

Anita NIESOBSKA, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA

e-mail: anita.niesobska@pwr.edu.pl

Zakład Inżynierii Bioprocessowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław

Hydroliza enzymatyczna wiązania peptydowego z oporami dyfuzyjnymi

Wstęp

Podstawowym wymaganiem stawianym skutecznej terapii antynowotworowej jest dotarcie leku do miejsca działania w formie aktywnej i w danym stężeniu oraz aby dawka terapeutyczna pozostała stała przez możliwie najdłuższy czas. Efekty takie są jednak trudne do osiągnięcia ze względu na ograniczenia w działaniu farmaceutyków, w tym ich degradację, oddziaływanie z innymi związkami i komórkami w organizmie, a także niezdolność do penetracji tkanek na skutek ich natury chemicznej. Przeszkody te mogą pokonać polimerowe systemy dostarczania leków pozwalające na kontrolowane uwalnianie substancji aktywnych [Vilar i in., 2012].

Uwalnianie leków z matryc polimerowych może zachodzić na kilka sposobów: na drodze dyfuzji z nośnika, z powodu pęcznienia polimeru, jego degradacji lub erozji [Dumoulin i in., 1999].

Stosunkowo nowym podejściem jest przyłączenie leku do niebiodegradowalnej matrycy polimerowej wiązaniem kowalencyjnym lub przez krótki łącznik, w którym to przypadku uwalnianie substancji aktywnej może zachodzić na drodze rozkładu wspomnianego połączenia pod wpływem różnych czynników, jak kwaśne pH czy enzymy [Vilar i in., 2012].

Zastosowanie enzymów do degradacji wiązania nośnik-lek stanowi alternatywę dla mało specyficznych strategii uwalniania, jak pęcznienie polimeru, czy chemiczna i fizyczna erozja. Koniugaty skomponowane z odpowiedniego łącznika i ukierunkowanego wobec niego enzymu stwarzają nowe możliwości lokalnego dostarczania leków z nośników polimerowych umieszczonych w miejscu chorobowo zmienionym.

Podstawowym zagadnieniem związanym z funkcjonowaniem układu lek-nośnik (matryca polimerowa) – enzym jest wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej z nałożonymi oporami dyfuzyjnymi, stabilność katalizatora w warunkach procesowych, szybkość transportu leku przez matrycę polimerową, co ostatecznie sprowadza się do określenia reżimu procesu. Badania szybkości transportu substancji przez matryce polimerowe przeprowadzono i opisano w pracy [Trusek-Hołownia i Jaworska, 2014].

Przedmiotem niniejszych badań było przyłączenie cząsteczki modelowej do stałego nośnika z udziałem wiązania amidowego i hydroliza powstałego połączenia z wykorzystaniem odpowiednio dobranego enzymu.

Badania doświadczalne

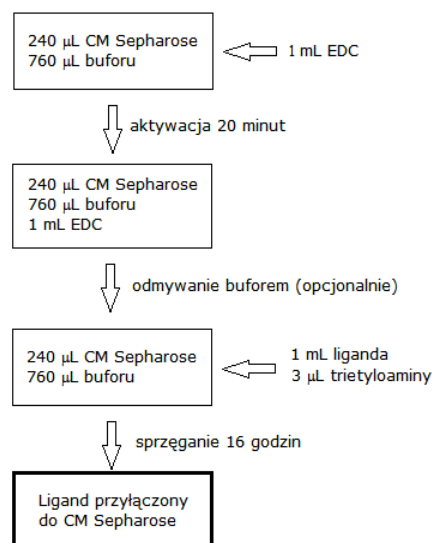
Materiały

W badaniach wykorzystano CM Sepharose® jako nośnik, H-D-Tyr-OMe chlorowodorek jako ligand, N-(3-dietylaminopropyl)-N'-etylokarbodiimid (EDC), α -chymotrypsynę z trzustki wołowej, termolizynę z *Bacillus thermoproteolyticus rokko*, proteazę z *Rhizopus sp.*, proteazę z *Bacillus licheniformis* (subtylizynę), wołową albuminę serum (BSA), standardy białek 6,5÷66 kDa (*Sigma-Aldrich*), disodu wodorofosforan, potasu diwodorofosforan, kwas ortofosforowy 85%, trietyloaminę bezwodną o czystości czda (POCH)

