

УДК 612.63:618.2-083

ПОЛУЧЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ ОТХОДОВ ГАММА-ГЛОБУЛИНОВОГО ПРОИЗВОДСТВА

*Дивоча В.А., Адамовская В.Г., Кобрин Т.М., Лагода О.В., Руссу А.В.,
Михальчук В.Н.*

Украинский НИИ медицины транспорта, г. Одесса

Агропромышленный селекционно-генетический институт НААНУ, г. Одесса

Целью исследований было выделение и очистка ингибиторов трипсиноподобных протеиназ из промышленных отходов получения гамма-глобулина из донорской крови человека.

В работе использовали отходы I-й стадии получения гамма-глобулина из донорской крови человека и биохимические методы исследования.

В результате исследований разработаны новая методика выделения и очистки ингибитора трипсиноподобных протеиназ с использованием гель-фильтрации на сефадексе и аффинной хроматографии на трипсин-сефарозе 4В. Использование для аффинной хроматографии на сефарозе 4В трипсина в качестве лиганда позволило очистить ингибитор трипсиноподобных протеиназ от 157,47 до 282,95 раз по сравнению с исходным белком. Из отходов материала через 24 часа (I-й стадия) получения гамма-глобулина установлена активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ во втором белковом пике (фракции № 48-58), которые элюировались 0,1 М СН₃СООН (рН 3,1) с максимальной активностью ингибитора во фракции № 49 (88,6 ± 8,3 мг/мл в 1 мин.) с процентом выхода 24,89%.

Ключевые слова: трипсиноподобная протеиназа, препараты из крови человека, очистка препаратов, получение ингибитора, грипп.

Введение

Пандемии гриппа уносят огромное число человеческих жизней и наносят огромный ущерб экономике в связи с не выходом на работу по болезни или по уходу за больными детьми. Причем, поскольку, в основном заболевает трудоспособная часть населения, то это сопровождается значительными экономическими потерями [1, 2].

На лечение гриппа и его осложнений ежегодно в мире расходуется более 14,6 млрд. долларов США. Так, в Украине убыток от каждого случая гриппа в среднем составляет 800-1200 гривен. С учетом того, что в 2009-2010 гг. ВОЗ объявила о пандемии гриппа в Украине

заболело гриппом и ОРВИ около 6,5 млн. человек и умерло 1128 человек, то экономические убытки страны составили более 5 млрд. гривен (Резолюция Всеукраинского конгресса «Грипп в Украине: итоги и программа дальнейших действий» от 3 марта 2010 г.).

В связи с этим к наиболее актуальным проблемам здравоохранения Украины следует отнести организацию и постоянное совершенствование мероприятий по профилактике и лечению гриппа [3].

Вакцинам в настоящее время принадлежит ведущая роль в профилактике и лечении гриппа. Несмотря на большое количество данных, подтверждающих

эффективность современных гриппозных вакцин, в последние годы многие больные, относящиеся к группам повышенного риска, остаются неохваченными ежегодной вакцинацией, вопреки рекомендациям специалистов. Недостаточно широкое применение вакцинации объясняется, в частности, сомнениями относительно безопасности вакцин [4].

В период с 1980 по 1994 гг. в США, Испании, Италии, Франции, Великобритании, Бельгии и Нидерландах было применено 625 млн. доз гриппозных вакцин. Только в 1998 г. в США и Европе было применено 125 млн. доз вакцин [5].

В СМИ высказывалось мнение, что «...ВОЗ умышленно ослабила критерии объявления пандемии, чтобы помочь фармацевтическим компаниям продать больше доз вакцин против штамма вируса гриппа А (H1N1) подороже, а производители противогриппозных препаратов и вакцин осуществляли давление на ВОЗ и заставили ее объявить «свиной грипп» пандемией...»

К трудностям обеспечения населения своевременной вакцинацией относится и быстрая постоянная изменчивость вируса гриппа, что в ряде случаев приводит к тому, что разработка и апробация новых вакцин отстает от динамики инфекционного процесса [6, 7].

