

C12Q 1/46 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2019-243
(22) Přihlášeno: 17.04.2019
(40) Zveřejněno: 29.10.2020
(Věstník č. 44/2020)
(47) Uděleno: 12.11.2020
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 23.12.2020
(Věstník č. 52/2020)

(56) Relevantní dokumenty:
Zeman, Jiří, et al. "The development of a butyrylcholinesterase porous pellet for innovative detection of cholinesterase inhibitors." European Journal of Pharmaceutical Sciences 109 (2017): 548-555. issn:0928-0987; ZEMAN, Jiří, et al. "Tubes for detection of cholinesterase inhibitors—Unique effects of Neusilin on the stability of butyrylcholinesterase-impregnated carriers." Enzyme and microbial technology, 2019, 128: 26-33. issn:0141-0229. EP 3196315 A1; CZ 306803 B6.

(73) Majitel patentu:
ORITEST spol. s r.o., Praha 5, Smíchov, CZ
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno,
Královo Pole, CZ

(72) Původce:
doc. David Vetchý, Ph.D., Hvozdec, CZ
doc. Aleš Franc, Ph.D., Brno, CZ
Mgr. Jiří Zeman, Brno, CZ
prof. Vladimír Pitschmann, CSc., Praha 5, CZ
Ing. Josef Orel, Praha 9, Kyje, CZ

(54) Název vynálezu:
**Obalené sférické matricové pelety určené k
adjustaci do detekčních trubiček k detekci
inhibitorů cholinesteráz**

(57) Anotace:
Obalené sférické matricové pelety, tvořené jádrem a obalem, obsahující imobilizovaný enzym na bázi cholinesteráz jako jsou acetylcholinesteráza a/nebo butyrylcholinesteráza, o aktivitě 1 až 100 kat.g⁻¹, kde enzym je v jádrech imobilizován na porézním, vodonerozpustném anorganickém materiálu, výhodně aluminiummetasilikátu, a tato jádra jsou obalena semipermeabilním obalem z vodonerozpustného polymeru výhodně na bázi derivátů akrylátů, přičemž celková koncentrace obalu činí 1 až 10 % hmotnosti sférických obalených matricových pelet a průměr výsledné velikosti obalených sférických matricových pelet se minimálně ze 75 % nachází v rozmezí velikosti 0,1 až 3,0 mm, výhodně 0,8 až 1,25 mm, přičemž jádra pelet jsou vyrobena metodou extruze-sféronizace a obal je nanášen nástřikem ve fluidním loži a výsledné obalené sférické matricové pelety se použijí k detekci inhibitorů cholinesteráz ve formě detekční trubičky obsahující uvedené obalené sférické matricové pelety.

Obalené sférické matricové pelety určené k adjustaci do detekčních trubiček k detekci inhibitorů cholinesteráz

5 Oblast techniky

Vynález se týká obalených sférických matricových pelet, určených zejména pro detekci inhibitorů cholinesteráz metodou enzymatické hydrolýzy substrátového acetylthiocholinu a/nebo butyrylthiocholinu za vzniku odpovídajícího thiolu, který je indikován barevnou změnou redoxního indikátoru nebo metodou enzymatické hydrolýzy chromogenního substrátu, a obsahujících imobilizovaný enzym na bázi cholinesteráz o aktivitě 1 až 100 nkat.g⁻¹, jakož i způsobu výroby těchto pelet extruzí-sféronizací nebo rotogranulací s následným fluidním obalením, použití těchto pelet pro detekci inhibitorů cholinesteráz a detekční trubičky obsahující uvedené obalené sférické matricové pelety a určené zejména pro detekci nervově paralytických látek (NPL) v ovzduší.

Dosavadní stav techniky

Imobilizované enzymy jsou obvykle proteázy, které jsou fyzikálně uzavřeny v omezené oblasti, aniž by ztratily svojí specifickou, enzymatickou aktivitu. Mohou být použity i opakovaně a/nebo kontinuálně. Imobilizace zde zajišťuje dostatečný kontakt reaktantů s enzymem, přičemž reaktant je obvykle obsažen v kapalně fázi, která prochází pevnou fází s imobilizovaným enzymem, případně je reaktant obsažen ve fázi plynné, která je nemísitelná s vodou. Na pevnou fází je zde kladeno několik požadavků. Má mít velký měrný povrch, hydrofilní charakter, má být nerozpustná ve vodě a chemicky, mechanicky a teplotně stálá. Má mít rovněž vhodný tvar a velikost částic, být odolná proti mikrobiálnímu působení a dovolit opakované a/nebo kontinuální používání. V současné době se používá řada způsobů imobilizace.

30 Způsoby imobilizace

Enzymy na bázi cholinesteráz jsou známy v imobilizovaném stavu již řadu let. K jejich imobilizaci se používají stejné způsoby jako u ostatních proteáz. Patří sem zejména adsorpce na nerozpustný nosič, vazba na ionexy, vazba na magnetické částice, zabudování do membrán a filmů, zabudování do gelů a pěn, zesíťené agregáty, imobilizace pomocí nanostruktur, imobilizace pomocí kovalentní vazby či pomocí protilátek. Lze proto říci, že obecně se k jejich imobilizaci používají substráty a techniky, které nacházejí širší uplatnění v biochemickém průmyslu. V patentové a odborné literatuře je zachycena již řada chráněných postupů, mezi nimiž někdy nelze jednoznačně diferencovat, neboť v sobě obsahují více uvedených principů. Všechny tyto systémy se pak vyskytují, ať už jednotlivě nebo kombinovaně, v různých detekčních systémech.

Následující taxonomie je uvedena pro větší přehlednost.

45 a) Sorpce na nerozpustný nosič

Jedná se o nejstarší způsob imobilizace, kde se mezi sorbentem a enzymem uplatňují například běžné síly koheze, adheze, vodíkové můstky, van der Waalovy síly apod.

Patentový dokument US 3049411 (1962) uvádí u imobilizace cholinesterázy materiály, jako je například filtrační papír nebo silikagel. Daný sorbent byl impregnován 4% roztokem enzymu, do něhož byl přidán hovězí sérový albumin nebo želatina, popř. jiná „stabilizující“ bílkovina, a směs byla následně vysušena. Při zjišťování potenciální kontaminace byl disk „enzymového papírku“ zvlhčen a pak přes něj byl prosán vzduch. Po aplikaci detekčního roztoku obsahujícího indoxylacetát, neinhibovaná cholinesteráza substrát rozštěpila. Vzniklý indoxyl pak byl vzduchem oxidován na indigo. Takto imobilizovaný enzym zůstal delší dobu aktivní i při

relativně vysokých teplotách, pokud byl skladován v suchu.

Rovněž patentový dokument US 4241180 (1980) uvádí filtrační papír jako substrát pro butyrylcholinesterázu, kde namísto albuminu bylo s obdobnými výsledky použito roztoku 2-merkaptioethanolu.

Patentový dokument US 3666627 A (1971) uvádí jako inventivní krok při impregnaci porézního skla skutečnost, že enzym byl vázán na nosič za přítomnosti substrátu. Vazbou bylo zablokováno aktivní místo enzymu, takže se skupiny aktivního místa nemohly podílet na reakci se substrátem. Získaný imobilizovaný enzym pak měl vyšší stabilitu i aktivitu.

