



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010105590/10, 16.02.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.02.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.02.2010

(45) Опубликовано: 10.08.2011 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2321574 C2, 10.04.2008. SU 1518373 A1,
10.10.1989. WANG TZU-HSIEN ET AL.

Immobilization of proteins on magnetic
nanoparticles. - Biotechnology and Bioprocess
Engineering, 2003, v. 8, pp.263-267. LIAO M-H.
ET AL. Immobilization of yeast alcohol
dehydrogenase on magnetic nanoparticles for
improving its stability. - Biotechnology Letters,
v. 23, (см. прод.)

Адрес для переписки:

650056, г.Кемерово, б-р Строителей, 47, ГОУ
ВПО Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности, Л.И.
Гориславской

(72) Автор(ы):

Просеков Александр Юрьевич (RU),
Солдатов Любовь Сергеевна (RU),
Бабич Ольга Олеговна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования "Кемеровский технологический
институт пищевой промышленности" (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ
ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии. Предложен способ получения
поверхностно-модифицированных наночастиц
для иммобилизации биологических веществ.
Способ заключается в модификации
содержащих сложноэфирные группы
наночастиц Fe₃O₄. Затем полученные частицы

обрабатывают

аминопропилтриэтоксисилоном. Далее
суспензию наночастиц инкубируют с
конденсирующим агентом и осуществляют
иммобилизацию фермента. Способ позволяет
получать иммобилизованные препараты с
удельной активностью фермента более 70%. 3
табл.

(56) (продолжение):

№20, October 2001, pp.1723-1727. KOUASSI GILLES K. ET AL. Examination of Cholesterol oxidase
attachment to magnetic nanoparticles. - Journal of Nanobiotechnology 2005, 3:1. US 4206286 A, 03.06.1980.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 11/14 (2006.01)*C07B 43/04* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010105590/10, 16.02.2010**(24) Effective date for property rights:
16.02.2010

Priority:

(22) Date of filing: **16.02.2010**(45) Date of publication: **10.08.2011 Bull. 22**

Mail address:

**650056, g.Kemerovo, b-r Stroitelej, 47, GOU VPO
Kemerovskij tekhnologicheskij institut pishchevoj
promyshlennosti, L.I. Gorislavskoj**

(72) Inventor(s):

**Prosekov Aleksandr Jur'evich (RU),
Soldatova Ljubov' Sergeevna (RU),
Babich Ol'ga Olegovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
vysshego professional'nogo obrazovaniya
"Kemerovskij tekhnologicheskij institut
pishchevoj promyshlennosti" (RU)**

(54) METHOD OF PRODUCING SURFACE-MODIFIED NANOPARTICLES FOR IMMOBILISING BIOLOGICAL SUBSTANCES

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: disclosed is a method of producing surface-modified nanoparticles for immobilising biological substances. The method involves modifying Fe_3O_4 nanoparticles containing

ester groups. The obtained particles are then treated with aminopropyl triethoxy silane. Further, the suspension of nanoparticles is incubated with a condensing agent and the enzyme is immobilised.

EFFECT: method enables to obtain immobilised preparations with high enzyme specific activity.

3 tbl, 3 ex

Изобретение относится к области молекулярной биологии и биоорганической химии, а именно к способу ковалентной иммобилизации биомолекул на поверхности наноматериалов, содержащих этерифицированные карбоксильные группы, и его применению при создании иммобилизованных ферментных препаратов. Изобретение
5 может быть использовано в биотехнологии, в том числе в пищевой промышленности.

В данной области известно большое число технических решений, среди которых наибольшее распространение получили химические способы иммобилизации, заключающиеся в ковалентном связывании биомолекул с предварительно
10 активированным носителем. Предварительная активация носителя предусматривает модификацию его поверхности путем обработки химическими соединениями, имеющими реакционноспособные функциональные группы (NH_2 , $-\text{NH}-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ и др.), посредством которых реализуется химическое присоединение биомолекул. Однако в своей массе эти технические решения обладают рядом недостатков, а именно:
15 использование дорогостоящих материалов и реактивов для иммобилизации, трудоемкость методик.

Известен способ иммобилизации (см. пат. РФ №94024389, МПК C12N 11/00, заявл. 29.06.1994, опубл. 10.06.1996) биообъектов на поверхности стекла (керамики),
20 заключающийся в обработке поверхности носителя раствором алкоксибензоата металла. В качестве растворителя используют полярный апротонный растворитель, в частности тетрагидрофуран, диметоксиэтан. Концентрация раствора составляет 0,05-0,8 моль/л. Раствор алкоксибензоата металла наносят на поверхность центрифугированием или окунанием и сушат на воздухе при температуре 15-30°C. В
25 качестве биообъекта используют глюкозооксидазу, которую в виде 3%-ного раствора наносят на модифицированную поверхность. Степень фиксации составляет 90%. Главными недостатками данного подхода являются низкая плотность функциональных групп на поверхности носителя, что приводит к невысокой
30 эффективности ковалентного связывания, а также трудоемкость процедуры иммобилизации.

Известен также способ получения иммобилизованного протеолитического фермента (см. пат. РФ №1041567, МПК C12N 11/10, опубл. 15.09.1983), предусматривающий растворение содержащего альдегидные группы носителя в
35 буферном растворе и последующее присоединение протеолитического фермента. В качестве носителя используют ксилоуронид, растворенный в 0,1 М трисоксиметиламинометановом буфере (рН 8,5), а присоединение фермента осуществляют при соотношении носитель-фермент 1:1. К основным недостаткам
40 данного способа относятся следующие: дефицитный и дорогостоящий носитель - ксилоуронид, низкая стабильность целевого продукта, необходимость хранения препарата при низкой температуре (0-4°C).

Также известен подход к получению иммобилизованного фермента, заключающийся в следующем (см. пат. РФ №586182, МПК C07G 7/02, заявл.
45 30.08.1974, опубл. 30.12.1977). Фермент вводят в водную или спиртовую среду вместе с сочетающим агентом - карбодиимидом, используя в качестве носителя карбоксилсодержащий материал, например, полипропиленовую ткань с привитыми группами акриловой кислоты, частично гидролизованный полиэтилентерефталат, в
50 форме тканей, пленок, гранул, волокон и т.д. При этом в случае проведения иммобилизации в водной среде при значениях рН порядка 5 в соответствующем буфере, когда фермент полностью растворим, в качестве сочетающего агента применяют водорастворимые карбодиимиды, например, 1-циклогексил-3-(2-

морфолиноэтил)-карбодиимид-м-п-толуолсульфонат и т.д. Основной недостаток этого способа иммобилизации связан с низкой удельной активностью полученных препаратов.

Наиболее близким к заявляемому изобретению - прототипом - является изобретение, описывающее ковалентную иммобилизацию биомолекул на поверхности полимерных материалов, содержащих этерифицированные карбоксильные группы (см. пат. РФ №2321574, МПК C07B 43/06, заявл. 06.04.2006, опубл. 10.04.2008). Данный способ основан на решении проведения модификации поверхности биочипа путем двухстадийной обработки, причем одна из стадий осуществляется в газовой фазе. Это позволяет снизить вероятность отслаивания модифицирующего слоя от поверхности носителя и увеличить количество иммобилизованных биообъектов. На первой стадии обработки поверхности чипа проводят аминолит поверхностных сложноэфирных групп полимера, для чего подложку обрабатывают в газовой фазе аминосиланом (аминопропилтриэтоксисилан, аминопропилтриметоксисилан). На второй стадии формируют большое количество функциональных групп, необходимых для иммобилизации биомолекул, путем проведения совместной поликонденсации соответствующего силана с триалкоксисилановыми фрагментами.

На заключительном этапе формирования чипа выбирают способ нанесения и иммобилизации биомолекул на модифицированную поверхность подложки и проводят иммобилизацию.

Основным недостатком данного решения следует считать тот факт, что ковалентная иммобилизация описана только для органических полимерных носителей, таких как полиметилметакрилат, поливинилхлорид, поликарбонат, полибутилметакрилат, сополимеры бутилметакрилата с другими мономерами, такими как стирол и акрилонитрил.

Задачей технического решения является упрощение процедуры иммобилизации ферментных препаратов и улучшение их физико-химических характеристик.

Технический результат достигается за счет использования в качестве матрицы наночастиц Fe_3O_4 , а также недорогих и доступных реактивов. Совокупность предложенных операций позволяет получать иммобилизованные ферментные препараты, отличающиеся от известных аналогов рядом признаков, прежде всего удельной активностью фермента, оптимальными значениями pH и температур.

Способ получения поверхностно-модифицированных наночастиц Fe_3O_4 для иммобилизации биологических веществ включает выполнение следующих операций. На первом этапе осуществляется получение наночастиц магнетита, содержащих на поверхности электрофильные сложноэфирные группы, путем взаимодействия полиметилметакрилата, хлорида железа (III) и диэтиленгликоля. Вторая стадия заключается в формировании на поверхности наночастиц слоя аминопропилтриэтоксисилана за счет протекания реакции аминолита электрофильных фрагментов носителя. Полученные наночастицы служат для последующей иммобилизации ферментов с использованием конденсирующего агента карбодиимида.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1

Смесь полиметилметакрилата, хлорида железа (III) и диэтиленгликоля нагревают при перемешивании в атмосфере азота до 220°C , после чего к смеси добавляют раствор гидроксида натрия в диэтиленгликоле, через несколько минут образовавшиеся наночастицы Fe_3O_4 со сложноэфирными группами отделяют

центрифугированием. Полученные магнитные наночастицы защищены от агрегации в силу межчастичных взаимодействий и влияния среды, а также модифицированы и пригодны для иммобилизации биологических веществ посредством конденсирующего агента. Вторая стадия заключается в формировании на поверхности наночастиц слоя

аминопропилтриэтоксисилана за счет протекания реакции аминолита электрофильных фрагментов носителя. Следует отметить, что на второй стадии присутствие воды в системе должно быть ограничено, поскольку ее наличие приводит к гидролизу

аминопропилтриэтоксисилана и образованию олигомерных силанов. Поэтому в отдельной камере объемом 50 см³ наночастицы (5,0 мг) покрывают газообразным 3-аминопропилтриэтоксисиланом (1 см³) при атмосферном давлении и температуре 70°C в течение 60 минут. После остывания образец обрабатывают этиловым спиртом три раза по 1 см³ и высушивают на воздухе. Далее частицы (5,0 мг)

обрабатывают 0,5%-ным раствором 3-аминопропилтриэтоксисилана (растворитель - смесь этанол:вода 1:1) в течение двух часов при температуре 50°C. На этом этапе происходит совместная поликонденсация силана с триалкоксисилановыми группами. По окончании процесса модификации наночастицы Fe₃O₄ несколько раз промывают растворителем вода - этиловый спирт (1:1) и готовят суспензию наночастиц с концентрацией 5 мг/см³ в 0,1М фосфатном буфере (pH 7,8).

Далее 200 мкл суспензии инкубируют с 200 мкл 100 мМ 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимида-м-п-толуолсульфоната в 0,1М фосфатном буфере в течение двух часов при непрерывном перемешивании при комнатной температуре. По окончании инкубации суспензию промывают три раза 0,025М фосфатным буфером и готовят суспензию в 500 мкл 0,1М фосфатного буфера. На следующей стадии растворяют 500 мкг α-химотрипсина в 500 мкл 0,1М фосфатного буфера и инкубируют полученный раствор с 500 мкл суспензии наночастиц в 0,1М фосфатном буфере при температуре 30°C в течение двух часов. По окончании иммобилизации наночастицы промывают 0,025М фосфатным буферным раствором до исчезновения активности в промывных водах. Полученный иммобилизованный препарат хранится в виде суспензии наночастиц с ковалентно связанным ферментом в 1000 мкл 0,1М фосфатного буфера. Физико-химические характеристики химотрипсина, иммобилизованного на наночастицах Fe₃O₄, представлены в табл.1. В качестве контроля в данном случае используют химотрипсин, иммобилизованный на немодифицированных наночастицах Fe₃O₄ адсорбционным способом.

Физико-химические параметры иммобилизованного химотрипсина					
Способ иммобилизации	Содержание белка в иммобилизован-ном препарате, мкг/мг носителя	Удельная активность фермента, ед./мг белка	Удельная активно-сть фермента, % от нативного	Оптимум, pH	Температурны й оптимум, °C
Иммобилизация на модифицированных наночастицах Fe ₃ O ₄	14,5	30,5	76,3	7,5-9,0	40
Контрольный опыт	9,8	22,5	56,3	7,4-9,0	35

Пример 2

Получение наночастиц Fe₃O₄ с поверхностными сложноэфирными группами и их модификацию силаном осуществляют аналогично примеру 1. Затем готовят суспензию наночастиц (5 мг/см³) в 200 мМ фосфатном буфере (pH 7,0). В качестве иммобилизуемого протеолитического фермента используют термолизин. Для его

иммобилизации 200 мкл суспензии инкубируют с 200 мкл 100 мМ 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимида-м-п-толуолсульфоната в 200 мМ фосфатном буфере в течение двух часов при непрерывном перемешивании при комнатной температуре. По окончании инкубации суспензию промывают три раза 200 мМ фосфатным буфером и готовят суспензию в 500 мкл 200 мМ фосфатного буфера. Затем подготавливают раствор термолизина, растворив 1000 мг фермента в 1000 мкл 200 мМ фосфатного буферного раствора, который инкубируют с 500 мкл суспензии наночастиц в 200 мМ фосфатном буфере при температуре 45°C в течение трех часов. По окончании иммобилизации наночастицы Fe₃O₄ промывают 200 мМ фосфатным буферным раствором до исчезновения активности в промывных водах. Полученный иммобилизованный препарат хранится в виде суспензии наночастиц с ковалентно связанным ферментом в 1000 мкл 200 мМ фосфатного буфера (pH 7,0). Физико-химические характеристики термолизина, иммобилизованного на наночастицах Fe₃O₄, представлены в табл.2. В качестве контроля используют термолизин, иммобилизованный на немодифицированных наночастицах Fe₃O₄ адсорбционным способом.

Физико-химические параметры иммобилизованного термолизина					
Способ иммобилизации	Содержание белка в иммобилизованном препарате, мкг/мг носителя	Удельная активность фермента, ед./мг белка	Удельная активность фермента, % от нативного	Оптимум, pH	Температурный оптимум, °C
Иммобилизация на модифицированных наночастицах Fe ₃ O ₄	21,5	38,9	76,4	6,9-8,6	45
Контрольный опыт	13,2	24,0	47,2	7,6-8,2	30

Пример 3

Для получения наночастиц Fe₃O₄ со сложноэфирными группами на поверхности и их модификации силаном осуществляют последовательность операций, аналогичную примеру 1, после чего готовят суспензию наночастиц (5 мг/см³) в 100 мМ фосфатном буфере (pH 6,8). Иммобилизуемым объектом является протеолитический фермент эластаза. 200 мкл суспензии инкубируют с 200 мкл 100 мМ 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимида-м-п-толуолсульфоната в 100 мМ фосфатном буфере в течение двух часов при непрерывном перемешивании при комнатной температуре. По окончании инкубации суспензию промывают три раза 100 мМ фосфатным буфером и готовят суспензию в 500 мкл 100 мМ фосфатного буфера. На следующем этапе иммобилизации растворяют 1000 мг эластазы в 1000 мкл 100 мМ фосфатного буфера и инкубируют полученный раствор с 500 мкл суспензии модифицированных наночастиц в 100 мМ фосфатном буфере при температуре 40°C в течение четырех часов. По окончании иммобилизации наночастицы промывают 100 мМ фосфатным буферным раствором до исчезновения активности в промывных водах. Полученный иммобилизованный препарат хранится в виде суспензии наночастиц с ковалентно связанным ферментом в 1000 мкл 100 мМ фосфатного буфера (pH 6,8). Физико-химические характеристики эластазы, иммобилизованной на наночастицах Fe₃O₄, представлены в табл.3. В качестве контроля используют эластазу, иммобилизованную на немодифицированных наночастицах Fe₃O₄ адсорбционным способом.

Физико-химические параметры иммобилизованной эластазы					
---	--	--	--	--	--

Способ иммобилизации	Содержание белка в иммобилизованном препарате, мкг/мг носителя	Удельная активность фермента, ед./мг белка	Удельная активность фермента, % от нативного	Оптимум pH	Температурный оптимум, °C
Иммобилизация на модифицированных наночастицах Fe ₃ O ₄	11,3	5,8	70,7	6,5-7,2	35
Контрольный опыт	7,7	4,5	54,8	6,8-7,1	28

Таким образом, иммобилизация протеолитических ферментов на поверхности модифицированных наночастиц Fe₃O₄ позволяет получить гетерогенные ферментные препараты с высокой удельной активностью по сравнению с известными способами иммобилизации ферментов на органических полимерных носителях. Преимущества данного изобретения перед прототипом следующие:

- обеспечение возможности использования в качестве носителя для иммобилизации наночастиц, обладающих рядом преимуществ перед макрообъектами;
- повышение удельной активности иммобилизованных препаратов;
- оптимизация условий функционирования иммобилизованных препаратов;
- упрощение технологии получения иммобилизованных препаратов.

Формула изобретения

Способ получения поверхностно-модифицированных наночастиц для иммобилизации биологических веществ, состоящий в формировании большого количества активных функциональных групп с использованием алкоксисиланов на поверхности носителя со сложноэфирными фрагментами, отличающийся тем, что в качестве поверхностно-модифицированного носителя используются наночастицы Fe₃O₄.