

На правах рукописи

ПОЛЕНОК ЕЛЕНА ГЕННАДЬЕВНА

**СИНТЕЗ И ПРИМЕНЕНИЕ АФФИННЫХ  
АДСОРБЕНТОВ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ  
СТРУКТУРНЫМИ АНАЛОГАМИ ГОРМОНОВ ДЛЯ  
ВЫДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ**

**15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук**

**Томск – 2003**

Работа выполнена в Кемеровской государственной медицинской академии на кафедре фармацевтической и токсикологической химии и Центральной научно-исследовательской лаборатории.

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук,

профессор

**Кузнецов Пётр Васильевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор фармацевтических наук,

профессор

**Краснов Ефим Авраамович**

кандидат химических наук,

доцент

**Белянин Максим Львович**

**Ведущая организация:**

Тюменская государственная медицинская академия

Защита диссертации состоится « 29 » декабря 2003 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.04 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Сибирского государственного медицинского университета: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 207

Автореферат разослан “26” ноября 2003 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Юсубов М.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Известно, что тироксинсвязывающие белки (ТСБ) играют важную роль в организме человека и животных, осуществляя транспортные функции по переноске гормонов к органам-мишеням, буферные функции, через которые лимитируется количество свободного гормона, дезинтоксикационные свойства по ингибированию гормонов и белков рецепторного пула. Некоторые из этих белков используются как составная часть диагностических наборов для определения гормонов и транспортных белков. Применяемые сегодня методы выделения и очистки ТСБ и других фармацевтических белков громоздки, дороги и малопродуктивны, что сдерживает развитие производства тест-систем в нашей стране.

Современные тенденции развития биотехнологии при выделении и очистке белков предполагают широкое использование метода аффинной хроматографии (АФХ). Этот метод успешно применяется в фармации для получения фармацевтических белков (Burnouf, 2001, Lowe, 2001). Несмотря на достигнутые успехи в области АФХ, проблема конструирования адсорбентов аффинного типа для различных вариантов АФХ по-прежнему остается актуальной. В этой связи очерчиваются новые подходы к аффинному синтезу – замена дорогостоящих, труднодоступных классических лигандов (гормоны, коферменты, субстраты и др.) в структурах адсорбентов на доступные фрагмент-аналоги из фонда лекарственных веществ, аналитических реагентов и природных соединений. Недавно проблема использования в аффинной хроматографии лекарственных веществ в качестве лигандов достаточно подробно обсуждена в монографии (Кузнецов, 2002).

Остается нерешенным вопрос о влиянии отдельных структурных фрагментов аффинного сорбента (тип матрицы, вставки и лиганда) на выделение ТСБ, что является особенно важным для процесса биотехнологического получения указанных белков в промышленных масштабах.

Таким образом, учитывая существенные пробелы знаний в данной области, такой аспект как синтез адсорбентов аффинного типа (ААфТ) на основе эпоксиактивированных носителей и лекарственных веществ в качестве лигандов для выделения и очистки ТСБ, оценка их хроматографической и биохимической эффективности делает исследования по данной проблеме исключительно актуальными для комплекса наук - биохимии, эндокринологии, фармацевтической химии и фармакологии, биотехнологии.

**Цель исследования.** Целью настоящей работы является создание новых оригинальных адсорбентов аффинного типа с иммобилизованными тиреоидными гормонами и их структурными аналогами для выделения и очистки тироксинсвязывающих белков из плазмы крови человека, оценка их свойств и эффективности.

**Задачи исследования:**

1. Изучить возможности различных вариантов синтеза ряда новых йодированных лигандов на основе известных лекарственных веществ (салицилатов, фталеинов и др.).

2. Разработать методы синтеза новых аффинных адсорбентов на базе эпоксиактивированных носителей с различными типами вставок, где в качестве лигандов используются тиреоидные гормоны и их структурные аналоги.

3. Изучить влияние отдельных структурных фрагментов адсорбентов аффинного типа (длина вставки, тип лиганда) на их селективность.

4. Исследовать влияние различных хроматографических условий выделения на эффективность очистки тироксинсвязывающих белков.

5. Охарактеризовать состав и свойства выделенных белков сыворотки крови иммунологическими и электрофоретическими методами.

**Научная новизна исследования.** Впервые получены групповые аффинные адсорбенты нового типа с иммобилизованными оригинальными лигандами на основе ряда доступных лекарственных веществ (производные салициловой кислоты, фенолфталеина и др.) для выделения

и очистки ТСБ. Предложенные оригинальные методики синтеза аффинных адсорбентов позволяют упростить процесс и сократить время синтеза аффинных адсорбентов.

Синтезировано 25 аффинных адсорбентов с различными структурными фрагментами системы «матрица- вставка- лиганд» и разной концентрацией иммобилизованного лиганда. Установлено влияние типа активации носителя и соответственно длины вставки на хроматографические свойства адсорбентов. Впервые синтезированы циклические аффинные адсорбенты, полученные путём дополнительной перешивки бисэпоксиактивированных гелей эпихлоргидрином.

Впервые проведен сравнительный анализ классических и оригинальных аффинных адсорбентов с иммобилизованными йодпроизводными лекарственных веществ. Среди синтезированных адсорбентов выявлены наиболее селективные и эффективные для аффинной очистки ТСБ.

**Научно-практическая значимость работы.** Применение новых оригинальных аффинных адсорбентов с иммобилизованными йодпроизводными лекарственных веществ позволяет упростить и удешевить методы выделения и очистки гормонсвязывающих белков. Разработанные методики синтеза новых адсорбентов, способы очистки ТСБ на их основе, позволяют улучшить качество и эффективность диагностических тест-систем медицинского назначения за счет повышения чистоты выделяемых белков.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс и в научно-исследовательскую работу на кафедре фармацевтической и токсикологической химии КГМА (акт внедрения от 30.08.03) и в практику Отдела иммунологии рака КемНЦ СО РАН (акт внедрения от 25.09.01).

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Синтез йодпроизводных лекарственных веществ (салицилаты, фенолфталеины, производные п-аминобензойной кислоты), структурных аналогов тироксина, для аффинной хроматографии тироксинсвязывающих белков.

2. Синтез эпоксиадсорбентов с различными длинами вставок, в том числе и цикломодифицированные, и вышеобозначенными лигандами.

3. Результаты хроматографического скрининга по влиянию структурных фрагментов эпоксиадсорбентов аффинного типа на их селективность.