Patentový dokument US 3802997 (1972) chrání analogický způsob imobilizace enzymů, doplněný o sušení produktu lyofilizací nebo v rozprašovací sušárně. Jednodušším způsobem je příprava enzymového papírku podle patentového dokumentu US 4120754 (1978), kde byla butyrylcholinesteráza imobilizována na filtračním papíře impregnací roztokem enzymu v pufru obsahujícím Tergitol 15-S-12. Papírek byl použit k detekci inhibitorů organofosfátového typu.

Ze sorpce cholinesteráz na vybělenou bavlněnou tkaninu pak vychází patentový dokument CZ 288576 (1994) a ze sorpce na granulovanou celulózu pak patentový dokument CZ 285242 (1995).

Patentový dokument US 2008160556 (2008) chrání úpravu filtračního papíru pro imobilizaci acetylcholinesterázy určeného pro přípravu proužku pro detekci inhibitorů acetylcholinesterázy. Filtrační papír byl nejprve impregnován kaseinátem vápenatým a po vysušení na něho byla nanášena směs roztoku enzymu s trehalózou a Ellmanovým činidlem. Jako další nerozpustný nosič může být využito sklo ve formě tenkých kapilár (J. Environmental Anal. Chem. 1980, 8, 277-282), polystyrénová fólie (Toxicol. Appl. Pharmacol. 1984, 73, 105-109) nebo povrch elektrody (NATO ASI Series 1988, 226, 187-194).

Jako další nerozpustný nosič k imobilizaci acetylcholinesteráz slouží i sférické pelety, ty mohou být například tvořené mikrokrystalicou celulózu bez nebo s oxidem hlinitým a koloidním oxidem křemičitým (Čes. Slov. Farm., 2012, 61, 234-239). Patent EP 3196315 (2016) pak chrání možnost imobilizace acetylcholinesterázy a/nebo butyrylcholinesterázy za pomoci nerozpustného nosiče na bázi magnesiumaluminometasilikátu se specifickým povrchem 200 až 400 m².g⁻¹, který byl zpracován do sférických pelet spolu alespoň jedním sféronizačním činidlem.

b) Vazba na ionexy

Postup imobilizace cholinesterázy a její stabilizace na celulózové podložce chrání patentový dokument US 4324858 (1982). Jako sorbent je zde využit iontoměničový DEAE nebo ECTEOLA papír s bazickými skupinami kovalentně navázanými na celulózu. Jako zdroj cholinesterázy byla využita plazma elektrického úhoře (*Electrophorus electricus*).

Podobně patentový dokument EP 0176585 B1 (1988) uvádí jako nosič iontoměničový papír s diethylaminoethylovými skupinami pro impregnaci cholinesterázy z platýze. Nejlepších výsledků bylo dosaženo, když byl iontoměničový papír nejprve ekvilibrován s roztokem chloridu sodného a po promytí a vysušení impregnován roztokem cholinesterázy ve fosfátovém pufru s obsahem sacharózy, dextranu a smáčedla Tween 80. Po vysušení mohl být enzymový papír přechováván v zatavených polypropylenových sáčcích při zachování minimálně poloviční počáteční aktivity po dlouhou dobu za vysoké teploty. K dosažení dobré stability byla nutná přítomnost sacharózy.

c) Vazba na magnetické částice

Magnetické částice s imobilizovanou cholinesterázou byly využity ke stanovení inhibitorů cholinesterázy průtokovou injekční analýzou (FIA). Imobilizovaný protein zde byl uvolněn

elektrickým impulzem (Anal. Chim. Acta 1990, 234, 113-117). K FIA je krom magnetických částic možné využít i pouhé porézní sklo (J. Chromatogr. A. 1991, 539, 47-54) případně různé methakryláty (Anal. Chim. Acta 1996, 324, 21-27).

5 d) Zabudování do membrán a filmů

Patentový dokument US 2475793 (1949) popisuje imobilizovanou cholinesterázu na bezbarvém krevním stromatu, které lze považovat za biologickou membránu, kde je vázána fyzikálními a iontovými vazbami. I po dalších úpravách ovšem enzym nebyl dostatečně stabilní, což vyplynulo ze snižování aktivity uvolněné cholinesterázy z nerozpustného podílu po několikadenním skladování v lednici.

Patentové dokumenty CZ 284970 (1997) a CZ 6566 (1997) chrání platinovou elektrodu s nanesenou grafitovou vrstvou modifikovanou kobaltnatým komplexem ftalocyaninu, která byla potažena membránou s imobilizovanou cholinesterázou. Membrána byla vytvořena nanesením směsi roztoku hovězího séra albuminu, roztoku butyrylcholinesterázy a roztoku glutaraldehydu jako látky síťující bílkoviny a roztoku fosfátového pufru o pH 7,4. Membrána pak vznikla zaschnutím nanesené vrstvy při pokojové teplotě.

Patentový dokument CN 101586100 (2012) chrání filmy obsahující imobilizovanou cholinesterázu, které jsou vytvořeny z roztoků vodorozpustných polymerů, jakými jsou polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon nebo arabská guma ve fosfátovém pufru. Dále se může jednat o kompozit obsahující kromě vodorozpustného polymeru i „lipoplast“ ve formě lipofilního polymeru. K vytvořeným roztokům se přidává enzym a hovězí sérum albumin. Enzymový film se připravuje jejich nasáknutím nebo nanesením na vhodnou podložku.

Dále existují práce, které popisují zabudování cholinesteráz do polyakrylové membrány, případně pomocí kovalentní vazby na povrch nylonových trubiček, nebo imobilizaci v lipidických membránách lipozomů (Adv. Mat. Res. 2013, 726-731, 850-853). Jsou známy také pokusy o imobilizaci v nitrocelulózovém filmu (Anal. Chim. SSSR 1990, 45, 1002- 1004).

e) Zabudování do gelů

Patentový dokument US 4241180 (1980) uvádí imobilizaci cholinesterázy z koňského séra v polysacharidovém gelu na bázi škrobu, agaru nebo karagenanu, který vznikl lyofilizací tuhnutí gelu na filtračním papíře. Imobilizovaná cholinesteráza pak rozštěpila substrát a vzniklý thiocholin zredukoval modrý 2,6-dichlorfenolindofenol na bezbarvý produkt. Byl-li k roztoku přidán inhibitor cholinesterázy, k odbarvení nedošlo. Nevýhodou takto připravovaných polysacharidových gelů je nízká mechanická pevnost.

Tuto nevýhodu odstraňuje patentový dokument DE 2946642 (1988), který využívá vyšších koncentrací škrobu. Připravuje se zde škrobový extrudát, vznikající extruzí škrobové pasty. Ten se následně vysuší, rozeleme a přesítuje.

Patentový dokument WO 8300345 (1987) chrání způsob navázání enzymů na kopolymerní gely, obsahující karboxylové skupiny. Nosičem enzymu byl slabě kyselý katex Akrilex C-100, což je parciálně hydrolyzovaný kopolymer akrylamidu s methylen-bis-akrylamidem. Ten ve srovnání s jinými nosiči poskytl nejlepší výsledky. Při srovnávacích experimentech byla úspěšná i imobilizace v zesíleném maleinanhidridu.

Patentový dokument BG 50904 (1992) popisuje imobilizaci cholinesterázy z hovězího, telecího a lidského séra v agarovém gelu. Enzym se na sorbentu zachytil v prostředí s nízkou iontovou silou. Adsorpční vazba enzymu byla při nízké iontové síle dostatečně silná, o čemž svědčilo vymytí balastních bílkovin při promývání roztokem chloridu sodného. Při zvýšení iontové síly se však enzym uvolnil a byl vymyt.