Protokoły sprzęgania

Wytworzenie wiązania amidowego pomiędzy ligandem H-D-Tyr-OMe a CM-Sepharose przeprowadzono w temperaturze pokojowej w różnych warunkach procesowych (Tab. 1) – modyfikacje procedury [Nakajima i Ikada, 1995]. Schematycznie poszczególne etapy przedstawiono na rys. 1. 240 μ L nośnika (CM-Sepharose) zawierającego 2,16 \cdot 10⁻⁵ mola grup karboksylowych dodano do 760 μ L buforu o danym pH . W następnej kolejności dodano 1,0 mL roztworu EDC

(aktywator) o stężeniu 41,4 g \cdot L⁻¹ (21,6 \cdot 10⁻⁵ mola) i mieszano przez 20 minut. Po tym czasie dodano 1,0 mL roztworu liganda (2,16 \cdot 10⁻⁵ mola) oraz 3,0 μ L trietyloaminy (2,16 \cdot 10⁻⁵ mola) i pozostawiono na 16 godzin w warunkach mieszania. W przypadku protokołu z odmywaniem EDC, nośnik przemyto odpowiednim buforem przed dodaniem liganda i trietyloaminy.



Rys. 1. Schemat protokołu sprzęgania

Według powyższego schematu przeprowadzono także sprzęganie peptydów o masach cząsteczkowych ok. 200÷10000 Da (aktywacja i sprzęganie w pH 7,0; bez odmywania aktywatora).

Tab. 1. Zastosowane strategie sprzęgania i uzyskane wydajności

Aktywacja pH	Sprzęganie pH	Strategia	Wydajność, [%]
6,0 ^a	6,0	Bez odmywania EDC	5,3
7,0 ^b	7,0		73,5
5,0 ^c	7,0	Z odmywaniem EDC	39,4
6,0	6,0		4,2
6,0	7,0		17,1
7,0	7,0		48,8

^a 0,05 M bufor fosforanowy pH 6,0 ^b 0,05 M bufor fosforanowy pH 7,0
^c 0,05 M bufor fosforanowy pH 5,0

Próbki pobrane przed i po reakcji sprzęgania analizowano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) w celu sprawdzenia wydajności przeprowadzonej immobilizacji.

Analiza HPLC

H-D-Tyr-OMe poddano analizie HPLC wykorzystując *Waters LC Module I PLUS HPLC System* (*Waters, USA*) oraz kolumnę *XTerra RP₁₈* (*Waters*). Dobrano następujące warunki analizy: faza mobilna 0,3% kwas ortofosforowy, przepływ 1,0 mL \cdot min⁻¹, objętość nstrzyku 10 μ L, temperatura kolumny i detektora 30°C, czas analizy 10 minut,

detekcja UV przy długości fali 280 nm. Otrzymane chromatogramy zanalizowano z wykorzystaniem programu *Millennium 32* (Waters, USA).

Masy cząsteczkowe peptydów i ich stężenie oznaczono metodą SE-HPLC stosując połączone szeregowo kolumny *BioSep-SEC-s2000* i *Yarra-3u-SEC-2000* (Phenomenex). Zastosowano następujące warunki pomiarowe: 0,1 M bufor fosforanowy *pH* 6,8; przepływ 0,6 mL min⁻¹; detekcja UV przy 214 nm; temperatura kolumny 25 °C; czas analizy 60 min. Masę cząsteczkową poszczególnych peptydów wyznaczano na podstawie krzywej standardowej:

$$\log(M_{\text{cząst}}) = -0,1296t_{\text{ret}} + 5,2143 \quad (1)$$

wykonej dla wzorcowych związków o znanych masach cząsteczkowych (albumina serum – 66 kDa; anhydraza węglanowa – 29 kDa; cytochrom C – 12,4 kDa; aprotynina – 6,5 kDa, cyjanokobalamina – 1,3 kDa).

Hydroliza wiązania aminokwas-nośnik

Reakcje hydrolizy przeprowadzono dla nośnika z przyłączoną H-D-Tyr-OMe, przy aktywacji i sprzęganiu zachodzącym w *pH* 7,0 bez odmywania aktywatora. Do nośnika przemytego po sprzęganiu buforem o odpowiednim dla danego enzymu *pH* dodano 5 mL enzymu w danym stężeniu (Tab. 2). Stężenia enzymów, *pH* i temperaturę w procesie dobrano w niezależnych reakcjach hydrolizy białek w reaktorze mieszalnikowym.

