



(51) МПК
C12N 9/36 (2006.01)
C12N 11/10 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 9/2462 (2019.05); *C12N 11/10* (2019.05); *G01N 11/10* (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018121112, 07.06.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 07.06.2018

Дата регистрации:
 17.07.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.06.2018

(45) Опубликовано: 17.07.2019 Бюл. № 20

Адрес для переписки:

105005, Москва, ул. 2-я Бауманская, 5, стр. 1,
 МГТУ им. Н.Э. Баумана, ЦЗИС, для Нелюба
 (МИЦ КМ)

(72) Автор(ы):

Левашов Павел Андреевич (RU),
 Адамова Ирина Юрьевна (RU),
 Матолыгина Дарья Андреевна (RU),
 Овчинникова Екатерина Дмитриевна (RU),
 Нелюб Владимир Александрович (RU),
 Буянов Иван Андреевич (RU),
 Чуднов Илья Владимирович (RU),
 Бородулин Алексей Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Московский государственный
 технический университет имени Н.Э.
 Баумана (национальный исследовательский
 университет)" (МГТУ им. Н.Э. Баумана) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: Левашов П.А. и др. "СИНТЕЗ
 АФФИННЫХ СОРБЕНТОВ С
 ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ
 СИНТЕТИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ ДЛЯ
 ПРОЦЕДУР ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО
 АФЕРЕЗА", Биомедицинская химия, т.56(6),
 2010, 739-746. Dekina S. S et al.
 "MUCOADHESIVE GEL WITH
 IMMOBILIZED LYSOZYME: PREPARATION
 AND PROPERTIES", Biotechnologia Acta, 2015,
 Vol.8, No. 3, p.104-109. CN 106589202 A, (см.
 прод.)

(54) Способ ковалентной иммобилизации лизоцима для последующего применения иммобилизованного лизоцима для снижения бактериальной обсемененности биологических жидкостей

(57) Реферат:

Изобретение относится к технологиям производства и использования сорбентов, применяемых в том числе для медицинских целей, а именно для экстракорпоральной терапии больных с сепсисом с использованием сорбции биологических жидкостей. Задача изобретения: расширение ассортимента способов эффективного

получения и антибактериального применения в составе сорбента ковалентно иммобилизованного лизоцима с отсутствием риска утечки лизоцима в биожидкость (водный раствор, в том числе физраствор, а также плазму крови и цельную кровь (с учетом гемосовместимости сорбента)). Задача решается предлагаемым способом

RU 2 694 883 С1

RU 2 694 883 С1

R U 2 6 9 4 8 8 3 C 1

R U 2 6 9 4 8 8 3 C 1

ковалентной иммобилизации лизоцима на аминированную агарозную матрицу, а именно: иммобилизация лизоцима на аминированную агарозную матрицу с получением молекулярного спейсера $-\text{NH-C}_6\text{H}_{12}-\text{NH-C}_5\text{H}_{10}-\text{NH}-$, присоединяющего молекулу лизоцима. В качестве матрицы гемосовместимого сорбента используют промышленно выпускаемые макропористые агарозные матрицы марок Sepharose (Сепароза) (производитель GE Healthcare, США) и WorkBeads

(WB) 200 Sec (производитель Bio-Works, Швеция). Иммобилизованный лизоцим в составе полученного сорбента с отсутствием риска утечки лизоцима применяют для снижения бактериальной обсемененности биологических жидкостей посредством лизиса бактериальных клеток с наблюдением результатов лизиса двумя путями: статически со слежением падения оптической плотности или динамически в протоке на сорбционной колонке. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 4 ил., 9 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

26.04.2017. SU 220920 A1, 01.07.1968. SU 1622398 A1, 23.01.1991. SU 1690767 A1, 15.11.1991. RU 17000 U1, 10.03.2001.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 9/2462 (2019.05); *C12N 11/10* (2019.05); *G01N 11/10* (2019.05)

(21)(22) Application: 2018121112, 07.06.2018

(24) Effective date for property rights:
07.06.2018

Registration date:
17.07.2019

Priority:

(22) Date of filing: 07.06.2018

(45) Date of publication: 17.07.2019 Bull. № 20

Mail address:

105005, Moskva, ul. 2-ya Baumanskaya, 5, str. 1,
MGTU im. N.E. Baumana, TSZIS, dlya Nelyuba
(MITS KM)

(72) Inventor(s):

Levashov Pavel Andreevich (RU),
Adamova Irina Yurevna (RU),
Matolygina Darya Andreevna (RU),
Ovchinnikova Ekaterina Dmitrievna (RU),
Nelyub Vladimir Aleksandrovich (RU),
Buyanov Ivan Andreevich (RU),
Chudnov Ilya Vladimirovich (RU),
Borodulin Aleksej Sergeevich (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
tekhnicheskij universitet imeni N.E. Baumana
(natsionalnyj issledovatelskij universitet)"
(MGTU im. N.E. Baumana) (RU)

C1

(54) METHOD OF LYSOCYME COVALENT IMMOBILIZATION FOR SUBSEQUENT APPLICATION OF
IMMOBILIZED LYSOZYME TO REDUCE BACTERIAL POPULATION OF BIOLOGICAL FLUIDS

3
8
8
4
8
2
6
9
4
8
U
R

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to technologies for production and use of sorbents used for medical purposes, namely for extracorporeal therapy of patients with sepsis using biological liquids sorption. Objective of invention is to widen the range of methods for efficient preparation and antibacterial application in composition of sorbent covalently immobilized lysozyme with no risk of lysozyme leakage into bioliquid (aqueous solution, including saline solution, as well as blood plasma and whole blood (taking into account sorbent hemocompatibility)). Objective is solved by the proposed method of lysocyme covalent immobilization on an aminated agarose matrix, namely: lysocyme immobilization on an aminated agarose matrix

to obtain a molecular spacer -NH-C₆H₁₂-NH-C₅H₁₀-NH-, attaching a lysocyme molecule. Matrix of hemocompatible sorbent used is commercially available macroporous agarose matrices Sepharose (manufactured by GE Healthcare, USA) and WorkBeads (WB) 200 Sec (manufactured by Bio-Works, Sweden).