В связи с этим, для профилактики гриппа на сегодняшний день кроме вакцин представлен широкий выбор лекарственных средств: Антигриппин I, II, III; Амантадин, Ремантадин, Арбидол, Лаферон, Кагоцел, Ингаверин, Амиксин, Интерферон и другие, которые блокируют развитие вируса гриппа в организме человека [8].

В настоящее время используются два принципиально новых зарубежных препарата: Занамивир (Relenza) и Осельтамивир (Тамифлу) [9, 10].

Они являются ингибиторами нейраминидазы вируса гриппа, которые получены путем генной инженерии и кристаллографии.

Однако, вышеназванные препараты и противогриппозные вакцины могут вызвать побочные действия со стороны кровеносной и лимфатической системы (тромбоцитопению). Со стороны иммунной системы – аллергические реакции, в очень редких случаях – анафилактический шок. Со стороны нервной системы – частые головные боли и редко – парестезии, судороги, энцефаломиелит, неврит, синдром Гийена-Барре. Со стороны сосудистой системы – васкулит с транзиторным нарушением функции почек. К общим расстройствам относятся утомляемость и невралгия.

Наряду с разработкой новых высокоэффективных и безопасных вакцин, перспективным является поиск новых лекарственных средств, точками приложения которых могут быть механизмы взаимодействия и повреждения клеток организма человека вируса гриппа [11].

По нашему мнению, для успешной борьбы с вирусом гриппа необходим новый класс ингибиторов. Основой для создания таких препаратов могут стать работы отечественных ученых, которые, используя эффект расщепления гемагглютиниона вируса гриппа на две субъединицы (HA1, HA2) трипсиноподобными протеиназами клеток эпителия респираторного тракта, получили ингибитор трипсиноподобных протеиназ, который блокировал развитие гриппа у белых мышей, зараженных смертельной дозой вируса и 60 % животных оставались живы [12].

Необходимость решения важной государственной научно-прикладной проблемы обоснования и разработки биотехнологии получения противовирусного препарата для человека на основании использования «протеолитической теории» вируса гриппа обусловила следующие направления исследования, а именно: изучение взаимодействия ферментной системы клетки и вируса гриппа, наличия трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов в донорской крови человека и в отдельных фракциях плазмы

крови, наличия ингибиторов трипсиноподобных протеиназ и самих протеиназ в вакцинах и препаратах аптечной сети [13].

Исследование направлено на анализ полученных с крови человека ингибиторов протеиназ и трипсиноподобных протеиназ на всех этапах промышленного производства гамма глобулина.

Данная работа посвящена разработке нового противовирусного препарата для человека на основе использования «протеолитической теории» вируса гриппа.

Цель работы – выделение и очистка ингибиторов трипсиноподобных протеиназ из промышленных отходов получения гаммаглобулина из донорской крови человека.

Материалы и методы

В работе использовали хроматографические методы исследования.

Колоночную хроматографию белков проводили используя методы гель-хроматографии, ионообменной и аффинной хроматографии. Хроматографическое разделение белковых смесей проводили используя шкаф низких температур (Combicoldrac 11), перистальтический насос (Microperpex) и коллектор фракций FCC-60 (Чехословакия). Обработку сефадексов и ионнообменных смол осуществляли по стандартным методикам [14].

Гель-хроматографию проводили с применением сефадексов G-15 и G-100 (“Pharmacia”, Швеция) в 0,005 М Трис-НСl буфере рН 7,6. В случае гель-хроматографии на сефадексе G-100 размер колонки составлял 2,6 x 60,0 см, объем фракций – 5,0 мл, скорость 15 мл/час. В случае гель-фильтрации на сефадексе G-15 размер колонки составлял 1,6 x 90,0 см, объем фракций – 7,0 мл, скорость 15 мл/час. В обоих случаях на колонку было нанесено 15 мл ферментного раствора, содержащего 32,55 мг белка.

Аффинную хроматографию проводили на трипсин-сефарозе 4В. Трипсин ковалентно связывали с BrCN-сефарозой

4В по методу Е.В. Лушниковой и др. [15].

Содержание белка в исследуемых образцах тканей и в ферментных препаратах на этапах экстракции и препаративного выделения регистрировали колориметрическим методом W.J. Lowry [16].

Определение активности α_1 -анти-трипсина проводили по методу К.Н. Веремеенко [17] в модификации А.П. Левацкого [18]. Принцип метода основан на определении активности ингибитора по торможению реакции гидролиза казеина кристаллическим трипсином (“Спофа”, Чехословакия).

Электрофоретический анализ в нередуцирующих условиях проводили по Laemmli на пластинах 140 X 140 X 1 мм в кислой (аланин-уксусный буфер, рН 4,5) и щелочной (трис-глициновый буфер, рН 8,3) средах в однородном 10 %-ном вертикальном полиакриламидном геле (“Reanal”, Венгрия) при температуре + 25 °С в течение 4,5 часов [19]. Избыток красителя удаляли смесью 5 %-ного изопропилового спирта с 7,0 %-ной уксусной кислотой при комнатной температуре. Визуализацию белков проводили окраской гелей в растворе 0,25 %-ного раствора Кумасси голубого R-250 (“Serva”, Швеция), содержащего 45,0 %-ный этанол и 9,0 %-ную уксусную кислоту. Электрофореграммы получали сканированием влажных гелевых блоков.

Электрофоретический анализ в редуцирующих условиях проводили на пластинах 140 X 140 X 1 мм в щелочной (трис-глициновый буфер, рН 8,3) средах в однородном 15 %-ном вертикальном полиакриламидном геле с 0,1 %-ном ДДС-Na (“Reanal”, Венгрия) при температуре + 25 °С в течение 4,5 часов [20]. Окрашивание, удаление избытка красителя, визуализацию и сканирование электрофореграмм проводили как описано выше. В качестве маркеров молекулярных масс использовали белки („Serva” Швеция): фосфоорилазу В – 97 000 Да, бычий сывороточный альбумин 66 000

Да, овальбумин – 45 000 Да, карбоангидразу – 30 000 Да, ингибитор трипсина – 21 000 Да и α -лактальбумин – 14 400 Да.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятой схеме по программе “Microsoft® Excel”.

Результаты и их обсуждение

Анализ современных методов выделения ингибитора трипсиноподобных протеиназ показывает, что как правило, методики, разработанные для выделения ингибитора из одного вида организмов, не могут быть использованы для выделения его из другого организма. Очистка ингибиторов из тканей осложнена тем, что многие из них находятся в клетке в виде сложных комплексов с другими ферментами, белками или мембранами. Все это во многом предопределяет трудности получения их в очищенном виде и их аномальное поведение при хроматографических методах исследования.

В связи с этим нами была разработана оптимальная схема получения ингибитора трипсиноподобных протеиназ в очищенном виде, которая включала следующие этапы: экстракцию, диализ, гель-хроматографию и аффинную хромато-

рафию на трипсин-сефарозе 4 В.

Исследования были проведены с образцом I-ой стадии (24-часовой центрифугат № 1), полученный с областной станции переливания крови г. Одессы.

Одним из первых этапов выделения и очистки ингибиторов является их экстракция из анализируемого материала. В данной схеме для экстракции ингибитора из материала отходов различных стадий промышленного способа получения гаммаглобулина (в соотношении 1:2) был использован 0,1 М фосфатный буфер pH 7,5. Полученный экстракт центрифугировали при 7-8 тыс. об. в мин. на протяжении 60 мин. при +4 °С. Супернатант I замораживали при – 18 °С. К осадку добавляли 6,0 мл 1,0 % Тритон X-100, выдерживали в течение 12 часов при + 4 °С, подвергали озвучиванию при 22 кГц по 15 сек. 4 раза и повторно центрифугировали при 7-8 тыс. об. в мин. на протяжении 60 мин. при + 4 °С (супернатант II). Полученные супернатанты I и II объединяли, и использовали для определения: содержания белка по методу Лоури, активности трипсиноподобных протеиназ, активности ингибитора трипсиноподобных протеиназ и для проведения гель- и аф-

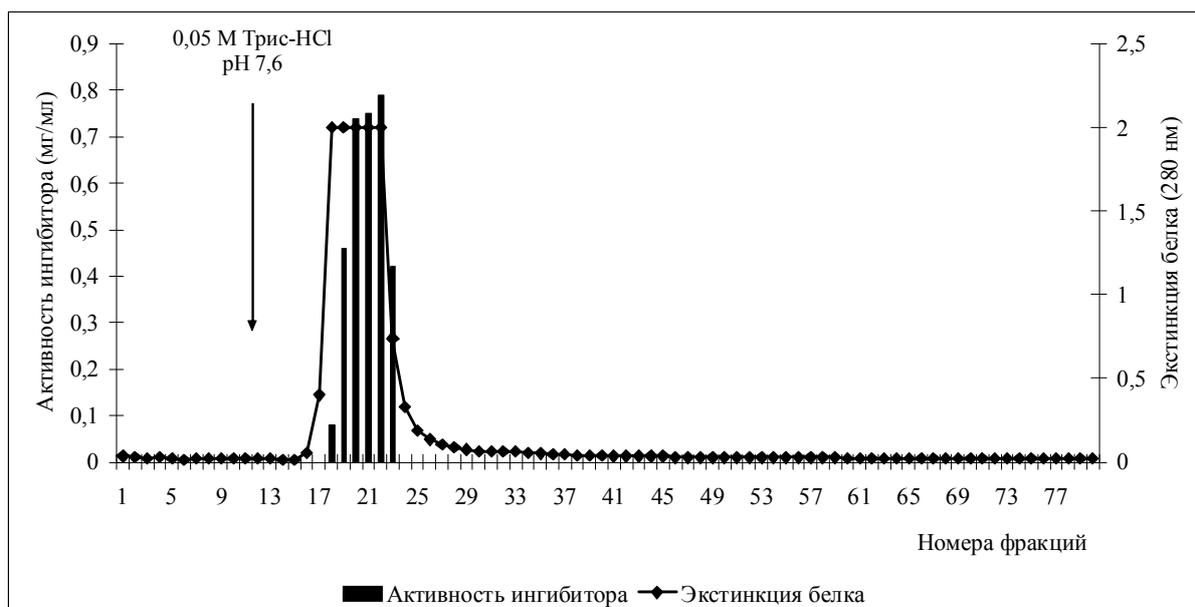


Рис. 1. Хроматографическое распределение активности ингибитора трипсиноподобных протеиназ и экстинкция белка во фракции отходов I-й стадии промышленного способа получения гамма-глобулина Сефадекс G-15 (1,8 x 90,0 см). Нанесено 69,36 мг белка; объем фракций 4,5 мл, скорость – 18,0 мл/час, элюирование 0,05 М Трис-НСl буфером (pH 7,6)

Таблица 1

Активность препарата ингибитора трипсиноподобных протеиназ, выделенного из отходов I стадии (центрифугат № 1) промышленного способа получения гамма-глобулина на этапах его выделения и очистки ($M \pm m$, $n = 5$)

Этап выделения	Объем, мл	Содержание белка, мг/мл сыворотки	Активность ингибитора		A-V	Процент выхода ингибитора по отношению к фракции		Коэффициент очистки ингибитора по отношению к фракции	
			A	УА		после диализа	после G-15	после диализа	после G-15
			Белковый раствор после диализа	64,0 ± 6,1		69,36 ± 6,81	15,10 ± 1,30	0,217 ± 0,02	996,40 ± 1,07
Гель-хроматография на G-15 (фракции 18-23)	27,0 ± 2,3	5,20 ± 0,47	13,40 ± 1,18	2,77 ± 0,24	361,80 ± 34,00	37,44	100,0	12,76	1,0
Аффинная хроматография на трипсин-сефарозе 4 В (фракции 48-58)	36,0 ± 2,5	0,072 ± 0,007	13,40 ± 1,22	34,17 ± 3,22	88,60 ± 8,30	9,17	24,89	157,47	12,34

Примечание: А – активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ в мг инактивированного кристаллического трипсина на мл сыворотки за 1 мин инкубации при 37 °С; УА – удельная активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ в мг инактивированного кристаллического трипсина на мг белка сыворотки за 1 мин инкубации при 37 °С; А x V – суммарная активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ в объеме исследуемой фракции в мг инактивированного кристаллического трипсина на мл сыворотки за 1 мин инкубации при 37 °С

финной хроматографии.

Выделение и очистка ингибитора трипсиноподобных протеиназ из отходов I-й стадии промышленного способа получения гамма - глобулина

Материалом для исследования служил образец отходов I стадии (центрифугат № 1, 24 часа) промышленного способа получения гаммаглобулина, полученный в 2010 году со станции переливания крови г. Одессы.

Хроматографические исследования образца отходов I стадии промышленного способа получения гаммаглобулина на сефадексе G-15 показали (рис. 1), что активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ идентифицировалась в единственном белковом пике (во фракциях № 18-23), в котором установлено наибольшее содержание белка (до 98 %) и который элюировался с колонки 0,05 М Трис-HCL буфером pH 7,6.

Использование гель-хроматографии на сефадексе G-15 позволило очистить исходный образец в 12,76 раза от низкомолекулярных примесей со значительным повышением удельной активности ингибитора трипсиноподобных протеиназ (по отношению к исходному об-

разцу - в 12,76 раза) (табл. 1). По сравнению с содержанием исследуемого ингибитора в исходном образце, выход ингибитора при данном методе очистки составил 37,44 %.

Во всех фракциях, в которых было установлено наличие ингибитора трипсиноподобных протеиназ, определяемого по гидролизу БАПНА, активность этого ингибитора, определяемого по гидролизу 2,0 %-ного казеина установлена не была. Фракции, обладающие ингибиторной активностью объединяли и использовали в дальнейшем для очистки на трипсин-сефарозе 4 В. Результаты аффинной хроматографии показали, что нанесенная в полном объеме (36 мл) фракция, полученная после гель-хроматографии на сефадексе G-15 элюировалась с трипсин-сефарозы 4 В 0,1 М уксусной кислотой (pH 3,1). Основная масса белка (до 96 %) была идентифицирована в первом белковом пике, который не сорбировался на трипсин-сефарозе 4 В, элюировался с колонки 0,1 М Трис-HCL буфером pH 7,6 и не обладал ингибиторной активностью, определяемой по гидролизу БАПНА (рис. 2). Активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ была установлена во втором белковом пике (фракции № 48-

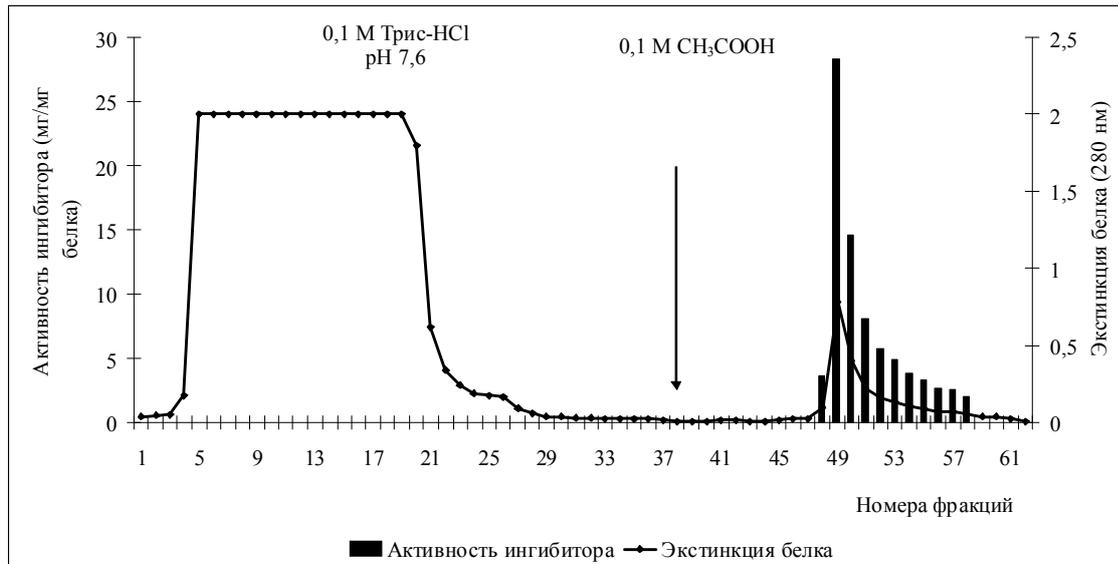


Рис. 2. Очистка ингибитора трипсиноподобных протеиназ из отходов I стадии (24 часа) промышленного способа получения гаммаглобулина методом аффинной хроматографии. Аффинная хроматография на Трипсин-Сефарозе 4 В (0,8 x 10,0 см). Нанесено 1,74 мг белка; объем фракций 4,5 мл, скорость – 18,0 мл/час, элюирование 0,1 М Трис-НСl буфером (рН 7,6) и 0,1 М CH₃COOH (рН 3,1).

58), который элюировался 0,1 М CH₃COOH (рН 3,1) с максимальной активностью ингибитора во фракции № 49 (рис. 2).

Использование для аффинной хроматографии на сефарозе 4 В трипсина в качестве лиганда позволило дополнительно очистить ингибитор трипсиноподобных протеиназ в 12,34 раза, по сравнению с гель-хроматографией и в 157,47 раза – по сравнению с исходным образцом белка с с 25,0 % выходом (рис. 1).

Нами разработана методика выделения ингибитора трипсиноподобных протеиназ из промышленных отходов сывороточного производства донорской крови человека [21].

По данным литературы известно что ингибиторы вирусных протеаз блокируют протеазы вирусов, которые берут участие в «раздевании» вирионов, нарезании гигантских полипептидов на отдельные белковые молекулы, регулируют функции вирусных генов. Так, трипсиноподобные протеиназы расщепляют белок – предшественник гемагглютинаина на две субъединицы HA₁ и HA₂, где гемагглютинин 2 отвечает за развитие инфекционного процесса. Только после расщепления вирус проникает в клетку и начинает

размножаться. Ингибиторы блокируют расщепление вирусных белков путем подавления клеточных энзимов. В присутствии ингибиторов клеточных трипсиноподобных протеиназ после одного цикла репродукции исходного вируса с расщепленными белками образуется вирусное потомство с нерасщепленными, функционально не активными вирусными белками.

По результатам наших предыдущих исследований, сырьем для получения ингибитора трипсиноподобных протеиназ могут служить отходы после всех стадий технологического процесса получения гамма-глобулина. Отходы содержат большое количество ингибиторов трипсиноподобных протеиназ. Получение противовирусных препаратов из отходов донорской крови человека позволит полнее использовать белки крови, повысить экономическую целесообразность фракционирования, увеличить номенклатуру препаратов крови, что ведет к снижению себестоимости их производства. Исследования продолжаются.

Выводы

1. Разработана новая методика выделения и очистки ингибитора трипсиноподобных протеиназ с использовани-

- ем гель - фильтрации сефадексах и аффинной хроматографии на трипсин- сефарозе 4В.
2. Использование для аффинной хроматографии на сефарозе 4В трипсина в качестве лиганда позволило очистить ингибитор трипсиноподобных протеиназ от 157,47 до 282,95 раза по сравнению с исходным образом белка.
 3. Из отходов материала через 24 часа (I-й стадии) получения гамма-глобулина установлена активность ингибитора трипсиноподобных протеиназ во втором белковом пике (фракции № 48-58), который элюировался 0,1 М CH_3COOH (рН 3,1) с максимальной активностью ингибитора во фракции № 49 ($88,6 \pm 8,3$ мг/мл за 1 мин.) и процентном выхода 24,89 % .

