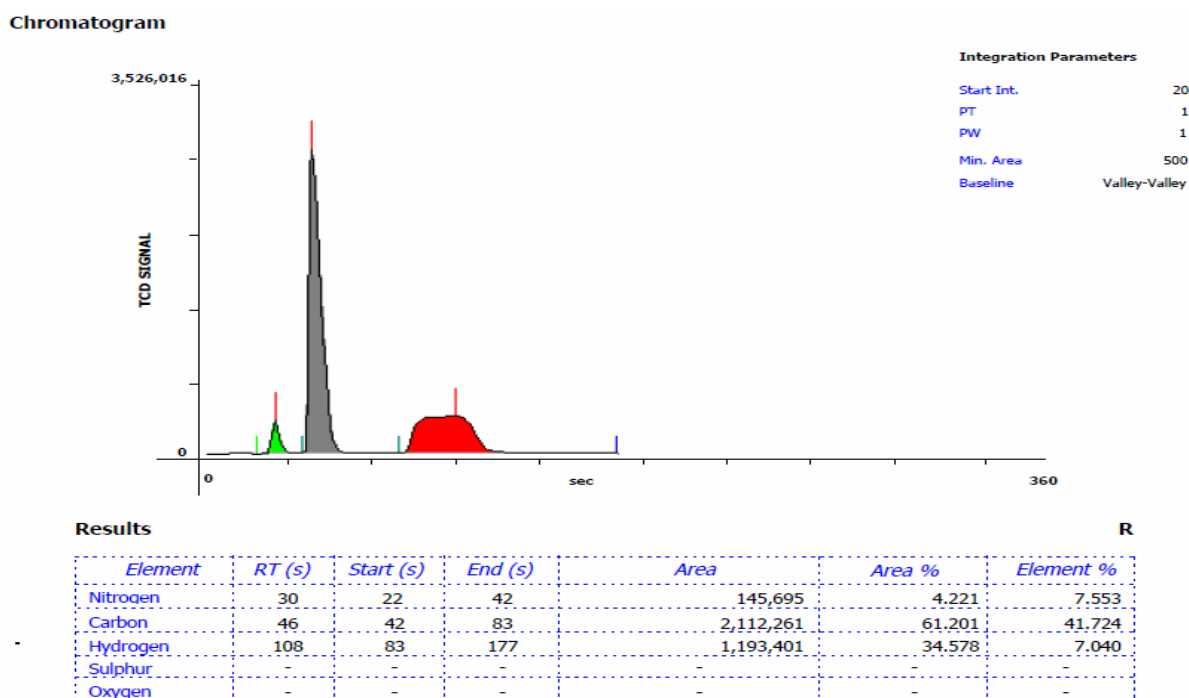
1.2.3. Определяне на DD чрез елементен анализ.

От получените данни за N% и C% съдържание в проби от хитозан Ch-L (фиг.6) и хитозан Ch-H (фиг.7) е изчислена степента на деацетилиране както следва:

- За хитозан Ch-L получената стойност за DD е 77%.
- За хитозан Ch-H получената стойност за DD е 78%.



Фиг.6. Елементен анализ на Ch-L.



Фиг.7. Елементен анализ на Ch-H.

Стойностите за DD, изчислени с помощта на различни аналитични методи за двете проби хитозан са представени в табл.2. Резултатите се различават значително, което показва, че DD е силно зависим параметър от използвания аналитичен метод. Тези наши заключения са в съгласие и с резултатите на Khan, където степента на деацетилиране на една и съща проба хитозан варира от 50% до 90% при използване на три аналитични методи. По тези причини авторите предлагат, когато се използва DD да се уточнява методът по който е определена стойността.

Таблица 2. Сравнение на стойностите за DD получени с помощта на различните аналитични методи.

Метод	DD за Ch-L	DD за Ch-H
FDUV - спектрофотометрия	89,7%	78%
FTIR – спектрофотометрия	62,4%	57,7%
Елементен анализ	77,0%	78,0%

2. Получаване на макро- и микро- хитозанови частици.

2.1. Получаване на частици по преципитационния метод.

Разтвори на Ch-H и на Ch-L се накапват през игла с вътрешен диаметър 0.413 мм в 10% разтвор на NaOH и етанол в съотношение 4:1 (опитната постановка е представена на схема 1). Тъй като хитозанът не е разтворим в алкална среда, той преципитира, и така получените макрочастици се филтруват и промиват с дестилирана вода.

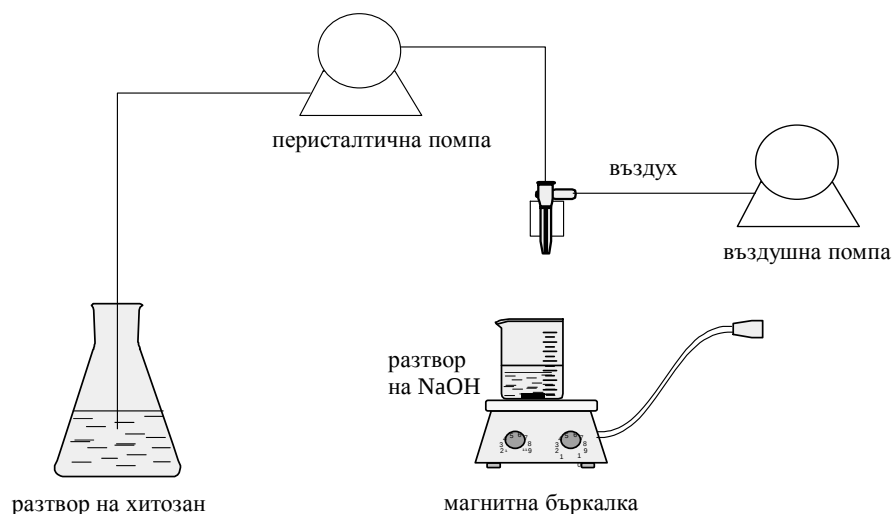
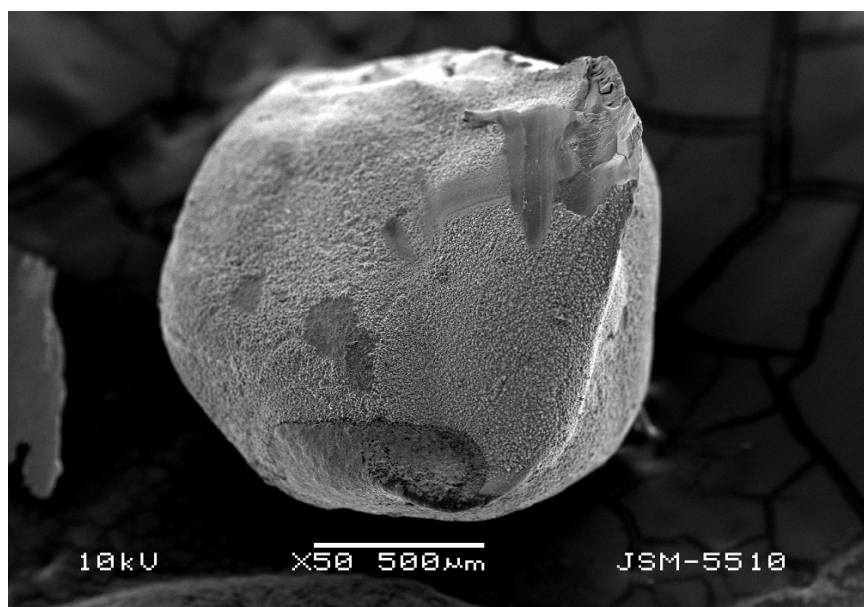


Схема 1. Опитна постановка за получаване на макро- и микро- частици от хитозан по преципитационния метод.

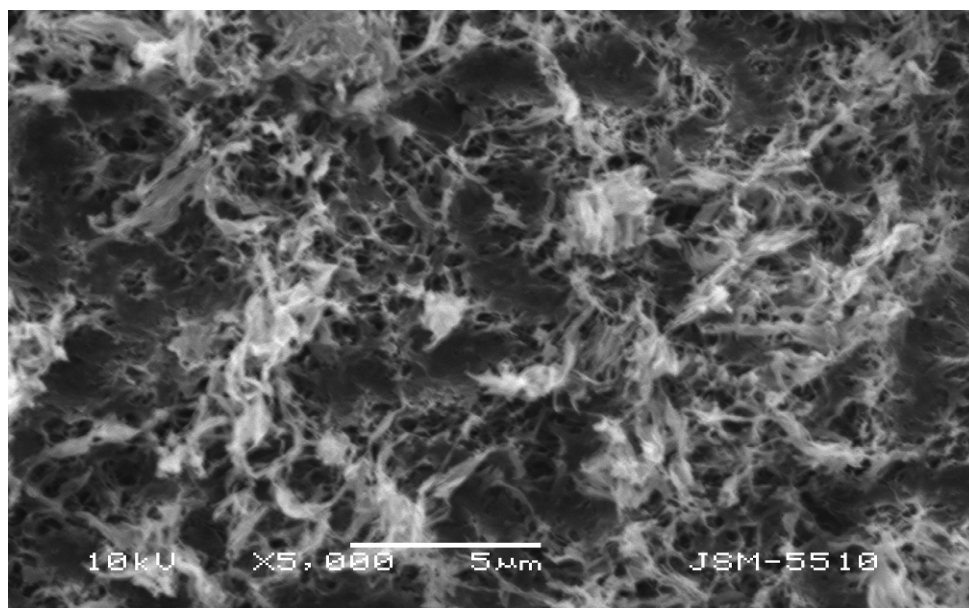


Фиг.8. Фотография на влажни хитозанови макрочастици.

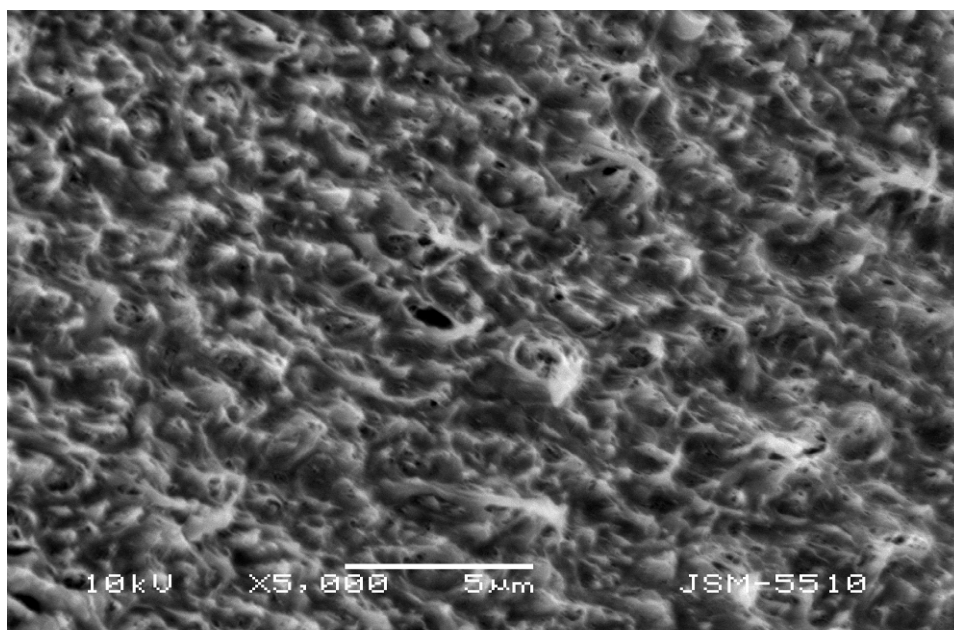
Фотография на получените сферични частици е представени на фиг.8. На фиг.9, 10 и 11 са представени резултатите от SEM на макрочастица, както и на повърхности за проби Ch-H и Ch-L. Диаметърът на лиофилно изсушените частици варира в границите 1200-1500 μm . При 5000x увеличение се наблюдава силно изразената им порьозна структура. Морфологията на повърхностите се различава в голяма степен (порьозността на проба Ch-H е по-силно изразена) поради голямата разлика в съдържанието на хитозана при формуването на хитозановите частички (2 и 6%).



Фиг.9. SEM на макрочастица.