EFFECT: immobilized lysozyme in the composition of the obtained sorbent with no risk of lysozyme leakage is used to reduce bacterial contamination of biological fluids by lysing bacterial cells with observing the lysis results in two ways: statically tracking the optical density drop or dynamically in the flow on the sorption column.

3 cl, 4 dwg, 9 tbl, 1 ex

R
U
2
6
9
4
8
8
3

C1

Область техники

Изобретение относится к технологиям производства и использования сорбентов, применяемых в том числе для медицинских целей, а именно для экстракорпоральной терапии больных с сепсисом с использованием сорбции биологических жидкостей.

5 Уровень техники

Получение и использование препаратов иммобилизованного лизоцима является важной задачей, расширяющей спектр медицинского и биотехнологического применения данного самого коммерчески распространенного фермента.

Один из существующих вариантов иммобилизации лизоцима - это нековалентное

10 включение фермента в криогель поливинилового спирта на стадии изготовления геля в процессе циклического многократного замораживания-оттаивания

(ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЛИЗОЦИМА В КРИОГЕЛЬ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА.

Декина С.С., Романовская И.И., Овсепян А.М., Молодая А.Л., Пашкин И.И. // Biotechnol. Acta. 2014. V.7. No 3. P.69) В данном варианте лизоцим сохраняет бактериолитическую

15 активность и проявляет хорошую стабильность в работе и хранении. Кроме того иммобилизованный таким образом лизоцим характеризуется расширенным рН-профилем активности, существенно отличным от такового для растворимого фермента. Расширение рН-профиля активности является положительным моментом в плане дополнительного расширения спектра условий применимости лизоцима. Активность

20 данного варианта иммобилизованного лизоцима была проверена на кишечной палочке (Escherichia coli), золотистом стафилококке (Staphylococcus aureus) синегнойной палочке (Pseudomonas aeruginosa).

Однако, у лизоцима, нековалентно иммобилизованного в криогеле поливинилового спирта, есть ограничения по сферам применения, особенно в медицине, так как в этом

25 варианте иммобилизации присутствует фактор утечки фермента из геля.

Ещё один вариант иммобилизации лизоцима - это включение белка в нанопоры наночастиц силикагеля (Kao K.-Ch., Lin T.-S., Moi Ch.-Y. // J. Phys. Chem. C. 2014. V. 118. P. 6734). Было показано, что при такой иммобилизации несколько возрастала активность и заметно улучшалась стабильность активности лизоцима.

30 Однако следует отметить, что данный вариант иммобилизации также является нековалентным присоединением и соответственно предполагает утечку белка с частиц. Кроме того, использование данного материала для лизиса целых клеток микроорганизмов может оказаться весьма проблематично ввиду стерической недоступности фермента в наноразмерных порах.

35 Лизоцим можно иммобилизовывать как нековалентно так и ковалентно на хитине и хитозане (Jiang S.S., Qin Ya., Yang J., Li M., Xiong L., Sun Q.J. // Food Chem. 2017. V.221. P. 1507; Lian Z.X., Ma Zh.S., Wei J., Liu H. // Proc. Biochem. 2012. V.47. P. 201; патент Китая CN106519271 (A) METHOD FOR PREPARING ANTIBACTERIAL MEMBRANE BY N-SUCCINYL-CHITOSAN IMMOBILIZED LYSOZYME (Опубликовано: 2017-03-22)).

40 Показано, что активность нековалентно иммобилизованного на хитине лизоцима в полтора раза выше, чем у нативного лизоцима, если сравнивать их действие на клетки *Micrococcus luteus*. Нековалентно и ковалентно иммобилизованный на хитозане лизоцим демонстрирует стабильную активность в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

45 В качестве недостатка препаратов на основе хитина и хитозана следует отметить то, что природное сырьё хитин и хитозан может сильно различаться в зависимости от способов получения и источников, что может негативно сказаться на практическом применении данных материалов в медицине.

Существует способ приготовления лизоцима, ковалентно иммобилизованного на полистироле (Wu Y., Daeschel M.A. // J. Food Sci. 2007. V.72. Nr.9 P.M369). В этом методе применяются подходы из твердофазного синтеза пептидов. Используют хлорметил-полистирол, на который прививают ϵ -аминокапроновую кислоту с

- 5 третбутилоксикарбонильной защитой, затем переводят аминогруппу в бромацетил производное с последующим присоединением единственного гистидина лизоцима (His-15). Полученный иммобилизованный лизоцим обладает хорошей стабильностью, проявляя около 15% активности от исходного растворимого лизоцима при действии на клетки *Micrococcus luteus*. Сниженная активность вероятно является следствием 10 стерической ограниченной доступности лизоцима для клеток. Из плюсов способа следует отметить точную направленную иммобилизацию и отсутствие побочных продуктов с неустановленной структурой.

Из минусов способа можно отметить высокую стоимость исходных материалов и сложность схемы синтеза, что однозначно станет препятствием для широкого 15 практического применения.

Также в ходе патентного поиска были найдены несколько патентов про способы иммобилизации лизоцима.

