



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 9/2462 (2020.02); C12N 11/10 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019140897, 11.12.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.12.2019

Дата регистрации:
20.10.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.12.2019

(45) Опубликовано: 20.10.2020 Бюл. № 29

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Левашов Павел Андреевич (RU),
Адамова Ирина Юрьевна (RU),
Нелюб Владимир Александрович (RU),
Овчинникова Екатерина Дмитриевна (RU),
Бородулин Алексей Сергеевич (RU),
Матолыгина Дарья Андреевна (RU),
Алешина Наталия Васильевна (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: RU 2694883 C1, 17.07.2019. CN
0106589202 A, 26.04.2017. РОНЖИН Н.О. И
ДР. "Оценка активности лизоцима после его
ковалентной иммобилизации на наноалмазы
детонационного синтеза" // Вестник КрасГАУ
"Биологические науки", 2016, N 8, с.38-44.

(54) Способ сорбционного удаления целых патогенных бактериальных клеток из раствора с помощью автоклавированного иммобилизованного лизоцима

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен способ сорбционного удаления целых патогенных бактериальных клеток из биологической жидкости, включающий пропускание суспензии бактериальных клеток через колонку с сорбентом с аминированной макропористой полисахаридной матрицей с автоклавированным, ковалентно

иммобилизованным лизоцимом. Автоклавирование иммобилизованного лизоцима в составе сорбента осуществляют при температуре 121°C в течение 30 минут. Способ обеспечивает сорбционное удаление целых патогенных бактериальных клеток без их разрушения. 1 з.п. ф-лы, 2 ил., 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 9/2462 (2020.02); *C12N 11/10* (2020.02)(21)(22) Application: **2019140897**, 11.12.2019(24) Effective date for property rights:
11.12.2019Registration date:
20.10.2020

Priority:

(22) Date of filing: 11.12.2019

(45) Date of publication: 20.10.2020 Bull. № 29

Mail address:

105005, Moskva, ul. 2-ya Baumanskaya, 5, str. 1,
MG TU im. N.E. Bauman, TSIS, dlya Nelyuba
V.A. (MITS KM)

(72) Inventor(s):

Levashov Pavel Andreevich (RU),
Adamova Irina Yurevna (RU),
Nelyub Vladimir Aleksandrovich (RU),
Ovchinnikova Ekaterina Dmitrievna (RU),
Borodulin Aleksey Sergeevich (RU),
Matolygina Darya Andreevna (RU),
Aleshina Nataliya Vasilevna (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
tekhnicheskij universitet imeni N.E. Bauman
(natsionalnyj issledovatel'skij universitet)"
(MG TU im. N.E. Bauman) (RU)**(54) METHOD FOR SORPTION REMOVAL OF WHOLE PATHOGENIC BACTERIAL CELLS FROM SOLUTION USING AUTOCLAVED IMMOBILIZED LYSOZYME**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention relates to the biotechnology. Disclosed is a method for sorption removal of whole pathogenic bacterial cells from a biological fluid, involving passing a suspension of bacterial cells through a column with a sorbent with an aminated macroporous polysaccharide matrix with autoclaved, covalently immobilized lysozyme.

Autoclaving of the immobilized lysozyme in the sorbent composition is carried out at temperature of 121 °C for 30 minutes.

EFFECT: method provides sorption removal of whole pathogenic bacterial cells without their destruction.

1 cl, 2 dwg, 1 ex

Область техники

Изобретение относится к технологиям использования сорбентов, применяемых для медицинских целей, а именно сорбентов с ковалентно иммобилизованным лизоцимом для экстракорпоральной терапии больных с сепсисом с использованием сорбции биологических жидкостей (растворов), и является продолжением и развитием авторских изобретений в патентах RU2694883 и RU2684639.

Уровень техники

В патенте RU2694883 (Опубликовано: 17.07.2019 Бюл. №20) представлен авторский способ ковалентной иммобилизации лизоцима для последующего применения иммобилизованного лизоцима для снижения бактериальной обсемененности биологических жидкостей. В этом способе производят иммобилизацию лизоцима на аминированную агарозную матрицу с получением молекулярного спейсера $-NH-C_6H_{12}-NH-C_5H_{10}-NH-$, присоединяющего молекулу лизоцима. В качестве матрицы гемосовместимого сорбента используют промышленно выпускаемые макропористые агарозные матрицы марок Sepharose (Сефароза) (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.

