



(51) МПК
C12N 11/02 (2006.01)
C12N 11/08 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012139201/10, 13.09.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 13.09.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.09.2012

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2014 Бюл. № 9

(45) Опубликовано: 20.08.2014 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **PETRIKOVICS I., et al., Enzyme-based intravascular defense against organophosphoms neurotoxins: Synergism of dendritic-enzyme complexes with 2-PAM and atropine. // Nanotoxicology, 2005, V.1(2), p.85-92. RU 2451077 C1, 20.05.2012. RU 2261911 C1, 10.10.2005. ЕФРЕМЕНКО Е.Н., Гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток (см. прод.)**

Адрес для переписки:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,
 Московский государственный университет
 имени М.В. Ломоносова, Центр трансфера
 технологий, О.Г. Дьяченко

(72) Автор(ы):

Кабанов Александр Викторович (RU),
 Ефременко Елена Николаевна (RU),
 Клячко Наталья Львовна (RU),
 Бронич Татьяна Карловна (RU),
 Лягин Илья Владимирович (RU),
 Варфоломеев Сергей Дмитриевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 профессионального образования
 "Московский государственный университет
 имени М.В. Ломоносова" (МГУ) (RU),
 Юниверсити оф Небраска Медикал Сентер
 (UNMC) (US)

(54) НАНОРАЗМЕРНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ БИОКАТАЛИЗАТОР ДЛЯ ДЕТОКСИФИКАЦИИ
 ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ *in vivo*

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен ферментный биокатализатор в виде наноразмерных частиц для детоксификации фосфорорганических соединений *in vivo*. Биокатализатор представляет собой нековалентные полиэлектролитные комплексы. Данные комплексы состоят из полигистидин-содержащего полипептида со свойствами органотрифосфатгидролазы и блок-сополимера полиэтиленгликоля и полиглутаминовой кислоты

в зарядовом соотношении фермент:блок-сополимер в диапазоне от 2:1 до 1:5. Изобретение обеспечивает существенное упрощение технологии получения биокатализатора, увеличение его каталитической эффективности, снижение вводимой дозы, уменьшение иммунотоксичного эффекта, а также повышение активности в реакциях гидролиза пестицидов и отравляющих веществ. 3 з.п. ф-лы, 6 пр.

(56) (продолжение):

микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты, Автореферат, 2009, Москва, стр.28-33. ЛЯГИН И.В., Иммобилизованные биокатализаторы на основе полигистидинсодержащих

R U 2 5 2 5 6 5 8 C 2

R U 2 5 2 5 6 5 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 11/02 (2006.01)
C12N 11/08 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012139201/10, 13.09.2012**(24) Effective date for property rights:
13.09.2012

Priority:

(22) Date of filing: **13.09.2012**(43) Application published: **27.03.2014** Bull. № **9**(45) Date of publication: **20.08.2014** Bull. № **23**

Mail address:

**119991, Moskva, GSP-1, Leninskie gory, 1,
Moskovskij gosudarstvennyj universitet imeni M.V.
Lomonosova, Tsentr transfera tekhnologij, O.G.
D'jachenko**

(72) Inventor(s):

**Kabanov Aleksandr Viktorovich (RU),
Efremenko Elena Nikolaevna (RU),
Kljachko Natal'ja L'vovna (RU),
Bronich Tat'jana Karlovna (RU),
Ljagin Il'ja Vladimirovich (RU),
Varfolomeev Sergej Dmitrievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**University of Nebraska Medical Center
(UNMC) (US)**

(54) **NANOSCALE ENZYME BIOCATALYST FOR in vivo DETOXIFICATION OF ORGANOPHOSPHOROUS COMPOUNDS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology. What is presented is an enzyme biocatalyst in the form of nanoscale particles for in vivo detoxification of organophosphorous compounds. The biocatalyst represents non-covalent polyelectrolyte complexes. The given complexes consist of a polyhistidine-containing polypeptide with the properties of organophosphorous hydrolase and polyethylene

glycol-polyglutamic acid block copolymer in a charge relation of enzyme:block copolymer falling within the range of 2:1 to 1:5.

EFFECT: invention provides significant simplification of the biocatalyst technology, an increase of its catalytic efficiency, a dose decline, an immunotoxic suppression, as well as higher activity in hydrolysis reactions of pesticides and toxic materials.