Патент RU2569510 СОРБЕНТ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИЙ СОБОЙ НАНОАЛМАЗНЫЙ МАТЕРИАЛ (ВАРИАНТЫ), СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ 20 (Опубликовано: 27.11.2015 Бюл. № 33). Сорбенты на основе наноалмазов могут быть использованы для иммобилизации или удаления вирусов, специфических антител, иммуносорбции, в диагностических целях, для дезактивации и удаления вирусов из внешней среды. Сорбенты из наноалмазов содержащих материалов получают в результате детонационного синтеза и модификации. Поверхность детонационных наноалмазов 25 подвергают целенаправленному изменению путем модифицирования химически активными жидкими и газообразными веществами при повышенных температурах. В результате модифицирования состав поверхностных радикалов, содержащих атомы неуглеродной природы (O, H, N, S), пополняется дополнительными атомами, что приводит к появлению дополнительных аналогичных или новых функциональных 30 групп, способных образовывать связи с функциональными группами биологических объектов. Изобретение обеспечивает возможность удаления широкого спектра белковых материалов с помощью полученных сорбентов из различных биологических жидкостей.

Однако, наноалмазы в медицинских экстракорпоральных процедурах не используются, лизоцим привязан нековалентно и поэтому не исключена утечка.

35 Патент Китая CN106589202 (A) LYSOZYME IMMOBILIZED CARRIER AND PREPARATION METHOD THEREOF (Опубликовано: 2017-04-26). Изобретение относится к матрице (носителю) иммобилизованного лизоцима и способу получения, относящемуся к области иммобилизации фермента. В изобретении применяется экологически безопасный технологический процесс сусpenзионной полимеризации с использованием 40 метилакрилата в качестве основного сырья, дивинилбензола в качестве сшивющего агента, регулирующего структуру смолы путем добавления третьего мономерного стирола для увеличения механической прочности носителя, макропористый носитель лизоцима был приготовлен в присутствии реагента, а гидролиз слабокислой макропористой катионообменной смолы был получен с получением ферментного 45 носителя. В конце отверженный лизоцим получали взаимодействием смолы, глутаральдегида и лизоцима. Активность иммобилизованного лизоцима составляла от 3000 до 5000 мкг / г.

Однако, для данного материала не была показана гемосовместимость.

Таким образом иммобилизованный лизоцим в составе сорбентов может быть получен различными способами и способен проявлять эффективность действия в составе самых разных материалов. Однако, для медицинских целей, а именно для методов экстракорпоральной терапии, следует в первую очередь рассматривать способы

5 ковалентной иммобилизации, так как они минимизируют риск утечки лиганда. При выборе матрицы следует ориентироваться на варианты, совместимые с плазмой и цельной кровью. При выборе способа получения практический приоритет имеют более простые схемы синтеза без использования дорогостоящих или токсичных реагентов.

Также актуальна задача сохранения антибактериальной активности лизоцима при 10 его иммобилизации в матрице сорбента. По этой задаче также найден ряд публикаций патентов, а именно:

Патент RU2476205 КОМПОЗИЦИЯ С ПРОТИВОИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ (Опубликовано: 27.02.2013 Бюл. № 6). Изобретение относится к области медицины и фармацевтической промышленности и представляет собой 15 композицию с противоинфекционной активностью, представляющую собой сбалансированный комплекс, включающий пробиотический агент, адсорбент и вспомогательную добавку. В качестве адсорбента - цеолит, в том числе с лизоцимом. Изобретение обеспечивает высокую эффективность и универсальность в отношении опасных инфекций бактериальной и вирусной этиологии, является безопасным и 20 стабильным при хранении.

Однако, для экстракорпоральной терапии людей лизоцим, сорбированный на цеолите (с возможностью утечки белка), - это непригодная-система.

Патент Китая CN106519271 (A) METHOD FOR PREPARING ANTIBACTERIAL MEMBRANE BY N-SUCCINYL-CHITOSAN IMMOBILIZED LYSOZYME (Опубликовано: 25 2017-03-22). Изобретение раскрывает способ получения антибактериальной мембраны путем иммобилизации N-сукцинил-хитозан (NSC) с лизоцимом, в частности, для разработки естественной бактериостатической мембраны с сильной водорастворимостью. NSC получали путем сукцинилирования хитозана, карбоксильную группу NSC активировали, затем ковалентно связывали с лизоцимом и, наконец, 30 антибактериальную мембрану готовили методом сквозной перегонки. Способ прост и удобен в работе, а подготовленная мембрана обладает сильной антибактериальной активностью против бактерий *Staphylococcus aureus* и *Listeria*.

Однако, свойства природного полимер хитозана могут сильно варьироваться и плохо поддаются стандартизации, что может послужить проблемой для медицинского 35 использования

Общим недостатком всех вышеуказанных способов является отсутствие показанной гемо-совместимости сорбента с ковалентно иммобилизованным лизоцимом.

Раскрытие изобретения

Задачей изобретения было расширение ассортимента способов эффективного 40 получения и антибактериального применения в составе сорбента ковалентно иммобилизованного лизоцима с отсутствием риска утечки лизоцима (невнесение никаких дополнительных веществ) в сорбирующую биологическую жидкость (водный раствор, в том числе физраствор, а также плазма крови и цельная кровь (с учетом гемосовместимости сорбента)). Возможна адаптация способа и к другим биологическим 45 жидкостям.

Задача решается предлагаемым способом ковалентной иммобилизации лизоцима на аминированную агарозную матрицу, а именно: иммобилизация лизоцима на аминированную агарозную матрицу с получением молекулярного спейсера

-NH-C₆H₁₂-NH-C₅H₁₀-NH-, присоединяющего молекулу лизоцима.