4. Результаты идентификации адсорбированных белков, выделенных с классических и оригинальных аффинных адсорбентов.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы доложены на областных научных конференциях: "Фундаментальные и медико-социальные проблемы НИР в медицине" (Новокузнецк, 1998) и "Молодые учёные Кузбассу. Взгляд в XXI век" (Кемерово, 2001); международных конференциях: "Проблемы медицины и биологии" (Кемерово, 1998), "Фармация в XXI веке: Инновации и традиции" (Санкт-Петербург, 1999), "Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фарм. деятельности" (Томск, 2000); на XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003).

**Публикации.** Основные материалы исследований опубликованы в 10 печатных работах.

**Личный вклад автора.** Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

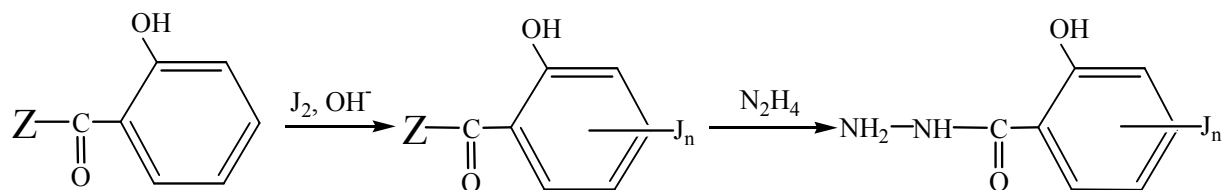
**Объём и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и указателя цитируемой литературы. Работа изложена на 122 страницах, содержит 11 таблиц, 34 рисунка. Библиографический список включает 144 источника, из них 76 на иностранном языке.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Синтез лигандов для адсорбентов аффинного типа

Впервые нами для аффинной очистки ТСБ предложены лиганды, изостерные ключевому фрагменту классического лиганда тироксина ( $T_4$ ), содержащие дийодфенольный (гидразид тетраидфенолфталеина, дийодтирозин) и дийоданилиновый фрагменты (гидразид 3,5-дийод-4-аминобензойной кислоты), а также йодпроизводные салициловой кислоты.

Синтез лигандов, производных салициловой кислоты (СК), проводили известными реакциями иодирования и гидразиолиза по общей схеме:



$Z = -\text{OCH}_3; -\text{NH}_2$

$n = 1, 2$

Йодсодержащие фенолфталеиновые лиганды были получены аналогичным способом из фенолфталеина (ФФ).

Физико-химическая характеристика синтезированных лигандов и ряда модельных веществ (салициловая кислота, салициламид, фенолфталеин) представлена в таблице 1. Образцы салициловой кислоты и салициламида полностью соответствуют требованиям Государственной фармакопеи СССР X издания (ГФ X). Среди синтезированных лигандов выявлены следующие различия: введение атома йода в молекулу салициловой кислоты повышает температуру плавления вещества, йодсодержащие производные СК (пСК) и ФФ (пФФ) более подвижны в условиях ТСХ (система растворителей для фенольных соединений толуол – этилацетат – муравьиная кислота 5:4:1; реактив обнаружения смесь 1%-х растворов  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  1:1).

Метод ТСХ также использовали и для контроля чистоты синтезированных лигандов. Чистые вещества (г-СК, г-иСК, г-ФФ, г-тиФФ, ДИТ, Т<sub>4</sub>) проявлялись одним пятном в ТСХ.

Найденные величины элементных анализов пСК и пФФ соответствуют вычисленным по брутто-формулам. Например, для г-иСК найдено, % : С 32,85; Н 2,46; N 6,4; вычислено, % : С 30,22; Н 2,52; N 10,07. Для г-тиФФ найдено, % : С 33,74; Н 1,84; N 1,67; вычислено, % : С 28,10; Н 1,64; N 3,28.

## Физико-химические параметры лигандов

Вещество	Температура плавления, °С	ТСХ, Rf	УФ - спектр		ИК - спектр	
			min	max	$\nu_{\text{OH}}, \nu_{\text{NH}}$ см <sup>-1</sup>	$\nu_{\text{CO}}$ см <sup>-1</sup>
1. Салициловая кислота (СК)	158-161	0,41	230	263	3346	1587
2. Гидразид салициловой кислоты (г-СК)	148-149	0,44	265	301	3253 3307	1626 1733
3. Гидразид 5-йод-салициловой кислоты (г-иСК)	213-215	0,73	275	318	3351 3462	1635 1676
4. Смесь гидразидов дийодсалициловой кислоты (г-диСК)*	—	0,67 (0,57)	292	324	3326 3426	1626
5. Салициламид	140-142	0,66	251	304	3173 3374	1607 1653
6. 5-йодсалициламид (п-иСА)	222-223	0,73	290	317	3207 3466	1620 1673
7. Фенолфталеин (ФФ)	259-263	0,85	260	275	3333	1706
8. Гидразид фенолфталеина (г-ФФ)	255-257	0,86	260	275	3273	1706
9. Гидразид тетраiodфенолфталеина (г-тиФФ)	148-153	0,93	270	285	3333	1720
10. 3,5-дийодтирозин (ДИТ)	213	---	275	310	3500 3569	1600

\* В смеси гидразидов дийод-СК основным веществом является 3,5-дийодСК, примесь не идентифицирована.

УФ-спектры йод-пСК и йод-пФФ показывают чёткий bathochromic сдвиг длинноволновой полосы максимума гидразидов 5-йодСК ( $\lambda_{\text{max}}$  318 нм), г-диСК ( $\lambda_{\text{max}}$  324 нм) и тетраiodфенолфталеина ( $\lambda_{\text{max}}$  285 нм) по сравнению с несодержащими йод веществами, характеризующий наличие заместителей в орто-пара-положении (табл.1).

В ИК-спектрах пСК и г-тиФФ наблюдаются полосы поглощения в области 3200-3600 см<sup>-1</sup>, характерные для связей  $\nu_{\text{OH}}$  и  $\nu_{\text{NH}}$ , а также в области 1600-1800 см<sup>-1</sup>, характеризующие валентные колебания  $\nu_{\text{CO}}$  (табл.1). Так, у г-иСК наблюдаются полосы поглощения при 1635 см<sup>-1</sup> и 1670 см<sup>-1</sup> ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), у г-тиФФ – при 1720 см<sup>-1</sup> ( $\nu_{\text{C=O}}$ ).