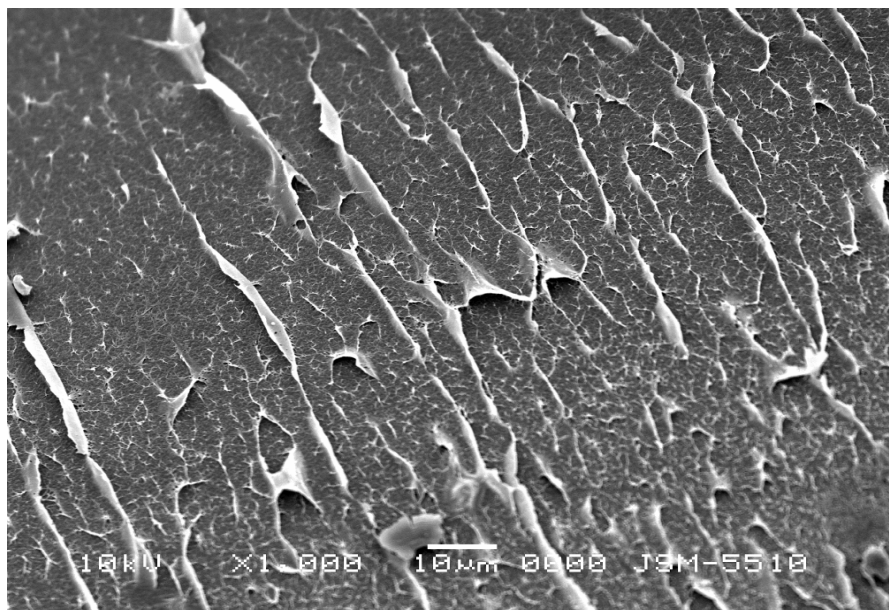


Фиг.10. SEM на повърхност на макрочастица от Ch-H.

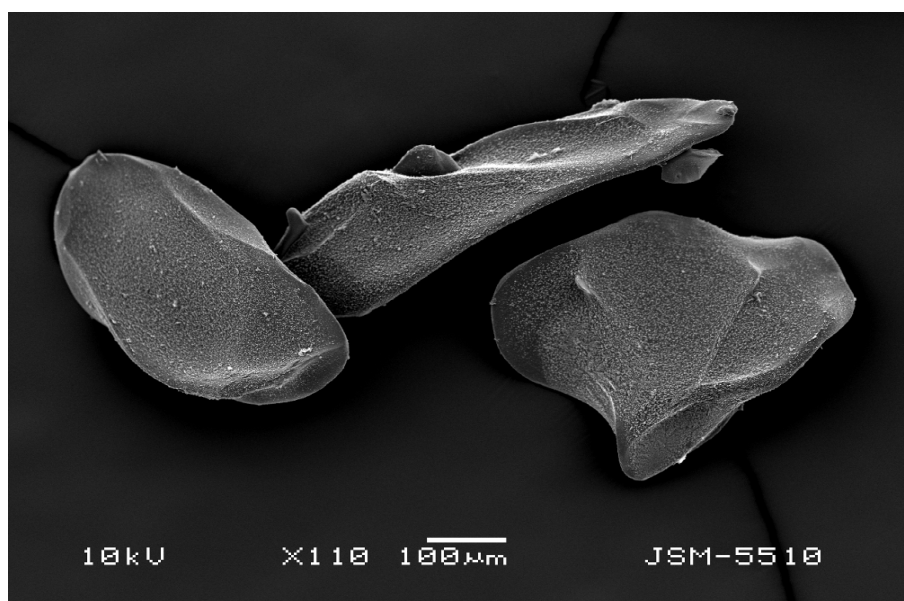


Фиг.11. SEM на повърхност на макрочастица от Ch-L.

Повърхността на макрочастица след изсушаване под вакуум (фиг.12) се различава в сравнение с тази след лиофилно изсушаване поради необратимо нарушаване гелната структура.



Фиг.12. SEM на повърхност на макрочастица след изсушаване под вакуум.



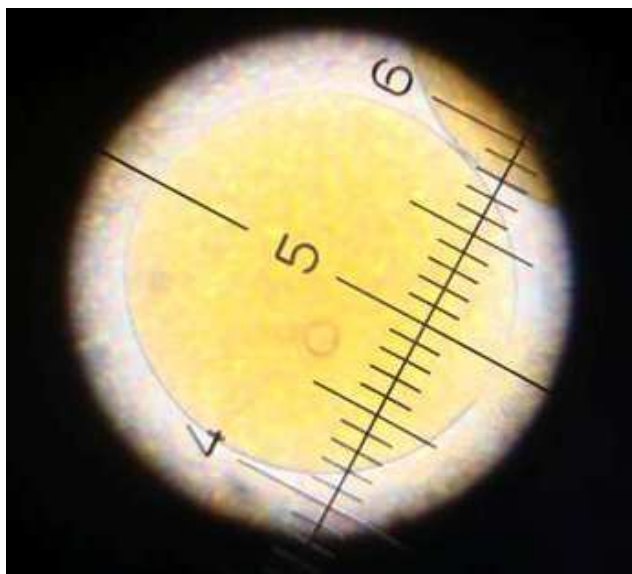
Фиг.13. SEM на микрочастици.

Микрочастици се получават чрез използване на въздушна струя с помощта на помпа. Размерът на частиците е функция от скоростта на двата потока (хитозанов и въздушен). Формата на получените частички е неправилна в резултат на приложената въздушна струя при формирането им (фиг.13), а размерът им варира от 100 до 500 μm .

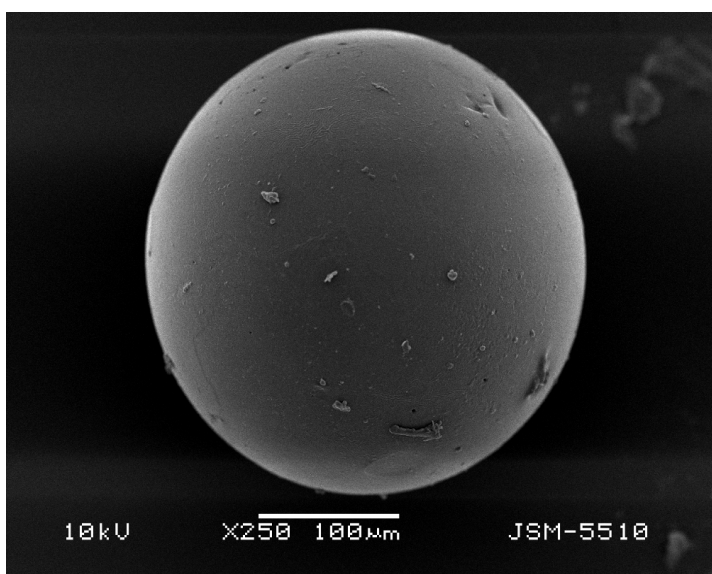
2.2. Получаване на микрочастици по емулсионния метод.

Фотография на хитозанова микрочастичка под микроскоп е представена на фиг.14, формата е сферична, а диаметърът е 0,52mm и е жълто оцветена, ефект от третирането с глутаров алдехид. SEM изображение на изсушените чрез лиофилизация

частици е представено на фиг.15. Диаметърът на микрочастиците е 0,3mm, формата е сферична, но при това увеличение морфологията на повърхността не може да се определи.



Фиг.14. Фотография на хитозанова микрочастичка (увеличение 40х).

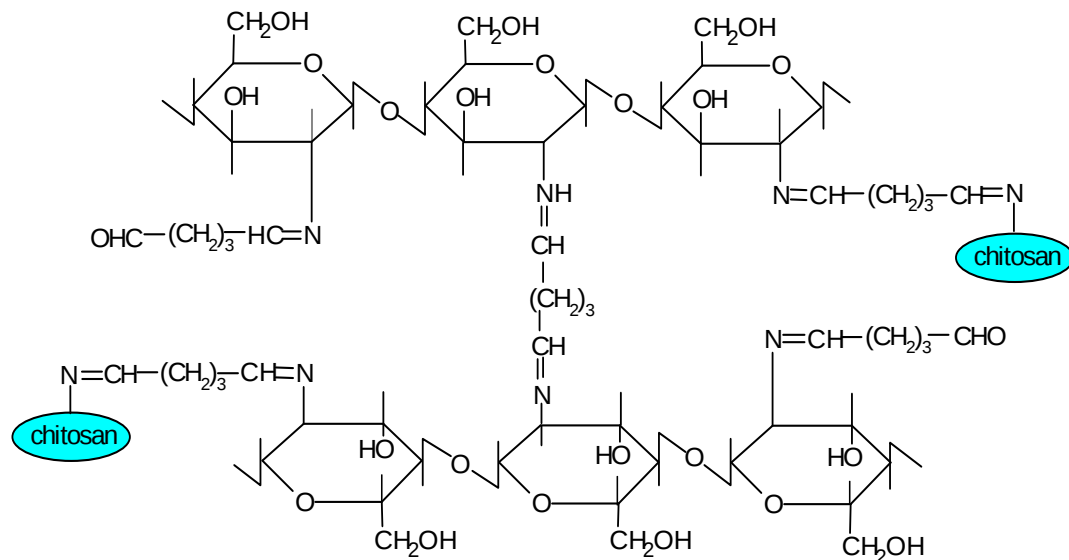


Фиг.15. SEM на микрочастица получена по емулсионния метод.

3. Изследване на омрежването и активирането на хитозанови частици с глутаров алдехид.

Една възможност за обясняване химизма на омрежването на хитозана с диалдехидната форма на глутаровия алдехид е представена на фиг.16, но по този

начин не може да се обясни влиянието на различните форми на GA, присъстващи в реакционната среда, както и някои свойства на получените гелове. От фигурата се вижда, че пространственото omрежване на полимерните вериги се осъществява само чрез образуването на Шифови бази.

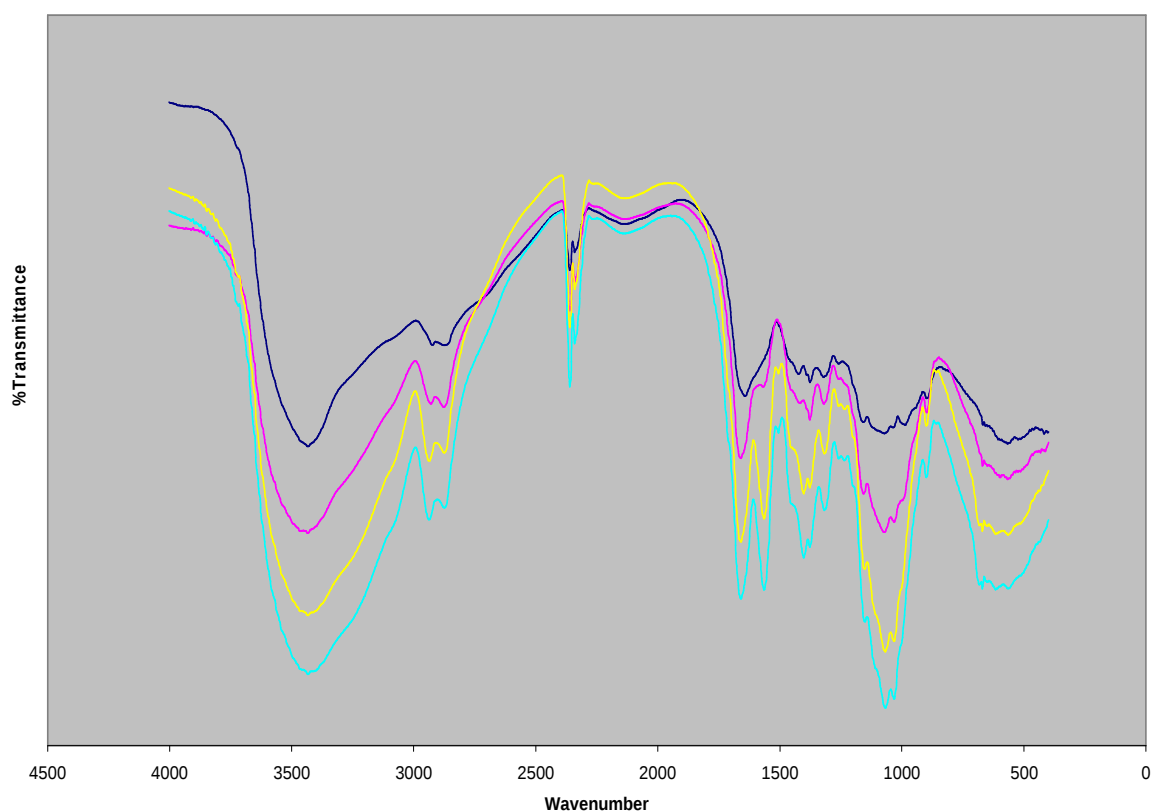


Фиг.16. Omрежване и активиране на хитозан с мономерен глутаров алдехид.