Tab. 2. Warunki prowadzenia reakcji hydrolizy

Enzym	Stężenie enzymu [g·L ⁻¹]	Objętość reakcyjna [mL]	Bufor	Temperatura [°C]
α-chymotrypsyna	0,5	6,0	Fosforanowy <i>pH</i> 7,2	37
Termolizyna	0,5			50
Proteaza z <i>Bacillus licheniformis</i>	0,05			50
Proteaza z <i>Rhizopus sp.</i>	0,5		KH ₂ PO ₄ /HCl <i>pH</i> 3,0	37

Reakcje prowadzono przez 24 godziny, w trakcie pobierając próbki i poddając je analizie HPLC. Po tym czasie dodano kolejną porcję enzymu w wyższym stężeniu i pozostawiono na kolejną dobę. Hydrolizaty analizowano na HPLC jak poprzednio. Stopień hydrolizy (SH) wyznaczano według wzoru

$$SH = \frac{W}{H} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:

SH – stopień hydrolizy [%]

W – liczba cząsteczek liganda, która została odłączona od nośnika po danym czasie hydrolizy

H – liczba cząsteczek liganda przyłączona do nośnika

Hydroliza przyłączonych peptydów

Wołową albuminę serum (BSA) poddano hydrolizie z udziałem termolizyny jako biokatalizatora celem uzyskania peptydów do dalszego sprzęgania z nośnikiem stałym. Hydrolizę BSA prowadzono w termostatowanych reaktorach mieszalnikowych (50°C) w *pH* 7,2.

W tym celu roztwór białka [5,0 g·L⁻¹] oraz termolizyny [0,5 g·L⁻¹] preinkubowano w 50°C przez 10 minut. Następnie rozpoczęto reakcję dodając enzym do substratu. Proces prowadzono przez 48 godzin. Roztwór po hydrolizie, zawierający szeroką gamę peptydów poddano w dalszej kolejności sprzęganiu z nośnikiem CM *Sepharose*.

Następnie przeprowadzono reakcję hydrolizy sprzęgniętych do nośnika peptydów z udziałem subtylizyny [2,0 g·L⁻¹]. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C przez 48 godzin. Próbki uzyskane na wszystkich etapach badań (hydroliza BSA, sprzęganie, hydroliza peptydów) poddano analizie HPLC.

Wyniki i ich analiza

Efektywność reakcji sprzęgania

W pierwszej kolejności przeprowadzono reakcje sprzęgania wybranej cząsteczki modelowej, jaką była H-D-Tyr-OMe z nośnikiem stałym CM *Sepharose*. CM *Sepharose* jest nośnikiem ziarnistym posiadającym na powierzchni wolne grupy karboksylowe, do których przy udziale EDC jako aktywatora przyłączono wiązaniem amidowym ligand mający wolną grupę aminową. Reakcje przeprowadzono w buforach do aktywacji i sprzęgania różniących się odczynem *pH* (modyfikując samodzielnie posiadany protokół [Nakajima i Ikada, 1995]) w celu znalezienia warunków sprzyjających najbardziej efektywnej immobilizacji (Tab. 1).

W przypadku, gdy zarówno bufor do aktywacji nośnika, jak i bufor do sprzęgania liganda miały *pH* 7,0, uzyskano najwyższą wydajność (73,5%). Z danych literaturowych wynika, że aktywacja grup karboksylowych najlepiej zachodzi przy *pH* lekko kwaśnym 6,0 [Pieper i in., 2000; Wissink i in., 2001], jednak wyniki badań uzyskane przez autorów niniejszej pracy tego nie potwierdzają, co wskazuje, iż dla każdej pary nośnik ligand należy indywidualnie dobrać warunki sprzęgania, aby uzyskać możliwie najwyższą wydajność.

Hydroliza wiązania aminokwas-nośnik

Hydrolizę utworzonego wiązania ligand (aminokwas)-nośnik prowadzono z wykorzystaniem różnych enzymów proteolitycznych (Tab. 2). Wg bazy MEROPS dobrane proteazy posiadają specyficzność hydrolizy wiązania peptydowego w pozycji P1', niemniej problemem może być, że posiadają one niewielką aktywność egzo-peptydazową.

