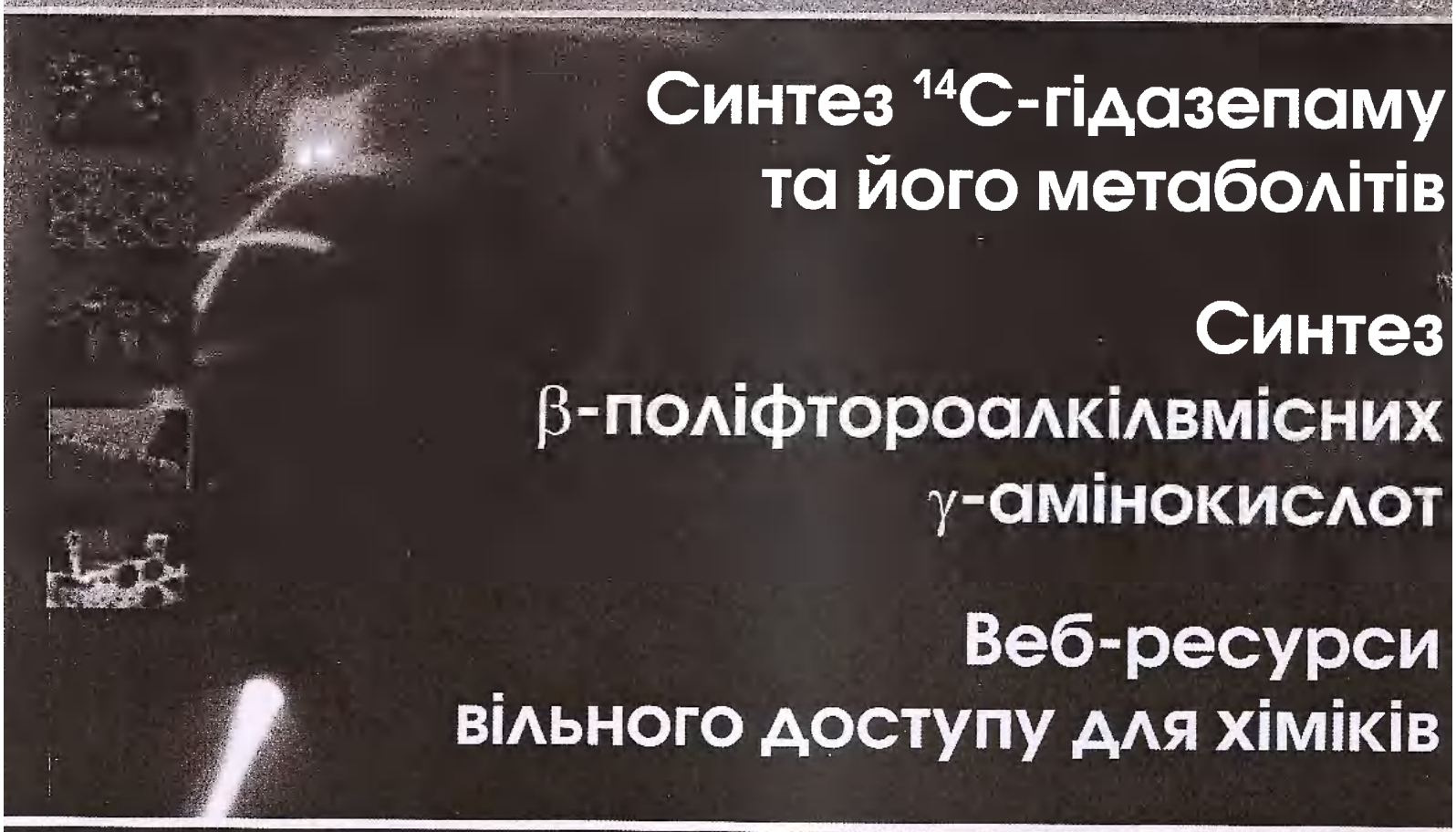
UKRAINICA BIOORGANICA ACTA

Журнал біоорганічної і біологічної хімії

Том 5, 1, 2007

ISSN 1814-2758



Синтез ^{14}C-гідазепаму та його метаболітів

Синтез β-поліфтороалкілвмісних γ-амінокислот

Веб-ресурси вільного доступу для хіміків

ТИСЯЧА ДРІБНИЧОК ДЛЯ ВАШОЇ ЛАБОРАТОРІЇ...

Sente-Lab

www.sente-lab.com

03087, м. Київ, п/с 80
Тел.: 38 (044) 201-44-69, 531-52-85
e-mail: market@sente-lab.com

Ukrainica Bioorganica Acta 1 (2007) 7—10

Ukrainica Bioorganica Acta

www.bioorganica.org.ua

Оптимізація етапів синтезу нового комплексного індуктора інтерферонів I типу

Ю.М. Пенчук, О.В. Карпов*, С.В. Верьовка[1]

Національний університет харчових технологій
вул. Володимирська, 68, Київ, 01033, Україна

[1]*Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України*
вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна

Резюме. Встановлено оптимальні умови й відібрано найбільш дієві компоненти для створення нового індуктора інтерферонів I типу багаторазового використання на основі комплексів РНК із тилороном, іммобілізованих на нерозчинних гранулярних матрицях.

Ключові слова: іммобілізація, інтерферон, індуктор, сферон, РНК, тилорон.

Вступ. На сьогодні в Україні існує велика потреба у препаратах інтерферону (ІФН). При цьому поряд із генноінженерним рекомбінантним ІФН I типу широко використовуються препарати ІФН I типу (α/β-ІФН) природного походження, оскільки їм притаманний комплекс унікальних властивостей, що позитивно впливають на терапевтичне використання препарату. Природні ІФН, на відміну від рекомбінантних ІФН I типу, не є продуктами одного гена, а являють собою комплекс білкових молекул, експресованих щонайменше 15 генами у природно збалансованих пропорціях. До того ж препарати природного ІФН I типу містять групу важливих цитокінів із вираженим імуномодулюючим ефектом [1]. Ці властивості підвищують клінічні ефекти використання природних ІФН, що зумовлює актуальність їх промислового отримання.

Ключовим етапом біосинтезу ІФН є процес індукції, тобто позаклітинної активації відповідних генів [2]. Класичні підходи до здійснення індукції ІФН I типу *in vitro* полягають у внесенні в культуру клітин-продуцентів індукторів — вірусів або дволанцюгових РНК (природних і синтетичних). Використання вірусів як індукторів значно ускладнює технологічний процес, оскільки потребує додаткових операцій з очистки й контролю отриманих препаратів ІФН на інфекційність. Використання як індуктора дволанцюгової РНК пов'язане з її беззворотною втратою, що, з урахуванням значної вартості препаратів РНК, різко збільшує витрати процесу, обмежує його придатність лабораторними дослідженнями та практично унеможливлює технологічне використання.

З метою подолання зазначених недоліків нами запропоновано практичне рішення, що базується на використанні як індуктора ІФН I типу іммобілізованих на нерозчинних носіях комплексів дріжджової РНК із гідрохлоридом тилорону (ІММК) [3]. Показано, що механічний контакт клітин із нуклеїновим компонентом на поверхні ІММК є достатнім для запуску процесу інтерфероногенезу. На відміну від традиційних індукторів, створені комплекси забезпечують можливість багаторазового використання та не потребують очистки кінцевого продукту від вірусів. Тим самим досягнуто істотного спрощення та здешевлення процесу, що робить можливим отримання препаратів ІФН I типу природного походження в промис-

* Corresponding author.
Tel./fax: +38044-2879241
E-mail address: karpov_av@hotmail.com

© Ю.М. Пенчук, О.В. Карпов, С.В. Верьовка, 2007

лових масштабах. Метою цієї роботи є дослідження оптимальних умов синтезу ІММК.