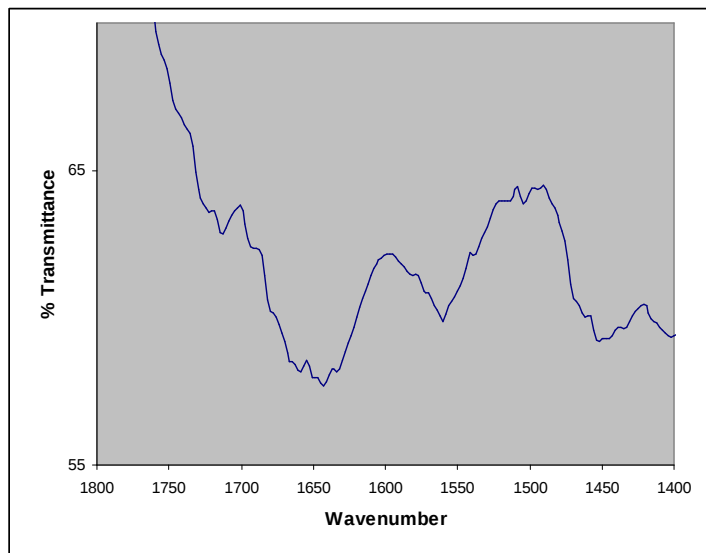
За да се оцени влиянието на GA върху omрежването и активирането на хитозановите частички, процесът е проведен с различни моларни излишъци (1:1, 1:10 и 1:20). При всичките експерименти се получават жълто-кафяво оцветени частички с различен интензитет на оцветяване. Процесът е времезависим, видимата промяна протича за 1 час, но третирането е реализирано в продължение на 4 часа. Подобен ефект се наблюдава и в работата на Ji et al., които количествено оценяват цвета на omрежения хитозанов гел. Процесът на omрежване е изследван чрез FTIR спектроскопия на немодифициран и модифициран хитозан особено в диапазона $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, характерен за валентните трептения на карбонилните групи и на заместени и незаместени имини. Както се очакваше, при немодифицирания хитозан се наблюдава характерен максимум при 1643 cm^{-1} , съответстващ на $>\text{C}=\text{O}$ за амид I, което показва, че хитозанът не е напълно деацетилиран. При omрежените хитозанови частички този максимум се отмества при 1659 cm^{-1} поради наслагването в тази област и на образуваните $>\text{C}=\text{N}-$ групи (фиг.17).

Влиянието на излишъка от GA върху процеса на модификация на хитозановите частички се демонстрира от FTIR спектрите (фиг.17) при 1564 cm^{-1} . Според Verri et al. ивицата при това вълново число е характерна за виниловите валентни трептения.

Друга възможност е тя да се дължи на образуваната връзка от типа на вторичните амини ($-\text{NH}-$) между аминокрупата на хитозана и двойната връзка на поликондензационния продукт на GA (присъединяване тип “Michael”). При еквимоларно количество на GA спрямо $-\text{NH}_2$ групите на хитозана, в спектъра се отчита само едно „рамо“ при 1567 cm^{-1} , докато при 10 и 20 кратен излишък на омрежващия реагент се наблюдават почти еднакви максимуми на поглъщане, което показва, че пълното модифициране на хитозана се постига при 10 кратен излишък. При модифицираните хитозанови проби се наблюдава и увеличение интензитета на ивицата на валентните трептения на $\text{C}=\text{N}$ при $2940\text{--}2945\text{ cm}^{-1}$, което произтича от въглеводородната верига на глутаровия алдехид. Сигналят при 1714 cm^{-1} е характерен за валентните трептения на алдехидната група (фиг.18), чрез която може да се реализира ковалентното имобилизиране на трипсин.

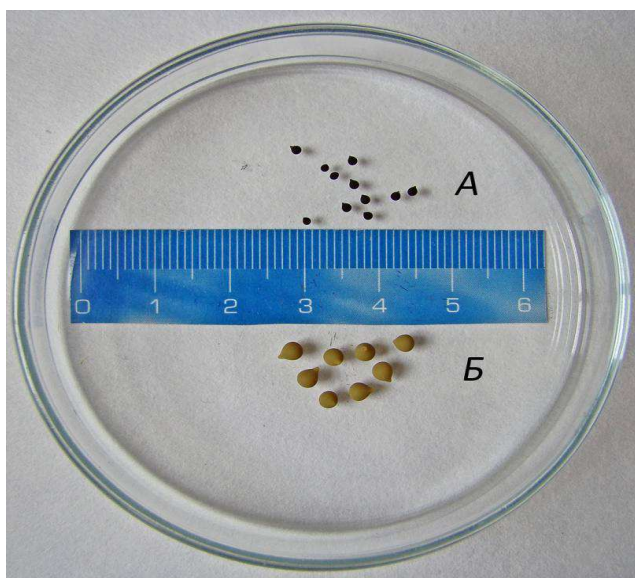


Фиг.17. FTIR спектри на: немодифициран хитозан (синьо), омрежен хитозан с 1:1 M GA (червено), омрежен хитозан с 1:10 M GA (жълто) и омрежен хитозан с 1:20 M GA (зелено).



Фиг.18. FTIR спектри на хитозан, омрежен с 1:5 M GA.

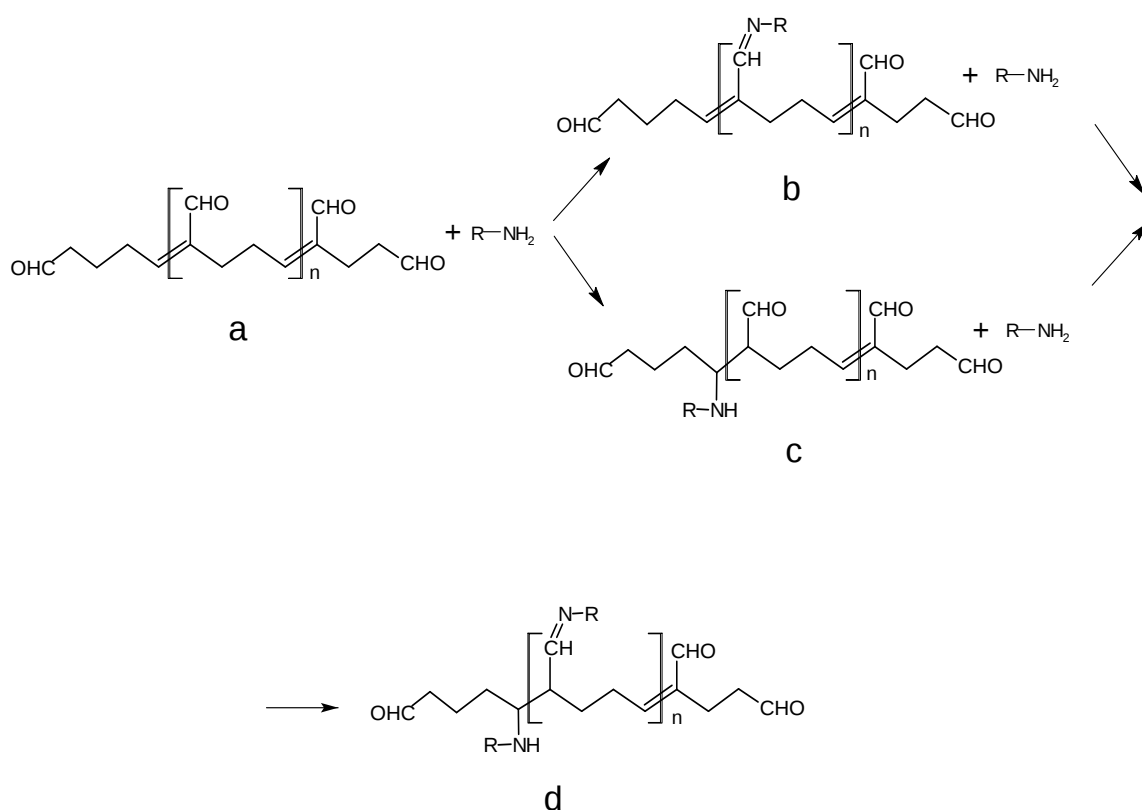
Степента на омрежване с различни количества GA корелира и с интензивността на оцветяването на влажните частичките, за разлика от изсушените, които са тъмно оцветени (фиг.19).



Фиг.19. Макрочастици от хитозан - А: Изсушени частици; Б: Влажни частици.

Изследвана е устойчивостта на омрежените хитозанови частички при кисели рН стойности. При макроскопско наблюдение ясно се отчита разликата между омрежените и неомрежените частици. Неомрежените частици лесно се разтварят в кисела среда. Омрежените частици с еквимоларно съотношение на глутаров алдехид: NH_2 -групи от хитозана остават стабилни в разтвора, но увеличават обема си приблизително двукратно, докато омрежените с 10- и 20-кратен излишък на глутаров

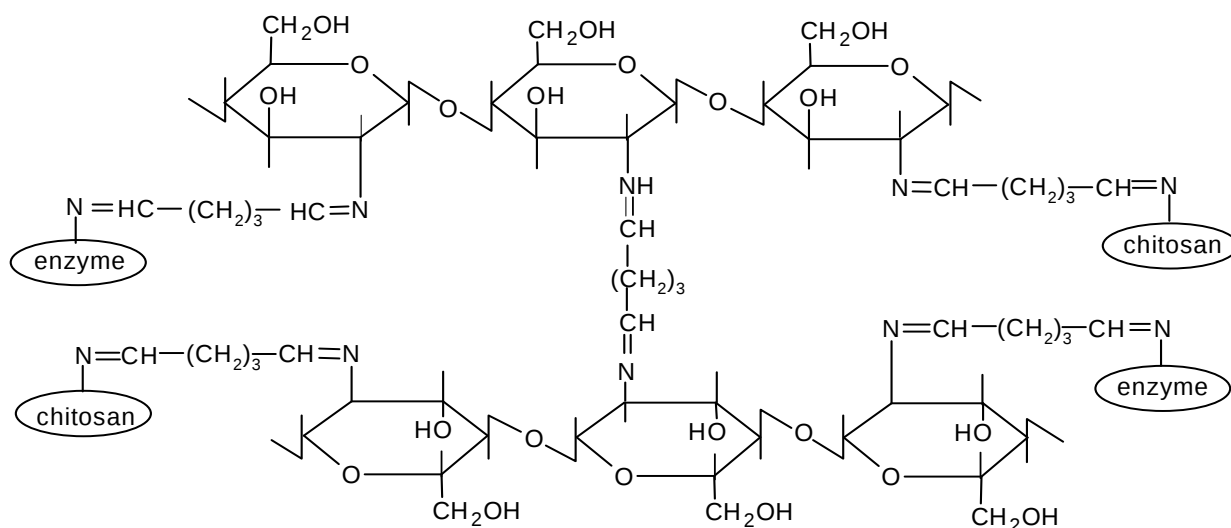
алдехид частици запазват формата и обема си. Тези резултати са още едно доказателство в подкрепа на смесения механизъм на омрежване на хитозановите вериги с продуктите от алдолната кондензация на глутаровия алдехид (фиг.20). Стабилността на гелните структури при кисело рН изключва създаването на самостоятелна Шифова база, за която е характерна нестабилност при условията на експеримента. Спрежението на двойната връзка на $>C=N-$ с двойната връзка в α,β положение (фиг.20-b) стабилизира омрежения хитозан. Друга причина за устойчивостта на междумолекулните мрежи е и създаването на стабилни връзки от типа на вторичните амини чрез присъединителната реакция (Michael addition) на аминокрупите от хитозана към двойните връзки на полимерния глутаров алдехид (фиг.20-с), както и комбиниране на двата механизма (фиг.20-d).



Фиг.20. Възможни механизми на взаимодействие на хитозан ($R-NH_2$) с полимерен глутаров алдехид (a).

4. Имобилизирание на трипсин към хитозанови носители.

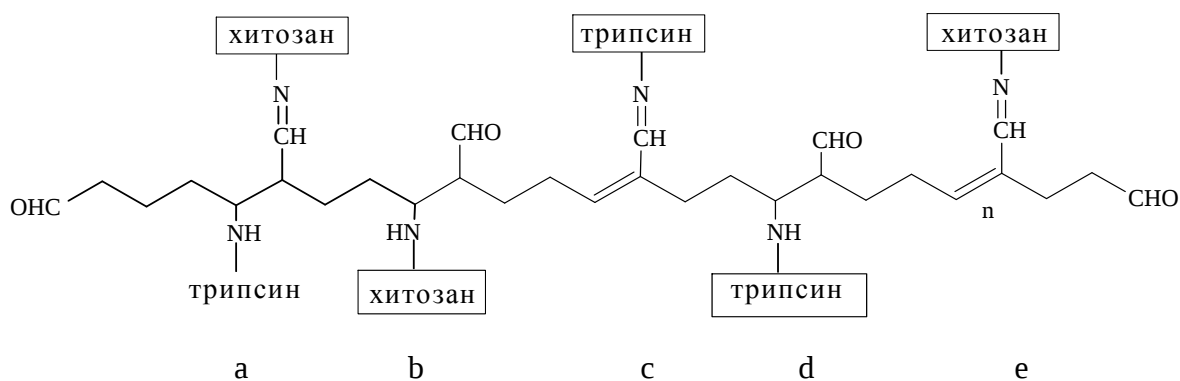
Механизмът на ковалентно имобилизирание на ензими към хитозанови гелове омрежени и активирани с GA (като диалдехид) най-често се представя както е показано на фиг.21.



Фиг.21. Ковалентно свързване на трипсин към омрежен и активиран хитозан с мономерен глутаров алдехид.