W przypadku zastosowania takich enzymów jak termolizyna i proteaza z *B. licheniformis* (subtylizyna), nie zaobserwowano zajścia reakcji hydrolizy. Niewielki, aczkolwiek widoczny postęp hydrolizy odnotowano, gdy użyto enzymów α-chymotrypsyny i proteazy z *Rhizopus sp.* (Tab. 3). Po 24 godzinach prowadzenia procesu hydrolizy dodano drugą porcję odpowiedniego enzymu w stężeniu 2,0 g·L⁻¹. W przypadku reakcji z α-chymotrypsyną zaobserwowano wzrost stopnia hydrolizy o blisko 0,6 punktu procentowego, podczas gdy stopień hydrolizy po trawieniu proteazą z *Rhizopus sp.* nie uległ zmianie.

Tab. 3. Wydajności reakcji hydrolizy wiązania aminokwas-nośnik uzyskane dla enzymów α-chymotrypsyna i proteaza z *Rhizopus sp.*

Enzym	Czas hydrolizy [h]	Stopień hydrolizy [%]
α-chymotrypsyna	1,5	0,122
	3,5	0,130
	24	0,146
	48	0,723
Proteaza z <i>Rhizopus sp.</i>	1,5	0,194
	3,5	0,196
	24	0,295
	48	0,295

Wyniki uzyskane dla chymotrypsyny można zinterpretować następująco: enzym posiada zdolność dyfundowania do powierzchni nośnika w celu hydrolizy wiązania pomiędzy nim a aminokwasem. Reakcja ta przebiega w reżimie mieszanym, ponieważ z jednej strony efektywność całego procesu jest znacznie niższa aniżeli w reaktorze mieszalnikowym (co spowodowane jest oporami dyfuzji zewnętrznej) a równocześnie wzrost stężenia enzymu podnosi znacząco (nieliniowo) stopień hydrolizy.

Analogicznego zjawiska nie zaobserwowano dla proteazy z *Rhizopus sp.*, co świadczy, że dyfuzja zewnętrzna jest czynnikiem dominującym w procesie i na tyle silnym, że po hydrolizie wiązań łatwiej dostępnych proces zostaje zatrzymany i w konsekwencji jego wydajność jest bardzo niska.

Hydroliza przyłączonych peptydów

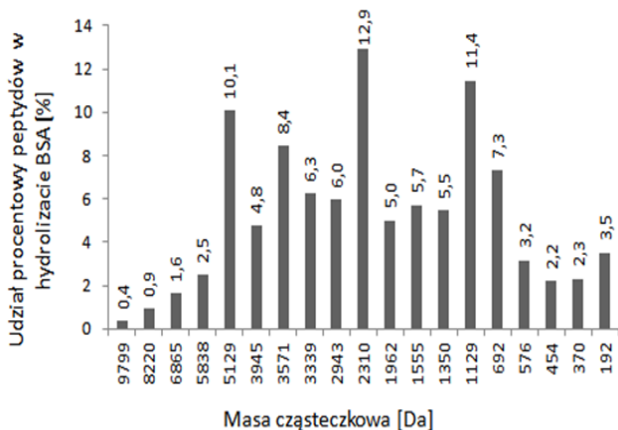
W przypadku eksperymentów mających na celu sprawdzenie przebiegu hydrolizy immobilizowanych na nośniku stałym peptydów, w pierwszej kolejności przeprowadzono reakcję hydrolizy wołowej albuminy serum z udziałem enzymu termolizyna. Uzyskany po 48 h rozkład peptydów pokazano na rys. 2. Wynika z niego, iż w procesie enzymatycznej degradacji BSA powstaje szeroki wachlarz peptydów o masach od ok. 10 kDa do ok. 0,2 kDa (masa pojedynczych aminokwasów). Hydrolizat albuminy serum był następnie substratem do reakcji sprzęgania z nośnikiem stałym CM *Sepharose*. Wydajność tego procesu wyniosła 88,0 %.

W kolejnym kroku przeprowadzono hydrolizę peptydów na nośniku, wykorzystując jako biokatalizator proteazę z *B. licheniformis* (subtylizynę), który to enzym charakteryzuje się szeroką specyficznością substratową. Skład uzyskanych hydrolizatów przedstawiono na rys. 3. Jak widać, skład jakościowy próby różni się od składu roztworu podawanego do przyłączenia z nośnikiem. Częsteczki te (Rys. 3) powstały najprawdopodobniej przez odcinanie od dłuższych łańcuchów, do których enzym miał dogodny dostęp. Z tego też względu w hydrolizacie nie ma fragmentów o masie większej niż 5,5 kDa i mniejszych niż 0,2 kDa. Z bilansu masy wynika, iż uwolnione zostało 77,2 % masy immobilizowanych peptydów. Częsteczki, które pozostały przyłączone do nośnika to takie, do których enzym nie dotarł ze względu na opory sferyczne.