Patentový dokument WO 2009061921 (2009) chrání způsob stabilizace cholinesterázy formou imobilizace v pórech gelu na bázi přírodních i syntetických polymerů. Vedle toho uvádí i stabilizaci ve formě liposomů a nanokompozitů a v polyuretanové pění.

Existují i odborné studie, zabývající se imobilizací acetylcholinesteráz k analytickým účelům za pomoci fluorimetrie do škrobového gelu, naneseného na polyuretanové podložce (Anal. Chem. 1965, 37, 1675-1680) nebo v enzymových polštářcích (Anal. Biochem. 1967, 19, 587-592).

f) Zabudování do pěny

Patentový dokument US 6406876 B1 (2002) uvádí polyuretanovou pěnu jako prostředek imobilizace cholinesteráz. Tento způsob imobilizace spočívá v reakci aminoskupiny lysinových a argininových zbytků lokalizovaných na povrchu molekuly, přičemž žádná není na vstupu do dutiny aktivního centra. Navázání enzymu proto neblokuje přístup substrátů, inhibitorů a reaktivátorů do katalytického místa. Příprava porézního nosiče zahrnuje použití prepolymeru a povrchově aktivní látky. Výsledek imobilizace značně závisí na intenzitě míchání během polymerace. Před denaturací vlivem střížných sil chránil imobilizovaný enzym přídavek povrchově aktivních látek, jako je Pluronic C-65, popř. malé množství glycerolu. Imobilizované enzymy jsou stále i při vyšší teplotě. Při konstrukci biosenzoru mohou být spolu s cholinesterázou koimobilizovány i další enzymy.

Patentové dokumenty US 6759220 (2004) a US 7422892 (2008) obsahují variace ve způsobu přípravy polyuretanové pěny, které ovlivňují jak její vlastnosti, tak i stupeň interakce enzymu s reaktivními skupinami pre-polymeru. Z hydrolytických enzymů zde byly imobilizovány i butyrylcholinesteráza a acetylcholinesteráza. Zařízení s těmito enzymy bylo využito pro kontinuální monitoring různých inhibitorů ve vodě i ve vzduchu,

g) Zesítené agregáty

Patentový dokument RU 2182929 (2002) uvádí metodu zesítení bílkoviny glutaraldehydem k imobilizaci cholinesterázy z koňského séra. Předmětem ochrany je souprava pro stanovení inhibitorů cholinesteráz s použitím imobilizovaného enzymu. Imobilizace byla provedena rovnoměrným nanášením roztoku cholinesterázy z koňské krve v pufru, spolu se síťujícím činidlem, na pohybující se pás vláknitého materiálu. Nanášení enzymu a činidla probíhalo dvěma oddělenými trubicemi.

Patentový dokument RU 2386120 (2010) chrání optický biosenzor pro detekci ireverzibilních inhibitorů, který obsahuje jako aktivní prvek intenzivně fluoreskující komplex cholinesterázy s reverzibilním inhibitorem - luminogenem. Komplex je imobilizovaný na „neutrální podložce“ uzavřením v N-isopropylakrylamidovém gelu řídce síťovaném methylenbisakrylamidem. Zesítený gel se připravuje přímo na podložce fotopolymerací.

h) Imobilizace pomocí nanostruktur

Za nový typ nosiče lze považovat uhlíková nanovlákná, která byla nejprve karboxylována a pak ultrazvukem dispergována v roztoku. Po odstranění roztoku vzniká porézní membrána, která může prostřednictvím karbodiimidu sloužit k vazbě cholinesterázy (J. Mater. Chem. B 2014, 2, 915-922).

i) Imobilizace pomocí kovalentní vazby

Při tomto druhu imobilizace se používají specifické vazebné reakce mezi enzymem a substrátem. Patentový dokument US 3519538A (1970) uvádí jako sorbent, který poskytuje s enzymem kovalentní vazbu, silikagel, různé silikáty (bentonit, wollastonit) a oxidy kovů (hliníku,

- hydroxylapatitu nebo oxidu nikelnatého, jehož vrstvička byla např. získána po oxidaci sítky z niklu). Nosič byl nejprve modifikován reakcí s aminopropyltriethoxysilanem v toluenu. Primární aminoskupiny získaného produktu pak byly využity k navázání enzymů známými postupy imobilizace např. pomocí dicyklohexylkarbodiimidu. Připravený derivát s aromatickými aminoskupinami pak může být diazotován a kopulován s enzymem. Aminoskupiny modifikovaného nosiče mohou být také aktivovány reakcí s thiofosgenem za vzniku derivátu s isothiokyanátovými skupinami, které pak reagují s aminoskupinami enzymu. Nejčastěji se ale využívá reakce s glutaraldehydem, kdy se enzym váže za vzniku Schiffových bází.
- 10 Předmětem patentového dokumentu DE 1768934 (1972) je mimo jiné obecný způsob imobilizace enzymů na nerozpustný polymerní nosič s kovalentně navázaným reverzibilním inhibitorem. Na ten se pak váže odpovídající enzym, který lze z afinitní vazby uvolnit změnou pH a/nebo iontové síly prostředí, případně vytěsněním kompetitivními látkami nebo substráty.
- 15 Patentový dokument US 3809616 A (1974) uvádí jako nosič upravený filtrační papír s modifikovaným polyakroleinem s imobilizovanou cholinesterázou z koňského séra. Při imobilizaci cholinesterázy se na polymer (polyakrolein solubilizovaný siřičitany a následně zesílený reakcí s alifatickým diaminem) navázalo více než tři čtvrtiny enzymu. Cholinesteráza se přitom mohla kovalentně vázat na zbytkové aldehydické skupiny modifikovaného polyakroleinu, ale také mohla být vázána nekovalentními iontovými vazbami na jeho aminoskupiny. Po impregnování roztokem N-methylindoxylbutyrátu v isopropanolu se na papíře postupně objevilo tmavě zelené zbarvení produktu oxidací indoxylu, který vznikl hydrolýzou esteru. V přítomnosti inhibitorů cholinesterázy ve vzduchu ke vzniku zbarvení nedocházelo.
- 20 Patentový dokument US 7572764 (2009) uvádí rekombinantní lidskou acetylcholinesterázu nebo purifikovanou acetylcholinesterázu z hovězího fetálního séra a butyrylcholinesterázu, navázané skrze aminoskupinu na rozpustný polymer - methoxypolyethylenglykol 5000 nebo 20 000, který byl aktivovaný sukcinimidylpropionátem. Ve srovnání s nativním enzymem konjugáty lépe odolávají působení krevních proteáz a jsou stabilnější v krevním oběhu. Mohou proto také lépe sloužit k detoxikaci organismu od organofosfátů. Princip aktivace koncových hydroxylových skupin polyetherů deriváty sukcinimidu lze využít nejen pro přípravu rozpustných konjugátů, ale pro přípravu enzymů imobilizovaných na nerozpustných nosičích s hydroxylovými skupinami. Kromě volných aminoskupin mohou být k reakci využity i thiolové skupiny cysteinových zbytků.
- 25 Ze stejného principu vychází i patentový dokument WO 2009139905, který chrání konjugáty cholinesterázy s rozpustnými nepeptidickými polymery se zlepšenými vlastnostmi.
- Patentový dokument EP 1561100 (2005) uvádí specifický postup vazby acetylcholinesterázy na selektivní tranzistor z oxidu hlinitého prostřednictvím kyanurchloridu. Iontově selektivní tranzistor s imobilizovaným enzymem vytváří biosenzor, z něhož se enzym uvolňuje působením elektrického pole.
- 30 Patentový dokument WO 200806495 (2008) uvádí imobilizaci acetylcholinesterázy z elektrického úhoře pomocí konjugátu s avidinem, který vznikl působením glutaraldehydu. Konjugát reagoval s biotinem, který byl navázan na povrchu plastové mikrotitrační destičky. Systému je možné využít jako biosenzoru.
- Existují práce, které uvádějí vazbu cholinesterázy na piezoelektrický senzor, tvořený křemenným krystalem, povlečeným tenkými vrstvičkami zlata s navázanou monovrstvou 11-merkaptoundekanové kyseliny s derivátem kokainu inhibujícím enzym. Na takto upravený povrch je pak navázána cholinesteráza. V přítomnosti jiných inhibitorů se pak navázaný enzym uvolňuje (Anal. Bioanal. Chem. 2005, 382, 1904-1911).

