

Изобретение относится к биотехнологии вирусных препаратов и касается выделения ингибитора трипсиноподобных протеаз с высокой степенью чистоты и противовирусной активностью.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является способ выделения ингибитора трипсина [1], в котором ингибитор трипсина получают из люцерны, однако ингибитор трипсиноподобных протеаз из живых клеток получен впервые.

Задачей изобретения является разработка способа получения ингибитора трипсиноподобных протеаз, нарезающих белок гемагглютинаина вируса гриппа на две субъ-единицы HA1 - HA2, путем выделения фермента из живых клеток легкого животного.

-Поставленная задача осуществляется тем, что лёгкое здорового животного отмывают в фосфатном буфере, гомогенизируют его ультразвуком, центрифугируют, замораживают, к осадку добавляют тритон X-100, после чего по истечении 18-20 ч подвергают повторному озвучиванию и центрифугированию, затем I и II супернатанты объединяют и подвергают разделению протеаз и ее ингибитора методом ионообменной хроматографии. Очистку до гомогенного состояния ингибитора проводят с помощью гельфильтрации на сефадексах с последующей афинной хроматографией, а десорбцию белков производят фосфатным буфером и диализом против воды с последующей лиофильной сушкой и ампулированием.

Способ осуществляется следующим образом.

Легкие здоровых белых мышей отмывают от крови в фосфатном буфере с pH 7,5 при температуре +4°C, затем измельчают глазными ножницами и растирают в стерильной охлажденной посуде со стеклом соединяют с фосфатным буфером в соотношении 1:1 (1 легкое : 1 мл), после чего подвергают гомогенизацию ультразвуком интенсивностью 15-20 мГц в течение 30-60 с, центрифугируют при 10000 об/мин в течение 50-60 мин при температуре +4°C, после этого супернатант замораживают до температуры -18 -20°C, а к осадку добавляют 1 %-ный раствор тритона X-100, перемешивают и помещают на холод при температуре +4, +6°C на 18-20 ч, по истечении которых осадок подвергают повторному озвучиванию и центрифугированию при указанных выше параметрах. Отбирают 11 супернатант, соединяют его с 1 и подвергают разделению протеазы и ингибитора с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ - целлюлозе. Очистку до гомогенного состояния ингибитора протеаз проводят с помощью гельфильтрации на сефадексах G-15 и G-50 с дальнейшей афинной хроматографией на трипсин-сефарозе 4В [2]. Для этого следует подготовить иммобилизованный сорбент трипсин - сефарозы 4В. Отвешивают требуемое количество СЫВч - активированной сефарозы 4В (1 г смолы дает 3,5 мл геля), отмывают несколько раз на стеклянном фильтре, используя 1 мМ HCl (200 мл/1 г смолы), растворяют трипсин в рабочем буфере, используя 0,1 М NaHCO₃, pH 8,3, содержащий 0,5 М NaCl (5-10 мг на 1 мл геля), смешивают раствор трипсина с суспензией геля, помещают в встряхиватель на 2 ч при комнатной температуре. После этого отмывают избыток трипсина и блокируют оставшиеся активные группы, используя 0,1 М NaHCO₃, содержащий 0,5 NaCl, затем отмывают в течение 2 ч 0,1 М боратым буфером. В дальнейшем отмывают от избытка реагента и адсорбированного белка (сначала рабочим буфером 0,1 М NaHCO₃ с 0,5 М NaCl, а затем 0,1 М ацетатным буфером pH 4,0, содержащим 0,5 М NaCl). Полученный конъюгат белка с сефарозой используют для афинной хроматографии, для проведения которой применяют колонку фирмы Phazmacla Fine chemical размером 10/10. Объем наносимой пробы может быть произвольным, так как ингибитор трипсина прочно сорбируется с гелем. Афинную хроматографию проводят в 0,05 М трис-HCl буфере pH 7,5. Десорбцию белков проводят последовательно буферными растворами, содержащими 1 М HCl, 8 М мочевины с раствором 0,2 KCl-HCl с pH 2,0. Ингибитор элюируется с колонки одним пиком буфером 0,2 М KCl-HCl pH 2,0. При данной величине колонки ингибитор выходит в трех фракциях (23-25, объем фракции 2 мл, фракция 5 мин, скорость 0,4 мл/мин). Всего при хроматографии собрано 30 фракций. Полученный раствор ингибиторов трипсина лиофильно высушивают. Ингибитор трипсина во фракциях определяют по степени торможения гидролиза БАПНА (N-бензоил-L-аргенин-p-нитроанилид) кристаллическим трипсином [3]. Электрофорез изоформ ингибиторов проводят в 7,5% геле в трисглициновом буфере при pH 8,3 [4].

Преимущество предлагаемого способа в сравнении с прототипом заключается в том, что в прототипе получен ингибитор трипсина, а в заявляемом способе впервые получен - клеточный ингибитор трипсиноподобных протеаз, которые отвечают за расщепление белка - предшественника гемагглютинаина вируса гриппа. Ингибитор протеаз выделен из легких здоровых вышей, а в прототипе -из люцерны. Для очистки ингибитора клеточных трипсиноподобных протеаз в заявляемом способе необходимо было получить иммобилизованный сорбент трипсин - сефарозы 4В. Десорбцию белков проводили последовательно буферными растворами, содержащими 1 м HCl, 8 М мочевины с pH 2,0, а в прототипе десорбцию белков осуществляли 0,15 М ацетатным буфером с pH 7.