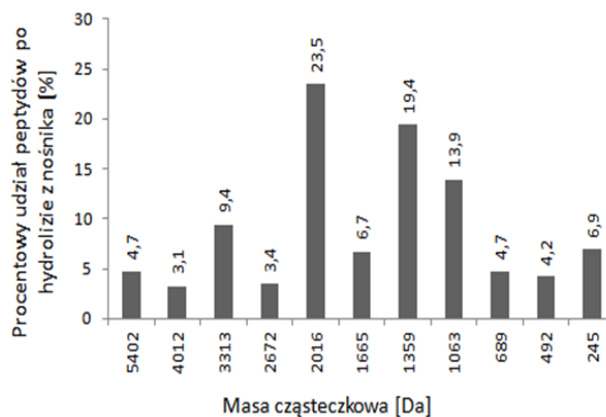
Wnioski

Badania przedstawione w niniejszej pracy stanowią wstęp do dalszych badań nad zagadnieniem koniugatów substancji biologicznie czynnych i nośników stałych, które w przyszłości mogą zostać wykorzystane jako rezerwuary leków do kontrolowanego uwalniania przykładowo w terapii antynowotworowej.

Pomimo, iż sprzęganie różnych ligandów z nośnikami jest dość szeroko opisane w literaturze, wyniki badań własnych pokazały potrzebę optymalizacji warunków prowadzenia tego procesu dla danego układu ligand-nośnik.



Rys. 2. Rozkład mas cząsteczkowych peptydów uzyskanych w procesie hydrolizy albuminy serum (BSA) z udziałem termolizyny, będących następnie substratem reakcji sprzęgania z nośnikiem stałym.



Rys. 3. Rozkład mas cząsteczkowych dla fragmentów uzyskanych w wyniku hydrolizy peptydów immobilizowanych na nośniku CM *Sepharose* z udziałem enzymu subtylizyny jako aktywatora.

Hydroliza wiązania amidowego między cząsteczką aminokwasu a nośnikiem stałym z udziałem proteazy jest silnie ograniczona przez dostępność enzymu do unieruchomionego substratu. Istnieje potrzeba dobrania łącznika oddalającego uwalnianą cząsteczkę od powierzchni nośnika. Potrzebę tę potwierdzają wyniki uzyskane dla hydrolizy dłuższych peptydów immobilizowanych na nośniku stałym. Osiągnięty znacznie wyższy stopień hydrolizy świadczy o lepszej dostępności enzymu do takiego substratu.

LITERATURA

- Dumoulin Y., Cartilier L.H., Mateescu M.A., 1999. Cross-linked amylose tablets containing α -amylase: an enzymatically-controlled drug release system. *J. Control. Release*, **60**, 161-167. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00065-6
- Nakajima N., Ikada Y., 1995. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 123-130. DOI: 10.1021/bc00031a015
- Pieper J.S., Hafmans T., Veerkamp J.H., van Kuppevelt T.H., 2000. Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects. *Biomaterials*, **21**, 581-93. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00222-7
- Trusek-Holownia A., Jaworska P., 2014. Polymeric drug carriers - Control of the daily dose and therapy duration. *Biocybern. Biomed. Eng.* (on-line version). DOI: 10.1016/j.bbe.2014.11.001
- Vilar G., Tulla-Puche J., Albericio F., 2012. Polymers and drug delivery systems. *Curr. Drug Deliv.*, **9**, 367-94. DOI: 10.2174/156720112801323053
- Wissink M.J.B., Beermink R., Pieper J.S., Poot A.A., Engbers G.H.M., Beugeling T., van Aken W.G., Feijen J., 2001. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation. *Biomaterials*, **22**, 151-163. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00164-2

Praca była finansowana przez Narodowe Centrum Nauki jako projekt nr 2013/11/B/ST8/03672.

Prezentacja wyników podczas XII Ogólnokrajowej Konferencji Naukowej "Postępy Inżynierii Bioreaktorowej" finansowana ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii.