



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 157 405** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) МПК<sup>7</sup> **C 12 N 11/14**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 98122582/13, 11.12.1998

(24) Дата начала действия патента: 11.12.1998

(46) Дата публикации: 10.10.2000

(56) Ссылки: Березин И.В. и др. Имобилизованные ферменты. - М.: Высшая школа, 1987, с.157.  
Муронце В.И., Наградова Н.К. Имобилизованные олигомерные ферменты. - М.: Наука, 1984, с.8-17.

(98) Адрес для переписки:  
170642, г.Тверь, ул. Советская 4, ТГМА

(71) Заявитель:

Тверская государственная медицинская академия,  
Стрелец Евгений Владимирович

(72) Изобретатель: Стрелец Е.В.

(73) Патентообладатель:

Тверская государственная медицинская академия,  
Стрелец Евгений Владимирович

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ С МОЛЕКУЛЯРНЫМ ЙОДОМ И ЙОДИДОМ КАЛИЯ

(57)

(57) Изобретение относится к биотехнологии, экспериментальной микробиологии. Может найти применение в медицине, при получении препаратов, в которых ферменты связаны с йодом, при создании биологических фильтров. Ферменты переводят в твердофазное состояние

реакцией комплексообразования с молекулярным йодом и йодидом калия. Используют их водные растворы в качестве иммобилизующих агентов, которые остаются в составе твердофазных комплексов. Активность ферментов после иммобилизации составляет 70-87% от контроля, они сохраняют активность до 1 мес.

RU 2 1 5 7 4 0 5 C 2

RU 2 1 5 7 4 0 5 C 2



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 157 405** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **C 12 N 11/14**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 98122582/13, 11.12.1998  
(24) Effective date for property rights: 11.12.1998  
(46) Date of publication: 10.10.2000  
(98) Mail address:  
170642, g.Tver', ul. Sovetskaja 4, TGMA

(71) Applicant:  
Tverskaja gosudarstvennaja meditsinskaja  
akademija,  
Strelets Evgenij Vladimirovich  
(72) Inventor: Strelets E.V.  
(73) Proprietor:  
Tverskaja gosudarstvennaja meditsinskaja  
akademija,  
Strelets Evgenij Vladimirovich

(54) **METHOD OF PREPARING IMMOBILIZED ENZYMES USING COMPLEX FORMATION REACTION WITH MOLECULAR IODINE AND POTASSIUM IODIDE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, experimental microbiology. SUBSTANCE: enzymes are converted to the solid-phase state by reaction of complex formation with molecular iodine and potassium iodide. Their aqueous solutions are used as immobilizing agents that remain in composition of solid-phase

complexes. Enzyme activity after their immobilization is 70-87% of control value and enzymes retain activity for 1 month. Invention can be used in medicine for preparing preparations where enzymes are bound with iodine for design of biological filters. EFFECT: improved method of preparing, high activity of immobilized enzymes.

RU 2 1 5 7 4 0 5 C 2

RU 2 1 5 7 4 0 5 C 2

Изобретение относится к бионеорганической химии, биотехнологии, фармакологии и экспериментальной микробиологии.

В связи с тем, что возбудители различных инфекций со временем приобретают резистентность к существующим лекарственным формам, вопрос о поисках эффективных препаратов для лечения и профилактики является одним из актуальных.

Наиболее оправданным с экологических позиций является применение способов борьбы с инфекцией, аналога которых существуют в природе. Применение натуральных ферментов в этом направлении оправдано.

Ферменты, такие как лизоцим, трипсин, ДНК-аза, широко применяются в медицинской практике и фармакологии. Один из способов повышения эффективности ферментов - их иммобилизация. Иммобилизации ферментов посвящен один из разделов биотехнологии.

Известен способ ковалентного присоединения ферментов к поверхности носителя (Березин И.В. и др. Иммобилизованные ферменты М., Высшая школа, 1987). Способ заключается в химической модификации фермента аналогом мономера, т.е. соединением, содержащим ненасыщенные связи. При последующей сополимеризации с мономером, молекула фермента формирует вокруг себя поверхность носителя, комплементарную собственной, ковалентно к ней присоединяясь.

Недостатком данного способа является применение тяжелых токсичных реагентов для модификации ферментов (например, хлорангидрида акриловой кислоты). Возможно ожидать появление аллергических реакций в случае медицинского применения.

В качестве прототипа нами избран способ модификации путем внутримолекулярного сшивания фермента бифункциональными реагентами (Березин И.В. и др. Иммобилизованные ферменты М., Высшая школа, 1987).

Однако существует ряд недостатков, которые снижают ценность метода внутримолекулярного сшивания ферментов для практических целей. Среди них: эмпирический характер поиска оптимального сшивающего агента, применение для модификации реагентов - продуктов химического синтеза, которые могут вызвать негативный ответ в случае медицинского применения, возникает необходимость дополнительной очистки модифицированных ферментов и проведения аллергологических и токсикологических исследований. В случае ковалентной сшивки имеет место малая продолжительность работы активного центра фермента, что резко ограничивает возможность применения модифицированных ферментов.

Нами предлагается способ получения иммобилизованных ферментов с помощью реакции комплексообразования с полииодидами и молекулярным йодом, который базируется на химическом взаимодействии лизосомальных ферментов и галогенов, которое приводит к образованию твердофазных комплексов. В результате образуются белки, содержащие связанный йод. Технический результат достигается

смешиванием предварительно приготовленных растворов ферментов (1 мг/мл) с раствором Люголя (1:3). Растворы компонентов реакции берутся в равных объемах - 1 мл. Реакция проводится при комнатной температуре. Оптимальное соотношение фермент: [I<sub>2</sub>] в реакции комплексообразования с полииодидами и молекулярным йодом определяется с помощью гравиметрического анализа. Комплексы являются стабильными в интервале pH 4-8,5.

В результате реакции комплексообразования ферменты, содержащие связанный йод, переходят из раствора в твердофазное состояние. Оно характеризуется образованием микрокомплексов (микрочастиц) размером до нескольких микрон (мкм), которые имеют огромную общую площадь поверхности активных центров ферментов, способных взаимодействовать с молекулами микробных субстратов, находящимися в окружающей среде.

Микрочастицы твердофазных ферментов имеют тенденцию к агрегации - укрупнению в макрокомплексы размером до нескольких десятков и сотен мкм.

Предлагаемый нами способ получения иммобилизованных ферментов с помощью реакции комплексообразования с полииодидами и молекулярным йодом имеет ряд преимуществ перед известными. Преимущество связано с близостью предлагаемого способа к природным механизмам обезвреживания микроорганизмов, функционирующим в лейкоцитах и макрофагах. Реакция комплексообразования с полииодидами и молекулярным йодом осуществляется даже, если ферменты связаны активными центрами с соответствующими субстратами - пептидогликаном, полипептидами, дезоксирибонуклеиновыми кислотами. Активные центры вышеуказанных ферментов при взаимодействии с пептидогликаном, полипептидами, дезоксирибонуклеиновыми кислотами образуют ван-дер-ваальсовы и водородные связи с каждой молекулой соответствующего микробного субстрата. Активные центры указанных ферментов, связанных с молекулярным йодом и полииодидами, сохраняют каталитическую активность и осуществляют гидролитические реакции биомолекул.

Способ получения иммобилизованных ферментов с помощью реакции комплексообразования с полииодидами и молекулярным йодом позволяет расширить возможности предлагаемой технологии за счет использования других лизосомальных антимикробных ферментов и других галогенов и галогенидов. Аналоги лизосомальных ферментов - трипсин, химотрипсин, ДНК-аза, РНК-аза производятся промышленностью из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Их субстрактный профиль сходен с лизосомальными ферментами. Лизоцим производится также для медицинских целей.

Использование галогенов в связанном с белками виде является предпочтительным с медицинской точки зрения. За счет связанного с ферментным белком йода достигается микробицидность препаратов.

Преимуществом способа получения

иммобилизованных ферментов с помощью реакции комплексообразования с полииодидами и молекулярным йодом является его несложность, доступность, относительная рентабельность. Все препараты выпускаются отечественными производителями и являются вполне доступными.

Очевидно, что способ практически не нуждается в дополнительных клинических испытаниях. По сути, любая обработка поврежденных тканей раствором йода или раствором Люголя в быту, в практике здравоохранения сопровождается формированием комплексов лизоцим-йод, ДНК-аза-йод, трипсин-йод и др. Образование таких комплексов имеет место, т.к. при повреждении соматических клеток выделяется большое количество внутриклеточных трипсиноподобных ферментов, нуклеаз, лизоцима и др. Этот феномен ранее не был обнаружен и не были оценены свойства этих комплексов.

Предлагаемый способ дает возможность получать препараты, в которых ферменты, используемые для связывания соответствующего субстрата, не фиксированы на поверхностях каких-либо специальных твердых носителей, являющихся инородными телами, причем ферменты, полученные в результате комплексообразования с галогенами, образуют твердофазные комплексы (конъюгаты) с огромной общей площадью поверхности, сохраняя при этом способность взаимодействовать с соответствующим субстратом практически всех видов микроорганизмов, формируя химические связи между ферментом и соответствующим субстратом, что является новым по сравнению с прототипом. Незафиксированность ферментов значительно расширяет возможности применения этих препаратов.

Способ получения иммобилизованных ферментов с помощью реакции комплексообразования с полииодидами и молекулярным йодом может иметь:

медицинское применение для создания препаратов связанного йода на основе природных веществ белкового происхождения;

техническое применение для создания биологических фильтров (очистные устройства).

Предлагаемый способ получения иммобилизованных ферментов с помощью реакции комплексообразования с полииодидами и молекулярным йодом в

случае медицинского применения может быть выполнен в двух вариантах, примеров.

Вариант 1.

5 Смешиваются равные объемы раствора соответствующего фермента (1 мг/мл) и раствора Люголя, взятых в разведении 1:3 ( $I_2$  - 0,1 г; KI - 0,2 г;  $H_2O_{dest}$  - 90 мл). Реакция проводится при комнатной температуре в течение 1-2 мин. Твердофазные комплексы фермент-йод выпадают в виде осадка. Отделение комплексов от не прореагировавших компонентов реакции 10 проводятся фильтрованием или центрифугированием. Центрифугирование осуществляют при 5000 об/мин 3 минуты однократно. При повторном 15 ресуспендировании-центрифугировании комплексы разукрупняются и/или растворяются.

Вариант 2.

20 Смотри вариант 1. После добавления раствора Люголя необходимо ввести в реакционную смесь 1,8% раствор  $FeCl_3$  в соотношении 1:20 (относительно объема раствора фермента). Очистка комплексов - смотри вариант 1. При использовании 25 повторного ресуспендирования-центрифугирования комплексы остаются стабильными.

Активность ферментов после 30 иммобилизации составляла 85-87% от уровня контроля при использовании варианта 1 и 70-80% - при использовании варианта 2. Ферменты сохраняли свою активность достаточно длительный срок - 1 месяц (максимальный срок наблюдения). В конце 35 срока наблюдения активность ферментов соответственно составляла 78-80% и 65-70% от контроля.

Литература

1. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек В.В., Можаяев В.В., Хмельницкий Ю. Л., Имобилизованные ферменты. - М.: Высшая школа, 1987. 157 с.

#### 40 Формула изобретения:

Способ получения иммобилизованных ферментов с помощью реакции комплексообразования с молекулярным йодом и йодом калия, предусматривающий химическую модификацию лизосомальных ферментов иммобилизующими агентами, отличающийся тем, что ферменты переводят в твердофазное состояние 45 иммобилизующими агентами, в качестве которых используют молекулярный йод и йодид калия в водном растворе, остающиеся в составе твердофазных комплексов.

55

60