В другом патенте RU2684639 (Опубликовано: 11.04.2019 Бюл. №11) представлен авторский сорбент с иммобилизованным лизоцимом в качестве лиганда в матрице гемосовместимого сорбента для удаления эндотоксинов из биологических жидкостей с отсутствием риска утечки лизоцима в сорбируемую биологическую жидкость (водный раствор, в том числе физиологический раствор, плазму крови и цельную кровь (с учетом гемосовместимости сорбента)). В статье П.А. Левашов, Д.А. Матолыгина, Е.Д. Овчинникова, И.Ю. Адамова, О.А. Дмитриева, А.В. Нуждина, Н.С. Покровский, Н.Л. Еремеев «Новый сорбент на основе ковалентно иммобилизованного лизоцима для удаления бактериального липополисахарида (эндотоксина) из биологических жидкостей» Биохимия (Москва) 84 (2019) стр. 33-39. <https://doi.org/10.1134/S0006297919010048> описан тот же сорбент, что и в патенте RU2684639.

Однако в этих авторских аналогах предлагаемого изобретения не было значимой операции автоклавирования иммобилизованного лизоцима в составе сорбента. Сорбируя патогенные бактериальные клетки из раствора, иммобилизованный лизоцим без автоклавирования, как бактериолитический фермент, будет разрушать эти клетки. В результате в растворе вместо целых бактерий будут оставаться потенциально токсичные продукты распада этих патогенных бактерий, что также крайне нежелательно в условиях экстракорпоральной терапии больных с сепсисом.

Раскрытие изобретения

Для предотвращения проявления ферментативной активности иммобилизованного лизоцима предлагается проавтоклавируют его при высокой температуре, чтобы нарушить структуру каталитического домена фермента лизоцима. После автоклавирования способность лизоцима связывать патогенные бактериальные клетки сохраняется, и поэтому бактериальные клетки из раствора будут удаляться сорбентом уже без разрушения, что является преимуществом обновленного сорбента с автоклавированным, иммобилизованным лизоцимом для его применения в медицинских целях.

Подготовку данного обновленного сорбента с предварительной иммобилизацией и автоклавированием лизоцима производят следующим образом. Полисахаридную

матрицу WorkBeads 200SEC (Bio-Works, Швеция) предварительно аминируют и промывают, используя воронку Бюхнера 20-кратным объемом дистиллированной воды, добавляют двукратный объем 2% раствора NaIC_4 . Далее смесь инкубируют при температуре 20°C в течение 2 часов на качалке; после инкубации гель промывают 20-кратным объемом дистиллированной воды. Далее добавляют один объем 2 М раствора 1,6-диаминогексана с последующей инкубацией смеси при температуре 20°C в течение 2 часов на качалке. Затем к полученному препарату добавляют два объема свежеприготовленного 0,5% водного раствора NaNH_4 и инкубируют в течение 30 минут при перемешивании. Затем добавляют еще одну порцию свежеприготовленного раствора NaNH_4 и смесь инкубируют еще 30 минут. Далее аминированную матрицу промывают 5-кратным объемом 1 М раствора NaCl и 10-кратным объемом буфера 30 мМ NaHCO_3 - NaOH , pH=10,0. К 4 мл 50% суспензии аминированной матрицы в буферной смеси 30 мМ NaHCO_3 - NaOH , pH=10,0 добавляют 0,23 мл 25% раствора глутарового альдегида и перемешивают в течение 30 мин на качалке при 25°C. Затем гель промывают 20 мл буферного раствора 30 мМ NaHCO_3 - NaOH , pH=10,0 и смешивают с 3 мл раствора лизоцима в том же буферном растворе (концентрация лизоцима 10 мг/мл). Инкубируют смесь 1 час на качалке при температуре 25°C. Полученный сорбент обрабатывают 4 мл 2% водного раствора боргидрида натрия дважды. Время каждой инкубации с раствором боргидрида натрия составляет 20 мин. Затем сорбент промывают 80 мл дистиллированной воды. И дополнительно проводят автоклавирование 50% суспензии сорбента в дистиллированной воде при температуре 121°C в течение 30 мин в автоклаве (например, в автоклаве марки Tuttnauer 2540МК (Израиль)).

На примерах распространенных патогенных бактериальных клеток *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* их удаление из раствора с помощью предлагаемого автоклавированного иммобилизованного лизоцима производят следующим образом.

Для проверки, что автоклавированный иммобилизованный лизоцим не разрушает целые патогенные бактериальные клетки, а только их сорбирует, проводят следующие действия. К гелю обновленного сорбента с автоклавированным иммобилизованным лизоцимом добавляют суспензию клеток *Micrococcus luteus* в буферном растворе 10 мМ Tris-MES- CH_3COOH , pH 7,5 (из расчета 30 мкл сорбента на мл суспензии клеток) и инкубируют на роторной качалке со скоростью 10 оборотов в мин при 37°C. Через определенные интервалы времени (7-10 мин) отбирают пробы по 2 мл и дают гелю сорбента осесть в течение 1 минуты (время оседания 30-40 с). Измеряют оптическую плотность надосадочной суспензии при длине волны 650 нм. В сорбенте с автоклавированным иммобилизованным лизоцимом происходит выход оптической плотности к некоторому порогу (границе), отвечающему заполнению поверхности сорбента связанными адсорбированными целыми патогенными бактериальными клетками, что свидетельствует о том, что автоклавированный иммобилизованный лизоцим не разрушает эти целые бактериальные клетки, а только их сорбирует. В случае неавтоклавированного иммобилизованного лизоцима не наблюдается выхода оптической плотности к пороговому значению, оптическая плотность продолжает падать, так как идет разрушение бактериальных клеток.

Эффективность удаления автоклавированным иммобилизованным лизоцимом бактериальных клеток из раствора определяют пропусканием суспензии клеток *Micrococcus luteus* или *Escherichia coli* через колонки с обновленным сорбентом. Через колонку высотой 1,25 см и поперечным сечением 0,8 см (объем геля 1 мл) пропускают 5 мл суспензии клеток со скоростью 0,5 мл/мин при температуре 25°C. Раствор

вытесняют 5 мл буферного раствора или плазмы крови человека. Измеряют оптическую плотность надосадочной суспензии при длине волны 650 нм. Количество сорбированных клеток оценивают по разнице оптической плотности (A_{650}) с учетом разведения, увеличения объема (V) в процессе хроматографии до (индексы 0 в формуле) и после

(индексы после) процесса: $E = \frac{V_0 \cdot A_{650_0} - V_{\text{после}} \cdot A_{650_{\text{после}}}}{V_0 \cdot A_{650_0}} \cdot 100\%$. Снижение количества

клеток после пропускания через колонку в среднем составляет для *Micrococcus luteus* - 33%, для *Escherichia coli* - 18%.

Таким образом сорбционное удаление без разрушения целых патогенных бактериальных клеток из раствора можно достаточно эффективно проводить с помощью сорбента с автоклавированным, ковалентно иммобилизованным лизоцимом.

Перечень фигур

Фиг. 1. Оптическое осветление суспензии клеток *Micrococcus luteus* в присутствии сорбента с автоклавированным иммобилизованным лизоцимом (0,03 мл сорбента на 1 мл суспензии клеток).

Фиг. 2. Снижение количества бактерий при пропускании раствора через колонку с сорбентом с автоклавированным иммобилизованным лизоцимом (исходное количество клеток порядка $5 \cdot 10^8$, объем сорбента 1 мл).

Примеры осуществления изобретения
Подготовку сорбента с предварительной иммобилизацией и автоклавированием лизоцима производили следующим образом. Полисахаридную матрицу WorkBeads 200SEC (Bio-Works, Швеция) предварительно аминировали и промывали, используя воронку Бюхнера, 20-кратным объемом дистиллированной воды, добавляли двукратный объем 2% раствора NaIO_4 . Далее смесь инкубировали при температуре 20°C в течение 2 часов на качалке; после инкубации гель промывали 20-кратным объемом дистиллированной воды. Далее добавляли один объем 2 М раствора 1,6-диаминогексана с последующей инкубацией смеси при температуре 20°C в течение 2 часов на качалке. Затем к полученному препарату добавляли два объема свежеприготовленного 0,5% водного раствора NaBH_4 и инкубировали в течение 30 минут при перемешивании. Затем добавляли еще одну порцию свежеприготовленного раствора NaBH_4 и смесь инкубировали еще 30 минут. Далее аминированную матрицу промывали 5-кратным объемом 1 М раствора NaCl и 10-кратным объемом буфера 30 мМ NaHCO_3 - NaOH , pH=10,0. К 4 мл 50% суспензии аминированной матрицы в буферной смеси 30 мМ NaHCO_3 - NaOH , pH=10,0 добавляли 0,23 мл 25% раствора глутарового альдегида и перемешивали в течение 30 мин на качалке при 25°C. Затем полученный гель промывали 20 мл буферного раствора 30 мМ NaHCO_3 - NaOH , pH=10,0 и смешивали с 3 мл раствора лизоцима в том же буферном растворе (концентрация лизоцима 10 мг/мл). Инкубировали смесь 1 час на качалке при температуре 25°C. Полученный сорбент обрабатывали 4 мл 2% водного раствора боргидрида натрия дважды. Время каждой инкубации с раствором боргидрида натрия составляло 20 мин. Затем сорбент промывали 80 мл дистиллированной воды. И дополнительно проводили автоклавирование 50% суспензии сорбента в дистиллированной воде при температуре 121°C в течение 30 мин в автоклаве марки Tuttnauer 2540 МК (Израиль).

Для проверки эффективности удаления распространенных патогенных бактериальных клеток *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* сравнивали сорбенты с неавтоклавированным иммобилизованным лизоцимом и иммобилизованным лизоцимом с автоклавированием.

К осевшему гелю добавляли суспензию клеток *Micrococcus luteus* в буферном растворе 10 mM Tris-MES-CH₃COOH, pH 7,5 (из расчета 30 мкл сорбента на мл суспензии клеток) и инкубировали на роторной качалке со скоростью 10 оборотов в мин при 37°C. Через определенные интервалы времени (7-10 мин) отбирали пробы по 2 мл и давали сорбенту осесть в течение 1 минуты (время оседания 30-40 с). Измеряли оптическую плотность надосадочной суспензии при длине волны 650 нм. Исходная оптическая плотность суспензии клеток составляла 0,5-0,6, что соответствует порядку 10⁸ бактерий в мл. Экспериментальные результаты показывают (см. графики фиг. 1), что в случае сорбента с неавтоклавированным иммобилизованным лизоцимом падение оптической плотности (уменьшение количества бактериальных клеток) продолжается и после 1 часа и после 2 часов инкубации, что свидетельствует о разрушении бактериальных клеток активным ферментом-лизоцимом. А в случае сорбента с автоклавированным иммобилизованным ферментом лизоцима наблюдается выход оптической плотности к некоторому порогу (границе), отвечающему заполнению поверхности сорбента связанными адсорбированными целыми бактериальными клетками. Таким образом, можно признать, что автоклавированный иммобилизованный лизоцим не разрушает патогенные бактериальные клетки, а только их сорбирует.

Для проверки эффективности удаления сорбентом с автоклавированным, иммобилизованным лизоцимом бактериальных клеток из раствора пропускали суспензии клеток *Micrococcus luteus* или *Escherichia coli* через колонки с обновленным сорбентом. Суспензии клеток готовили в буферном растворе, содержащем 10 mM KН₂РO₄, 0,9% NaCl, pH 7.0. Исходная оптическая плотность суспензии клеток составляла 0,5-0,6, что соответствует порядку 10⁸ бактерий в мл (прим.: такое количество заведомо выше в 10000-100000 раз, чем в реальных случаях бактериальной обсемененности растворов в биотехнологии). Через колонку высотой 1,25 см и поперечным сечением 0,8 см² (объем геля 1 мл) пропускали 5 мл суспензии клеток со скоростью 0,5 мл/мин при температуре 25°C. Раствор вытесняли 5 мл буферного раствора или плазмы крови человека. Количество сорбированных клеток оценивали по разнице оптической плотности A₆₅₀ с учетом разведения, увеличения объема (V) в процессе хроматографии до (индексы 0 в формуле) и после (индексы после) процесса:
$$E = \frac{V_0 \cdot A_{650_0} - V_{\text{после}} \cdot A_{650_{\text{после}}}}{V_0 \cdot A_{650_0}} \cdot 100\% .$$

Снижение количества клеток после пропускания через колонку (см. фиг. 2) в среднем составило для *Micrococcus luteus* - 33%, для *Escherichia coli* - 18%. Таким образом можно признать достаточно эффективным удаление целых патогенных бактерий из раствора обновленным сорбентом с автоклавированным иммобилизованным лизоцимом.