Матеріали й методи. Компонентами ІММК слугували дріжджова РНК (НПО «Біохімреактив», Олайна, Латвія) та гідрохлорид тилорону («Sigma», США). Препарат дріжджової РНК додатково очищали потрійною фенольною депротеїнізацією з подальшим осадженням етанолом за стандартною методикою [4]. Як нерозчинні гранулярні носії для ковалентного зв'язування полінуклеотидних компонентів ІММК використовували гідрофільні гранульовані носії — Сефадекс (Sephadex G-50 Medium, 50-150 μm, «Pharmacia», Швеція), Сефарозу (Sepharose 4B, 60-140 μm, «Pharmacia», Швеція) та Сферон (Spheron 300 (LC), 63-100 μm, «Lachema», Чехія). Активізацію оксигруп носіїв проводили за стандартним ціанбромідним методом [5]. Для отримання відповідних ІММК наважки ліофілізованої дріжджової РНК розчиняли у 30,0 мл 0,1 М натрій-фосфатного буфера, pH 8,0. До 11 мл активованого носія додавали розчин РНК (10 мг/мл) та інкубували отриману суміш 12 год за 4 °С зі струшуванням на шотель-апараті. Одержаний нерозчинний кон'югат послідовно промивали 0,05 М трис-HCl буфером, pH 7,6, 0,1 М натрій-фосфатним буфером, pH 8,0, і знову 0,05 М трис-HCl буфером, pH 7,6. Тим самим гранулярний нерозчинний носій, який містив РНК, відмивали від розчинної РНК та інактивували надлишок активованих груп, що не ввійшли в реакцію. Комплексоутворення з тилороном проводили інкубацією протягом 1 год у 0,05 М розчині гідрохлориду тилорону в 0,01 М трис-HCl буфері, pH 6,8, після чого отримані препарати ІММК відфільтровували та відмивали від надлишку тилорону тим же буфером.

Рівень іммобілізації РНК на гранулах носіїв визначали на спектрофотометрі CE 272 (Cecil Instruments, Англія) за поглинання при 260 нм і кольорової реакції з орциновим реактивом (метод Мейбаума) після гідролізу 0,5 М КОН за 37 °С [4]. Для цього до 1,0 мл стандартного розчину РНК або проби РНК додавали 1,0 мл орцинового реактиву, суміш витримували на киплячій водяній бані 45 хв і охолоджували (реакція Біаля). Інтенсивність зеленого забарвлення виміряли на фотоелектроколориметрі (ФЕК-2) при 670 нм (червоний світлофільтр). Вміст РНК у пробах визначали за попередньо побудованим калібрувальним графіком. Виходячи з отриманих значень кількості РНК у пробах, підраховували кількісне співвідношення РНК/носій.

Аналогічно, з використанням тих же носіїв, готували препарати порівняння — іммобілізовані стандартні індуктори ІФН I типу нуклеїнової природи — ридостин (дволанцюгова РНК дріжджів *S. cerevisiae*, НПО «Вектор», Росія) і дволанцюговий комплекс поліінозинової та поліцитидилової кислот poly(I)-poly(C) («Serva», Німеччина).

Визначення інтерфероногенної активності досліджуваних ІММК проводили шляхом внесення відповідної їх кількості до клітин лінії ПТП і лейкоцитів периферійної крові людини зі щільністю $3x10^6$ клітин в 1 мл середовища, як описано нами раніше [3]. Титри ІФН у пробах надосадкової рідини встановлювали за стандартною методикою [2], використовуючи як тест-вірус вірус везикулярного стоматиту штам Індіана в дозі 100 $ТЦД_{50}$.