j) Imobilizace pomocí protilátek

Patentový dokument EP 073889 B1 (2003) chrání imobilizaci cholinesterázy na fragment myší protilátky proti lidské sérové cholinesteráze, který je zde fixovaný sorpcí v jamkách polystyrénové mikrotitrační destičky. Tvorby komplexu fragmentu protilátky a cholinesterázy se využívá ke stanovení aktivity cholinesterázy v séru, která při onemocnění cirhózou nebo
 5 rakovinou jater klesá. Stanovení je založeno na afinitě další látky k cholinesteráze, a to lektinu z houby mísenky oranžové (*Aleuria auratia*), na nějž byl navázán biotin. Cholinesterázy jako glykoproteiny s lektiny interagují.

V analogickém patentovém dokumentu JP 10221344 A (2004) se chrání snáze dostupný lektin z
 10 čočky a značená protilátka.

Detekční systémy

Na základě výše popsaných mechanismů, uplatňujících se v imobilizaci cholinesteráz, existují
 15 detekční systémy, které využívají tyto principy ke konstrukci sofistikovaných zařízení. Ta se dají s různým úspěchem využívat při detekci inhibitorů cholinesteráz například v životním prostředí. Patentový dokument US 3689224 (1972) chrání sofistikované laminované destičkové zařízení kryté polymery monochlorotrifluoroethylenem nebo tetrafluoroethylenem, které je adjustované v hliníkové fólii. Patentový dokument US 3809617A (1974) chrání kombinované detekční disky
 20 a patentový dokument WO 8504424 (1985) chrání jednoduché detektorové kity s dvěma dotykovými plochami pro detekci látek.

Zcela originálním řešením jsou detekční trubičky pro inhibitory cholinesteráz, kde byl použit lyofilizovaný preparát butyrylcholinesteráza s plnivem želatinou, která zvyšovala stabilitu
 25 enzymu (Int. J. Environ. Anal. Chem. 1979, 6, 89-94). Patentový dokument CZ 285242 (1993) popisuje detekční trubičku k indikaci bojových chemických látek na bázi inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a ve vodě.

Z dosavadního stavu techniky vyplývá, že v současné době jsou velmi progresivním způsobem
 30 detekce inhibitorů cholinesteráz v terénu tzv. detekční trubičky. Patentový dokument CZ 285242 (1993) uvádí takový detekční systém s obsahem cholinesterázy (acetylcholinesterázy a/nebo butyrylcholinesterázy). Enzymy mohou být imobilizované na celulóзовých granulích o rozměrech 0,8 až 1,2 mm, případně na nosičích ve formě sférických pelet o velikosti 0,8 až 1,25 mm, připravených metodou extruze-sferonizace (Čes. Slov. Farm. 2012, 61, 234-239).
 35 Granulát i pelety jsou adjustovány ve skleněných trubičkách. Granule a pelety v tomto detekčním systému však poskytují poměrně málo syté zbarvení a poměrně málo zřetelný a uniformní barevný přechod při enzymatické kolorimetrické reakci, ať už s použitím chromogenních činidel a substrátů nebo samotných chromogenních substrátů. Tento stav se snažil zlepšit patent EP 3196315 (2016), který popisuje možnost imobilizace acetylcholinesterázy a/nebo
 40 butyrylcholinesterázy za pomoci nerozpustného nosiče na bázi magnesiumaluminometasilikátu, který byl zpracován do sférických pelet o rozměrech 0,8 do 1,25 mm a kterými byly detekční trubičky vyplněny. Zde sice docházelo k sytému zbarvení pelet, ale tato barva se postupem času vyplavovala do reakčního prostředí, které rovněž zbarvila, což mohlo způsobit problém v identifikaci barevného přechodu. Tento nedostatek eliminoval vynález CZ 306803 (2016), který
 45 spočívá v tom, že enzym acetylcholinesteráza a/nebo butyrylcholinesteráza je imobilizován na povrchu peletových jader ve formě pevné disperze v hydrofilním polymeru, tvořícím primární obal peletových jader, který je následně překryt sekundárním semipermeabilním obalem z vodонераzpustného polymeru. Tak nedochází k vyplavení vzniklé barvy do reakčního prostředí a zkrácení identifikace výsledného zbarvení pelety. Zavření enzymu v obalové vrstvě však vede ke
 50 snížení detekční rychlosti a proces dvojitého obalování je zdlouhavý a nákladnější. Tento nedostatek eliminuje řešení popsané v tomto vynálezu.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou obalené sférické matricové pelety, určené pro detekci inhibitorů cholinesteráz metodou enzymatické hydrolýzy substrátového acetylthiocholinu a/nebo butyrylthiocholinu za vzniku odpovídajícího thiolu, který je indikován barevnou změnou redoxního indikátoru, nebo metodou enzymatické hydrolýzy chromogenního substrátu. Obalené sférické matricové pelety obsahující imobilizovaný enzym na bázi cholinesteráz o aktivitě až 100 nkat.g⁻¹, jejichž podstata spočívá v tom, že enzym je v peletách imobilizován na porézním, vodonerozpustném anorganickém materiálu, majícím specifický povrch v rozmezí 200 až 400 nr.g⁻¹, výhodně rovný 300 nr.g⁻¹, sypnou hustotu v rozmezí 0,05 až 0,25 g.l⁻¹, výhodně rovnou 0,15 g.l⁻¹ a hodnota pH vodného výluhu se nachází v rozmezí 6 až 8, výhodně je rovna 7,4. Obal je tvořen semipermeabilní membránou, dovolující prostupu vody, zatímco obal sám je vodonerozpustný a zůstane po celou dobu testování na peletě. Výsledné obalené sférické matricové pelety mají průměr velikosti ze 75 % v rozmezí velikosti 0,1 až 3,0 mm, výhodně 0,8 až 1,25 mm.

Podíl imobilizovaného enzymu na bázi cholinesteráz na porézním, vodonerozpustném anorganickém materiálu tvoří 0,01 až 1 % hmotnosti, vztaženo na celkovou hmotnost jader obalovaných sférických matricových pelet, což je dostatečné k zajištění výsledné aktivity v rozmezí 1 až 100 nkat.g⁻¹. Enzym na bázi cholinesterázy tvoří acetylcholinesteráza a/nebo butyrylcholinesteráza, případně jejich směs v jakémkoliv poměru, výhodněji je zde obsažena butyrylcholinesteráza samotná.