Для аминирования агарозной матрицы ее промывали 10-тью объемами дистиллированной воды на стеклянном фильтре, присоединённом к водоструйному насосу с помощью колбы Бунзена. К навеске геля добавляли двукратное количество 2% водного раствора периода натрия и инкубировали 2 часа на качалке при 20°C. После инкубации матрицу промывали 20-кратным объемом дистиллированной воды. К матрице, активированной периодатом натрия, добавляли однократный объем 2М раствора 1,6-диаминогексана и инкубировали 2 часа на качалке при 25°C. Затем добавляли 2-кратный объем свежеприготовленного 0,5% (по весу) раствора натрия боргидрида натрия и инкубировали 30 минут при перемешивании. Обработку боргидридом повторяли дважды. Далее промывали гель 5-кратным объемом 1 М раствора NaCl и 20-кратным объемом дистиллированной воды.

Затем к 10 мл 50% суспензии аминированной матрицы в буферной смеси 30 mM NaHCO₃-NaOH, pH=10,0 добавляли 0,56 мл 25% раствора глутарового альдегида и перемешивали в течение 30 мин на качалке при 25°C. Далее гель промывали 50 мл буферного раствора 30 mM NaHCO₃-NaOH, pH=10,0 и смешивали с 10 мл раствора лизоцима в том же буферном растворе (концентрация лизоцима 7,5 мг/мл). Смесь инкубировали 1 час на качалке при 25°C. Полученный сорбент обрабатывали 10 мл 0,5% (по весу) водного раствора боргидрида натрия дважды. Время каждой инкубации с раствором боргидрида натрия составляло 20 мин. После блокировки сорбент промывали 200 мл дистиллированной воды. Выход на стадии иммобилизации лизоцима для всех образцов составил не менее 98%.

В качестве матрицы сорбента использовали промышленно выпускаемые макропористые агарозные матрицы марок Sepharose (Сепароза) (производитель GE Healthcare, США) и WorkBeads (WB) 200 Sec (производитель Bio-Works, Швеция) (прим.: в настоящий момент максимальный опыт использования в клинической медицинской практике накоплен для сорбентов на основе агарозных матриц).

В плане проверок антибактериального использования иммобилизованный лизоцим в составе полученного сорбента с отсутствием риска утечки лизоцима (невнесения никаких дополнительных веществ в обрабатываемую (фильтруемую) биологическую жидкость) применяют для снижения бактериальной обсемененности биологических жидкостей посредством лизиса бактериальных клеток с наблюдением результатов лизиса двумя путями: статически со слежением падения оптической плотности или динамически в протоке на сорбционной колонке.

Перечень рисунков

Рис. 1 - Схема приготовления аминированной матрицы и затем ковалентная иммобилизация (присоединение к матрице) лизоцима через молекулярный спейсер.

Рис. 2 - кинетические кривые лизиса клеток *Escherichia coli* (E.coli) для различных количеств геля с иммобилизованным лизоцимом (изменение оптического поглощения во времени при инкубации E.coli с различным количеством препарата иммобилизованного лизоцима).

Рис. 3 - зависимость скорости лизиса *Escherichia coli* от количества сорбента (количества препарата иммобилизованного лизоцима).

Рис. 4 - калибровочная кривая для растворимого лизоцима (зависимость скорости лизиса *Escherichia coli* от концентрации свободного лизоцима).

Осуществление изобретения

На рис. 1 представлена схема приготовления аминированной матрицы и затем

ковалентная иммобилизация (присоединение к матрице) лизоцима через спейсер. Большую роль в повышении эффективности действия иммобилизованного лизоцима играет применение молекулярного спейсера (для устранения стерических препятствий присоединению макромолекулярных лигандов (лизоцима) между ними и матрицей 5 бывает необходимо ввести молекулу спейсера). Наиболее перспективный вариант иммобилизованного лизоцима получен ковалентным присоединением фермента к матрице через связь спейсер $-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_{12}-\text{NH}-\text{C}_5\text{H}_{10}-\text{NH}-$. Иммобилизованный лизоцим такого типа обладает бактериолитической активностью как по отношению 10 грамотрицательных, так и по отношению к грамположительным бактериям. Выбранный вариант иммобилизованного лизоцима способен лизировать клетки *Escherichia coli* в более расширенном диапазоне значений pH по сравнению с растворимой формой фермента. При этом препарат стабилен в хранении.

Сорбенты, полученные на матрице, активированной периодатом натрия без использования молекулярного спейсера, независимо от типа матрицы имеют 15 существенно сниженную активность в отношении грамположительных бактерий *Micrococcus luteus*. При введении молекулярного спейсера путем введения фрагмента $-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_{12}-\text{NH}-$ и последующей конденсации с глутаровым альдегидом с получением соединяющей молекулярной структуры $-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_{12}-\text{NH}-\text{C}_5\text{H}_{10}-\text{NH}-$, у лизоцима заметно 20 повышается способность к лизису как грамположительных бактерий так и грамотрицательных бактерий. Наличие более высокой активности по отношению к грамотрицательным бактериям у лизоцима, иммобилизованного с применением молекулярного спейсера, является очень важным моментом, так как при сепсисе часто 25 ключевую роль играют грамотрицательные бактерии.

Пример способа получения сорбента.

Одна из наиболее удобных матриц - это вариант сшитой агарозы, для которого изначально коммерчески доступны гемосовместимые матрицы, для которых на стадии производства можно варьировать размеры и форму гранул, размеры их внутренних пор. Примером подобной потенциально гемосовместимой агарозной матрицы может 30 служить материал WorkBeads компании Bio-Works (Швеция) или его ближайшие аналоги. Препарат самого лизоцима был промышленного производства компании Sigma (США).

Для получения сорбента на основе агарозной матрицы с иммобилизованным лизоцимом предлагаемым способом вначале для аминирования агарозной матрицы ее 35 промывали 10-тью объемами дистиллированной воды на стеклянном фильтре, добавляли двукратное количество 2% водного раствора периодата натрия и инкубировали 2 часа на качалке при 20°C. После инкубации матрицу промывали 20-кратным объемом дистиллированной воды. К матрице, активированной периодатом натрия, добавляли однократный объем 2M раствора 1,6-диаминогексана и инкубировали 40 2 часа на качалке при 25°C.

Затем добавляли 2-кратный объем свежеприготовленного 0,5% (по весу) раствора натрия боргидрида натрия и инкубировали 30 минут при перемешивании. Обработку боргидридом повторяли дважды. Далее промывали гель 5-кратным объемом 1 M раствора NaCl и 20-кратным объемом дистиллированной воды. Затем к 10 мл 50% 45 супензии аминированной матрицы в буферной смеси 30 mM NaHCO₃-NaOH, pH=10,0 добавляли 0,56 мл 25% раствора глутарового альдегида и перемешивали в течение 30 мин на качалке при 25°C. Затем гель промывали 50 мл буферного раствора 30 mM NaHCO₃-NaOH, pH=10,0 и смешивали с 10 мл раствора лизоцима в том же буферном

растворе (концентрация лизоцима 7,5 мг/мл). Смесь инкубировали 1 час на качалке при 25°C. Полученный сорбент обрабатывали 10 мл 0,5% (по весу) водного раствора боргидрида натрия дважды. Время каждой инкубации с раствором боргидрида натрия составляло 20 мин. После блокировки сорбент промывали 200 мл дистиллированной воды. Выход на стадии иммобилизации лизоцима для всех образцов составил не менее 98%.

Для доказательства, что лиганд иммобилизованного лизоцима не отваливается от матрицы (и потом не утекает из сорбента в биожидкость) получали смывы с гелей 10 препаратов иммобилизованного лизоцима. В колонку высотой 5 см и сечением 1 см² помещали 2 мл 50% суспензии сорбента. Далее исследовали лизис бактериальных клеток при добавлении полученного на выходе из колонки смыва. И далее собирали вытекший из колонки раствор и дополнительно промывали колонку буферной смесью. Собирали смыв с колонку до достижения суммарного объема жидкости 3 мл. В случае наличия утечки лиганда, смывы будут обладать бактериолитической активностью.

15 Бактериолитическая активность регистрируется уже при концентрации лизоцима 0,05 мкг в мл и более. Так как в смывах активности не обнаружено, то можно гарантировать, что концентрация лизоцима в смывах менее 0,05 мкг в мл. Весь смыв может содержать не более 3×0,05 мкг=0,15 мкг. Объем сорбента в этом испытании был 1 мл, иммобилизованного лизоцима было 15 мг (15000 мкг) на мл сорбента. Таким образом 20 в смыве не может быть лизоцима в количестве более 0,15/15000=0,00001 (одной стотысячной части) от иммобилизованного количества (или 0,001%).

Также были получены экспериментальные результаты проверки гемосовместимости (с кровью человека) синтезированного сорбента с иммобилизованным лизоцимом.

По методике проверки кровь доноров брали в пробирки 50 мл с предварительно 25 добавленным до конечной концентрации 2,5 Ед/мл гепарином. Колонку делали из носика 10 мл и фильтра 90 (133) мкм. Вносили 200 мкл сорбента, промывали 2 мл физиологического раствора, снизу надевали силиконовый шланг. Предобработку сорбента гепарином проводили после промывки физиологическим раствором из расчета 100 Ед гепарина на 1 мл сорбента, инкубация сорбента с 2-кратным объемом 30 физ. раствора с гепарином, RT, перемешивание, 10 мин. Хроматографию сорбента с 4 мл крови проводили при комнатной температуре, самотеком, время контакта от 20 до 30 минут. Кровь после хроматографии собирали в пробирку 15 мл. В качестве 35 отрицательного контроля использовалась колонка без сорбента. В кровь после колонки добавляли ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ, аликовтили по 1 мл и измеряли клетки в геманализаторе Elite3 Erba Mannheim (2-3 параллели). Сравнительные результаты представлены в таблицах 1-8 по эритроцитам, тромбоцитам, лимфоцитам, гемоглобину и гематокриту.

Общим выводом анализа результатов в таблицах является то, что синтезированный по предлагаемому способу сорбент с иммобилизованным лизоцимом совместим с 40 цельной кровью человека (гемосовместим).

Результаты проверки гемосовместимости полученного сорбента с ковалентно иммобилизованным лизоцимом

1. Эритроциты

Таблица 1. Кровь 1 - эритроциты

Сорбент	Эритроциты		Средний объем эритроцита		Среднее содержание гемоглобина в эритроците		Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах		Широта распределения популяции эритроцитов - стандартное отклонение		Широта распределения популяции эритроцитов по объему - коэффициент вариации	
	Кл/л (10 ¹²)	%	фл	%	пг	%	г/л	%	фл	%	%	% от контроля
Контроль	5,05	100,0	83,0	100,0	26,15	100,0	316,5	100,0	35,1	100,0	13,7	100,0
Сорбент с лизоцимом	5,06	100,2	82,5	99,4	25,85	98,9	312,5	98,7	36,3	103,4	13,9	101,5

Таблица 2. Кровь 2 - эритроциты.

Сорбент	Эритроциты		Средний объем эритроцита		Среднее содержание гемоглобина в эритроците		Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах		Широта распределения популяции эритроцитов - стандартное отклонение		Широта распределения популяции эритроцитов - коэффициент вариации	
	Кл/л (10 ¹²)	%	фл	%	пг	%	г/л	%	фл	%	%	% от контроля
Контроль	5,14	100,0	82,0	100,0	24,95	100,0	305,0	100,0	37,45	100,0	14,6	100,0
Сорбент с лизоцимом	4,98	96,9	81,5	99,4	25,20	101,0	309,5	101,5	36,3	96,9	14,3	101,5

2. Тромбоциты.