4 cl, 6 ex

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к ферментным биокатализаторам в виде наноразмерных частиц, представляющих собой нековалентные полиэлектролитные комплексы, сформированные полигистидин-содержащим полипептидом с активностью органофосфатгидролазы и блок-сополимером полиэтиленгликоля с полианионом и предназначенных для детоксификации фосфорорганических соединений (ФОС) *in vivo* путем их гидролиза. Изобретение может быть использовано в качестве антидота для профилактики и элиминирования интоксикации, вызванной попаданием ФОС в организм человека или животных в результате чрезвычайных ситуаций (катастроф и террористических актов) или регулярного контакта с ФОС при их производстве, применении, хранении и утилизации.

ФОС представляют собой эфиры ортофосфорной и алкилфосфоновой кислот, а также их производных. К их числу относятся пестициды, широко применяемые в сельском, приусадебном и домашнем хозяйстве, а также ингибиторы коррозии, применяемые в теплоэнергетике, нефте- и газодобывающей промышленности, пластификаторы и стабилизаторы, используемые в строительной промышленности, в составе моющих и чистящих средств промышленного назначения, а также высокотоксичные боевые отравляющие вещества нервно-паралитического действия зоман, зарин, Vx и продукты их разложения (метилфосфоновая кислота и ее эфиры) [Kwong T.C. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. // Ther. Drug. Monk., 2002, V.24(1), p.144-149; Юфит С.С. Яды вокруг нас. Вызов человечеству.// М.: Классик Стиль, 2002, 368 с.; Абрамов В.В. и др. (ред. Путилова В.Я.). Современные природоохранные технологии в электроэнергетике: Информационный сборник. // М.: Издат. дом МЭИ, 2007, 388 с.; Москвичев Ю.А., Фельдблюм В.Ш. Химия в нашей жизни (продукты органического синтеза и их применение). // Изд-во ЯГТУ, 2007, Ярославль, с.244-250].

Ежегодное производство, хранение и применение ФОС в объеме сотен тысяч тонн [Gold, R.S., Wales, M.E., Grimsly, J.K., Green solution for chemical problems. // Disarm. Technol., 2000, V.23, p.263-286] для нужд сельского хозяйства, а также низкие скорости разложения ФОС в условиях окружающей среды приводят к накоплению и обнаружению этих веществ первоначально в почве. Далее происходит попадание ФОС в грунтовые и речные воды, продукты питания, табачные и хлопчатобумажные изделия, домашнюю пыль [Obendorf, S.K., Lemley, A.T., Hedge, A., Kline, A.A., Tan, K., Dokuchaeva, T., Distribution of pesticide residues within homes in central New York state. // Arch. Environ. Contam. Toxicol., 2006, V.50(1), p.31-44; Lemley, A., Hedge, A., Obendorf, S.K., Hong, S., Kim, J., Muss, T.M., Varner, C.J., Selected pesticide residues in house dust from farmers homes in central New York state. // Bull. Environ. Contamin. Toxicol., 2002, V.69(2), p.155-163]. Проникновение ФОС в организм животных и в том числе человека может происходить не только вместе с водой и продуктами питания (перорально), но и ингаляторно - при дыхании, а также трансдермально при непосредственном контакте с ними. ФОС оказывают на организм человека нейротоксичное воздействие, которое в зависимости от концентрации ФОС может быть острым или отдаленным. Также ФОС являются мутагенами, вызывающими хромосомную аберрацию, при этом негативный эффект, как правило, носит кумулятивный характер.

Согласно Международной конвенции о химическом разоружении [United Nation, Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction, corrected version in accordance with Depositary Notification C.N.246.1994. <http://www.opcw.org/html/db/cwc/eng/cwc_frameset.html>] на территории Российской Федерации и США должны быть уничтожены фосфорорганические боевые

отравляющие вещества (зарин, зоман и Vx). Безопасность этого процесса может быть обусловлена наличием комплекса высокоэффективных защитных средств, включая те, что могут быть применены *in vivo* путем их введения непосредственно в организм для профилактики и элиминирования нейротоксичного эффекта ФОС.

5 Известно, что ферментные системы кожи, крови, внутренних органов участвуют в естественной защите человека от эндогенных и экзогенных ядов. Роль ферментов печени, легких и почек, цитохромов P450, оксидаз, трансфераз и амидокарбоксилэстераз в метаболизме лекарств и ксенобиотиков хорошо известна. Признана также важность эстераз плазмы крови в инактивации многочисленных токсикантов. Эти ферменты формируют эндогенные барьеры, защищающие физиологические системы от отдельных токсикантов, и, несмотря на то, что процессы ферментативной детоксификации протекают в соответствии с разными механизмами, их часто называют «биоловушками» токсикантов [Массой П., Рошу Д. Каталитические «биоловушки» против токсических эфиров, альтернативный подход для профилактики и лечения отравлений. // Acta naturae, 10 2009, №1, с.68-78], поскольку большей частью, взаимодействуя с токсикантами, ферменты либо необратимо инактивируются при детоксификации ФОС, образуя с ними высокоустойчивые комплексы, либо эти ферменты проявляют низкую гидролитическую активность и, образуя фермент-субстратный комплекс, надолго выбывают из процесса детоксификации. В этой связи актуально применение в качестве основы для антидотных 15 средств тех ферментов, что обладают широким гидролитическим субстратным спектром действия и высокой каталитической активностью по отношению к ФОС.

Детоксификация различных ФОС с помощью таких биокатализаторов, как ферменты, имеет ряд преимуществ, а именно она проходит в мягких условиях, и продукты гидролиза, как правило, являются биологически деградируемыми соединениями. На 25 сегодняшний день наиболее высоко активным ферментом, осуществляющим биодеструкцию самого широкого спектра ФОС, является орнотриэстераза (ОРН, ЕС 3.1.8.1, арилдиалкилфосфатаза), катализирующая гидролиз эфирной связи в производных ортофосфорной и фосфоновой кислот [Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Ферменты деструкции фосфорорганических нейротоксинов. // Успехи биол. химии, 30 Т.44, 2004, с.307-340].

На сегодняшний день известно несколько ферментных биокатализаторов, созданных на основе ОРН, для использования в качестве антидотов против нейротоксичного действия ФОС *in vivo*.

Известен иммобилизованный биокатализатор, полученный для детоксификации 35 ФОС *in vivo* в виде ОРН, модифицированной пэгиллированием [Jun D., Musilová L., Link M., Loiodice M., Nachon F., Rochu D., Renault F., Masson P. Preparation and characterization of methoxy polyethylene glycol-conjugated phosphotriesterase as a potential catalytic bioscavenger against organophosphate poisoning. // Chem.-Biol. Interact., 2010, V.187, p.380-383; Trovaslet-Leroy M., Musilova L., Renault F., Brazzotto X., Misik J., Novotny L., Froment M.T., Gillon 40 E., Loiodice M., Verdier L., Masson P., Rochu D., Jun D., Nachon F. Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents. // Toxicol. Lett., 2011, V. 206 (1), p.14-23]. Для этого ПЭГ с молекулярной массой 2 или 5 кг/моль посредством концевой альдегидной группы ковалентно пришивают к NH₂-группам лизина, находящимся на поверхности молекулы ОРН. Полимер растворяют в 200 мМ боратном буфере (рН 8,5), содержащем 0,1 мМ CoCl₂ и восстанавливающий агент - цианоборгидрид натрия, и смешивают с ферментом в оптимальном мольном соотношении ОРН:ПЭГ:NaBH₃CN 45 равном 1:1200:48000 для ПЭГ с молекулярной массой 2 кг/моль или 1:800:40000 для

ПЭГ с молекулярной массой 5 кг/моль при температуре 25°C в течение 24 ч. Реакцию останавливают добавлением 10% масс. раствора глицина, после чего удаляют непрореагировавший полимер ультрафильтрацией. С 1 моль фермента связывается до 16 моль ПЭГ.

5 Период полуинактивации такого ферментного биокатализатора при 37°C составляет 12,3 ч при введении препарата внутримышечно в дозе 1,19 мг/кг самкам крыс марки Wistar. При внутримышечном введении клиренс препарата не определяется.

К недостаткам описанного биокатализатора следует отнести:

10 - развитие иммунного ответа у животных независимо от типа ПЭГ, используемого для модификации ОРН;

- используется длительная и трудоемкая процедура получения пэгиллированного фермента, в результате которой теряется 50% ферментативной активности;

15 - отсутствие данных по каталитическим характеристикам и возможности детоксификации других ФОС, кроме Параоксона, а также отсутствие данных по диапазону рН и температурного действия данного биокатализатора не позволяет оценить потенциал его практического применения.

Известны биокатализаторы, представляющие собой конъюгаты ОРН с полиэтиленгликолем (ПЭГ), полученные в результате ковалентной модификации поверхности фермента [Novikov V.N., Grimsley J.K., Kern R.J., Wild J.R., Wales M.E.

20 Improved pharmacokinetics and immunogenicity profile of organophosphorus hydrolase by chemical modification with polyethylene glycol. // J. Control. Release, 2010, V.146, p.318-325].

Для этого используют короткоцепочечные преполимеры с молекулярной массой от 333 до 686 г/моль, состоящие из 4, 8 или 12 звеньев этиленгликоля с концевой

25 сукцинимидной группой, способной связываться с остатками лизина или аргинина на поверхности белка, или разветвленный полимер ПЭГ₄-[ПЭГ₁₂]₃ (ПЭГ₄₀) с наибольшей

из всех молекулярной массой 2421 г/моль. Модификацию ОРН проводят в 10 мМ фосфатном буфере (рН 8,4), содержащем 20 мМ КСl и 50 мкМ СоСl₂. Фермент в

30 концентрации 1 г/л смешивают с полимером в мольном соотношении фермент:полимер, равном 1:800. Смесь выдерживают при +25°C в течение 30 мин, а затем экспонируют при +4°C в течение 12 ч. После этого модифицированный фермент диализуют против

исходного буфера. Максимальная активность биокатализатора наблюдается при связывании 1 моль фермента с 6 моль ПЭГ₄₀. Константа Михаэлиса наилучшего образца

данного биокатализатора по Параоксону составляет 57±4 мкМ, каталитическая

35 константа - 4629±23 с⁻¹, а эффективность каталитического действия - 8,1×10⁷ М⁻¹с⁻¹.

Основными недостатками этого биокатализатора являются:

- все образцы биокатализатора вызывают сильнейший иммунный ответ после внутривенного введения морским свинкам марки Dunkin Hartley в дозе 0,75 мг/кг, что подтверждено обнаружением специфических антител к ОРН в плазме крови

40 исследованных животных;

- используется длительная и трудоемкая процедура получения пэгиллированного фермента, в результате которой теряется до 75% ферментативной активности.

Известен ферментный биокатализатор на основе ОРН, нанокapsулированной в полиоксазолиновый разветвленный полимер и предназначенный для применения в

45 качестве антидота [Petrikovics I., Wales M.E., Jaszberenyi J.C., Budai M., Baskin S.I., Szilasi M., Logue B.A., Chapela P., Wild J.R. Enzyme-based intravascular defense against

organophosphoms neurotoxins: Synergism of dendritic-enzyme complexes with 2-PAM and atropine. // Nanotoxicology, 2005, V.1(2), p.85-92]. Препарат получают в 50 мМ бис-трис-

пропановом буфере (рН 8,5) путем смешивания полимера с ферментом в весовом соотношении 20:1. Конечная концентрация комплекса составляет 20 г/л, который далее лиофилизуют. Активность готового препарата составляет 1-5 Ед./мг_{преп}, или в пересчете на фермент - 48-238 Ед./г_{белка}.

Внутривенное введение такого ферментного биокатализатора мужским особям мышей марки Balb/c в дозе 500-2500 мг/кг позволяет улучшить в 2,85 раза защиту животных от токсичного действия Параоксона, вводимого внутривенно через 1 ч после введения биокатализатора, по сравнению с результатом применения неинкапсулированного фермента в тех же условиях.

Вместе с этим описанный ферментный биокатализатор обладает рядом существенных недостатков, а именно:

- низкая удельная активность антидота приводит к необходимости введения его в огромных дозах для достижения целевого эффекта, что существенно усложняет саму процедуру введения, поскольку в расчете на 1 человека применяемая доза достигает 150 г сухого препарата внутривенно, а потому ставит вопрос об иммунотоксичности биокатализатора, экономической обоснованности и практической целесообразности использования подобного антидота;

- отсутствие данных по каталитическим характеристикам и возможности детоксификации других ФОС, кроме Параоксона, а также отсутствие данных по диапазону рН и температурного действия, термостабильности, фармакокинетических данных действия данного биокатализатора не позволяет оценить потенциал его практического применения.

Данное техническое решение как наиболее близкое к заявляемому по своему назначению и способу получения, а именно получению наноразмерного биокатализатора с органофосфатгидролазной активностью, представляющего собой нековалентный комплекс фермента с полимером и предназначенного для детоксификации ФОС, принято за прототип.

Задачей предлагаемого изобретения является разработка ферментного биокатализатора в виде наноразмерных частиц для детоксификации ФОС *in vivo*, представляющих собой высокоактивные и термостабильные нековалентные полиэлектролитные комплексы с широким субстратным спектром действия.

Поставленная задача решается тем, что ферментный биокатализатор в виде наноразмерных частиц для детоксификации фосфорорганических соединений *in vivo* получают в виде нековалентных полиэлектролитных комплексов, сформированных при рН 7,5-10,5 и температуре +8÷30°С полигистидин-содержащим полипептидом со свойствами органофосфатгидролазы и блок-сополимером полиэтиленгликоля с полианионом в виде полиглутаминовой кислоты разной степени полимеризации, взятыми в зарядовом соотношении фермент:блок-сополимер в диапазоне от 2:1 до 1:5.

В качестве основного каталитического начала в предлагаемом изобретении используется оригинальный полигистидин-содержащий полипептид с активностью органофосфатгидролазы, который характеризуется существенно улучшенными по отношению к исходному ферменту органофосфатгидролазе каталитическими характеристиками, позволяющими использовать его для гидролиза фосфорорганических отравляющих веществ в более широком диапазоне рН и температуры, а также проводить более эффективный и быстрый гидролиз различных ФОС [Патент РФ 2255975, МПК⁷ C12N 1/21, C12N 15/52, C12N 15/70. Рекомбинантная плазмидная ДНК рTES-His-ORH и продуцент олигогистидинсодержащей органофосфатгидролазы; Патент РФ 2296164, МПК⁷ C12S 13/00, A62D 3/00. Способ ферментативного гидролиза боевых отравляющих

веществ. Вотчицева Ю.А., Ефременко Е.Н., Алиев Т.К., Варфоломеев С.Д. (2006) Свойства гексагистидин-содержащей органофосфатгидролазы» // Биохимия, Т.76 (2), с.216-222; Гудков Д.А., Вотчицева Ю.А., Ефременко Е.Н. (2006). Гидролиз параоксона, катализируемый органофосфатгидролазой, содержащей полигистидиновую последовательность на С-конце молекулы белка. // Вестник МГУ, сер. Хим., Т.47(1), с.15-20].

Наличие полигистидиновой последовательности в молекуле полипептида позволяет проводить быструю очистку и выделение такого фермента из клеток *E.coli* в одну стадию за счет образования множественных координационных связей между молекулой гибридного белка и металл-хелатирующими носителями [Efremenko E., Votchitseva Y., Plieva F., Galaev I., Mattiasson B. (2006). Purification of His₆-organophosphate hydrolase using monolithic supermacroporous polyacrylamide cryogels developed for immobilized metal affinity chromatography. // Appl. Microb. Biotech., V.70 (5), p.558-563], и, следовательно, масштабирование процесса его наработки с целью использования при получении заявляемого ферментного биокатализатора легко реализуемо.

Ранее данный полипептид для целей его применения в качестве антидота не использовался.

Для стабилизации ферментативной активности полигистидин-содержащего пептида в крови при его непосредственном введении в организм, согласно заявляемому изобретению, формируют нековалентный полиэлектролитный комплекс, для чего ферментный раствор смешивают в определенном соотношении с раствором блок-сополимера полиэтиленгликоля и полианиона. Получение такого комплекса способствует формированию наноразмерных частиц, удобных для применения *in vivo* [Patent WO 2008/141155 A1, 2008; Compositions for protein delivery and methods of use thereof; A61K 38/16; A61K 38/28] и использования в процессе детоксификации нейротоксинов. Кроме того, поскольку такая модификация поверхности фермента способствует снижению его иммуногенности как чужеродного белка, вводимого в организм животных, в том числе человека, а также позволяет увеличить время пребывания фермента в организме в каталитически активной форме за счет увеличения его стабильности и снижения его доступности к гидролитическому воздействию литических ферментов крови.

В качестве блок-сополимера для модификации полигистидин-содержащего полипептида с активностью ОРН в заявляемом изобретении используется блок-сополимер полиэтиленгликоля и полиглутаминовой кислоты, имеющей разную степень полимеризации. Такое техническое решение обеспечивает формирование устойчивого полиэлектролитного комплекса между положительно заряженными функциональными группами, локализованными на стороне, противоположной активному центру фермента, и полианионом. При этом блок-сополимер не затрагивает активный центр фермента, позволяя сохранять его высокую активность, но при этом существенно стабилизирует активную конформацию белка. Физический метод стабилизации полипептида, используемый в заявляемом изобретении, в отличие от ковалентного метода, применяемого в аналогах, гарантирует максимальное сохранение исходных характеристик фермента.

Диапазон варьирования зарядового соотношения фермента и блок-сополимера (от 2:1 до 1:5), применяемый для получения заявляемого биокатализатора, выбран экспериментально и обеспечивает получение высокоактивного и термостабильного ферментного биокатализатора в виде наноразмерных частиц (в среднем 29±4 нм). Увеличение этого соотношения в сторону повышения доли фермента приводит к

снижению стабильности его действия в диапазоне pH 7,0-12,0 и температуры 15-60°C, а увеличение доли полимера в соотношении фермент:полимер свыше 1:5 приводит к снижению каталитической активности биокатализатора и не приводит к заметному улучшению термостабильности ферментного биокатализатора.

5 Такое сочетание всех основных компонентов наноразмерного ферментного биокатализатора, которое указано в заявляемом техническом решении, да еще к тому же при заявляемых соотношениях фермента и блок-сополимера, эффективное взаимодействие которых осуществляется при pH 7,5-10,5 и температуре +8-30°C, ранее известно не было и позволяет характеризовать предлагаемое техническое решение как

10 новое.

Ниже приводятся конкретные примеры реализации заявляемого технического решения.

Пример 1. Ферментный биокатализатор в виде наноразмерных частиц на основе His₆-ОРН и ПЭГ-ПГК₅₀ в зарядовом соотношении 2:1.

15 К очищенному ферменту His₆-ОРН, находящемуся в 100 мМ карбонатном буфере (pH 10,5) в концентрации 1 г/л, добавляют 20 г/л водный раствор ПЭГ₁₁₉-ПГК₅₀ (M_w=13 кг/моль) так, чтобы концентрация блок-сополимера составила 0,09 г/л. Приготовленную смесь оставляют при комнатной температуре на 30 мин для формирования ферментного

20 биокатализатора в виде нековалентного полиэлектролитного комплекса с зарядовым соотношением фермента и блок-сополимера 2:1.

Полученный ферментный биокатализатор имеет размер частиц 29±4 нм, обладает каталитической константой действия по фосфорорганическому пестициду Параоксону 5010±60 с⁻¹, константой Михаэлиса 16,7±0,9 мкМ и константой эффективности действия 25 (3,0±0,2)×10⁸ М⁻¹с⁻¹, функционирует в диапазоне pH 7,0-12,0 и температур 15-60°C. Каталитическая константа действия по фосфорорганическому пестициду Хлорпирифосу составляет 482±25 с⁻¹, константа Михаэлиса - 150±10 мкМ и константа эффективности действия - (3,2±0,4)×10⁶ М⁻¹с⁻¹. Снижение активности данного биокатализатора, 30 выдержанного при 55°C в течение 15 мин, составляет менее 5%. Расчетный период полуинактивации биокатализатора при 37°C составляет как минимум 500 ч. При внутривенном введении ферментного биокатализатора в дозе 1 мг/кг клиренс у белых крыс (скорость выведения, CL) составляет 27,6 мл/ч. Специфические антитела к ферментному биокатализатору этого состава при его введении в указанной дозе в 35 плазме крови исследованных животных отсутствуют.

Пример 2. Ферментный биокатализатор в виде наноразмерных частиц на основе His₆-ОРН и ПЭГ-ПГК₁₀ в зарядовом соотношении 1:1.

40 К очищенному ферменту His₆-ОРН, находящемуся в 50 мМ фосфатно-солевом буфере (pH 7,5) в концентрации 1 г/л, добавляют 20 г/л водный раствор ПЭГ₁₁₉-ПГК₁₀ (M_w=6.5 кг/моль) так, чтобы концентрация блок-сополимера составила 0,45 г/л. Приготовленную смесь оставляют при температуре +8°C на 40 мин для формирования ферментного биокатализатора в виде нековалентного полиэлектролитного комплекса с зарядовым соотношением фермента и блок-сополимера 1:1.

45 Полученный ферментный биокатализатор имеет размер частиц 30±5 нм, обладает каталитической константой действия по фосфорорганическому пестициду Паратиону 1040±80 с⁻¹, константой Михаэлиса 20,1±1,7 мкМ и константой эффективности действия (5,2±0,8)×10⁷ М⁻¹с⁻¹, функционирует в диапазоне pH 7,0-12,0 и температур 15-60°C.

Каталитическая константа действия по фосфорорганическому пестициду Диазинону составляет $85,6 \pm 5,1 \text{ с}^{-1}$, константа Михаэлиса - $202 \pm 13 \text{ мкМ}$ и константа эффективности действия - $(4,2 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Снижение активности данного биокатализатора, выдержанного при 55°C в течение 15 мин, составляет менее 3%. При внутривенном введении ферментного биокатализатора в дозе 1 мг/кг клиренс у белых крыс (скорость выведения, CL) составляет 28,2 мл/ч. Специфические антитела к ферментному биокатализатору этого состава при его введении в указанной дозе в плазме крови исследованных животных отсутствуют.

Пример 3. Ферментный биокатализатор в виде наноразмерных частиц на основе His₆-ОРН и ПЭГ-ПГК₅₀ в зарядовом соотношении 1:2.

К очищенному ферменту His₆-ОРН, находящемуся в 100 мМ карбонатном буфере (рН 9,5) в концентрации 1 г/л, добавляют 20 г/л водный раствор ПЭГ₁₁₉-ПГК₅₀ ($M_w=13 \text{ кг/моль}$) так, чтобы концентрация блок-сополимера составила 0,36 г/л. Приготовленную смесь оставляют при температуре 30°C на 20 мин для формирования ферментного биокатализатора в виде нековалентного полиэлектролитного комплекса с зарядовым соотношением фермента и блок-сополимера 1:2.

Полученный ферментный биокатализатор имеет размер частиц $28 \pm 3 \text{ нм}$, обладает каталитической константой действия по фосфорорганическому пестициду Метилпаратиону $309 \pm 15 \text{ с}^{-1}$, константой Михаэлиса $34,5 \pm 1,9 \text{ мкМ}$ и константой эффективности действия $(9,0 \pm 0,9) \times 10^6 \text{ М} \text{ с}^{-1}$, функционирует в диапазоне рН 7,0-12,0 и температур 15-60°C. Снижение активности данного биокатализатора, выдержанного при 55°C в течение 15 мин, составляет менее 4%. При внутривенном введении ферментного биокатализатора в дозе 1 мг/кг клиренс у белых крыс (скорость выведения, CL) составляет 32,2 мл/ч. Специфические антитела к ферментному биокатализатору этого состава при его введении в указанной дозе в плазме крови исследованных животных отсутствуют.

Пример 4. Ферментный биокатализатор в виде наноразмерных частиц на основе His₆-ОРН и ПЭГ-ПГК₅₀ в зарядовом соотношении 1:5.

К очищенному ферменту His₆-ОРН, находящемуся в 50 мМ карбонатном буфере (рН 10,5) в концентрации 1 г/л, добавляют 20 г/л водный раствор ПЭГ₁₁₉-ПГК₅₀ ($M_w=13 \text{ кг/моль}$) так, чтобы концентрация блок-сополимера составила 0,9 г/л. Приготовленную смесь оставляют при температуре 20°C на 30 мин для формирования ферментного биокатализатора в виде нековалентного полиэлектролитного комплекса с зарядовым соотношением фермента и блок-сополимера 1:5.

Полученный ферментный биокатализатор имеет размер частиц $27 \pm 4 \text{ нм}$, обладает каталитической константой действия по фосфорорганическому пестициду Параоксону $4190 \pm 100 \text{ с}^{-1}$, константой Михаэлиса $38,0 \pm 1,7 \text{ мкМ}$ и константой эффективности действия $(1,1 \pm 0,1) \times 10 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, функционирует в диапазоне рН 7,0-12,0 и температур 15-60°C. Каталитическая константа действия по фосфорорганическому пестициду Кумафосу составляет $335 \pm 15 \text{ с}^{-1}$, константа Михаэлиса - $350 \pm 20 \text{ мкМ}$ и константа эффективности действия - $(9,6 \pm 1,0) \times 10 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Снижение активности данного биокатализатора, выдержанного при 55°C в течение 15 мин, составляет менее 5%. При внутривенном введении ферментного биокатализатора в дозе 1 мг/кг клиренс у белых крыс (скорость выведения, CL) составляет 41,5 мл/ч. Специфические антитела к ферментному

биокатализатору этого состава при его введении в указанной дозе в плазме крови исследованных животных отсутствуют.

Пример 5. Ферментный биокатализатор в виде наноразмерных частиц на основе His₁₂-ОРН и ПЭГ-ПГК₅₀ в зарядовом соотношении 1:4.

5 К очищенному ферменту His₁₂-ОРН, находящемуся в 50 мМ фосфатном буфере (рН 8,0) в концентрации 1 г/л, добавляют 20 г/л водный раствор ПЭГ₁₁₉-ПГК₅₀ (M_W=13 кг/моль) так, чтобы концентрация блок-сополимера составила 0,72 г/л. Приготовленную смесь оставляют при комнатной температуре на 30 мин для формирования ферментного биокатализатора в виде нековалентного полиэлектролитного комплекса с зарядовым соотношением фермента и блок-сополимера 1:4.

10 Полученный ферментный биокатализатор имеет размер частиц 30±5 нм, обладает каталитической константой действия по фосфорорганическому пестициду Параоксону 4008±235 с⁻¹, константой Михаэлиса 253±40 мкМ и константой эффективности действия (1,6±0,3)×10⁷ М⁻¹с⁻¹, функционирует в диапазоне рН 7,0-12,0 и температур 15-60°С. Снижение активности данного биокатализатора, выдержанного при 55°С в течение 15 мин, составляет менее 2%. При внутривенном введении ферментного биокатализатора в дозе 1 мг/кг клиренс у белых крыс (скорость выведения, CL) составляет 37,6 мл/ч. Специфические антитела к ферментному биокатализатору этого состава при его введении

20 в указанной дозе в плазме крови исследованных животных отсутствуют.

Пример 6. Свойства заявляемого ферментного биокатализатора как антитоксина *in vivo* при детоксификации отравляющего вещества Vx.

25 Ферментный биокатализатор в виде нековалентного полиэлектролитного комплекса с зарядовым соотношением фермента и блок-сополимера 1:5, полученный как описано в Примере 1, вводят внутривенно белым крысам марки Sprague Dawley в дозе 1 мг/кг. Через 1 ч крысам внутривенно вводят вещество Vx в дозе LD₅₀, фиксируют гибель 25,0% животных и наблюдают уменьшение количества погибших животных в 2 раза по сравнению с контрольной группой.

30 Ферментный биокатализатор в виде нековалентного полиэлектролитного комплекса с зарядовым соотношением фермента и блок-сополимера 1:5, полученный как описано в Примере 4, вводят внутривенно белым крысам марки Sprague Dawley в дозе 1 мг/кг. Через 1 ч крысам внутривенно вводят вещество Vx в дозе LD₅₀, фиксируют гибель 16,7% животных и наблюдают уменьшение количества погибших животных в 3 раза по сравнению с контрольной группой.

35 Таким образом, заявляемое изобретение в сравнении с известными аналогами и прототипом характеризуется:

- существенным упрощением технологии получения, не требующей применения сшивающих химических агентов, формирующих ковалентные связи между функциональными группами фермента и полимера, модифицирующего белковую поверхность;
- получение нековалентных комплексов вместо ковалентных, как основы формирования заявляемого ферментного биокатализатора, а также применение более каталитически активного, чем ОРН, полигистидин-содержащего полипептида позволяет
- 45 значительно увеличить каталитическую эффективность действия получаемых наночастиц;
- высокая активность заявляемого ферментного биокатализатора позволяет значительно снизить вводимую дозу, существенным образом улучшив экономическую

сторону применения подобных антидотов и уменьшив возможность их иммунотоксичного эффекта;

- заявляемый ферментный биокатализатор характеризуется существенным снижением количества полимера, используемого для получения наноразмерных стабильных частиц (снижение соотношения фермент:полимер от 1:400-800, характерной для аналогов и прототипа до 1:5 в максимуме для предлагаемого решения), что также улучшает экономическую характеристику заявляемого ферментного биокатализатора;
- заявляемый ферментный биокатализатор обладает широким субстратным спектром действия в отношении ФОС и проявляет высокую активность в реакциях гидролиза пестицидов и отравляющих веществ (на примере вещества Vx) *in vivo*.

Формула изобретения

1. Ферментный биокатализатор в виде наноразмерных частиц для детоксификации фосфорорганических соединений *in vivo*, отличающийся тем, что представляет собой нековалентные полиэлектролитные комплексы, состоящие из полигистидин-содержащего полипептида со свойствами органофосфатгидролазы и блок-сополимера полиэтиленгликоля и полиглутаминовой кислоты, взятых в зарядовом соотношении фермент:блок-сополимер в диапазоне от 2:1 до 1:5.
2. Ферментный биокатализатор по п.1, отличающийся тем, что полиэлектролитные комплексы представляют собой наночастицы размером 29 ± 4 нм, сформированные при pH 7,5-10,5 и температуре +8-(+30)°C.
3. Ферментный биокатализатор по п.1, отличающийся тем, что молекулярная масса блок-сополимера находится в диапазоне 6,5-13 кг/моль.
4. Ферментный биокатализатор по п.1, отличающийся тем, что полиглутаминовая кислота имеет степень полимеризации 50-100, полиэтиленгликоль - 119.

30

35

40

45