Výhodně je porézní, vodonerozpustný anorganický materiál tvořen aluminiummetasilikátem spolu s alespoň jednou sféronizační pomocnou látkou, kterou výhodně tvoří mikrokrytalická celulóza. Obsah porézního, vodonerozpustného anorganického materiálu ve směsi s alespoň jedním sféronizačním činidlem tvoří 1 až 90 % hmotnosti, výhodněji 5 až 50 % hmotnosti jádra obalené sférické matricové pelety.

Obal sférických matricových pelet je tvořen deriváty akrylátu, estery a étery celulózy, šelakem, polyvinylacetátem, případně jejich směsí v libovolném poměru v celkové koncentraci od 0,1 do 15 % hmotnosti obalené sférické matricové pelety. Výhodně je tvořen směsí kopolymeru ethylakrylátu, methylmethakrylátu a esteru amonné soli methakrylové kyseliny (použita pod komerčním názvem Eudragit® RL, Evonik, Německo). Prostupnost vody obalem lze z časového hlediska zvýšit přísadou ve vodě rozpustných látek, které v obalu vytvoří póry, umožňující rychlý přístup činidla k jádru pelety s obsahem imobilizovaného enzymu. Mezi tyto vodorozpustné látky patří polyethylenglykol a/nebo polyvinylpyrrolidon, případně jejich směs. Výhodný hmotnostní poměr Eudragit® RL : polyethylenglykol : polyvinylpyrrolidon činí 1,5 až 6,5 : 0,5 až 1,7 : 0,1 až 0,5, přičemž celková koncentrace obalu činí 1 až 10 % hmotnosti obalené sférické matricové pelety. Obal je nanesen z lihového roztoku na sférická matricová peletová jádra podle uvedeného příkladu 4.

Jádra obalených sférických matricových pelet se vyrábějí metodou extruze-sféronizace nebo rotogranulace podle příkladu 1, přičemž cholinesteráza se na jádra aplikuje ponořením peletových jader do impregnační suspenze dle příkladu 3, a po vysušení dojde k její imobilizaci. Impregnovaná jádra se dále obalují nástřikem rozpuštěných, resp. dispergovaných, komponent obalu ve fluidním loži, přičemž obal se rovnoměrně vytváří na jejich povrchu, aniž by po ukončení nástřiku bylo nutné další tepelné úpravy obalu, jak je uvedeno v příkladu 4. Uvedené příklady přitom dané řešení nad rámec popisu vynálezu nikterak neomezuje. Obalené sférické matricové pelety se adjustují do skleněných detekčních trubiček v množství nezbytném k dosažení aktivity imobilizovaného enzymu na bázi cholinesteráz od 0,1 do 100 nkat, výhodně 3 nkat, v jedné detekční trubičce.

Předmětem vynálezu je rovněž detekční trubička pro detekci inhibitorů cholinesteráz metodou

enzymatické hydrolýzy substrátového acetylthiocholinu a/nebo butyrylthiocholinu za vzniku odpovídajícího thiolu, který je indikován barevnou změnou redoxního indikátoru nebo metodou enzymatické hydrolýzy chromogenního substrátu, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje výše definované obalené sférické matricové pelety a dále substrátový acetylthiocholin a/nebo butyrylthiocholin a/nebo chromogenní činidlo.

Z výše uvedeného je zřejmé, že se vynález týká složení sférických matricových obalených pelet s obsahem imobilizovaného enzymu acetylcholinesterázy, resp. butyrylcholinesterázy, (případně jejich směsi v jakémkoliv poměru) o aktivitě 1 až 100 nkat.g⁻¹, které jsou adjustovány ve formě skleněných detekčních trubiček. Trubičky s adjustovanými peletami slouží pro detekci nervově paralytických látek v potencionálně kontaminovaném prostředí.

Trubička obsahuje dvě vrstvy a dvě skleněné ampulky s roztoky. Indikační vrstva obsahuje pelety s imobilizovanou acetylcholinesterázou a/nebo butyrylcholinesterázou. Další vrstva obsahuje drcené sklo impregnované substrátovým acetylthiocholinem a/nebo butyrylthiocholinem a chromogenním činidlem - kyselina 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová), Ellmanovo činidlo. Obě ampulky jsou plněny roztokem pufru o pH 6 až 9.

Při detekci se ampulka u indikační vrstvy rozbije kovovým bodcem a její obsah se setřepe na pelety. Do trubičky se nasaje ekvivalentní objem vzduchu. Poté se rozbije druhá ampulka a její obsah se setřepe přes drcené sklo až na pelety. Hodnotí se změna zabarvení vrstvy s obsaženými peletami. Pokud dojde ke žlutému zabarvení, ovzduší neobsahuje NPL. V opačném případě zůstane vrstva beze změny, případně dochází ke žlutému zbarvení až po delší době. Jedno z možných provedení uvedené detekční trubičky je znázorněno na obr. 1, kde 1 jsou ampulky s tlumivým roztokem, 2 jsou vymežovací a těsnicí tělíska, 3 je indikační vrstva s peletami a 4 je vrstva drceného skla se substrátem a indikátorem, případně jen s chromogenním substrátem.

Principem detekce NPL je enzymatická kolorimetrická reakce, kdy v nepřítomnosti NPL dochází k hydrolýze acetylthiocholinu, resp. butyrylthiocholinu, cholinesterázou na příslušnou kyselinu a thiocholin. Thiocholin dále reaguje s kyselinou 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoovou) za vzniku kyseliny 2-nitro-5-thiobenzoové (viz obr. 2). Kyselina 2-nitro-5-thiobenzoová pak způsobí žluté zabarvení detektoru, které lze vyhodnotit pouhým okem nebo spektrofotometricky při 412 nm. Pokud ke změně barvy nedojde, jedná se o kontaminaci ovzduší NPL, kdy NPL inhibuje enzym a nedochází k uvolnění thiocholinu a následné barevné reakci. Detekční trubičku lze využít i pro zjištění přítomnosti NPL ve vodě.

Kromě kyseliny 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoové) lze k detekci NPL využít i jiná chromogenní činidla nebo chromogenní substráty, např. indoxylacetát. kdy hydrolýzou indoxylacetátu vzniká indoxyl a kyselina octová. Indoxyl se poté samovolně přeměňuje na indigo a roztok se zbarvuje do modra (obr. 3). Postup práce s trubičkou je zde obdobný.

Dosavadní řešení imobilizace enzymů ve vodorozpuštěných membránách CN 101586100 (2012) nebo pelet adjustovaných ve formě trubiček s obsahem pelet EP 3196315 (2016) mají tu nevýhodu, že při testování dochází k vyplavení zabarvení do vnějšího prostředí, čímž se snižuje intenzita zbarvení samotných pelet. V případě EP 3196315 (2016) se z těla pelet uvolňuje zabarvení do vnějšího, tekutého prostředí, které pak zhoršuje sledovat intenzitu zabarvení samotných pelet. Tuto nevýhodu odstranila řešení chráněné vynálezem CZ 306803, který popisuje imobilizaci enzymu na povrchu pelet ve vodorozpuštěné membráně ve formě primárního obalu, který je obalen ještě další vodonerozpustnou (sekundární obal), avšak semipermeabilní membránou. Sekundární obal nerozpustný ve vodě dovolí prostupu vody s činidlem k primárnímu obalu. Zde pak dojde k barevné reakci. Obal, který zůstává zachován, pak zpomalí odplavení vzniklého barviva do vnějšího prostředí. To se viditelně projeví i v zabarvení tohoto prostředí, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci uvolněného barviva. Řešení popsané ve vynálezu ovšem podstatně snižuje rychlost detekce a citlivost (obr. 4).