Таблица 3. Кровь 1 - тромбоциты.

Сорбент	Тромбоциты		Тромбокрит		Средний объем тромбоцитов		Количество больших тромбоцитов		Коэффициент больших тромбоцитов		Широта распределения популяции тромбоцитов - стандартное отклонение		Широта распределения популяции тромбоцитов - коэффициент вариации	
	Кл/л (10 ⁹)	%	%	% от контроля	фл	%	Кл/л (10 ⁹)	%	%	% от контроля	фл	%	%	% от контроля
Контроль	210,5	100,0	0,17	100,0	7,85	100,0	47,5	100,0	22,44	100,0	10,85	100,0	38,45	100,0
Сорбент с лизоцимом	112,0	53,2	0,09	51,5	7,75	98,7	23,5	49,5	20,988	93,5	10,1	93,1	37,65	97,9

Таблица 4. Кровь 2 - тромбоциты.

Сорбент	Тромбоциты		Тромбокрит		Средний объем тромбоцитов		Количество больших тромбоцитов		Коэффициент больших тромбоцитов		Широта распределения популяции тромбоцитов - стандартное отклонение		Широта распределения популяции тромбоцитов - коэффициент вариации	
	Кл/л (10 ⁹)	%	%	% от контроля	фл	%	Кл/л (10 ⁹)	%	%	% от контроля	фл	%	%	% от контроля
Контроль	16,35	100,0	0,12	100,0	7,25	100,0	27,0	100,0	16,59	100,0	8,6	100,0	35,65	100,0
Сорбент с лизоцимом	155,0	94,8	0,12	100,0	7,25	100,0	25,0	92,6	16,22	97,8	8,9	103,5	36,10	101,3

35

40

45

3. Лимфоциты

Таблица 5. Кровь 1 - лимфоциты.

Сорбент	Лейкоциты		Лимфоциты		Моноциты		Гранулоциты		% лимфоцитов		% моноцитов		% гранулоцитов		
	Кл/л (10 ⁹)	%	% от контроля												
Контроль	5,94	100,0	1,88	100,0	0,24	100,0	3,82	31,55	100,0	4,1	100,0	64,3	100,0		
Сорбент с лизоцимом	4,28	72,0	1,61	85,9	0,15	60,4	2,53	37,6	119,2	3,35	81,7	59,05	91,8		

Таблица 6. Кровь 2 - лимфоциты.

Сорбент	Лейкоциты		Лимфоциты		Моноциты		Гранулоциты		% лимфоцитов		% моноцитов		% гранулоцитов		
	Кл/л (10 ⁹)	%	% от контроля												
Контроль	5,35	100,0	1,25	100,0	0,55	100,0	3,55	23,40	100,0	10,25	100,0	66,40	100,0		
Сорбент с лизоцимом	4,38	97,0	1,00	79,6	0,43	78,0	2,95	22,70	97,0	9,80	95,6	67,45	101,6		

4. Гемоглобин, гематокрит.

Таблица 7. Кровь 1 – гемоглобин, гематокрит.

Сорбент	Гематокрит		Гемоглобин	
	%	% от контроля	г/л	% от контроля
Контроль	41,76	100,0	132,0	100,0
Сорбент с лизоцимом	41,84	100,2	130,5	98,9

Таблица 8. Кровь 2 – гемоглобин, гематокрит.

Сорбент	Гематокрит		Гемоглобин	
	%	% от контроля	г/л	% от контроля
Контроль	41,95	100,0	12,0	100,0
Сорбент с лизоцимом	40,46	96,5	125,0	96,5

Пример наблюдения результатов лизиса бактериальных клеток статически со слежением падения оптической плотности.

К 200 мкл 50% суспензии препарата иммобилизованного лизоцима или 200 мкл смыва с геля добавляли 900 мкл буферного раствора 0,02M Tris-HCl, pH=8,3 и 20-100 мкл суспензии бактериальных клеток (до достижения оптического поглощения 0,4).

Инкубировали смесь 5-20 мин на качалке при температуре 25°C. В качестве отрицательного контроля использовали суспензии матриц без иммобилизованного лизоцима, в качестве положительного контроля - раствор лизоцима в концентрации 10 мкг/мл. В надосадочном растворе после инкубации с препаратами иммобилизованного лизоцима определяли долю нелинизированных бактериальных клеток спектрофотометрически при длине волны 650-660 нм.

Были получены кинетические кривые лизиса клеток *Escherichia coli* для различных количеств геля с иммобилизованным лизоцимом (рис. 2). Скорость лизиса бактериальных клеток (оптических единиц поглощения в мин) определяли на начальных линейных участках полученных кривых. На рис. 3 представлена зависимость скорости лизиса *Escherichia coli* от количества сорбента (количества иммобилизованного фермента).

Количество иммобилизованного лизоцима определяли по разнице между добавленным количеством и количеством в надосадочной жидкости после процедуры иммобилизации. Концентрацию лизоцима определяли спектрофотометрически по оптическому поглощению раствора при длине волны 280 нм. Для определения доли активного (доступного для клеток) иммобилизованного лизоцима по отношению к общему количеству иммобилизованного фермента считали, что иммобилизованный лизоцим проявляет или не проявляет активность вследствие разной стерической доступности. Рассчитывали значения по калибровочной кривой (рис. 4) (активность от концентрации), полученной для стандартного раствора свободного лизоцима. По калибровочной кривой соотносили величину активности иммобилизованного лизоцима с количеством растворимого фермента, которое обеспечивает такую же активность. Исходя из общего количества иммобилизованного фермента, вычисляли долю фермента, обладающего активностью. По уравнению, описывающему калибровочную кривую на рис. 4,

расчитали количество активного иммобилизованного лизоцима, которое составило 37 ± 3 мкг на мл геля.