Результати й обговорення. Активацію гранульованих носіїв проводили традиційним для методів афінної хроматографії бромціановим методом, однак призначення та механізм дії отримуваних комплексів у нашому випадку мав суттєві відмінності від афінних сорбентів (табл. 1). Характерна для іммобілізованих полінуклеотидів молекулярна маса (порядку 550 кДа для дріжджової РНК, 200-800 кДа для ридостину та 200-400 кДа для poly(I)-poly(C)) практично виключала інкорпорацію лігандів усере-

Таблиця 1

*Вміст рибополінуклеотидів у препаратах ІММК, створених на основі гранульованих носіїв**

Носій	Розмір часток, мкм	Ридостин, мкг/г	poly(I)-poly(C), мкг/г	Дріжджова РНК, мкг/г
Сефадекс G-50	50-150	22,2±1,6	21,7±3,9	24,6±1,2
Сефароза 4B	60-140	27,1±3,1	26,8±3,6	29,3±2,3
Сферон 300	63-100	30,0±3,5	28,7±3,1	31,8±2,6

*Примітка: * — вміст рибополінуклеотидів визначали при першому циклі використання ІММК; дані 4-х дослідів.*

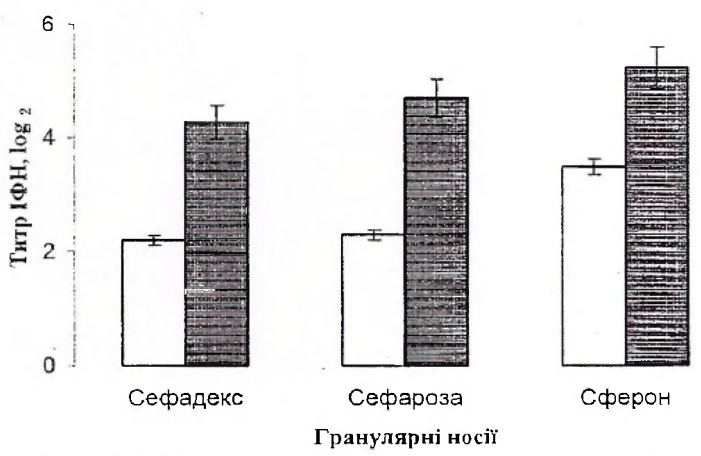


Рис. 1. Інтерфероногенна активність ІММК на основі різних гранулярних носіїв (□ — ПТП, ▤ — лейкоцити).

дину гранули, обмежуючи ковалентну кон'югацію зовнішньою поверхнею гранули. Щодо до мети дослідження — створення контактного індуктора ІФН — подібне обмеження аж ніяк не є вадою, оскільки саме іммобілізовані на поверхні гранули молекули мають вступати в контакт із клітинами-продуцентами. Вміст іммобілізованих рибополінуклеотидів у препаратах ІММК порівняно з літературними даними є принаймні на 2-3 порядки меншим за традиційної іммобілізації білків, здатних до інкорпорації в сітчасту структуру гранули [6]. Суттєвий надлишок активованих усередині сітчастої гранули груп лишається вільним та потребує інактивації, що досягається вищезазначеною промивкою трис-вміщуючим буфером. Тому різниця в ступені проникнення застосованих носіїв по відношенню до звичайних біологічних макромолекул неістотна. Значно важливішими факторами є розвиненість структури полімеру, здатної до контакту з клітинними поверхнями, й жорсткість структури носіїв, оскільки саме ними забезпечується індукційний ефект.