Литература

1. Taubenberger J. 1918 Influenza: the mother of all pandemic / J. Taubenberger, D. Morens // *Emerg Infect Dis.* – 2006. – V. 12, № 1. – P. 15 –22.
2. Kilbourne E. D. Influenza pandemics of the 20th century / E. D. Kilbourne // *Emerg Infect Dis.* – 2006. – V. 12, № 1. – P. 9–14.
4. Марієвський В. Загроза нової пандемії грипу: як реагувати? / В. Марієвський // *СЕС профілактична медицина.* – 2009. – № 5. – С. 10-11.
5. Гриневич О. Є й досвід, і фахівці, і можливості... / О. Гриневич // *СЕС профілактична медицина.* – 2009. – № 5. – С. 12-13.
6. Webster R. H5N1 Influenza — Continuing Evolution and Spread / R. Webster, G. Robert // *N Engl J Med.* – 2006. – V. 355, № 21. – P. 2174–2177.
7. Сборник «Грипп в Украине: итоги и программа дальнейших действий» от 3 марта 2010 г.
8. Андрейчин М. А. Пандемічний грип А (H1N1) Каліфорнія / М. А. Андрейчин, В. П. Малий // *Інфекційні хвороби.* – 2009. – № 4. – С. 103-131.
9. Спектр чувствительности к ремантадину вирусов группы А, циркулировавших в эпидемических сезонах 2002-2004 гг. / Е. С. Шевченко, Е. И. Бурцева, А. Н. Слепушкин [и др.] // *Вопр. вирусол.* – 2005. – № 5. – С. 32-35.
10. Ferraris O. Sensitivity of influenza viruses to Zanamivir and Oseltamivir: study performed on viruses circulating in France prior the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice / O. Ferraris, N. Kessler, B. Lina // *Antiviral Res.* – 2005. – V. 68. – P. 43-48.
11. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza / A. Moscona // *N Engl J Med.* – 2005. – V. 353, № 13. – P. 1363–1373.
12. Дивоча В.А. Роль протеиназ крови и их ингибиторов в механизмах противовирусной защиты / В.А. Дивоча, А.И. Гоженко, В.Н. Михальчук // *Доповіді Національної Академії наук України.* – 2011. - № 15. – С. 188-196.
13. Дивоча В.А. Протеолитическая теория патогенеза гриппа и усовершенствование его лечения / В.А. Дивоча, А.И. Гоженко, В.Н. Михальчук // *Актуальные проблемы транспортной медицины.* – 2011. - № 3(25). – С. 54-64. (англ. яз.)
14. Дивоча В.А. Изучение защитных свойств ингибиторов трипсиноподобных протеиназ, полученных из отходов сывороточного производства / В.А. Дивоча // *Актуальные проблемы транспортной медицины.* - 2011. - № 1 (23). - С. 113-116.
15. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М.: Высшая школа, 1971. – 352 с.
16. Получение иммобилизованных ферментов. Биоспецифическая хроматография / Е. В. Лушникова, Н. В. Федуркина, Е. В. Соколова [и др.] // *Методы современной биохимии.* – М: Наука, 1975. – С. 5-8.
17. Lowry W. J. Protein measurment with the Folin reagent / W. J. Lowry, F. Baker // *J. Biol Chem.* - 1951. – V. 193. - P. 265-275.
18. Веремеенко К. Н. Ферменты в отоларингологии / К. Н. Веремеенко. - К. : Здоровье, 1980. - 147 с.
19. Левицкий А. П. Методы определения

ингибиторов трипсина / А. П. Левицкий // Биохимические методы исследования селекционного материала : сб. науч. работ. - Одесса, 1979. - Вып. XV - С. 68-73.

20. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of Head of Bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. - 1970. - V. 227, N 5259. - P. 680-685.
21. Клінічна біохімія : підручник / [Бойків Д. П., Бондарчук Т. І., Іванків О. Л. та ін.]. - Київ: Медицина, 2007. - 318 с.
22. Патент 89778 Україна, МПК (2010), А 61 К 35/12. Спосіб виділення інгібітора трипсиноподібних протеїназ із відходів одержання гамаглобуліну та альбуміну донорської крові людини / Дівоча В. П., Михальчук В. М., Гоженко А. І.; заявник та патентодержатель Дівоча В. П., Михальчук В. М., Гоженко А. І. - № а 2006 11237; заяв. 25.10.2006 ; опубл. 15.02.2007, видано 10.03.2010, Бюл. № 5.

Резюме

ОТРИМАННЯ ІНГІБІТОРІВ ТРИПСИНОПОДІБНИХ ПРОТЕЇНАЗ З ВІДХОДІВ ГАММА-ГЛОБУЛІНОВОГО ВИРОБНИЦТВА

*Дівоча В.П., Адамовська В.Г.,
Кобрін Т.М., Лагода О.В., Руссу А.В.,
Михальчук В.М.*

Метою досліджень було виділення та очистка інгібіторів трипсиноподібних протеїназ із промислових відходів отримання гамма-глобуліну з донорської крові людини. У роботі використовували: відходи I-ї стадії отримання гамма-глобуліну з донорської крові людини та біохімічні методи дослідження. У результаті досліджень розроблено нова методика виділення і очистки інгібітору трипсиноподібних протеїназ з використанням гель – фільтрації на сефадексах та афінної хроматографії на трипсин-сефарозі 4В. Використання для афінної хроматографії на сефарозі 4В трипсину в якості ліганда дозволило очистити інгібітор трипсиноподібних протеїназ від 157,47 до 282,95 разів у порівнянні з вихідним білком. З відходів матеріалу через 24 год. (I-й стадії) отримання гамма-глобулі-

ну встановлена активність інгібітору трипсиноподібних протеїназ у другому білковому піці (фракції № 48-58), який елюювався 0,1 М CH_3COOH (рН 3,1) з максимальною активністю інгібітору во фракції № 49 ($88,6 \pm 8,3$ мг/мл за 1 хв.) та відсотком виходу 24,89 %.

Ключові слова: трипсиноподібна протеїназа, препарати з крові людини, очищення препаратів, отримання інгібітора, грип.

Summary

MANUFACTURING OF TRYPSINE-LIKE PROTEINASES INHIBITORS FROM THE WASTES OF GAMMA-GLOBULINE PRODUCTION

*Divocha V. A., Adamovska V. G.,
Kobrin T.M., Lagoda O.B., Russu A. B.,
Mikhalchuck B.M.*

Objective – to extract and purify inhibitors of trypsin-like proteinases. From industrial wastes of gamma-globuline manufacturing from a human blood. In the work we have used: outcomes of the I-st stage of gamma-globuline. Manufacturing from a human donor blood and biochemical methods of investigation. The research resulted in new technique of extraction and purification. of trypsin-like proteinases inhibitor with the use of gel-filtration on sefadexes and affine chromatography on trypsin-sepharosis 4B. The use of trypsin as lygand for affine chromatography on sepharosis 4B allowed to purify inhibitor from 157,47 to 282,95 times if compared with ourcoming lipid. From the outcomes of the material in 24 h (I-st stage) of gamma-globuline manufacturing the activity of inhibitor of trypsin-like proteinases have been determined in the second lipid peak (fractions № 48-58). It was eluated with 0,1 М CH_3COOH (рН 3,1) with top activity inhibitor in fraction in fraction № 49 ($88,6 \pm 8,3$ mg/ml per 1 min.) and total outcome of 24,89 %.

Key words: trypsin-like proteinases, preparates from human blood, cleaning products, obtaining inhibitor, influenza

*Впервые поступила в редакцию 19.11.2011 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*