Пример наблюдения результата лизиса бактериальных клеток динамически в протоке на сорбционной колонке при физиологических значениях ионной силы и pH.

Проводили лизис бактериальных клеток сорбентом с иммобилизованным лизоцимом при пропускании препарата через колонку в протоке и при физиологических значениях ионной силы и pH. Использовали иммобилизованный лизоцим и суспензию клеток *Micrococcus lisodeikticus* (синоним *Micrococcus luteus*). Суспензия клеток этих бактерий обладает наиболее стабильными оптическими характеристиками во времени и наиболее удобна для проведения длительного эксперимента. Через колонку высотой 5 см и сечением $0,8 \text{ см}^2$ (объем геля 4 мл) многократно пропускали 10 мл суспензии клеток *Micrococcus lisodeikticus* в буферном растворе, содержащем 10мМ KH_2PO_4 , 0,9% NaCl , $\text{pH}=7,0$. Скорость потока составляла около 4 мл в мин. Суспензию клеток пропускали суммарно 12 раз через колонку, после 3-го, 6-го, 9-го и 12-го раза остатки суспензии вытесняли 4 мл буферной смесью ЗФР и измеряли оптическое поглощение суспензии при длине волны 660 нм и объем суспензии.

В таблице 9 представлены данные по способности иммобилизованного лизоцима лизировать клетки бактерий *Micrococcus lisodeikticus* в протоке. Исходную концентрацию клеток брали $2,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл в буферной смеси 10мМ KH_2PO_4 - NaOH , 0,9% NaCl , $\text{pH}=7$. Как видно из таблицы, иммобилизованный лизоцим способен лизировать бактериальные клетки в протоке и при физиологических значениях ионной силы и pH. После трехкратного пропускания суспензии клеток было лизировано 40% бактерий. Уровень лизированных клеток после 12 пропусканий составил 75%, то есть осталось 25% целых клеток от их исходного количества.

Таблица 9 - Изменение концентрации клеток *Micrococcus lisodeikticus* при пропускании бактериальной суспензии через колонку с иммобилизованным лизоцимом

Количество циклов	ОП660	V, мл	Падение ОП от исходной ОП (с учетом разведения), %	Концентрация бактерий, КОЕ/мл
Исходная суспензия	0,502	10	0	$2,5 \cdot 10^7$
3	0,216	14	40	$1,5 \cdot 10^7$
6	0,125	18	55	$1,1 \cdot 10^7$
9	0,07	22	69	$0,8 \cdot 10^7$
12	0,05	25	75	$0,6 \cdot 10^7$

Представленные экспериментальные данные подтверждают практическое решение задач изобретения. Результаты всех экспериментов показали достаточно высокую эффективность и доказали возможность расширения ассортимента способов эффективного получения и антибактериального применения в составе сорбента ковалентно иммобилизованного лизоцима с отсутствием риска утечки лизоцима в обрабатываемую (фильтруемую) биологическую жидкость, а также при этом подтверждена гемосовместимость сорбента.

Предлагаемый способ разработан в рамках выполнения работы по Соглашению №14.574.21.0181 между Министерством образования и науки Российской Федерации (Госзаказчик) и МГТУ им. Н.Э. Баумана.

(57) Формула изобретения

1. Способ химической ковалентной иммобилизации лизоцима, характеризующийся иммобилизацией лизоцима на агарозную аминированную матрицу с получением

молекулярного спейсера $-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_{12}-\text{NH}-\text{C}_5\text{H}_{10}-\text{NH}-$, присоединяющего молекулу лизоцима, а именно: для аминирования агарозной матрицы ее промывают 10 объемами дистиллированной воды; к навеске геля добавляют двукратное количество 2% водного раствора периодата натрия и инкубируют 2 часа на качалке при 20°C; после инкубации 5 матрицу промывают 20-кратным объемом дистиллированной воды; далее к матрице, активированной периодатом натрия, добавляют однократный объем 2M раствора 1,6-диаминогексана и инкубируют 2 часа на качалке при 25°C; затем добавляют 2-кратный объем свежеприготовленного 0,5% (по весу) раствора натрия боргидрида натрия и инкубируют 30 минут при перемешивании; обработку боргидридом повторяют дважды; 10 далее промывают гель 5-кратным объемом 1M раствора NaCl и 20-кратным объемом дистиллированной воды; а затем к 10 мл 50% суспензии аминированной матрицы в буферной смеси 30 mM NaHCO₃-NaOH, pH=10,0, добавляют 0,56 мл 25% раствора глютарового альдегида и перемешивают в течение 30 мин на качалке при 25°C; 15 полученный гель промывают 50 мл буферного раствора 30 mM NaHCO₃-NaOH, pH=10,0, и смешивают с 10 мл раствора лизоцима в том же буферном растворе (концентрация лизоцима 7,5 мг/мл); смесь инкубируют 1 час на качалке при 25°C; далее полученный сорбент обрабатывают 10 мл 0,5% (по весу) водного раствора боргидрида натрия дважды; время каждой инкубации с раствором боргидрида натрия составляет 20 минут; 20 затем после блокировки гемосовместимый сорбент промывают 200 мл дистиллированной воды, при этом выход на стадии иммобилизации лизоцима для всех образцов составляет не менее 98%.

2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве матрицы сорбента используют промышленно выпускаемые макропористые агарозные матрицы.

3. Способ снижения бактериальной обсемененности биологических жидкостей, 25 включающий иммобилизацию лизоцима способом по п. 1, и далее проводят лизис бактериальных клеток с наблюдением результатов лизиса двумя путями: статически со слежением падения оптической плотности или динамически в протоке на сорбционной колонке.