Предлагаемый способ разработан в рамках выполнения работ по Соглашению №14.574.21.0181 между Минобрнауки Российской Федерации (Госзаказчик) и МГТУ им. Н.Э. Баумана.

(57) Формула изобретения

1. Способ сорбционного удаления целых патогенных бактериальных клеток из биологической жидкости, характеризующийся тем, что указанное удаление проводят с помощью сорбента с аминированной макропористой полисахаридной матрицей с автоклавированным, ковалентно иммобилизованным лизоцимом посредством пропускания суспензии бактериальных клеток через колонку указанного сорбента.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что автоклавирование иммобилизованного

лизоцима в составе сорбента осуществляют при температуре 121°C в течение 30 минут.

5

10

15

20

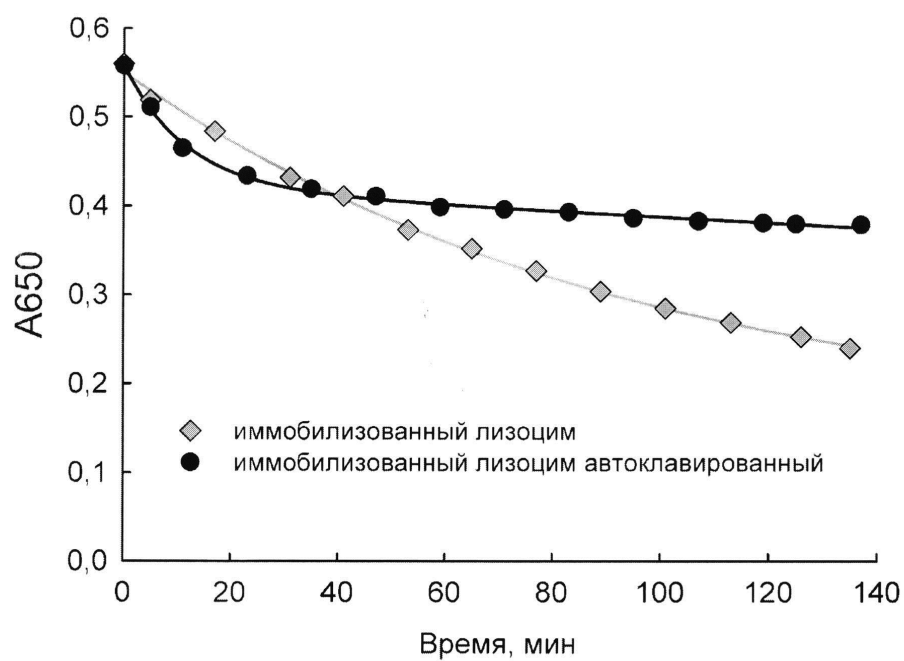
25

30

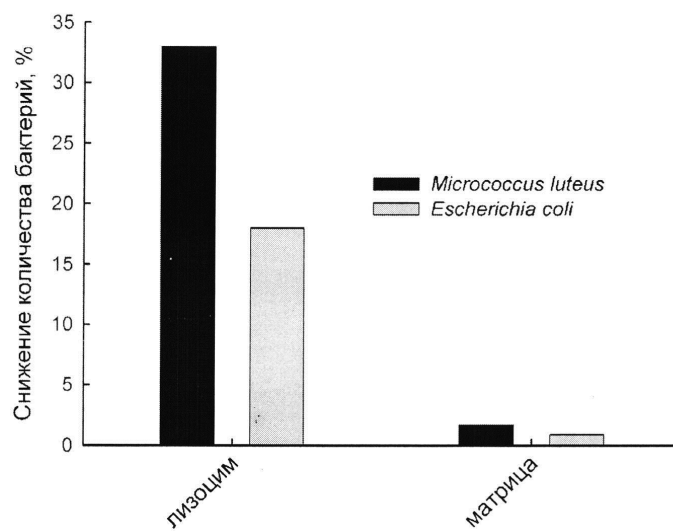
35

40

45



Фиг.1



Фиг.2