Для йод-пСК и г-тиФФ обнаружены полосы поглощения в области 500-600  $\text{см}^{-1}$  (для г-иСК  $\nu_{\text{max}}$  525  $\text{см}^{-1}$ , для г-диСК –  $\nu_{\text{max}}$  526  $\text{см}^{-1}$  и 546  $\text{см}^{-1}$ , для г-тиФФ –  $\nu_{\text{max}}$  540  $\text{см}^{-1}$ , для ДИТ –  $\nu_{\text{max}}$  514  $\text{см}^{-1}$  и 555  $\text{см}^{-1}$ ), доказывающие наличие молекул йода согласно литературным данным (Казицина, 1979).

В ПМР-спектре (ДМСО- $d_6$ ) г-иСК в зоне 6-9 м.д. обнаружены синглеты (6,61, 7,54-7,49, 8,11 м.д.), характеризующие 1,2,5- замещение бензольного кольца; сигналы 7,33 и 8,24 м.д. (NH-NH<sub>2</sub>), 12,77 м.д. (ОН фенольный). В смеси изомеров г-диСК в ПМР-спектре пока идентифицирован гидразид 3,5-дийодсалициловой кислоты.

Качественные реакции на функциональные группы синтезированных пСК и пФФ также подтверждают их строение. Так, с 1% раствором хлорида железа (III) пСК и пФФ дают фиолетовое окрашивание, что говорит о присутствии в молекуле веществ фенольного гидроксила. С реактивом Инмана-Динтзиса (2,4,6,-тринитробензилсульфонат натрия, ТНБС) реагируют только гидразидопроизводные СК и ФФ, окрашивая раствор в красно-вишневый цвет. При сжигании йод-пСК и г-тиФФ выделялись фиолетовые пары йода, которые растворялись в хлороформе и обесцвечивались раствором тиосульфата натрия (ГФ X).

Таким образом, структура синтезированных лигандов подтверждается данными химических и спектральных (УФ, ИК и ПМР) исследований.

## **2. Синтез адсорбентов аффинного типа с иммобилизованными оригинальными лигандами**

Из известных двух основных способов введения эпокси групп на поверхность агарозных гелей (активация 1- хлор- 2,3- эпоксипропаном (эпихлоргидрин, ЭХГ) по методу R. Axen (1974); диглицидиловым эфиром 1,4-бутандиола по методу L. Sandberg и J. Porath (19)) нами в работе использовался модифицированный П.В. Кузнецовым и соавт. (1993, 2003) метод R. Axen с добавлением в реакционную смесь органического растворителя ДМСО и солей тетраалкиламмония в качестве межфазного катализатора. Разработанные нами 2 режима эпоксиактивации на основе

бисглицидилового эфира 1,2-этиленгликоля, БГЭЭГ (БЭП-ААфТ) и ЭХГ (ЭХГ-ААфТ) позволяют получать стабильные эпокси-ААфТ с концентрацией концевых эпокси групп 4-11 мкМ/мл (режим №1) и 17-28 мкМ/мл (режим №2) упакованного геля. Цикломодифицированные бисэпокси-эпихлоргидринактивированные адсорбенты (Б/ЭХГ-ААфТ) содержали 28-30 мкМ/мл упакованного геля активных эпокси групп. Специально подчеркнём, что осуществлённый вариант дополнительной перешивки эпихлоргидрином на стадии БГЭЭГ-активации предложен нами впервые (Кузнецов, Поленок 1999, 2002).

Синтез эпоксиактивированных ААфТ представлен на рис.1. В результате были получены 3 типа эпокси-ААфТ: I-тип – ЭХГ-ААфТ, II-тип – БЭП-ААфТ, III-тип – Б/ЭХГ-ААфТ (рис.3). ААфТ I типа содержали короткий спейсер в 3 атома, II типа – длинный спейсер в 10 атомов. ААфТ III типа отличался от двух других наличием циклической структуры, полученной в результате взаимодействия ЭХГ с раскрывшимися ОН-группами бисэпоксиактивированного ААфТ.

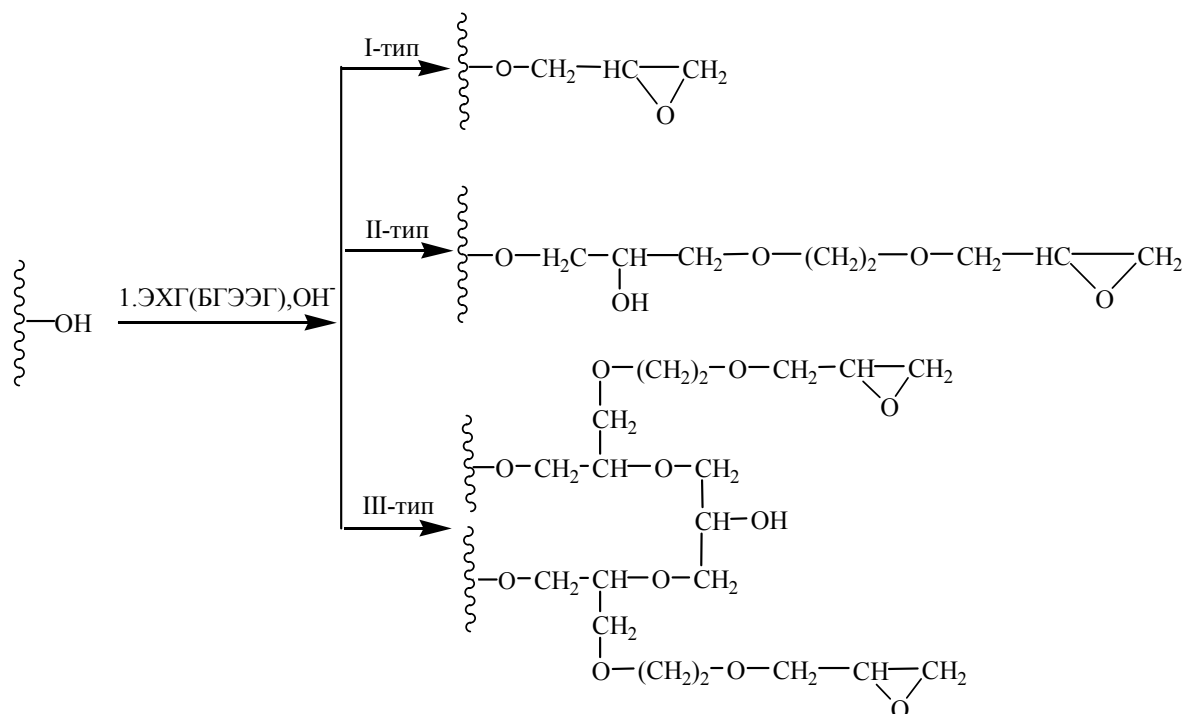
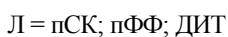
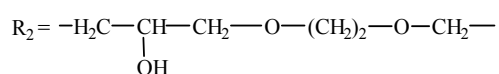
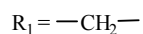
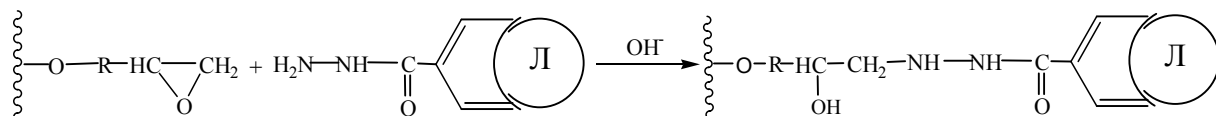


Рис.1. Схема эпоксиактивации адсорбентов аффинного типа

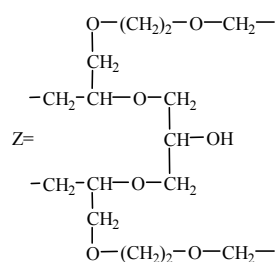
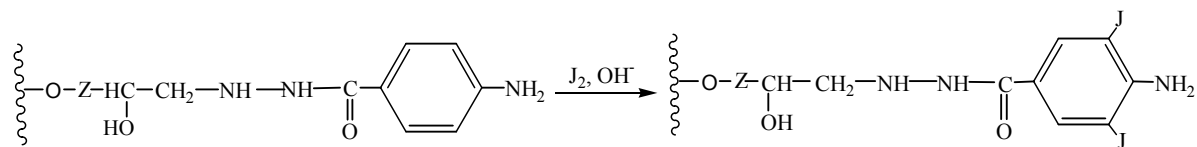
Концентрацию активных концевых эпоксигрупп определяли фенолфталеиновой пробой (Кузнецов, 2002), основанной на реакции оксиранов с тиосульфатом натрия с последующей косвенной ацидометрией.

Иммобилизацию синтезированных лигандов осуществляли по амино- или гидразидогруппе при pH 9-10 на все типы эпокси-ААфТ по схеме:



Качественные реакции на функциональные группы эпокси-ААфТ также совпадают с таковыми свободных лигандов. Так, эпоксигели с иммобилизованными гидразидами пСК с 1% раствором хлорида железа (III) дают светлофиолетовое окрашивание, ААфТ с иммобилизованным г-тиФФ реагируют с раствором 0,1 М NaOH, окрашиваясь в красно-синий цвет и обесцвечиваются в 0,1 М растворе HCl (индикаторный эффект).

Особо отметим синтез Б/ЭХГ-ААфТ с иммобилизованным г-диПАБК. В отличие от салицилатных и фталеиновых лигандов йодпроизводное ПАБК было получено путём иодирования геля с иммобилизованным г-ПАБК по схеме:



Подобное матричное иодирование лигандов известно в литературе (Arnostova, 2001), где авторы получали дийодпроизводное тирозина, иммобилизованное на дивинилсульфонактивированную агарозу.

Всего было синтезировано 25 эпокси-ААфТ с тремя типами вставок (3 атома, 10 атомов и цикломодифицированные) и семью типами лигандов.

### 3. Влияние типа активации на эффективность аффинной очистки белков.

Проведённый нами хроматографический скрининг синтезированных эпокси-ААфТ выявил следующие закономерности: увеличение расстояния между матрицей и лигандом от 3 атомов (ЭХГ-ААфТ) до 10 (БЭП-ААфТ) ведет к существенному снижению количества сорбируемого белка и, вероятно, снижению степени неспецифической сорбции на ААфТ, что видно из таблицы 2.

Таблица 2

Характеристика эпоксиактивированных агарозных гелей

Тип лиганда	Концентрация лиганда, мкМ/мл*			Ёмкость ААфТ по белку, мг/мл		
	ЭХГ-ААфТ	БЭП-ААфТ	Б/ЭХГ-ААфТ	ЭХГ-ААфТ	БЭП-ААфТ	Б/ЭХГ-ААфТ
1. г-СК	6	8	6	0,05	0,09	0,09
2. г-иСК	7	7	8	0,16	0,16	0,18
3. г-диСК	6	6	6	0,61	0,23	0,14
4. T <sub>4</sub>	11	8	-----	0,18	0,20	-----
5. ДИТ	13	12	11	0,23	0,23	0,06
6. г-тиФФ	6	6	6	0,52	0,42	0,06

\*Концентрация лиганда округлена до целых чисел

Эта закономерность особенно прослеживается в случае ААфТ с иммобилизованными дийодпроизводным г-СК и тетраидпроизводным г-ФФ. При одинаковой концентрации лиганда ЭХГ-активированный ААфТ с г-диСК адсорбирует больше белка по сравнению с БЭП-аналогом и цикломодифицированным ААфТ в 2,7 и 4,4 раза соответственно. Для ААфТ с иммобилизованным г-тиФФ характерны несколько иные хроматографические свойства. Сорбция ЭХГ- и БЭП- активированных

ААфТ отличается незначительно, однако цикломодифицированный Б/ЭХГ-ААфТ адсорбировал меньше белка в отличие от БЭП- и ЭХГ-ААфТ в 7 и 8 раз соответственно (табл.2). На сорбционные свойства ААфТ с иммобилизованным классическим лигандом Т<sub>4</sub> и ДИТ тип активации не влиял (табл.2). Только цикло-ААфТ с ДИТ адсорбировал в 3 раза меньше белка по сравнению с ЭХГ- и БЭП-аналогами. Такие же хроматографические свойства показали и ААфТ с иммобилизованными г-СК и г-диСК (табл.2).

Совершенно иная картина наблюдается при повышенной концентрации лиганда - более 20 мкМ/мл упакованного геля. БЭП-активированные ААфТ адсорбируют значительно меньше белка в отличие от ЭХГ-аналогов (табл.3).

Таблица 3

## Характеристика среднеёмких эпоксиактивированных ААфТ

Тип лиганда	Концентрация лиганда, мкМ/мл		Ёмкость ААфТ по белку, мг/мл	
	ЭХГ-ААфТ	БЭП-ААфТ	ЭХГ-ААфТ	БЭП-ААфТ
1. г-СК	24	24	0,51	0,32
2. г-иСК	24	24	0,23	0,23
3. г-диСК	24	24	5,7	0,92
4. г-тиФФ	24	24	3,4	0,88

Цикломодифицированные ААфТ при разбросе в концентрации иммобилизованного лиганда в 6-18 мкМ/мл упакованного геля сорбировали меньше белка в отличие от нециклических ААфТ (табл.2). Максимальная концентрация адсорбированного белка на Б/ЭХГ-ААфТ составила всего 0,20 мг/мл упакованного геля.