30

35

40

45

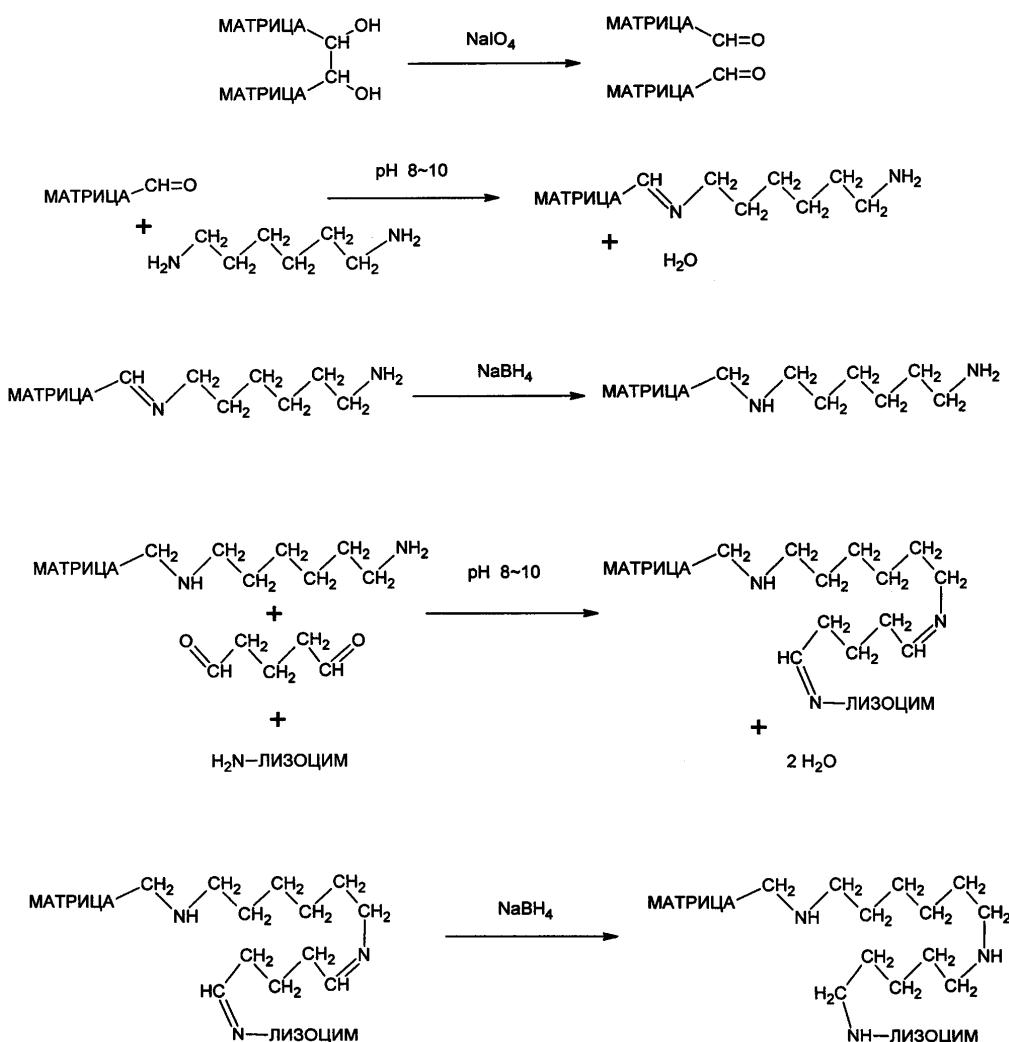


Рис.1

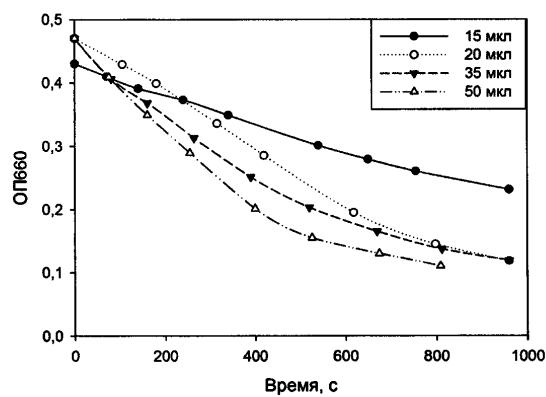


Рис.2

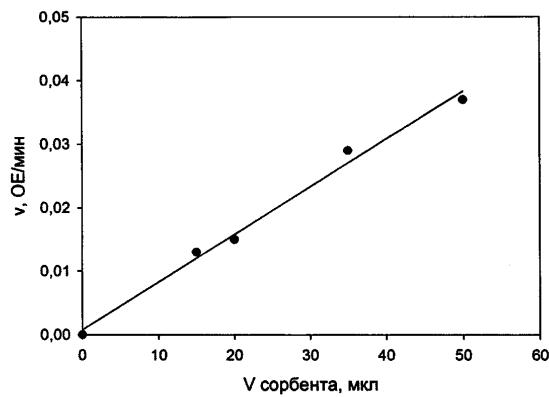


Рис.3

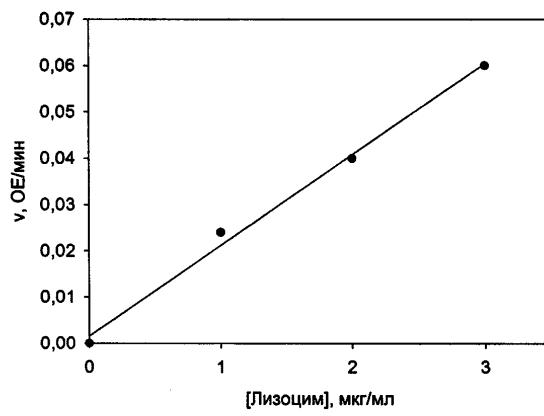


Рис.4