Имобилизирането на ензими към хитозанови гелове има по-сложен, комплексен механизъм, който произтича от представените по-горе съобщения относно механизмите за модифициране на хитозана и е представен на фиг.22:

- чрез образуване на вторичен амин (-NH-) (фиг.22-a,d) между аминогрупите на трипсина и двойните връзки на поликондензационния продукт на GA (присъединяване тип "Michael"). Тази връзка се характеризира със стабилност в широк диапазон на рН.
- чрез образуване на Шифови бази (-N=C<) (фиг.22-с), които в случая са стабилизирани от двойната връзка в α , β положение.
- чрез образуване на Шифови бази (не са отбелязани на фиг.22) между крайните алдехидните групи на полимерния глутаров алдехид и нуклеофилни функционални групи от трипсина.



Фиг.22. Ковалентно свързване на трипсин към омрежен и активиран хитозан с полимерен глутаров алдехид.

Предложеният механизъм не изключва и многоточковото имобилизиране на ензима, като по този начин белтъчната молекула може да се разглежда и като многофункционален реагент, омрежващ допълнително гелната структура на хитозановата матрица.

Условията на имобилизиране на трипсин върху хитозанови макрочастички и свойствата на получените проби са представени в табл. 3. Резултатите от таблицата показват, че се постигат големи количества имобилизиран трипсин (от 45 до 180 mg/g), което може да се обясни с високата степен на активиране на гелната структура и особено на ниското съдържание на хитозан в носителите (от 3,5 до 7,7%). По-голямо количество трипсин се свързва когато хитозановите частици се омрежат и активират с 10 кратен моларен излишък на GA и в пробите Ch-L, където съдържанието на хитозан е по-голямо (7,1 и 7,7%). Активността на имобилизирания трипсин както спрямо нискомолекулен така и спрямо високомолекулен субстрат се намалява с увеличаването на моларния излишък от глутаров алдехид за омрежване и активиране на хитозановите носители. Това може да се обясни чрез многоточковото свързване на белтъчната молекула в конформация, различна от нативната или чрез образуването на по-плътна гелна структура, която ограничава транспорта на субстрата и продукта в обема на носителя. Кой от двата механизма е отговорен в по-голяма степен ни предоставят резултатите от ензимните активности определени при много интензивно разбъркване (300 min^{-1}), при което относителните активности при всички проби се увеличават няколкократно. В подкрепа на предположението, че дифузията на субстрата и продукта в порите на частиците е лимитиращият процес в ензимната катализа са и резултатите, получени след хомогенизиране на макрочастиците (с помощта на лабораторно сито с размери 0,5mm). Увеличените стойности на специфичната и относителната активности (от 3 до 5 пъти) при изследваните проби доказват, че имобилизираният трипсин запазва в голяма степен каталитичните си свойства. Хидродинамичните изследвания са от особена важност при ензимни реакции с високомолекулни субстрати (хемоглобин, казеин), които се лимитират в по-голяма степен от дифузията на субстрата в гелните частици. Тези масообменни процеси се демонстрират в голяма степен при определянето на протеолитичната активност при скорост на разбъркване 60 min^{-1} – относителните активности се редуцират до 8,1% и в по-малка степен при 300 min^{-1} , където влиянието им е по-ограничено.

Таблица 3. Свойства на имобилизиран трипсин върху хитозанови макрочастички.

Проби / Свойства	Ch-L 1:1	Ch-L 1:10	Ch-H 1:1	Ch-H 1:10
Съдържание на хитозан [%]	7,1	7,7	3,5	3,9
Диаметър на частичките [mm]	3,2	2,8	3,4	3,1
Омрежване и активиране с GA с моларно съотношение NH ₂ :GA	1:1	1:10	1:1	1:10
Съдържание на белтък [mg/g] сухи частички	62,1	180,2	45	120
Специфична активност спрямо BAPNA * [U/mg белтък]	24,0	12,8	34,2	17,2
Относителна активност спрямо BAPNA * [%]	21,5	11,5	30,8	15,4
Протеолитична активност спрямо хемоглобин * [U/mg белтък]	105,4	61,9	162,7	91,7
Относителна активност спрямо хемоглобин * [%]	13,8	8,1	21,3	12,0
Специфична активност спрямо BAPNA ** [U/mg белтък]	78,3	70,8	95,0	82,5
Относителна активност спрямо BAPNA ** [%]	70,2	63,5	85,2	74,0
Протеолитична активност спрямо хемоглобин ** [U/mg белтък]	329,3	236,8	458,4	372,1
Относителна активност спрямо хемоглобин ** [%]	43,1	31,0	60,2	48,7

Специфична активност спрямо BAPNA на свободен трипсин = 111,5 U/mg

Протеолитична активност спрямо хемоглобин на свободен трипсин = 764 U/mg

*Скорост на разбъркване - 60 min⁻¹, ** Скорост на разбъркване - 300 min⁻¹

Получените микрочастички по емулсионния метод, които се характеризират с правилна сферична форма (фиг.14 и 15) са предпочетени пред тези, получени по преципитационния (с неправилна форма (фиг.13)) за имобилизиране на трипсин.

Получени са две проби:

- проба Ch-L-E-50 - към 2g активирани частици, суспендирани в 20 ml 0,1 M фосфатен буфер с pH 7,5 се прибавят 50 mg трипсин.
- проба Ch-L-E-150 - 150 mg трипсин се имобилизира към 2 g активирани частички при условия както при горната проба.

Свойствата на пробите са представени в табл.4. Резултатите от таблицата показват, че в проба Ch-L-E-150 количеството на имобилизирания трипсин е съизмеримо с това постигнато в макрочастички, проба Ch-L (1:10), което може да се обясни с еднаквите условия (излишък GA) за омрежване и активиране. Специфичната и относителната активности на имобилизирания трипсин както спрямо нискомолекулен така и спрямо високомолекулен субстрат се намаляват с увеличаването на количеството трипсин в процеса на имобилизиране, което може да се обясни чрез дифузионните ограничения на субстрата и продукта в обема на носителя. Спрямо резултатите при макро-частичките, при микрочастичките всички кинетични параметри на ИЕ са повишени поради по-малкия им размер. И тук се наблюдава значително повишаване на активността при много интензивно разбъркване (300 min^{-1}).

5. Определяне на K_i на свободен и имобилизиран трипсин.

Резултатите от титруването на активния център на трипсин “Sigma” ($3,36 \cdot 10^{-7} \text{ M/l}$) с увеличаващи се количества стандарт апротинин “Novo” – от $0,15 \cdot 10^{-7} \text{ [M/l]}$ до $1,08 \cdot 10^{-7} \text{ [M/l]}$ са представени на фиг.23. Зависимостта на графиката е почти линейна и този ход на титруване е характерен в случаите когато $[E_o]/K_i \gg 100$. От графиката, чрез екстраполация на линейната част до пресичането ѝ с абсцисата е определена еквивалентната точка, в която трипсинът и апротининът взаимодействат в еквимоларни съотношения - $[I_o] = 0,91 \cdot 10^{-7} \text{ [M/l]}$, същата е и концентрацията на трипсина в пробата от “Sigma, което съответства на 26,8% съдържание на активен трипсин (трипсин с активни центрове в нативна конформация). Константата на инхибиране е изчислена от наклона на получената права на фиг.24, $K_i = 0,41 \cdot 10^{-9} \text{ [M/l]}$, а отрезът $0,903 \cdot 10^{-7} \text{ [M/l]}$ е концентрацията на активния трипсин.

Таблица 4. Свойства на имобилизиран трипсин върху микрочастички.

Проби / Свойства	Ch-L-E-50	Ch-L-E-150
Съдържание на хитозан [%]	6,8	6,7
Диаметър на частичките [mm]	0,52	0,55
Омрежване и активиране с GA с моларно съотношение $\text{NH}_2:\text{GA}$	1:10	1:10
Съдържание на белтък [mg/g] сухи частички	125,2	190,7
Специфична активност спрямо BAPNA * [U/mg белтък]	41,4	32,2
Относителна активност спрямо BAPNA * [%]	37,1	28,9
Протеолитична активност спрямо хемоглобин * [U/mg белтък]	179,5	142,9
Относителна активност спрямо хемоглобин * [%]	23,5	18,7
Специфична активност спрямо BAPNA ** [U/mg белтък]	81,6	59,1
Относителна активност спрямо BAPNA ** [%]	73,2	53,0

Специфична активност спрямо BAPNA на свободен

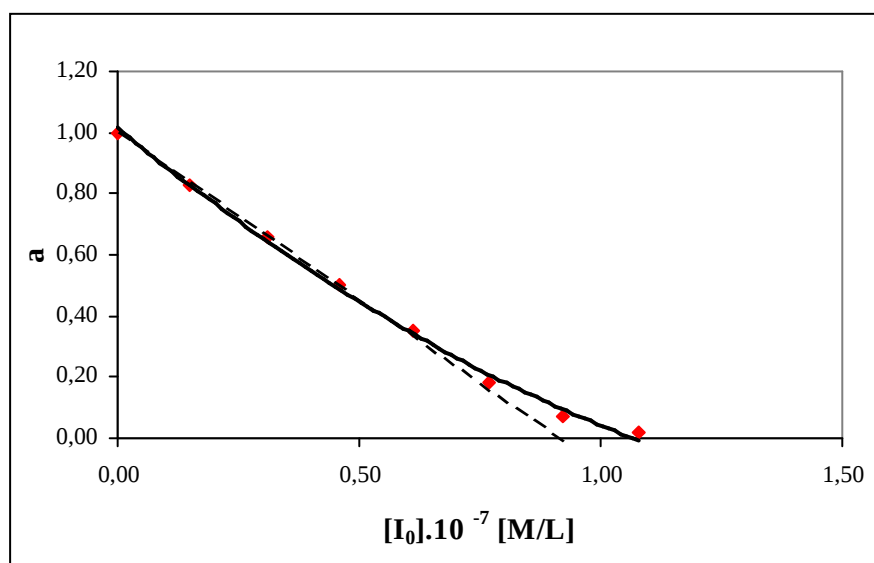
трипсин = 111,5 U/mg

Протеолитична активност спрямо хемоглобин на свободен

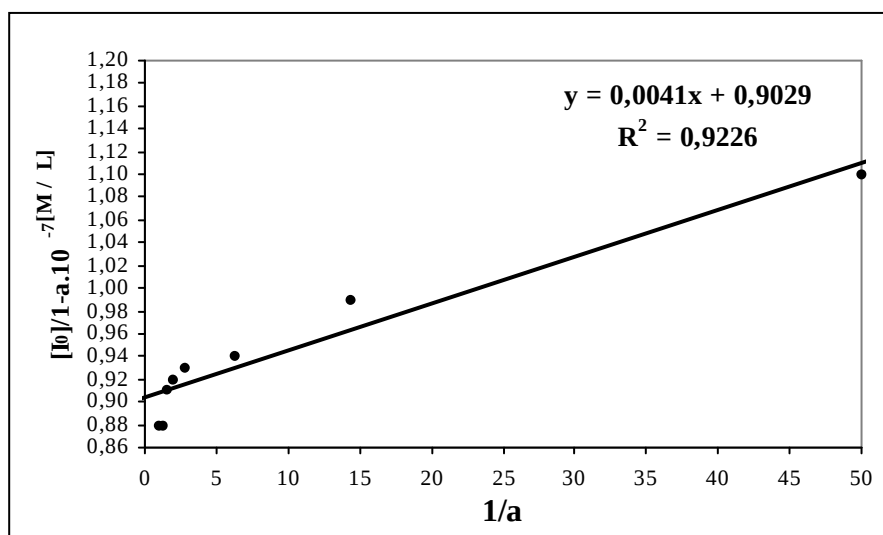
трипсин = 764 U/mg

*Скорост на разбъркване - 60 min^{-1} , ** Скорост на

разбъркване - 300 min^{-1}



Фиг.23. Титруване на „свободен” трипсин с апротинин.



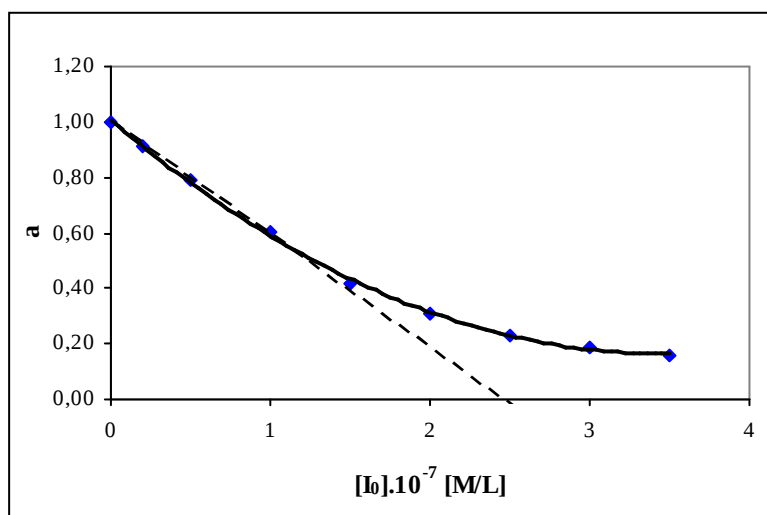
Фиг.24. Определяне на K_i за „свободен” трипсин и апротинин.

Резултатите от титруването на активния център на имобилизиран трипсин в хитозанови частички (проба Ch-L 1:1, 27,3 mg влажни частички) с увеличаващи се количества стандарт апротинин “Novo” – от $0,2 \cdot 10^{-7}$ [M/l] до $3,5 \cdot 10^{-7}$ [M/l] са представени в на фиг.25. Зависимостта на графиката не е линейна и този ход на титруване е характерен когато $[E_0]/K_i \ll 10$. От графиката е определена еквивалентната точка, в която имобилизираният трипсин и апротининът взаимодействат в еквимоларни съотношения.

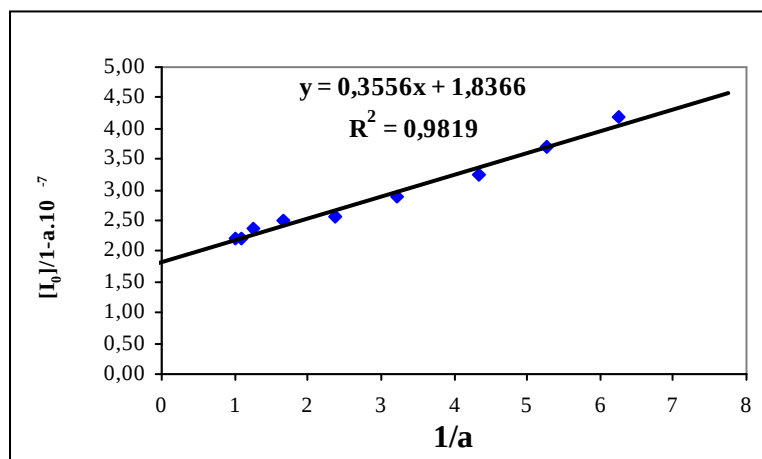
$[I_0] = 2,48 \cdot 10^{-7} [M/L]$, същата е и концентрацията на имобилизирания трипсин в пробата, което съответства на 27,5% съдържание на активен трипсин.

Константата на инхибиране е изчислена от наклона на получената права на фиг.26, $K_i = 0,356 \cdot 10^{-7} [M/L]$, а отрезът $1,84 \cdot 10^{-7} [M/L]$ е концентрацията на активния трипсин.

Чрез сравняване на %-ното съдържание на активните центрове в „свободен” и имобилизиран трипсин може да се направи заключението, че процесът на ковалентно свързване на ензима към омрежени и активирани с глутаров алдехид хитозанови гелове не води до промяна нативната конформация на участъка от белтъчната молекула, отговорен за каталитичната му функция. Този извод се потвърждава и от високите специфични и относителни активности на имобилизиран трипсин (табл.3 и 4) спрямо нискомолекулен субстрат и интензивно разбъркване, при които условия дифузионните ограничения на ензимната реакция се минимизират. Прави впечатление различието в стойностите на K_i при свободен и имобилизиран трипсин спрямо аprotинина, което може да се дължи на по-големите дифузионни ограничения при инхибитора, предвид по-голямата му молекулна маса в сравнение със синтетичния субстрат. Направените изводи са предпоставка за използването на имобилизирания трипсин към различни хитозанови матрици в етапите на афинитетно пречистване на аprotинин.



Фиг.25. Титруване на имобилизиран трипсин с аprotинин.



Фиг.26. Определяне на K_i за имобилизиран трипсин и аprotинин.

6. Пречистване на аprotинин от говежди бял дроб.

Терапевтичното приложение на аprotинина определя необходимостта от висока степен на пречистване на продукта и постигането на над 99% чистота, максимална инхибиторна активност и всички показатели застъпени в British Pharmacopoeia или Ph. Eur. Даже и в случаите, когато продуктът е хомогенен чрез SDS-PAGE и оцветен с Coomassie TM минималните примеси, които могат да бъдат биологично активни, може да доведат до значителни проблеми при терапевтично приложение. Ето защо е важно да се прави разлика между замърсители, които трябва да бъдат отстранени напълно и такива, които могат да бъдат намалени до приемливи нива.

В Handbook "Protein Purification" се предлагат следните общи правила за пречистване на протеини:

- качеството на крайния продукт не трябва да бъде компрометирано, препоръчително е да се постигат по-високи степени на пречистване от необходимото въпреки, че броят на пречистващите стъпки трябва да бъдат сведени до минимум.
- замърсители, които разграждат или дезактивират белтъците или влияят на анализите трябва да бъдат отстранени възможно най-рано.

Съхраняването на биологичната активност трябва да се разглежда на всеки етап от пречистването. Наложително е протеазите да се отстранят и на целевият продукт да се осигурят оптимални условия още в първия етап на пречистване.

Препоръките за „large scale” пречистване на протеини са:

- производственият процес трябва да осигури необходимата чистота и висок добив при пълна безопасност и надеждност на етапите в рамките на икономическите разходи.

- специални изисквания за безопасността могат да бъдат включени при пречистването на биофармацевтичните продукти: откриване или отстраняване на инфекциозни агенти, на пирогени, на имуногенни и канцерогенни замърсители.

Дефинирането на свойствата на целевия продукт е необходимо при избора на техниките за разделяне и експерименталните условия за пречистване. Най-важни от тях са: молекулна маса, изоелектрична точка, разтворимост и хидрофобност. Нативната електрофореза и SDS-PAGE са методите, които най-често се използват за уточняване свойствата на пречистващия белтък и на онечистващите вещества. Особено важно е познаването на „*stability window*” (условията осигуряващи стабилност на целевия продукт): температурна и pH стабилности, стабилност към органични разтворители, детергенти, соли (йонна сила), чувствителност към: протеази, метални йони и др.

6.1. Изследване екстракцията на апротинина от говежди бял дроб.

Екстракцията на апротинина от говеждия бял дроб е един от най-важните етапи, чрез който се осигурява високо съдържание на инхибитора в компромис със съдържанието на съпътстващите вещества. Друга цел на този етап е подготовката за следващия етап – отстраняване на частици и други замърсители, които са несъвместими с последващото хроматографско пречистване.

Изследвани са условията на екстракцията на апротинина от хомогенизиран говежди бял дроб с помощта на екстрагенти, като се варират температурата (стайна температура и 50° C), вида и концентрацията на органичния разтворител (метанол, етанол), солите ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и pH (1% H_2SO_4).

Резултатите са представени в табл.5, при всяка екстракция са определени количеството на екстрахираните белтъци и на апротинина и е изчислено процентното му съдържание спрямо общото съдържание на белтъци в екстракта. Добивът на апротинина варира от 85,1 до 135,2mg/kg изходна суровина, като прави впечатление, че във всички експерименти при 50° C екстрахираният инхибитор е с 10-20% повече, а съдържанието му спрямо общия белтък (чистотата на апротинина) също е по-голямо. Условията на предлаганите екстракции са комбинация и от термично въздействие за утаяване на термо-нестабилни вещества, изсолване на белтъци с етанол или метанол и силно кисела среда за дезактивиране на киселинно нестабилни протеази. Най-добри резултати са отчетени при екстракция 3 при 50° C, но наличието на Ca^{2+} е нежелателно предвид образуването на неразтворими продукти в процеса на

десорбция с фосфатен буфер на съпътстващите вещества при етапа на йонообменно пречистване. За по-нататъшното изолиране на аprotинин са избрани условията на екстракция 5 при 50° C, където е постигнат добив от 130 mg/kg и чистота -0,83%.

Таблица 5. Екстракция на аprotинин от говежди бял дроб.

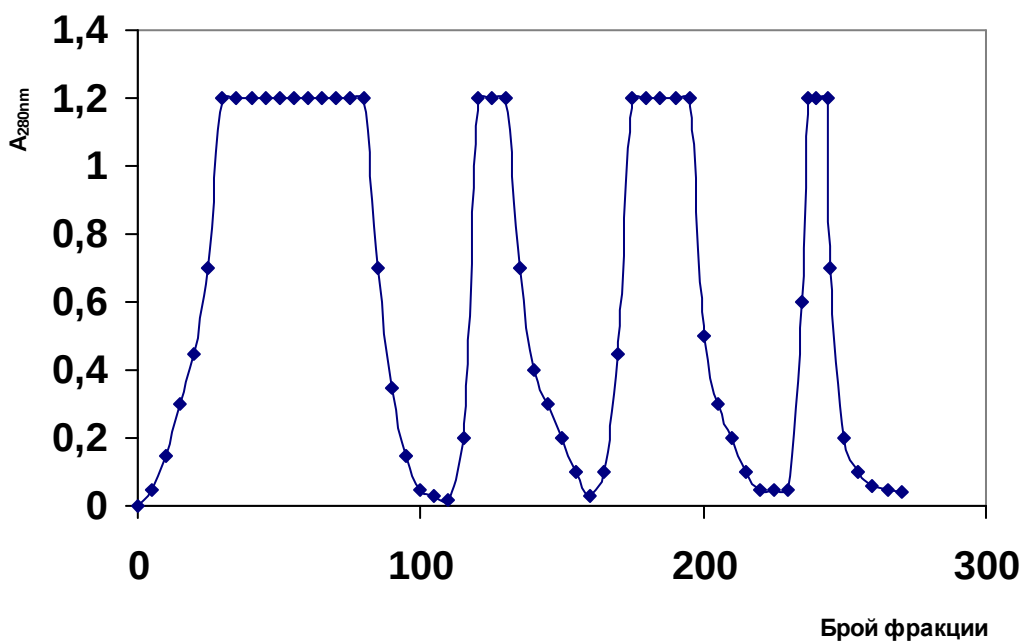
Екстракция	T°С	Екстрахиран белтък С [mg/ml]	Екстрахиран белтък [g/kg]*	Екстрахиран инхибитор [mg/kg]*	Съдържание на инхибитор [%]**
1	20	10,8	21,6	102,0	0,47
	50	9,2	18,4	125,3	0,68
2	20	8,1	16,2	85,1	0,52
	50	6,3	12,6	92,0	0,73
3	20	8,8	17,6	122,7	0,70
	50	6,5	13,0	148,0	1,14
4	20	13,3	26,6	110,4	0,42
	50	9,6	19,2	135,2	0,70
5	20	10,4	20,8	107,7	0,52
	50	7,8	15,6	130,0	0,83
6	20	10,7	21,4	93,4	0,44
	50	8,4	16,8	110,7	0,67

* - kg говежди бял дроб ** - спрямо екстрахирания белтък

6.2. Пречистване на „суров” аprotинин чрез катионообменна хроматография.

Йонообменната смола КУ-23 е синтезирана чрез съполимеризация на стирен и 8% дивинилбензен (омрежващ мономер) и последващо сулфониране. Активните групи – $C_6H_4-SO_3H$ имат силни киселинни свойства с $pK < 2$. Йонообменникът е макропорест, с правилна сферична форма с диаметър 250-1200 μm . Използването при промишлени условия на синтетичните йонообменни смоли в значителна степен се определя от техните свойства: механическа здравина, химическа устойчивост и голям капацитет спрямо високомолекулни вещества – при статични условия се постигат стойности до 250 mg/g йонит, а при динамични – до 420 mg/g.

Пречистването на „суров“ апротинин чрез йонообменна хроматография върху КУ-23 е проведено при условията предложени в патента на Камбуров и др. Сорбцията на 800 ml разтвор на „суров“ апротинин с pH 3,0 се провежда с дебит 60 ml/h и фракции от 10 ml се събират с помощта на колектор за фракции. Този обем екстракт не предизвиква насищане на сорбента и не се наблюдава „прескок“ на активната компонента през колоната. Фракциите от 0 до 110 на фиг.27 съдържат съпътстващи белтъчни вещества, които при тези условия не се сорбират върху йонообменника и се отстраняват. Фракциите от 110 до 160 съдържат вещества, които се десорбират след промиване на колоната с 50% етанол. Степенната десорбция на баластни белтъци се провежда с 0,1 М фосфатен буфер с pH 7,7 и фракциите от 163 до 230 се отстраняват. Апротининът се десорбира с 0,1 N NaOH, съдържащ 1M NaCl в посока отгоре надолу и фракциите от 234 до 255 съдържащи инхибиторна активност се обединяват, неутрализират се до неутрално pH и се анализират за съдържание на белтък и на апротинин. Обобщените резултати от пречистването са представени на табл.6. Прави впечатление високият фактор на пречистване (44,4), която се постига при условията на хроматографското пречистване. 88,4% от белтъците не се сорбират върху катионообменника, други 1,8% се отделят чрез промиване с 50% етанол и 9,9% се десорбират с 0,1 М фосфатен буфер с pH 7,7. 1296,8AtpE/mg е инхибиторната активност на апротинина, а добивът е 88,4% след този етап на пречистване.

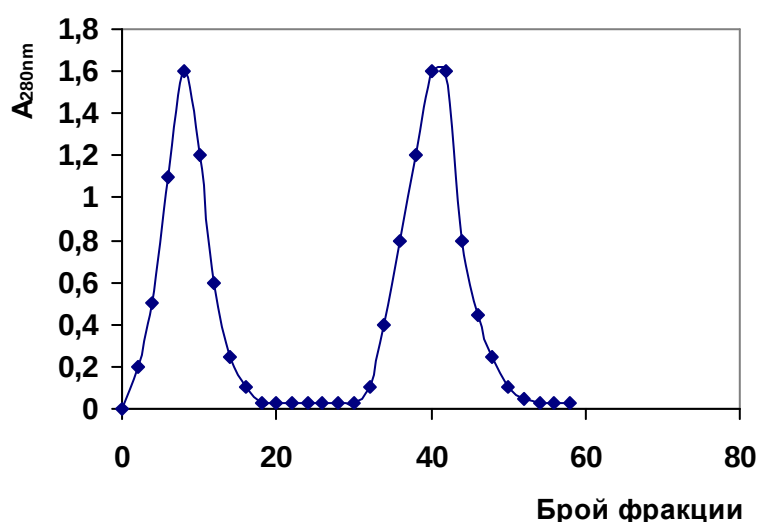


Фиг.27. Пречистване на „суров“ апротинин чрез катионообменна хроматография.

6.3. Пречистване на аprotинин с йонообменна хроматография върху Accell QMA.

Сорбентът AccellTM Plus QMA е от смесен тип неподвижна фаза: хидрофилен, на основата на силикагел, спада в групата на NP сорбенти („нормални” фази) със свързана диолна група и силен анионообменник с четвъртичен азот ($-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Cl}^-$) на основата на поли(акриламид-съ-акрилова киселина). Сорбционният му капацитет спрямо говежди серумен албумин е 200mg/g. Подходящ е за изолиране на белтъци (имуноглобулини и ензими), използва се и в хранително-вкусовата промишленост (за отделяне на пигменти от вина и плодови сокове) и за изолиране на фенолни съединения и пептиди.

Полученият аprotинин от етап 6.2. се подлага на пречистване с помощта на колона (2,5 x 17,5cm, 85ml обем на коланата), запълнена с анионообменник (Accell QMA, Millipore/Waters) на установка Pharmacia Biotech Biotech System 10831. Йонообменникът е уравновесен с 0,015 М трис-буфер с pH 8,5. Неутрализираните фракции от 234 до 255 (фиг.27) се подлагат на обезсоляване и концентриране чрез ултрафилтрация през мемрана с MWCO 2000g/mol. Разтворът в ултрафилтрационната клетка трикратно се „промива” с 0,015 М трис- буфер с pH 8,5 и се нанася на колоната със скорост 25 ml/h. Десорбцията е проведена със степенен градиент с 0,5 М NaCl в същия буфер. Фракции с обем 2,5 ml са анализирани за съдържание на белтък ($A_{280\text{nm}}$) и резултатите са представени на фиг.28.



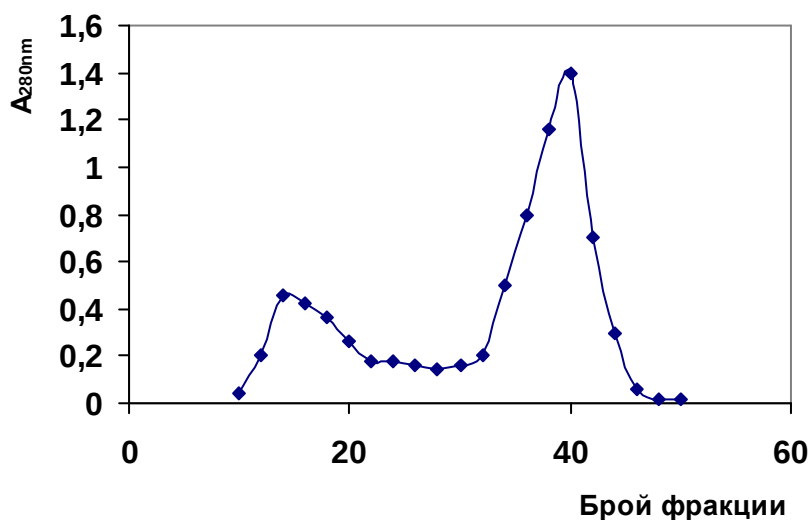
Фиг.28. Пречистване на аprotинин с анионообменна хроматография.

При тези условия аprotининът е натоварен като катион ($pI = 10,3$) и не се сорбира върху йонообменника (фракции от 0 до 18), докато някои съпътстващи белтъци под

формата на аниони се сорбират и последващо се десорбират с буфер с висока йонна сила (фракции от 32 до 50). Всички фракции са анализирани за съдържание на белтък и инхибиторна активност и резултатите са представени в табл.6. Постигната е 2961,5 AtpE/mg инхибиторна активност, фактор на пречистване – 101,4 и добив – 84,6%.

6.4. Пречистване на аprotинин с гел-хроматография.

Гел-хроматографското пречистване на аprotинина от етап 6.3. се реализира с колона запълнена със Sephadex G-50 и подвижна фаза 1 М оцетна киселина. Резултатът от хроматографския процес е представен на фиг.29. Фракциите от 12 до 24 съдържат високомолекулни белтъци, чийто обем на задържане е идентичен с този на Dextran blue от *Leuconostoc spp.* с молекулна маса 2 млн.g/mol, с който колоната предварително е калибрирана. Фракциите от 24 до 32 съдържат белтъци с молекулна маса 13 000 g/mol, калибрирането на този диапазон обеми на задържане е проведено предварително с Cytochrome C от сърце на говедо. Пикът, съдържащ фракциите от 32 до 46 съответства на вещества с молекулна маса под 10 000 g/mol.



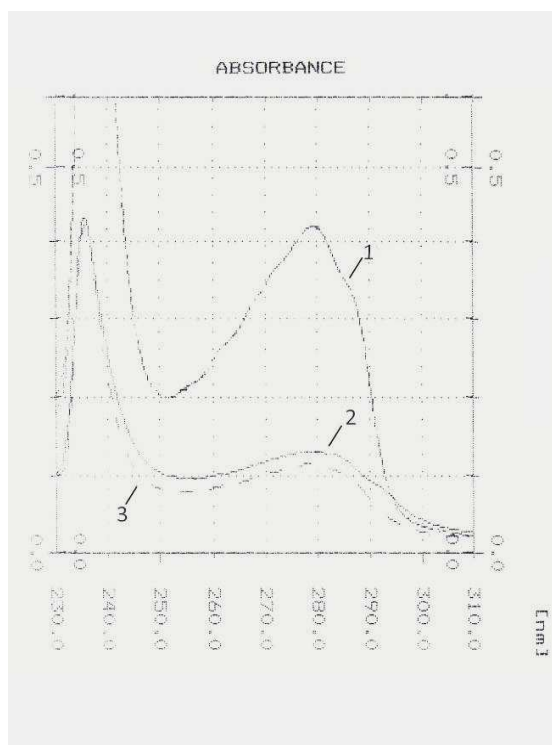
Фиг.29. Гел-хроматографското пречистване на аprotинин.

UV-спектри на обединените фракции на първия пик са представени на фиг.30-2. Фракциите след №35 са с необходимата чистота и се обединяват с тези до 46, (фиг.30-1), замразяват се в тънък слой и се изсушават лиофилно. Високопречистеният аprotинин се анализира за инхибиторна активност (3450 AtpE/mg) и електрофоретичната му картина е идентична с тази от фиг.33.

Таблица.6..Резултати от пречистването на апрогинин.

Етапи	Обем [ml]	Концентра- ция на белтък [mg/ml]	Количество белтък [mg]	Инхибиторна активност [AtpE/ml]	Обща инхибиторна активност. 10 ³ [AtpE]	Специфична инхибиторна активност [AtpE]	Фактор на пречистване	Добив [%]
Екстракция	2100	7,43	15600	216,7	455	29,2	1	100
Концентриране	800	19,0	15200	555,0	444	29,2	1	97,6
Йонообменна хромато- графия върху КУ-23 - сорбция - промиване - десорбция I - десорбция II	800	16,9	13500	-	-	-	-	-
	300	0,93	280	-	-	-	-	-
	500	3,0	1500	-	-	-	-	-
	95	3,26	310	4231,6	402	1296,8	44,4	88,4
Йонообменна хромато- графия върху Ассел TM Plus QMA - сорбция - десорбция	100	1,3	130	3850	385	2961,5	101,4	84,6
	120	1,38	165	-	-	-	-	-
Гелхроматография - I пик - II пик	130	0,15	19,5	-	-	-	-	-
	110	0,93	102,3	3208,5	353	3450	118,2	77,6

Резултатите от пречистването на апротинин при лабораторни условия чрез комбиниране на три хроматографски метода са представени на табл. 6. Прави впечатление, че още с първото хроматографско пречистване, което може да се приеме като етап на грубо пречистване от една триетапна стратегия се постига 44,4 фактор на пречистване. Междинното пречистване се реализира чрез анионообменна хроматография при която е постигнат фактор на пречистване 101,4. Последният етап на фино пречистване се провежда с помощта на гел-хроматографско пречистване. Постигнатите добиви на отделните етапи (над 90%) са предпоставка за икономическата ефективност на процеса. Полученият апротинин е електрофоретично хомогенен и с много висока инхибиторна активност.

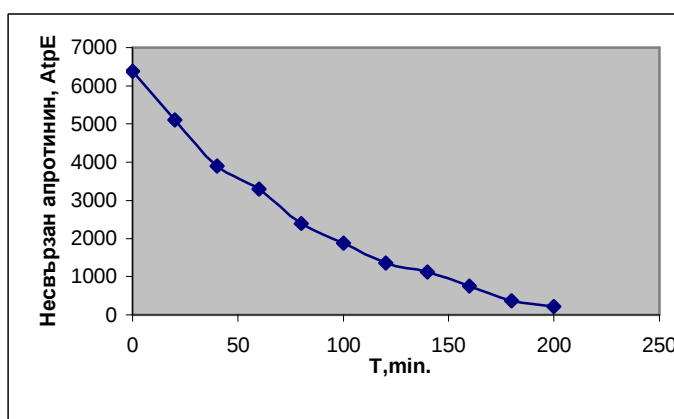


Фиг.30. UV-спектри на фракции: 1 - обединени фракции от 35 до 46, 2 – обединени фракции от 12 до 24.

6.5. Афинитетно пречистване на апротинин в „бач” процес.

За афинитетен сорбент е избрана проба макрочастички Ch-H 1:10 предвид оптималните свойства: количество имобилизиран трипсин и относителна активност. 1 g хитозанови частици с имобилизиран трипсин се разбъркват в 10 ml 0,015M трис - буфер с pH 7,8. 3 ml разтвор на апротинин (съдържащ 6500 AtpE), (получен при

условията на т.6.2. след десорбция 2 и уравновесен чрез ултрафилтрационна клетка с 0,015 M tris- буфер с pH 8,5) се разбъркват в продължение на 200 min. Резултатите от хода на афинитетното свързване на аprotинина са представени на фиг.31 и показват, че за времето на експеримента цялото количество инхибитор се сорбира. Докато в разтвор трипсин-инхибиторният комплекс се осъществява много бързо (1-2min.), резултатите от кинетичното изследване показват, че при хетерогенни условия комплексообразуването в голяма степен се забавя. Както и в случая с ензимната реакция спрямо BAPNA, тук тези процеси на затруднена дифузия в мрежата на гелната частица се проявяват в по-голяма степен предвид по-голямата молекула на инхибитора ($M_w=6512\text{g/mol}$) спрямо тази на субстрата ($M_w=435\text{g/mol}$). Друга причина за променения афинитет между лиганда и лигата е наличието на пространствени затруднения, произтичащи както от ковалентно свързвания трипсин, така и от полизахаридната гелна мрежа при условията на опита..

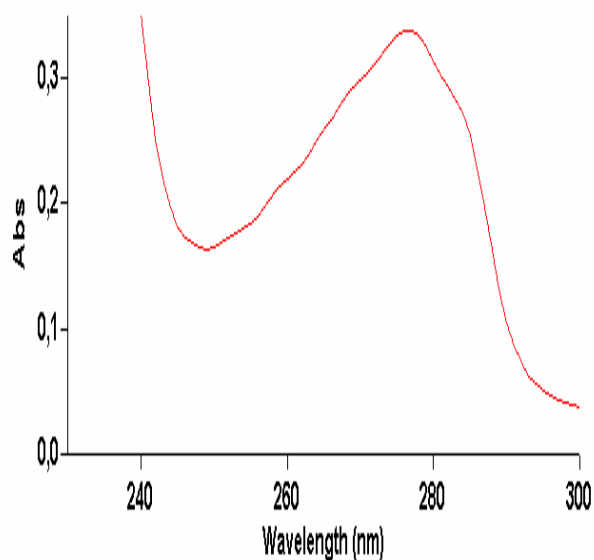


Фиг.31. Кинетика на афинитетна сорбция на аprotинин.

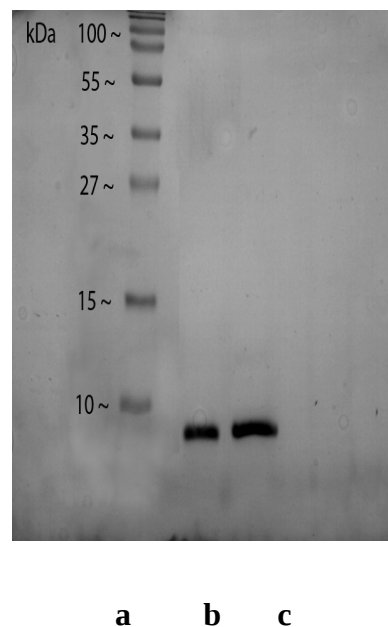
Неадсорбираните вещества се отделят чрез промиване със същия буфер, след което инхибиторът се десорбира с 5ml 0,1M HCl. Резултатите от SDS-PAGE на фиг.33 показват електрофоретична хомогенност на пречистения аprotинин, както и при използвания стандарт.

Резултатите от UV-спектъра на пречистения аprotинин са представени на фиг.32. Спектърът притежава характерният за белтъчните вещества максимум при 277nm и минимум при 254nm. Абсорбцията при 280nm се използва за определяне концентрацията на инхибитора с помощта на абсорбционен коефициент $A_{1cm}^{1\%} = 8,3$ ($c=0,41\text{ mg/ml}$). Определената инхибиторна активност (3250 AtrE/mg) е критерий за

много висока инхибиторна активност, постигната с афинитетния принцип на пречистване.



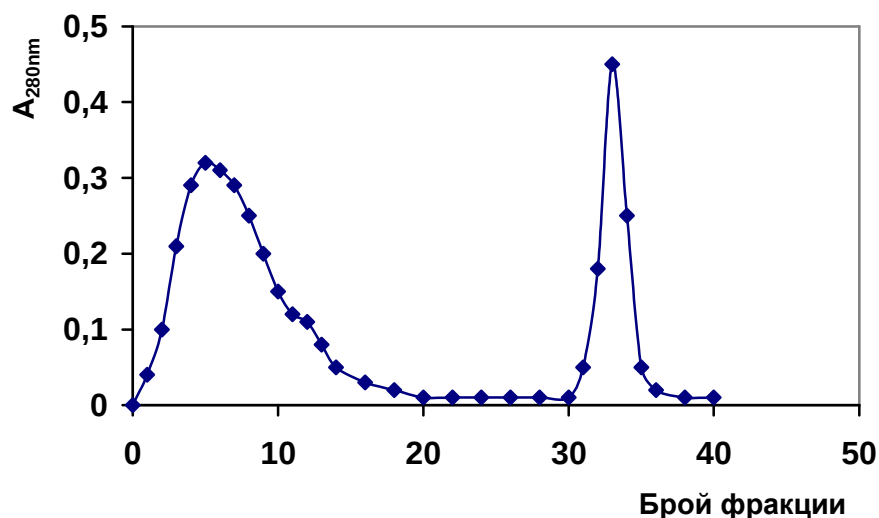
Фиг.32. UV спектър на афинитетно пречистен апротинин.



Фиг.33. SDS-PAGE на:
a – маркери; b - стандарт
апротинин; c – пречистен
апротинин.

6.6. Афинитетно пречистване на апротинин чрез „колонен” процес.

Хроматографската колоната е заредена с 5 g проба Ch-L-E-150 (имобилизиран трипсин върху хитозанови микрочастички, получени по емулсионния метод) и е уравновесена с 0,015 M Tris -буфер с pH 8,5. 10ml разтвор на апротинин (съдържащ 6500 AtpE), (получен при условията на т.6.2. след десорбция 2 и уравновесен чрез ултрафилтрационна клетка с 0,015 M трис-буфер с pH 8,5) се нанасят на колоната със скорост 5 ml/h (фиг.34, фракции от 1 до 5), след което колоната се промива с 50 ml буфер със скорост 10 ml/h (фиг.34, фракции от 6 до 30). Апротининът се елуира с 0,02 M глицинов буфер, pH 2,1, фракциите от 31 до 35 се обединяват и се анализират - 3350 AtpE/mg е инхибиторната активност, а SDS-PAGE показва електрофаретична хомогенност.



Фиг.34. Афинитетно пречистване на апротинин върху колона с Ch-L-E-150.

6.7. Получаване на апротини при заводски условия.

На базата на резултатите постигнати при лабораторни условия за получаване на апротинин е разработен “Регламент за производство на “Апротил” субстанция” за фармацевтично приложение” за ДФ “Софарма”. Съгласно условията на Регламента е изработена пробна партида от “Апротил” субстанция (“Апротил” е фирменото наименование на апротинина) и ампули “Апротил L” от 50 000 АtrЕ.

Характеристиките на готовия продукт са както следва:

1. Наименование

- 1.1. Българско наименование – Апротил
- 1.2. Наименование на латиница – Aprotil
- 1.3. Фармакопейно наименование – Aprotinin
- 1.4. Химическо наименование – няма
- 1.5. Синоними – Trasylol, Contrycal, Gordox, Iniprol, Traskolan, Antilysin.
- 1.6. Структурна формула – полипептид, изграден от 58 аминокиселинни остатъци.
- 1.7. Емпирична формула – $C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$
- 1.8. Молекулна маса – 6511,51g/mol

2. Физикохимични свойства

- 2.1. Външен вид – лиофилен прах
- 2.2. Цвят – бял до жълтеникаво бял
- 2.3. Мирис – без мирис

2.4. Разтворимост:

- във вода – лесно разтворим
- в изотоничен разтвор – лесно разтворим

2.5. Идентичност - определянето на стойността на инхибиторната активност в присъствие на субстрат BAPNA служи и за идентифициране.

2.6. рН на 0,5% воден разтвор – от 4,7 до 7,0

2.7. Съдържание на сулфатна пепел – не повече от 3,0 %

2.8. Съдържание на вода – не повече от 5,0 %

2.9. Съдържание на високомолекулни вещества – не се допускат

2.10. Инхибиторна активност – не по-малко от 3000 AtpE/mg

2.11. Апирогенност – апирогенен

2.12. Токсичност – нетоксичен

2.13. Стерилност – задължителна

Технологичната схема за производство на “Апротил” субстанция може да се обобщи в следните фази:

- Първа фаза - Екстракция
- Втора фаза - Йонообменна хроматография върху катионит КУ-23
- Трета фаза - Последователно утаяване на апротила с амониев сулфат и ацетон
- Четвърта фаза - Йонообменна хроматография върху Waters Accell plus QMA
- Пета фаза – Обезсоляване върху Sephadex G-50

Първа фаза - Екстракция на говежди бял дроб и концентриране на екстракта.

500 kg смлян на кутер говежди бял дроб се зареждат в реактор ($V=2 \text{ m}^3$) и към тях се прибавят 1000 l екстрахираща смес (60% етанол, съдържащ 1% H_2SO_4). Екстракцията се провежда при разбъркване при 50°C в продължение на 1 час, след което материалът се центрофугира на декантер центрофуга и се избистря на сепаратор „Alfa Laval”. Бистрият разтвор се концентрира на тънкослоен вакуумизпарител „Luva” до 400 l.

Втора фаза - Йонообменна хроматография върху катионит КУ-23.

Разтворът от втора фаза се пропуска през колона (20x100 cm), запълнена с 10 kg йонообменна смола КУ-23, която предварително е приведена в H^+ форма. Сорбцията се провежда със скорост 30 l/h в посока от долу нагоре, след което катионита се промива с 100 l дейонизирана вода и 150 l 0,1M фосфатен буфер с рН 7,7.

Непосредствено след това се пропуска 0,1 М разтвор на NaOH, съдържащ 1М NaCl и фракцията, съдържаща апротила се събира. рН на разтвора се корегира със H₂SO₄ до рН 4,0.

Трета фаза - Последователно утаяване на апротила с амониев сулфат и ацетон.

Към разтвора от втора фаза (около 50 l) се прибавят на порции 32 kg амониев сулфат при непрекъснато разбъркване до пълното му разтваряне и 100 g перлит. Образуваната утайка се отделя чрез филтруване с помощта на камерна филтърпреса, заредена с 4 бр. шихти ККЗ, 20x20 cm. Получената утайка (около 600 g) се разтваря в 10 l дест.вода и към разтвора се прибавят на порции 14,0 l охладен ацетон при непрекъснато разбъркване. Утайката се отделя чрез центрофугиране с помощта на охлаждаща центрофуга при 3000 min⁻¹.

Четвърта фаза - Йонообменна хроматография върху Waters Accell plus QMA.

60 g продукт от трета фаза се разтварят в 0,015 М трис-буфер с рН 8,5 и се пропуска през колоната (15x80 cm) на Waters Kilo Prep 250 EF (BioTage KP-250EF), (препаративна HPLC на Millipore Corporation), запълнена с Accell[™] Plus QMA (фиг.35). След нанасяна на пробата, през колоната се подава същият буфер и фракциите, съдържащи апротила се обединяват (около 12 l). Разтворът се концентрира на ротационен вакуумизпарител до краен обем 3,0 l.



Фиг.35. Препаративна система HPLC тип Waters KP 226Kilo Prep 250.

Пета фаза – Гел хроматография върху Sephadex G-50.

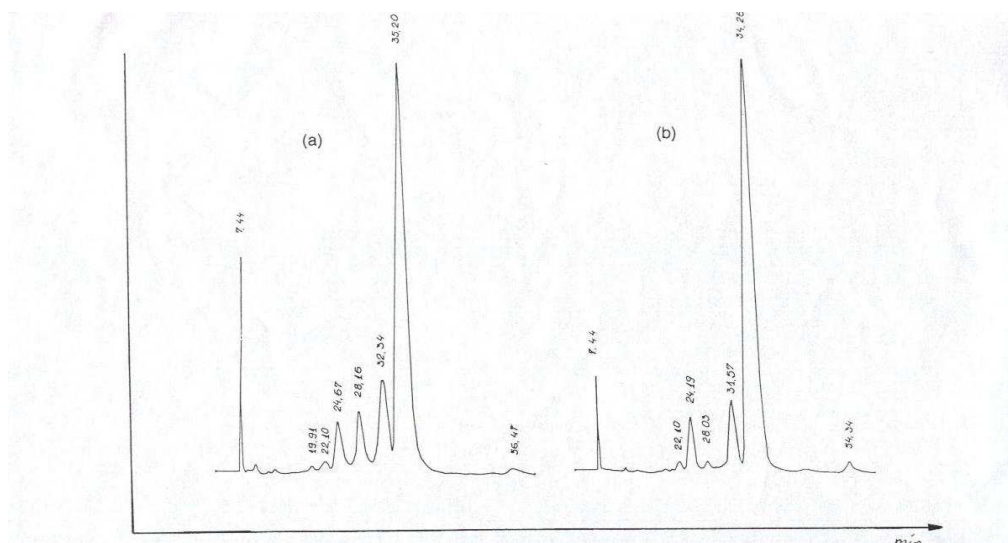
Разтворът от четвърта фаза се пропуска през колона (Pharmacia Fine Chemicals), „Stack” система, състояща се от последователно свързани 6 броя секции KS 370/15,

запълнени със Sephadex G-50 Superfine и уравновесени с 1% разтвор на оцетна киселина (фиг.36). Фракциите, съдържащи апротила се обединяват, разтворът се филтрува през филтър Millipore 0,22 μ в асептични условия и се лиофилизира.



Фиг.36. Колони „Stack” система за гелхроматография на апротил.

Чистотата на субстанцията от апротинин, получена по предложената по-горе технология е сравнена с тази на инжекционните форми “Gordox” и “Trasylol” с помощта на HPLC (колона LC-304 (Supelco, Bellefonte, PA) и различни мобилни фази съдържащи 0,1% трифлуороцетна киселина в ацетонитрил или NaClO_4 . Хроматограмата на фиг.37-а е за стандарт апротинин „Novo”, в който освен пикът на активната компонента се съдържат още три по-малки на онечистващи вещества, докато на фиг.37-б е представена хроматограмата на апротил-субстанция, в която компонент с време на задържане 28,03 min присъства като следи в анализираната проба.



Фиг. 37. HPLC хроматограми на: а – апротинин – NOVO и б – апротил-субстанция.



Фиг.38. Ампули „Апротил – L” 50 000 АтрЕ.

На получената субстанция е извършен контрол в ДИКЛС – София и с протокол № 91-4384 от 11.12.1991 г аналитичната документация за „Апротил-субстанция” е приета като достатъчна и експертизата се приема. От получената субстанция „Апротил”, която отговаря на всички показатели, залегнали в Регламента за производство са приготвени ампули „Апротил – L” 50 000 АтрЕ (фиг.38) и клиничните изследвания успешно са проведени във ВМА и МБАЛСМ „Н.И. Пирогов”.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В изпълнение на поставената цел на настоящата дисертационна работа са получени афинитетни сорбенти на основата на хитозанови макро- и микро- гелни частички с ковалентно имобилизиран трипсин. Изследвани са кинетичните свойства на неразтворимия ензим, а сродството между апротинина и трипсина е определено и с помощта на инхибиторната константа. Пречистването на апротинина е реализирано чрез комбиниране възможностите на различни разделителни методи, в т.ч. и с афинитетна хроматография. Постигнатите резултати могат да се представят в резюме както следва:

1. Физичните, химичните и биологичните свойства на хитозана са функция от два параметъра: степен на деацетилиране и молекулна маса, като и двата зависят от вида на изходната суровина и метода на получаване. С капилярен вискозиметър са определени различните вискозитети на хитозанови разтвори, а чрез зависимостта на Huggins и граничния вискозитет - $[\eta]$. Молекулната маса на използваните хитозанови проби е изчислена с уравнението на Mark-Houwink - за хитозан (проба Ch-L) с вискозитет $< 200 \text{ mPa.s}$ - $M_w = 160 \cdot 10^3 \text{ g/mol}$ и за хитозан (проба Ch-H) с вискозитет $> 400 \text{ mPa.s}$ - $M_w = 538 \cdot 10^3 \text{ g/mol}$.
2. Хитозанът като продукт на частично или напълно деацетилиран хитин се характеризира със степен на деацетилиране $> 0,65$, която представлява отношение на 2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкопиранозните към 2-амино-2-дезокси-D-глюкопиранозни звена. Стойността на DD зависи от аналитичния метод и по тази причина е определена с три различни метода: чрез елементен анализ, чрез FTIR и чрез FDUV спектрофотометрия. Получените стойностите за DD се различават значително (до 25%), с което потвърждаваме, че този параметър е силно зависим от използвания аналитичен метод. Резултатите за DD на двете хитозанови проби получени чрез FDUV (за Ch-L – 89,7% и за Ch-H – 78%) са използвани при стехиометричните изчисления на моларния излищък от глутаров алдехид при ковалентното омрежване и активиране на хитозановите матрици.
3. Макро- (среден диаметър 3,0 mm) и микрохитозанови частички са получени чрез преципитационния метод, а чрез емулсионния метод са формувани сферични микрочастички (среден диаметър 0,52 mm). Механическата здравина на хитозановите гранули зависи от съдържанието на полизахарида в тях, поради което формуването е проведено при максимална концентрация на хитозана - 2% за

Ch-H и 6% за Ch-L, при по-високи концентрации приложението на опитната постановка е нецелесъобразно. Силно изразена поръозна структура се наблюдава чрез SEM само при лиофилно изсушените проби, морфологията на повърхностите се различава в голяма степен (поръозността на проба Ch-H е по-силно изразена), докато след изсушаването им във вакуум сушилна гелната структура необратимо се нарушава.

4. Изследван е процесът на ковалентното omрежване на хитозановите гелове с глутаров алдехид с помощта на FTIR спектроскопия. Характерният максимум при 1643 cm^{-1} при немодифицирания хитозан се отмества при 1659 cm^{-1} поради наслагването му в тази област с образуваните $>\text{C}=\text{N}-$ групи при omрежените хитозанови частички. Влиянието на излишъка от GA върху процеса на модификация на хитозана се демонстрира от FTIR спектрите при 1564 cm^{-1} , ивицата при това вълново число е характерна за виниловите валентни трептения и на образуваната връзка от типа на вторичните амини ($-\text{NH}-$) между аминокрупата на хитозана и двойната връзка на поликондензационния продукт на GA. Максимално модифициране на хитозана се постига при 10 кратен излишък на GA.
5. Широкозастъпеният модел за omрежване на хитозана с глутаров алдехид под формата на диалдехид не може да обясни някои физико-химични и химични свойства на модифицираните гелове. Предложен е смесен механизъм на omрежване на хитозана с продуктите от алдолната кондензация на глутаровия алдехид. Стабилността на Шифовата база може да се дължи на спрежението на двойната връзка на $>\text{C}=\text{N}-$ с двойната връзка в α,β положение. От друга страна е възможно и създаването на стабилни връзки от типа на вторичните амини чрез присъединителната реакция на аминокрупите от хитозана към двойните връзки на полимерния глутаров алдехид.
6. Изследван е процесът на ковалентно имобилизиране на трипсин върху omрежените и активирани макро- и микрочастички. Установени са големи количества имобилизиран трипсин (от 45 до 180 mg/g), по-голямо количество трипсин се свързва в пробите Ch-L, където съдържанието на хитозан е по-голямо (7,1 и 7,7%) и когато хитозановите частици се omрежат и активират с 10 кратен моларен излишък на GA. След хомогенизиране на макрочастиците се наблюдава от 3 до 5 пъти увеличение на специфичната и относителната активности. Хидродинамичните изследвания при ензимната реакция с високомолекулен субстрат (хемоглобин) показват, че процесът се ограничава от масообменни

процеси при скорост на разбъркване 60 min^{-1} и в по-малка степен при 300 min^{-1} . Определените стойности на K_m са от един и същи порядък, което е доказателство, че каталитичните функции на имобилизирания трипсин са съхранени в процеса на ковалентното му свързване.

7. Предложени са механизми на ковалентното свързване на трипсина, които се основават на модела на омрежване и активиране на хитозановите частички с поликондензационните продукти на глутаровия алдехид. Ковалентното имобилизиране на ензима може да се реализира с помощта на:
 - образуване на вторичен амин между аминокрупите на трипсина и двойните връзки на поликондензационния продукт на GA
 - образуване на Шифови бази, които са стабилизиращи от двойната връзка в α, β положение
 - образуване на Шифови бази между алдехидните групи на полимерния глутаров алдехид и нуклеофилни функционални групи от трипсина
 - чрез комбиниране на изброените възможности
8. Изследвано е сродството на получените афинитетни лиганди спрямо БПТИ. От резултатите за титруването на активния център на „свободен“ и имобилизиран трипсин с аprotинин и от получените стойности за K_i може да се направи заключението, че процесът на ковалентно свързване на ензима към омрежени и активирани с глутаров алдехид хитозанови гелове не води до промяна на нативната конформация на участъка от белтъчната молекула, отговорен за каталитичната му функция и за способността на ензима да свързва инхибитор. Този извод се потвърждава и от високите специфични и относителни активности на имобилизиран трипсин спрямо нискомолекулен субстрат. Прави впечатление разликата в стойностите на K_i при свободен и имобилизиран трипсин спрямо аprotинина, което може да се дължи на по-големите дифузионни ограничения при инхибитора, предвид по-голямата му молекулна маса в сравнение със синтетичния субстрат.
9. Получените афинитетни лиганди са използвани за пречистване на аprotинин при лабораторни условия. Афинитетната хроматография (в колонен и “бач“процес) успешно е включена като етап, обединяващ целите на междинното и финалното пречистване в триетапната стратегия за получаване на БПТИ. По-добри резултати са постигнати с имобилизиран трипсин върху хитозанови микрочастици. Получен е електрофореетично хомогенен аprotинин с инхибиторна активност 3250 AtpE/mg .

10. За изолирането на апротинин са избрани условията на екстракция 5 при 50°C, където е постигнат добив от 130 mg/kg и чистота 0,83%. „Суровият“ апротинин е пречистен чрез йонообменна хроматография върху КУ-23, като е постигнат фактор на пречистване 44,4 и 1296,8 AtpE/mg инхибиторна активност. Чрез комбиниране на анионообменна и гелна хроматографии при лабораторни условия е постигната електрофоретична хомогенност и инхибиторна активност 3450 AtpE/mg на крайния продукт.
11. Резултатите от лабораторните изследванията върху изолирането и пречистването на апротинина с хроматографски методи са използвани при разработването на технология за производство на „Апротил“ субстанция за фармацевтично приложение. При промишлени условия е получен продукт с качества, залегнали в предложения Регламент за производство. Чистотата на апротинина, получен по предложената по-горе технология е определена с помощта на HPLC и е сравнена с образец апротинин – „Novo“. Хроматограмите показват високите качества на субстанцията „Апротил“, от която са приготвени ампули „Апротил – L“ 50 000 AtpE, чиито клиничните изследвания успешно са проведени във ВМА и МБАЛСМ „Н.И. Пирогов“.

ИЗВОДИ

В резултат на проведеното изследване могат да бъдат направени следните важни изводи:

1. Подбрани са и са охарактеризирани хитозанови продукти с различен вискозитет. В резултат на осъществените изследвания беше установено, че степента на деацетилиране на хитозана е параметър, зависим от използвания аналитичен метод. Резултатите за DD на двете хитозанови проби получени чрез FDUV (за Ch-L – 89,7% и за Ch-H – 78%) са използвани при стехиометричните изчисления на моларния излишък от глутаров алдехид.
2. С помощта на преципитационен и емулсионен методи са получени макро- и микрочастици със средни диаметри съответно 3,0 μm и 0,52 μm . Морфологията на повърхностите на получените макрочастици е изследвана чрез SEM, като е установено, че порьозността им зависи от съдържанието на хитозана използван в процеса на тяхното формване.
3. Изследван е процесът на ковалентно omрежване и активиране на хитозановите частички с различни моларни излишъци на глутаровия алдехид. С помощта на FTIR беше установено, че 10 кратния моларен излишък е достатъчен за модифициране на полизахаридния носител. Предложен е смесен механизъм за omрежване на гела, който включва образуване на $>\text{C}=\text{N}-$, стабилизирана от двойната връзка в α, β положение и създаване на връзки от типа на вторичните амини.
4. Имобилизирани са трипсин към макро- и микро- хитозанови частички и е установено, че се постигат от 45 до 180 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{носител}}$ свързан ензим. Активността на получения продукт зависи от моларния излишък на GA, от вида на използвания субстрат и дифузията на субстрата и продукта в порите на частиците. Изследвани са кинетичните свойства на имобилизирания трипсин, при което са определени $K_m=1,54 \text{ mM/L}$ и $K_i = 0,33 \cdot 10^{-7} \text{ M/L}$. Установено е запазване на сродството на ензима към нискомолекулния субстрат BAPNA, докато спрямо апротинина константата на инхибиране се увеличи приблизително с два порядъка в сравнение с тази на свободния трипсин.
5. Разработена е лабораторна стратегия за пречистване на апротинин чрез комбиниране на различни хроматографски методи в т.ч. катионообменна,

анионообменна, гелна и афинитетна. Изполването на имобилизиран трипсин върху хитозанови частички води до съкращаване на процеса на пречистване до електрофоретична хомогенност на апротинина и висока инхибиторна активност.

6. В резултат на мащабиране на лабораторната стратегия е разработена технология за получаване на „Апротил“-субстанция при промишлени условия, която се характеризира с постигане на висок добив и свойства на целевия продукт удовлетворяващи изискванията залегнали в технологичната документация.

ПРИНОСИ

1. Избраните хитозанови проби са охарактеризирани по отношение на молекулна маса и степен на деацетилиране с различни аналитични методи.
2. Получени са макро- и микро- хитозанови частички като морфологията на повърхностите им е изследвана чрез SEM.
3. Изследвано е ковалентното omрежване на хитозановите гелове при вариране на моларния излишък на глутаров алдехид и са предложени адекватни механизми на протичане на този процес.
4. Иmobилизиран е трипсин върху omрежените и активирани макро- и микрочастички и е охарактеризиран полученият афинитетен сорбент.
5. Изследвано е сродството на получените афинитетни лиганди спрямо БПТИ и получените афинитетни лиганди са използвани за пречистване на апротинин при лабораторни условия.
6. Разработена е технология за производство на “Апротил” субстанция при промишлени условия.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. Kamburov M., Lalov I., (2012). Preparation of chitosan beads for trypsin immobilization, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26, 156-163.
2. Камбуров М., Лалов И., Получаване на хитозанови частици с имобилизиран трипсин и използването му за пречистване на апротинин, “Хранителна наука, техника и технологии -2011”, 14-15 октомври 2011, Пловдив, т.LVIII, 189-194.
3. Лалов И., Камбуров М., Бозаджиев О., Иванова Х., Димитров И., Получаване на хитозан посредством микробиологична трансформация на спиртна шлемпа, “Хранителна наука, техника и технологии -2011” 14-15 октомври 2011, Пловдив, т.LVIII, 195-200.
4. Камбуров М., Лалов И., Изследване омрежването и активирането на хитозан с глутаров алдехид за имобилизиране на ензими, Научни трудове на УХТ, “Хранителна наука, техника и технологии -2012”, 19-20 октомври 2012, Пловдив, т.LIX, 579-583.
5. Камбуров, М.Н., Благоев С.Р., Начев Н.Д., Ушев П.Н., Георгиев С.С., Донецки И.А., (1995). Метод за получаване на апротинин. BG патент 51100.