Таким образом, БЭП-активированные ААфТ обладают более высокой селективностью в отличие от ЭХГ-аналогов при аффинном выделении ТСБ. Цикломодифицированные Б/ЭХГ-адсорбенты также проявили высокие адсорбционные свойства по сравнению с ЭХГ-активированными аналогами.

#### 4. Влияние структуры лиганда на селективность адсорбентов аффинного типа

Известно, что концентрация лиганда как правило оказывает существенное влияние на сорбционные свойства ААфТ (Кузнецов, 2002). В данной работе использовались 2 группы адсорбентов: низкоёмкие (концентрация лиганда менее 10 мкМ/мл геля) и среднеёмкие (концентрация лиганда более 17 мкМ/ мл геля).

Как и предполагалось, концентрация лиганда существенно влияла на адсорбционные параметры эпокси-ААфТ (табл.4, 5). Низкоёмкие БЭП-активированные ААфТ с иммобилизованными пСК и пФФ адсорбируют в 2-3 раза меньше белка по сравнению со среднеёмкими. Низкоёмкие БЭП-ААфТ с иммобилизованными ДИТ и г-тиФФ (при разнице в концентрации иммобилизованного лиганда в 3-4 раза) адсорбируют всего в 1,3-2 раза меньше белка (табл. 4).

Таблица 4

Характеристика БЭП-активированных адсорбентов аффинного типа.

Тип лиганда	Концентрация лиганда, мкМ/мл		Ёмкость ААфТ по белку, мг/мл	
	низкоёмкие	среднеёмкие	низкоёмкие	среднеёмкие
1. г-СК	4	17	0,13	0,23
2. г-иСК	7	---	0,16	---
3. г-диСК	6	17	0,23	0,65
4. г-тиФФ	4	17	0,28	0,62
5. Т <sub>4</sub>	8	---	0,20	---
6. ДИТ	4	12	0,18	0,23

Иная закономерность прослеживается у ЭХГ-активированных ААфТ. Низкоёмкие ЭХГ-ААфТ адсорбируют в 6-10 раз меньше белка в отличие от среднеёмких (табл. 5). При снижении концентрации лиганда в 4 раза ЭХГ-ААфТ с иммобилизованными г-диСК и г-тиФФ адсорбировали в 9 и 6 раз соответственно меньше белка.

Количество сорбируемого белка варьирует и в зависимости от типа лиганда (табл. 5). Так, ААфТ с иммобилизованным г-иСК адсорбирует

значительно меньше белка по сравнению с ААфТ с г-диСК и г-СК независимо от типа активации агарозы (табл.5). В целом, для ААфТ с дийод-пСК наблюдается тенденция к резкому увеличению сорбции белка особенно для ЭХГ-активированных ААфТ (табл. 5).

Таблица 5

Характеристика ЭХГ-активированных адсорбентов аффинного типа.

Тип лиганда	Концентрация лиганда, мкМ/мл		Ёмкость ААфТ по белку, мг/мл	
	низкоёмкие	среднеёмкие	низкоёмкие	среднеёмкие
1. г-СК	6	24	0,05	0,51
2. г-иСК	7	11	0,16	0,15
3. г-диСК	6	24	0,61	5,7
4. г-тиФФ	6	24	0,52	3,4
5. Т <sub>4</sub>	11	---	0,18	---
6. ДИТ	13	---	0,23	---

Достаточно высокие селективные свойства проявил синтезированный нами Б/ЭХГ-ААфТ с иммобилизованным г-диПАБК, который является изостером дийодтирозина – ёмкость по белку этого сорбента всего 0,20 мг/мл упакованного геля, примерно такая же как у синтезированного нами ААфТ с ДИТ и классического ААфТ с Т<sub>4</sub> (Свиридов, 1990). Подчеркнём, что ДИТ, используемый нами в синтезах эпокси-ААфТ, успешно применяется как лиганд в аффинной очистке фермента пепсина (Arnostova, 2001).

В итоге, среди синтезированных ААфТ с различными типами лигандов наиболее высокую селективность показали ААфТ с иммобилизованными г-иСК, ДИТ и г-диПАБК независимо от типа активации носителя. Они не уступают классическому ААфТ с иммобилизованным тироксином и способны заменить в синтезе эпокси-ААфТ дорогостоящий, дефицитный лиганд Т<sub>4</sub>.

## 5. Влияние типа элюента на спектр белковых фракций

В работе были использованы 5 различных элюентов: 0,1 М раствор глицин-HCl (pH 2,5), 8 М раствор мочевины (pH 7-8), 1мМ раствор NaOH (pH 11), 3 М раствор MgCl<sub>2</sub> (pH 6-7), 1% раствор додецилсульфата натрия (ДСН, pH 3-4). Самым эффективным элюентом оказался 1% раствор ДСН, элюирующий 100% адсорбированного белка. Элюция белков 1% раствором ДСН нами принята за 100% согласно литературным данным (Скоупс, 1985; Свиридов, 1990).

0,1 М раствор глицина, активно используемый для аффинной элюции иммуноглобулинов с ААфТ с иммобилизованным белком А, в нашем эксперименте показал отрицательный результат. Хаотропные реагенты (8 М раствор мочевины, 3 М раствор MgCl<sub>2</sub>) в среднем элюировали 60-85% общего белка (рис.2). Причём 8 М раствор мочевины эффективнее десорбировал белки с ЭХГ-активированных ААфТ в отличие от БЭП- и Б/ЭХГ-аналогов.

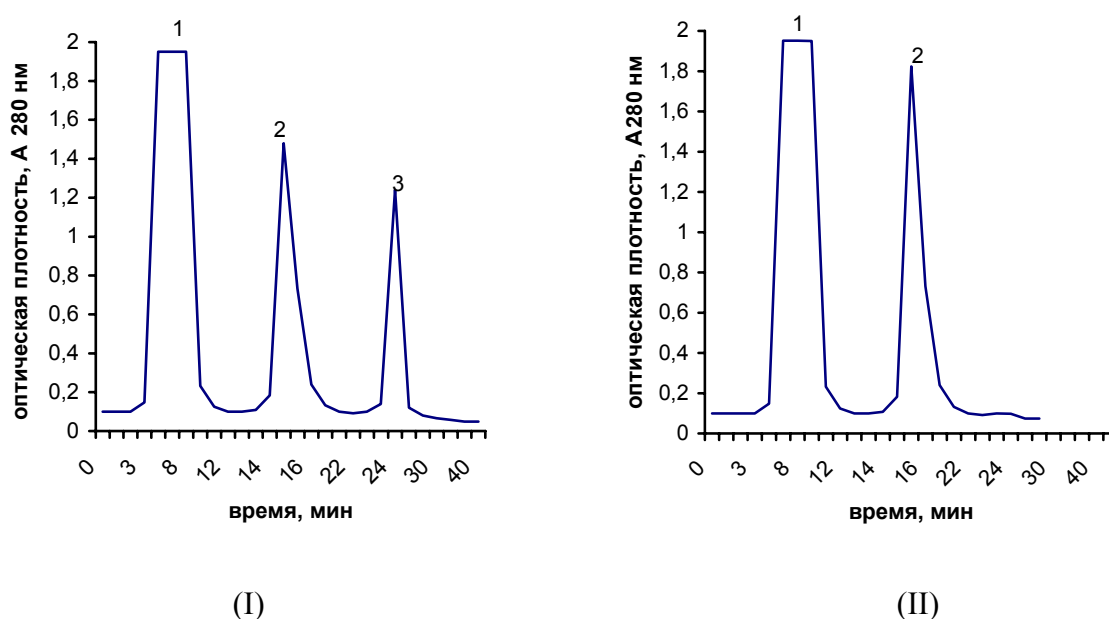


Рис. 2. Хроматограммы элюции белков с ЭХГ-г-иСК ((I) - 1- несорбированные белки, 2- элюция белков 8М мочевиной, 3- элюция белков 1% ДСН; (II) – 1 – несорбированные белки, 2- элюция белков 1% ДСН)



С Б/ЭХГ-активированных ААфТ с иммобилизованными ДИТ и г-СК растворы мочевины и хлорида магния малоэффективно десорбировали белки – менее 40% от общего количества белка. В целом, хаотропные элюенты (8М мочевины, 3М  $MgCl_3$ ) достаточно хорошо десорбировали белки с ААфТ с иммобилизованными моно- и дийодпроизводными СК независимо от типа активации носителя. Щелочной элюент (1мМ NaOH) наиболее эффективно десорбировал белки с ЭХГ- и БЭП-активированных ААфТ с г-диСК. Подобные результаты получены на ААфТ с иммобилизованным г-тиФФ.

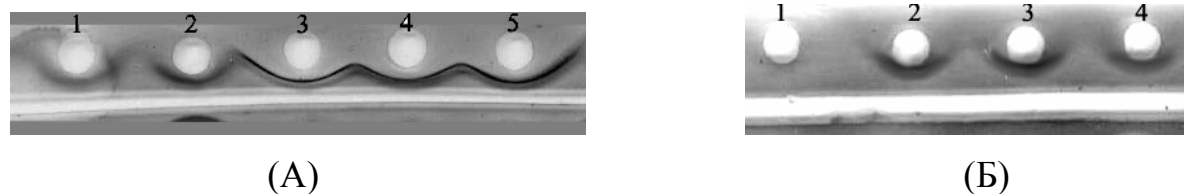
Таким образом, исходя из полученных экспериментальных данных, предпочтительно использование в качестве элюента 1% раствора ДСН в случае, когда денатурация белков не имеет принципиального значения. 1мМ раствор NaOH и 8 М раствор мочевины можно успешно применять для десорбции белков с ЭХГ- и БЭП-активированных ААфТ независимо от типа иммобилизованного лиганда.

#### **6. Идентификация белковых фракций, элюированных с синтезированных адсорбентов аффинного типа**

Для идентификации белков в выделенных образцах были использованы метод Оухтерлони и Грабар-Уильямс. Двойную радиальную диффузию проводили по описанной в работе (Фримель, 1987) методике. Последний метод использовался нами и для определения в белковых фракциях иммуноглобулинов разных классов – А, G, М.

Как показали экспериментальные данные все синтезированные нами эпокси-ААфТ адсорбируют IgG (рис.3(А)) - независимо от концентрации иммобилизованного лиганда. Эпокси-ААфТ с иммобилизованным г-диСК (ЭХГ- и БЭП-тип) и г-тиФФ (только ЭХГ-тип) помимо IgG адсорбируют ещё и иммуноглобулины класса А и М (рис.3(Б)). Эти данные были подтверждены и проведенным иммуноэлектрофорезом с сывороткой против всех сывороточных белков. Помимо иммуноглобулинов нами был выявлен альбумин. ААфТ с иммобилизованным классическим лигандом  $T_4$

и его аналогом ДИТ в нашем эксперименте из семейства иммуноглобулинов адсорбировали только IgG. Такой же результат был получен и на ААфТ с иммобилизованным моноидпроизводным СК.



*Рис.3. Иммунодиффузия в геле по Оухтерлони белковых фракций, выделенных с эпокси-ААфТ (в лунках белки с (А): 1- Б/ЭХГ- $\gamma$ -диПАБК, 2- БЭП- $\gamma$ СК, 3- БЭП- $\gamma$ -иСК, 4- БЭП- $T_4$ , 5- Б/ЭХГ-ДИТ, (Б): 1- Б/ЭХГ- $\gamma$ -диСК, 2 – БЭП- $\gamma$ -диСК, 3 – ЭХГ- $\gamma$ -диСК, 4 – ЭХГ- $\gamma$ -тиФФ; в канавке – (А): сыворотка против IgG, (Б): сыворотка против IgA)*

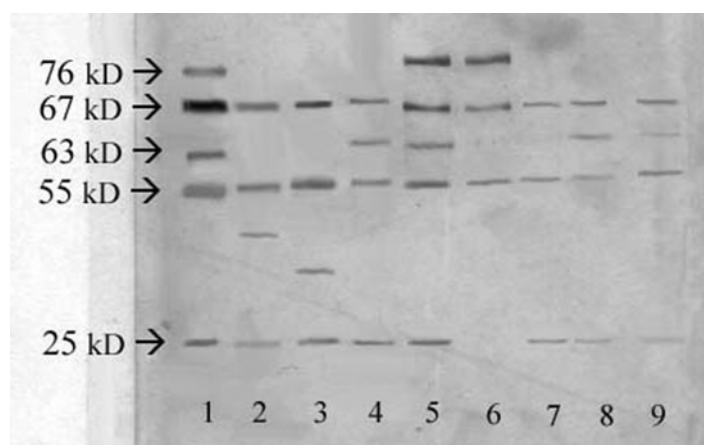
Иммунохемилюминисцентным методом во всех белковых фракциях был количественно определен основной тироксинсвязывающий белок ТСГ. Эпокси-ААфТ с иммобилизованными моно- и дийодпроизводными СК адсорбируют больше ТСГ в отличие от других сорбентов, в том числе и от классических. Так, концентрация ТСГ в белковых фракциях, выделенных с ААфТ с  $\gamma$ -иСК, составила 5-6 мг/л в отличие от классического ААфТ с  $T_4$  (3,5 мг/л).

Таким образом, иммунологическими методами было доказано присутствие во всех белковых фракциях, выделенных с синтезированных нами эпокси-ААфТ, преимущественно иммуноглобулина класса G. Только ААфТ с  $\gamma$ -диСК и  $\gamma$ -тиФФ адсорбировали ещё и иммуноглобулины класса А и М. Иммунохемилюминисцентным методом показано, что ААфТ с  $\gamma$ -иСК адсорбируют 1,5 раза больше основного тироксинсвязывающего белка ТСГ в отличие от других типов адсорбентов.

Данные электрофореза в градиентном 4-15% растворе ПААГ с додецилсульфатом натрия (ДСН) показали, что во всех белковых фракциях, выделенных с различных типов эпокси-ААфТ, присутствуют белки с молекулярной массой 67 kD, 55 kD и 25 kD. Результаты иммуно-

электрофореза показал, что эти молекулярные массы соответствуют белкам - альбумину (компонент 67 kD), иммуноглобулину G (55 kD и 25 kD – тяжёлые и лёгкие цепи), тироксинсвязывающему глобулину (компонент 55 kD).

Тип активации ААфТ влияет не только на общее количество сорбируемого белка, но и на белковый состав фракций, выделенных с ААфТ. Так, в белковом элюате с ЭХГ-ААфТ с г-диСК обнаруживается 6 белковых полос в отличие от его БЭП- и Б/ЭХГ-активированных аналогов (5 и 4 полос соответственно) (рис. 4).

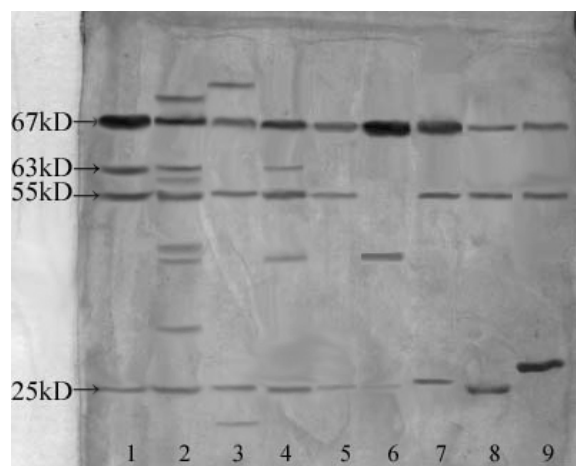


*Рис.4. Электрофорез в денатурирующих условиях белков, выделенных с БЭП-активированных ААфТ (1- маркёры, 2- БЭП-г-иСК, 3- Б/ЭХГ-г-диПАБК, 4- Б/ЭХГ-ДИТ, 5- БЭП-г-диСК, 6- Б/ЭХГ-г-диСК, 7- Б/ЭХГ-г-иСК, 8- Б/ЭХГ-г-СК, 9- БЭП-г-СК)*

Полученные данные позволяют говорить о более высокой селективности Б/ЭХГ-активированных ААфТ по сравнению с ЭХГ- и БЭП-аналогами. Интересно, что только на ААфТ с г-диСК и г-тиФФ помимо IgG адсорбируются ещё IgA (компонент 63 kD) и IgM (компонент 76 kD).

В элюате с ЭХГ-активированных ААфТ с г-тиФФ определяется около 9 белковых зон (рис.5), а в элюате с БЭП-аналога – всего 4-5 белковых зон, что подтверждает более высокие селективные свойства БЭП-активированных ААфТ (данные получены на среднеёмких эпокси-ААфТ с концентрацией иммобилизованного г-тиФФ 17-24 мкМ/мл геля).

Совершенно иная картина прослеживается на низкоёмких ААфТ с г-тиФФ (концентрация лиганда 6 мкМ/мл геля). ЭХГ- и БЭП-ААфТ с тетраiodпроизводным ФФ лишь незначительно отличаются по белковому спектру. Однако элюат с БЭП-аналога содержит меньше белковых полос (только 2-3) по сравнению с ЭХГ-ААфТ (рис.5).



*Рис.5. Электрофорез в денатурирующих условиях белков, выделенных с эпокси-ААфТ (1-маркеры, 2- ЭХГ-г-тиФФ, 3- БЭП-г-тиФФ, 4- ЭХГ\*-г-тиФФ, 5- ЭХГ-ДИТ, 6- БЭП\*-г-тиФФ, 7- БЭП-ДИТ, 8- ЭХГ-T<sub>4</sub>, 9- БЭП-T<sub>4</sub>)*

Интересно, что в отличие от среднеёмких ААфТ низкоёмкие адсорбенты с г-тиФФ независимо от типа активации не сорбируют IgM (компонент 76 kD) и IgA (компонент 63 kD). Кроме перечисленных белков синтезированные эпокси-ААфТ с г-диСК и г-тиФФ адсорбируют дополнительно неидентифицированные белки с молекулярной массой 43 kD и 33 kD (рис.4, 5).

Высокую селективность показали ААфТ с иммобилизованными гидразидом 5-йодсалициловой кислоты и дийодтирозином независимо от типа активации носителя. Эпокси-ААфТ этих типов адсорбировали только 3 белка (альбумин, IgG, ТСГ), как и ААфТ с классическим лигандом T<sub>4</sub> (рис.4, 5). Подчеркнём, что оригинальный Б/ЭХГ-ААфТ с иммобилизованным гидразидом 3,5-дийод-4-аминобензойной кислоты (структурным

аналогом дийодтирозина) также адсорбировал только три вышеназванных белка (рис.4).

Таким образом, электрофорез в денатурирующих условиях показал, что синтезированные нами эпокси-ААфТ с иммобилизованными гидразидами 5-йодсалициловой и 3,5-дийод-4-аминобензойной кислот, дийодтирозином обладают высокими селективными свойствами и адсорбируют те же белки, что и ААфТ с классическим лигандом Т<sub>4</sub>. Эпокси-ААфТ с гидразидами 3,5-дийодсалициловой кислоты и тетраидфенолфталеина оказались менее селективными при адсорбции белков. Тем не менее, они могут использоваться как групповые адсорбенты для аффинного выделения и очистки сывороточных белков, а также иммуноглобулинов различных классов.

## **ВЫВОДЫ**

1. Впервые синтезированы и апробированы в качестве оригинальных лигандов аффинных адсорбентов йодпроизводные лекарственных веществ (салициловой и п-аминобензойной кислот, фенолфталеина) для аффинной хроматографии тироксинсвязывающих белков. Структура целевых продуктов охарактеризована комплексом химических и спектральных методов (УФ, ИК, ПМР и др.).

2. Разработана эффективная методика эпоксиактивации полимерных носителей с использованием межфазных катализаторов (соли тетраалкиламмония) и мягких условий активации (комнатная температура, рН 9-10), позволяющая синтезировать адсорбенты аффинного типа за 4-6 часов.

3. Впервые получены цикломодифицированные эпихлоргидрином бисэпоксиактивированные аффинные адсорбенты, показавшие высокую селективность в адсорбции белков сыворотки крови.

4. Среди оригинальных йодсодержащих лигандов на основе хроматографического скрининга выявлены наиболее предпочтительные для аффинной очистки белков. Это аффинные адсорбенты с иммобилизованными гидразидом 5-йодсалициловой кислоты и 3,5-дийодтирозином. Они показали наибольшую эффективность в

исследовании тироксинсвязывающих белков независимо от типа активации носителя. Эти эпоксиадсорбенты по хроматографическим характеристикам не уступают классическому адсорбенту с иммобилизованным T<sub>4</sub>. Перспективным является использование в качестве лиганда гидразида 3,5-дидод-4-аминобензойной кислоты.

5. Установлено, что адсорбенты аффинного типа, активированные с помощью бисглицидилового эфира 1,2 – этиленгликоля (особенно с указанными выше лигандами), проявляют в изученных условиях наиболее селективные свойства в адсорбции белков в отличие от их эпихлоргидринактивированных аналогов и весьма перспективны в очистке сывороточных белков крови методом аффинной хроматографии. Найдено, что оптимальными элюентами являются додецилсульфат натрия (100%-я элюция белков) и 8М раствор мочевины (60-80%-я элюция белков).

6. Белковые фракции, выделенные с эпоксиадсорбентов, качественно охарактеризованы комплексом основных биохимических методов (электрофорез, иммуноэлектрофорез и др.). Установлено, что среди идентифицированных белков основными являются альбумин, иммуноглобулин G и тироксинсвязывающий глобулин. В ряде случаев (адсорбенты с иммобилизованными гидрамидами 3,5-дидодсалициловой кислоты и тетраидофенолфталеина) идентифицированы иммуноглобулины А и М.

### **Внедрение в практику**

Результаты исследований внедрены в учебный процесс на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Кемеровской государственной медицинской академии в элективный курс «Хроматографические методы исследования лекарственных средств», а также в научно-исследовательскую работу кафедры по теме: «Эпоксиактивация полисахаридных носителей - синтез нециклических и цикломодифицированных адсорбентов». Разработанные в диссертации

методики эпоксиактивации внедрены также в практику Отдела иммунологии рака КемНЦ СО РАН для синтеза аффинных адсорбентов, на которых выделяются антитела. Эта методика упрощает процесс синтеза и сокращает время, необходимое для получения адсорбентов.

Основные результаты исследований опубликованы в следующих работах:

1. Кузнецов, П.В. К проблеме выделения и очистки тироксин-связывающих белков на адсорбентах аффинного типа / П.В. Кузнецов, Е.Г. Поленок // Проблемы медицины и биологии: Материалы научной конференции. – Кемерово, 1997. - С. 62.

2. Кузнецов, П.В. О надежности способа эпоксиактивации полимерных носителей бисэпоксидом этиленгликоля в синтезах адсорбентов аффинного типа / П.В. Кузнецов, Е.Г. Поленок, Е.В. Энгельман // Проблемы медицины и биологии: Материалы международной конф. - Кемерово, 1998. - С. 283.

3. Поленок, Е.Г. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XIV. Аффинная хроматография белков сыворотки крови человека на новых эпоксиадсорбентах / Е.Г. Поленок, П.В. Кузнецов, С.Ф. Зинчук // Фундаментал. и медико-социал. проблемы НИР в медицине: Труды науч. конф. – Новокузнецк, 1998. - С. 83-86.

4. Кузнецов, П.В. Первичный скрининг новых аффинных адсорбентов по сывороточным белкам / П.В. Кузнецов, Е.Г. Поленок, С.Ф. Зинчук // Актуал. проблемы эндокринологии: Материалы науч. конф. - Кемерово, 1999. - С. 42-43.

5. Кузнецов, П.В. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XIII. К проблеме синтеза адсорбентов на основе бисэпоксида этиленгликоля / П.В. Кузнецов, Е.Г. Поленок, С.Ф. Зинчук, Е.В. Энгельман // Вестник РАЕН (ЗСО). - 1999. - Вып.2. - С. 60-62.

6. Кузнецов, П.В. Синтез адсорбентов аффинного типа нового поколения на основе диглицидилового эфира 1,2-этандиола / П.В. Кузнецов, Е.Г. Поленок, Л.С. Теслов и др. // Фармация в XXI веке. Инновации и традиции: Тезисы докладов междунар. науч. конф. - СПб, 1999. - С. 24-25.

7. Кузнецов, П.В. Реагент Хуберта в синтезах эпоксиадоадсорбентов для аффинной хроматографии / П.В. Кузнецов, Е.В. Энгельман, Е.Г. Поленок и др. // Поиск, разработка и внедрение новых лек. средств и организационных форм фарм. деятельности: Материалы междунар. конф. – Томск, 2000. - С. 95-96.

8. Поленок, Е.Г. Оригинальные аффинные адсорбенты с иммобилизованными салицилатными лигандами для аффинной хроматографии тироксинсвязывающих белков / Е.Г. Поленок // Молодые учёные Кузбассу. Взгляд в XXI век: Труды областной науч. конф. – Кемерово, 2001. - С. 146-151.

9. Поленок, Е.Г. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XVIII. О перспективах конструирования адсорбентов с йодсодержащими салицилатными и п-аминобензоатными лигандами для аффинной хроматографии белков сыворотки крови человека / Е.Г. Поленок, П.В. Кузнецов // Вестник РАЕН (ЗСО). - 2002. - Вып. 5. - С. 98-104.

10. Эпоксиактивированные адсорбенты в исследовании физиологически активных веществ / П.В. Кузнецов, А.С. Сухих, Л.С. Теслов, Е.Г. Поленок, Е.В. Энгельман // Тезисы XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. – Казань, 2003. – Т. 3. - С. 231.