Як видно з наведених даних, абсолютна кількість приєднаних полінуклеотидів у всіх випадках була більшою саме на гранулах Сферону. Відомо, що гідроксильні групи сферонів, які являють собою гідрофільні оксиалкілметакрилатні гелі, за своїми властивостями аналогічні гідроксилам агарози й сефадексів. Тому хімізм процесу активації всіх трьох нерозчинних носіїв є практично ідентичним [6]. Відмінна риса сферонів полягає в жорсткості структури та її стабільності щодо хімічних і мікробіологічних чинників [7]. Відзначається, що завдяки більш вільній орієнтації полінуклеотиду, ковалентно закріпленого на носіях типу сферонів, на відміну від інших, приєднання здійснюється більш повно й не впливає на реакції, яким цей полінуклеотид піддають далі [8]. Мабуть, саме ці фактори, а не лише надлишок іммобілізованої РНК, зумовлюють значну перевагу в індукторній здатності ІММК на основі сферонового носія, на відміну від носіїв на основі Сефарози та Сефадексу (рис. 1).

Варто також зазначити, що дріжджова РНК приєднувалася до носіїв більш ефективно, ніж інші полінуклеотиди. Можливо, це є відображенням структурних відмінностей цих полімерів. Якщо ридостин і poly(I)-poly(C) є дволанцюговими полімерами з відносно жорсткою структурою, то дріжджова РНК являє собою досить лабільний поодинокий ланцюг. Остання обставина, на наш погляд, може впливати на зв'язування дріжджової РНК із гранулами носіїв, роблячи цей процес більш дієвим.

Підсумовуючи наведені дані, можна зробити висновок, що дібрані нами методи активації гранулярних носіїв і ковалентного приєднання до них полінуклеотидів є достатньо ефективними для створення інтерферон-індукційних молекулярних комплексів, причому на особливу увагу заслуговує комплекс на основі Сферону. Враховуючи відносно невелику вартість компонентів, отриманих ІММК, такі конструкції можна розглядати як перспективні в широкомасштабному одержанні препаратів ІФН I типу природного походження. У виробництві ІФН багаторазове використання ІММК може зняти такі проблеми, як інактивація та очистка від вірусів-індукторів, або ж дасть змогу уникнути значних витрат, пов'язаних із використанням стандартних розчинних індукторів полінуклеотидної природи.

Надійшла в редакцію 05.10.2006 р.

Optimization of synthesis stages of a novel complex inducer for type I interferons

Yu.M. Penchuk, A.V. Karpov, S.V. Verevka[1]

National University of Food Technologies
68 Volodymyrska Str., Kyiv, 01033, Ukraine

[1]Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine
9 Leontovicha Str., Kyiv, 01601, Ukraine

Summary. Optimal conditions have been determined and the most effective components have been chosen neccesary for design of a novel interferon type I inducer of multiple use based on the RNA — tilorone complex immobilized on insoluble granular matrices.

Keywords: immobilization, interferon, inducer, spheron, RNA, tilorone.

Перелік літератури

1. *Ершов Ф.И.* Система интерферона в норме и при патологии. — М.: Медицина, 1996. — 240 с.

2. *Ершов Ф.И., Новохатский А.С.* Интерферон и его индукторы. — М.: Медицина, 1980. — 193 с.

3. *Карпов О.В., Верьовка С.В., Манджос О.П., Пенчук Ю.М., Поводзинський В.М., Жолобак Н.М., Співак М.Я., Кисельова О.К.* Індукція інтерферонів I типу в умовах in vitro за допомогою іммобілізованого комплексного інтерфероногену // Доп. НАН України. — 2003. — № 9. — С. 178-181.

4. Методы исследования нуклеиновых кислот / Под ред. А.Н. Белозерского. — М.: Мир, 1970. — 277 с.

5. *March S.C., Parikh I., Cuatrecasas P.* A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography // Anal. Biochem. — 1974. — Vol. 60. — P. 149-152.

6. *Туркова Я.* Аффинная хроматография. — М.: Мир, 1980. — 471 с.

7. *Остерман Л.А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М.: Наука, 1985. — 536 с.

8. *Bunemann H., Westhoff P., Herrmann R.C.* Immobilization of denatured DNA to macroporous supports: I. Efficiency of different coupling procedures // Nucl. Acid Res. — 1982. — Vol. 10. — P. 7163-7180.