Současné řešení ve formě obalených sférických matricových pelet má pak oproti stavu techniky CZ 306803 tu výhodu, že zde překvapivě a neočekávaně nedochází ke snížení rychlosti detekce a citlivosti, ačkoliv je enzym zabudován v matricovém jádru pod nerozpustnou vrstvou (jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v příkladu 10 - tabulce 4). Je zde zřejmě využito synergického jevu, kdy 5 magnesiumaluminiummetasilikát díky vysokému měrnému povrchu a výhodnému pH udržuje enzym/y aktivní po delší dobu. Zároveň je přítomností vnější nerozpustné semipermeabilní membrány zabráněno vyplavování enzymu do detekčního roztoku, což vede ke vzniku intenzivnějšího žlutého zbarvení v případě nepřítomnosti NPL. Díky absenci dvojitého obalu se zde zřejmě i výrazněji uplatní osmotický efekt jádra, které rychleji přijme vodu s obsahem 10 potenciálně přítomného organofosfátu, což urychlí reakci. Redukce obalových vrstev ze dvou na jednu podstatně zjednodušuje a zkracuje i proces přípravy obalených sférických matricových pelet. Kromě toho současné řešení ve formě matricových pelet má zcela neočekávaně a překvapivě (na rozdíl od pelet s dvojitým obalem popsaných v dokumentu CZ 306803) vyšší rychlost detekce, ačkoliv se enzym v obou případech nachází ve vrstvě pod semipermeabilním 15 obalem. Obalová vrstva navíc výhodně umožní detekci NPL i ve vodních zdrojích, jelikož pelety se ve vodním prostředí nerozpadnou a zůstanou ve formě nerozpustné matrice. Proto se mluví obalených sférických matricových peletách. Následující schéma (obr. 4) umožňuje obecné porovnání výhod popsaného řešení se současným stavem techniky.

20

Objasnění výkresů

Obr. 1 je příklad konstrukce detekční trubičky.

25

Obr. 2 je reakční schéma Ellmanovy reakce.

Obr. 3 je reakční schéma s indoxylacetátem.

30

Obr. 4 je schéma vývoje nosičů na bázi pelet s principy a výhodami jednotlivých provedení.

Příklady uskutečnění vynálezu

35

Způsob přípravy podle vynálezu je objasněn následujícími příklady provedení, aniž by jimi byl rozsah vynálezu omezen.

Příklad 1

40

Tab. 1 Složení pelet v hmotnostních dílech

Neusilin®	Avicel®	Avicel®	Pharmatose®	Kollidon®
US2	PH 101	RC 581	200 M	90
39,15	28,27	7,09	12,48	13,01

45

- Laktóza monohydrát (Pharmatose® 200 M), Neusilin® US2, Avicel® PH 101 a Avicel® RC 581 smísíme po dobu pěti minut v rychloběžném mixéru (Stephan UMC 5, A. Stephan u. Söhne GmbH & Co., Německo) až vznikne homogenní suchá směs.

50

- Kollidon® 90 za stálého míchání rozpustíme ve fosforečnanovém pufru o pH 7,4 (dle Ph. Eur.) na elektromagnetické míchače, čímž získáme pojivový roztok.
- K suché směsi postupně přilijeme roztok pojiva a míšíme 5 minut v rychloběžném mixéru (Stephan UMC 5, A. Stephan u. Söhne GmbH & Co., Německo) do vzniku vlhké disperze.

- Vlhkou hmotu extrudujeme sítem o velikosti otvoru 1,00 mm na extrudéru (PharmTex 35T, Wyss and Probst Engineering, Švýcarsko) při rychlosti 60 rpm.
- Extrudát sféronizujeme na sféronizéru (PharmTex 35T, Wyss and Probst Engineering, Švýcarsko) při rychlosti 1000 rpm po dobu 20 minut.
- Vzniklé pelety vysušíme při teplotě 30 °C po dobu 72 hod. (Horo 038A, Dr. Ing. A. Hoffman GmbH, Německo) do vlhkosti pod 0,5 %.

Příklad 2

Tab. 2 Relativní četnost síťových frakcí v % hmotnosti

Velikost sít [mm]	Frakce [hmotn. %]
>2,00	0,72
2,00-1,25	30,27
1,25-1,00	46,84
1,00-0,80	19,47
0,80 - 0,50	2,68
0,50 - 0,25	0,02
<0,25	0,00
Střední průměr pelet	1,23 mm

Pro další zpracování (impregnaci - viz následující příklad 3) se provede síťové třídění tak, aby se minimálně 75 % pelet nacházelo v rozmezí 0,8 až 1,25 mm.

Příklad 3

Impregnace peletových jader enzymem

- Připraví se suspenze obsahující enzym butyrylcholinesterázu (Sigma-Aldrich, USA) se specifickou aktivitou 62,5 nkat.ml⁻¹, 5 % dextranu a 0,5 % Spolaponu 247 ve fosfátovém pufru o pH 7,6.
- K impregnaci 100 g pelet bylo použito 80 ml suspenze.
- Pelety zůstaly ponořeny v suspenzi po dobu 15 min s následným 24hodinovým sušením při teplotě 35 °C.

Příklad 4

Tab. 3 Složení obalů určených pro potah peletových jader

Složení na 100 g peletových jader			
Šarže	a	b	c
Obal [%]	1,500	2,500	5,000
Eudragit® RL [g]	1,125	1,875	3,750
Polyethylenglykol 400 [g]	0,300	0,500	1,000
Kollidon® 25 [g]	0,075	0,125	0,250
Ethanol 96% [g]	7,880	13,130	26,250
Celkem [g]	9,375	15,625	31,250

- Eudragi® RL se na elektromagnetické míchačce rozpustí v ethanolu 96% a do roztoku se za stálého míchání přidá polyethylenglykol 400, případně Kollidon® 25, a směs se míchá až do úplného rozpuštění přidaných látek.
- Roztok se poté nastříkne na povrch pelet s již ukotveným enzymem ve fluidním zařízení M-100 (Medipo, Česká republika) při teplotě 40 °C, velikosti trysky 1 mm a tlaku vzduchu 100 až 200 kPa. Obalené pelety se následně dosuší při 25 °C po dobu 24 hodin.
- Pro další zpracování (adjustaci do detekčních trubiček - viz následující příklad 5) je možné provést sítové třídění tak, aby se minimálně 75 % obalených pelet nacházelo v rozmezí 0,8 až 1,25 mm.

Příklad 5

Kompozice detekční trubičky

Trubička obsahuje (ve směru proudění kontaminovaného vzduchu):

- Ampulku s roztokem pufru (objem 0,03 ml).
- Vrstvu drceného skla impregnovaného substrátem a indikátorem (případně jenom substrátem), délka vrstvy 10 mm, hmotnost vrstvy asi 0,1 g.
- Vrstvu sférických obalových matricových pelet s imobilizovaným enzymem (vždy jednotlivě a, b, nebo c - dle příkladu 4), délka vrstvy 10 mm, hmotnost asi 0,05 g.
- Ampulku s roztokem pufru (objem 0,03 ml).

Vrstvy jsou upevněné a vzájemně oddělené vymešovými tělísky z polyethylenu, propouštějícími plyn i kapalinu (ve tvaru hvězdiček).

Příklad 6

- Obě ampule obsahují fosfátový pufr o hodnotě pH 8,0.
- Drcené sklo o zrnění 0,7 až 0,9 mm je impregnované methanolvým roztokem obsahujícím 2 % acetylthiocholin jodidu a 0,2 % kyseliny 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoové).

- Vzorek obalených matricových pelet s imobilizovaným enzymem acetylcholinesterázou o aktivitě 10 nkat.g⁻¹ nosiče.
- Indikační efekt - funkční enzym - žluté zabarvení vrstvy, po inhibici zůstává bílá.

Příklad 7

- Obě ampule obsahují fosfátový pufr o hodnotě pH 7,4.
- Drcené sklo o změni 0,7 až 0,9 mm je impregnované methanolvým roztokem obsahujícím 2,5 % butyrylthiocholin jodidu a 0,15 % 2,6-dichlorfenolindofenolu.
- Vzorek obalených matricových pelet s imobilizovaným enzymem butyrylcholinesterázou o aktivitě 30 nkat.g⁻¹ nosiče.
- Indikační efekt - funkční enzym - dochází k odbarvení modré vrstvy, po inhibici zůstává modrá.

Příklad 8

- Obě ampule obsahují fosfátový pufr o hodnotě pH 8,2.
- Drcené sklo o změni 0,7 až 0,9 mm je impregnované 2% methanolvým roztokem indoxylacetátu.
- Vzorek obalených matricových pelet s imobilizovaným enzymem butyrylcholinesterázou o aktivitě 30 nkat.g⁻¹ nosiče.
- Indikační efekt - funkční enzym - dochází ke vzniku modrého zabarvení, po inhibici zůstává bílá.

Příklad 9

- Obě ampule obsahují fosfátový pufr o hodnotě pH 7,4.
- Drcené sklo o změni 0,7 až 0,9 mm je impregnované methanolvým roztokem obsahujícím 1 % acetylthiocholin jodidu, 1 % butyrylthiocholin jodidu a 0,15 % 2,6-dichlorfenolindofenolu.
- Vzorek obalených matricových pelet s imobilizovanou směsí enzymů acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy o aktivitě 20 nkat.g⁻¹ nosiče (u obou).
- Indikační efekt - funkční enzym - dochází k odbarvení modré vrstvy, po inhibici zůstává modrá.

Obecné schéma provedení detekční trubičky a její náplně je znázorněno na obr. 1, kde 1 jsou ampulky s tlumivým roztokem, 2 jsou vymežovací a těsnicí tělíska, 3 je indikační vrstva s peletami a 4 je vrstva drceného skla se substrátem a indikátorem, případně jen s chromogenním substrátem.

Příklad 10

- Pro simulaci inhibice enzymu nervovými látkami byl použit roztok fyzostigminu (reverzibilního inhibitoru) v množství 0,2 ml, který byl použit k navlhčení pelet namísto

čištěné vody.

- Inkubační doba byla 10 minut.
- 5 • Následně bylo přidáno 0,2 ml testovacího roztoku (směs příslušného substrátu a Ellmanova činidla) a po následujících 120 sekund byl vzorek vizuálně hodnocen.
- Plně inhibovaný vzorek si během této doby zachoval původní bílou barvu. Použitím různých předem definovaných koncentrací (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 a 8,0 μg fyzostigminu na 10 1 ml) testovacích roztoků fyzostigminu byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace fyzostigminu (citlivost).

Tab. 4 Srovnání citlivosti (limitů detekce) a rychlosti detekce

Sledované parametry	Patent CZ306803	Předmět vynálezu Kompozice <i>a, b, c</i> dle příkladu 4
Citlivost (fyzostigmin)	8 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$
Rychlost detekce	> 45 s	10-15 s

15

Postup práce s trubičkou

- Rozdrtíme vrchní ampulku a setřepeme její obsah na vrstvu pelet s enzymem.
- 20 • Provedeme odběr vzorku kontaminovaného vzduchu (ruční nebo elektrickou pumpičkou, objem 1 litr vzduchu).
- Počkáme 2 minuty (doba inkubace).
- 25 • Rozdrtíme spodní ampulku a její obsah setřepat přes vrstvu drceného skla až na vrstvu pelet (smýt impregnovaná činidla).
- Vyhodnotíme změnu zabarvení vrstvy pelet. Pokud vzduch není kontaminován, systém pracuje normálně a dochází k redukci chromogenního činidla nebo hydrolýze chromogenního substrátu, což je doprovázeno barvenou změnou (zabarvení nebo odbarvení indikační vrstvy). V přítomnosti kontaminantů se zabarvení indikační vrstvy po určitou dobu 30 nemění. Na základě délky této doby lze určit koncentraci kontaminantů v ovzduší.

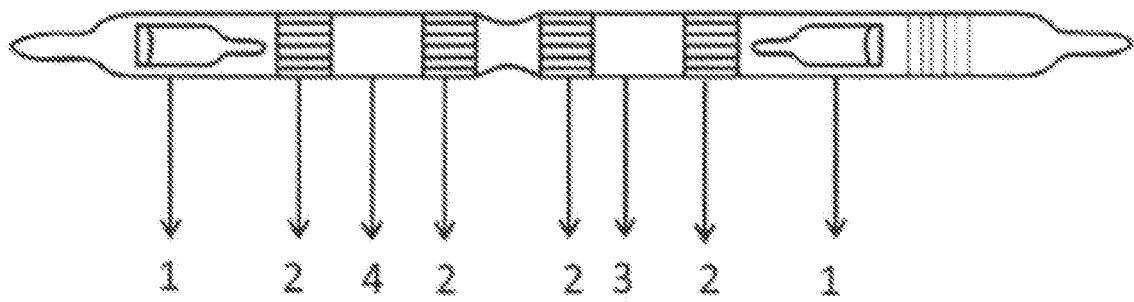
35 Průmyslová využitelnost

Obalené sférické matricové pelety by mohly mít uplatnění v průmyslové výrobě detekčních trubiček k zjišťování inhibitorů cholinesteráz, zejména nervově paralytických bojových chemických látek a dalších vojensky významných sloučenin s podobným mechanismem 40 toxického účinku. Jednoduché detekční prostředky tohoto typu jsou standardní součástí technické výbavy vojenských chemických jednotek a chemických specialistů v oblasti ochrany obyvatelstva.

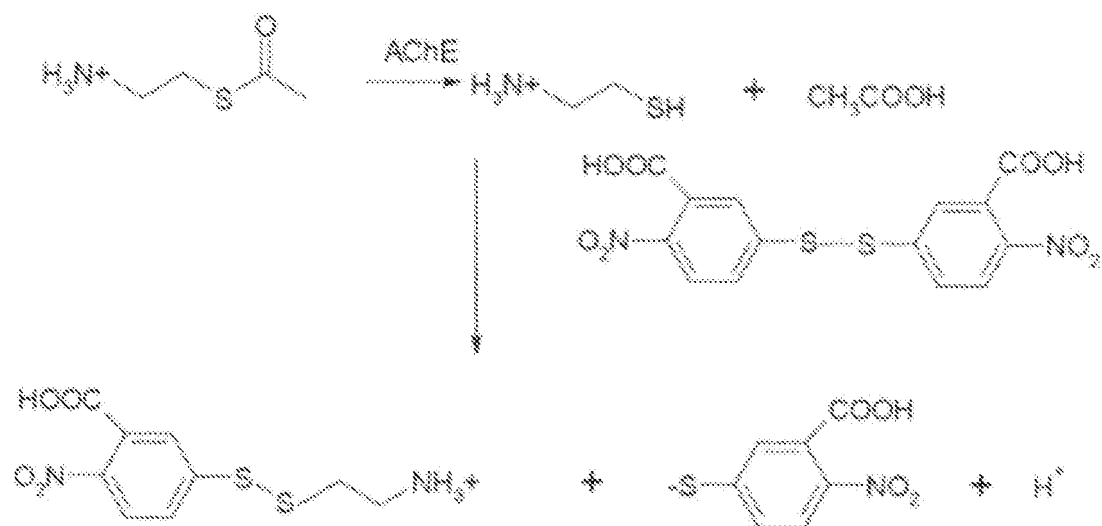
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Obalené sférické matricové pelety určené pro detekci inhibitorů cholinesteráz metodou enzymatické hydrolýzy substrátového acetylthiocholinu a/nebo butyrylthiocholinu za vzniku odpovídajícího thiolu, který je indikován barevnou změnou redoxního indikátoru nebo metodou enzymatické hydrolýzy chromogenního substrátu a obsahující imobilizovaný enzym na bázi cholinesteráz o aktivitě 1 až 100 nkat.g⁻¹, **vyznačené tím**, že enzym je v peletách imobilizován na porézním, vodonerozpustném anorganickém materiálu o specifickém povrchu v rozmezí 200 až 400 nr.g⁻¹, výhodně 300 nr.g⁻¹, o hodnotě pH vodného výluhu v rozmezí 6 až 8, výhodně 7,4, přičemž tyto pelety jsou obaleny semipermeabilním obalem z vodonerozpustného polymeru, kde celková koncentrace obalu činí 0,1 až 15 % hmotnosti sférických obalených matricových pelet a průměr výsledné velikosti obalených sférických matricových pelet se minimálně ze 75 % nachází v rozmezí velikosti 0,1 až 3,0 mm, výhodně 0,8 až 1,25 mm.
2. Obalené sférické matricové pelety podle nároku 1, **vyznačené tím**, že enzym na bázi cholinesterázy je acetylcholinesteráza a/nebo butyrylcholinesteráza, výhodně butyrylcholinesteráza, přičemž podíl imobilizovaného enzymu na bázi cholinesteráz v porézním, vodonerozpustném anorganickém materiálu je roven 0,01 až 1 % hmotnosti, vztaženo na celkovou hmotnost obalených sférických matricových pelet, k zajištění výsledné aktivity imobilizovaného enzymu v rozmezí 1 až 100 nkat.g⁻¹.
3. Obalené sférické matricové pelety podle nároků 1 a 2, **vyznačené tím**, že porézní, vodonerozpustný anorganický materiál je aluminiummetasilikát, jehož obsah je v rozmezí 1 až 90 % hmotnosti, výhodně 5 až 50 % hmotnosti jádra obalené sférické matricové pelety.
4. Obalené sférické matricové pelety podle nároků 1 až 3, **vyznačené tím**, že semipermeabilní, vodonerozpustný polymer je tvořen deriváty akrylátů, estery a étery celulózy, šelakem, polyvinylacetátem v celkové koncentraci od 0,1 do 15 % hmotnosti obalené sférické matricové pelety, výhodně směsí kopolymeru ethylakrylátu, methylmethakrylátu a esteru amonné soli methakrylové kyseliny ve směsi s polyethylenglykolem a/nebo polyvinylpyrrolidonem v jejich vzájemném hmotnostním poměru 1,5 až 6,5 : 0,5 až 1,7 : 0,1 až 0,5.
5. Způsob přípravy obalených matricových pelet podle nároků 1 až 4, **vyznačený tím**, že peletová jádra s obsahem imobilizovaného enzymu určená k nanášení obalu se vyrobí metodou extruze-sféronizace nebo rotogranulace a obal se nanese nástřikem ve fluidním loži.
6. Použití pelet podle nároků 1 až 5 k adjustaci do skleněných detekčních trubiček ke stanovení inhibitorů cholinesteráz, přičemž aktivita imobilizovaného enzymu na bázi cholinesteráz se nachází v rozmezí 1 až 100 nkat, výhodně 3 nkat v jedné detekční trubičce.
7. Detekční trubička pro detekci inhibitorů cholinesteráz metodou enzymatické hydrolýzy substrátového acetylthiocholinu a/nebo butyrylthiocholinu za vzniku odpovídajícího thiolu, který je indikován barevnou změnou redoxního indikátoru nebo metodou enzymatické hydrolýzy chromogenního substrátu, **vyznačená tím**, že obsahuje obalené sférické matricové pelety podle nároků 1 až 4 a dále obsahuje substrátový acetylthiocholin a/nebo butyrylthiocholin a/nebo chromogenní činidlo, případně jen chromogenní činidlo.

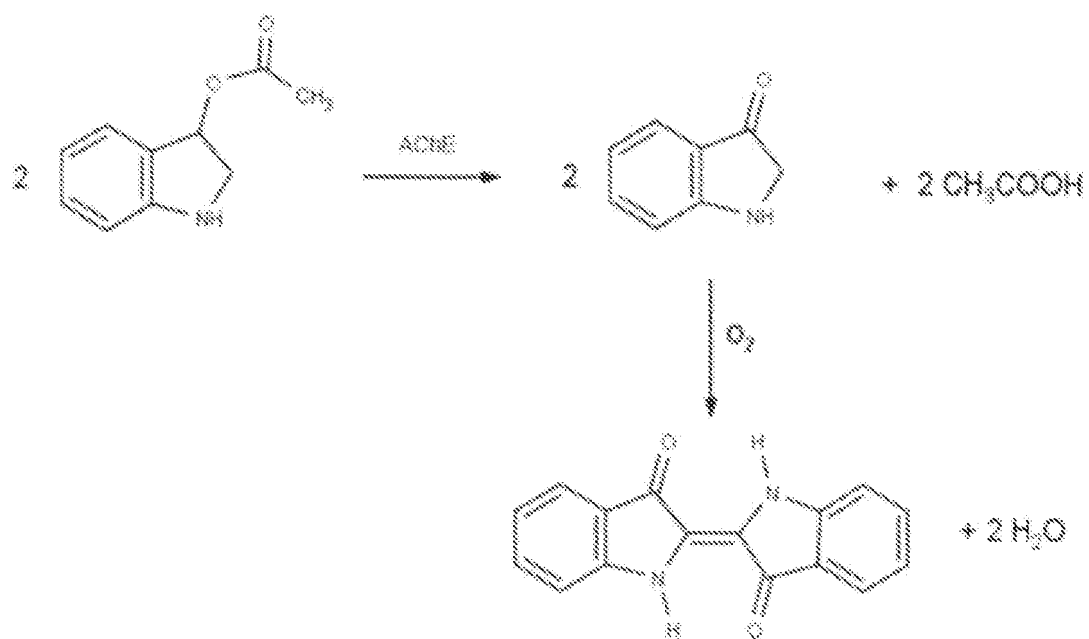
4 výkresy



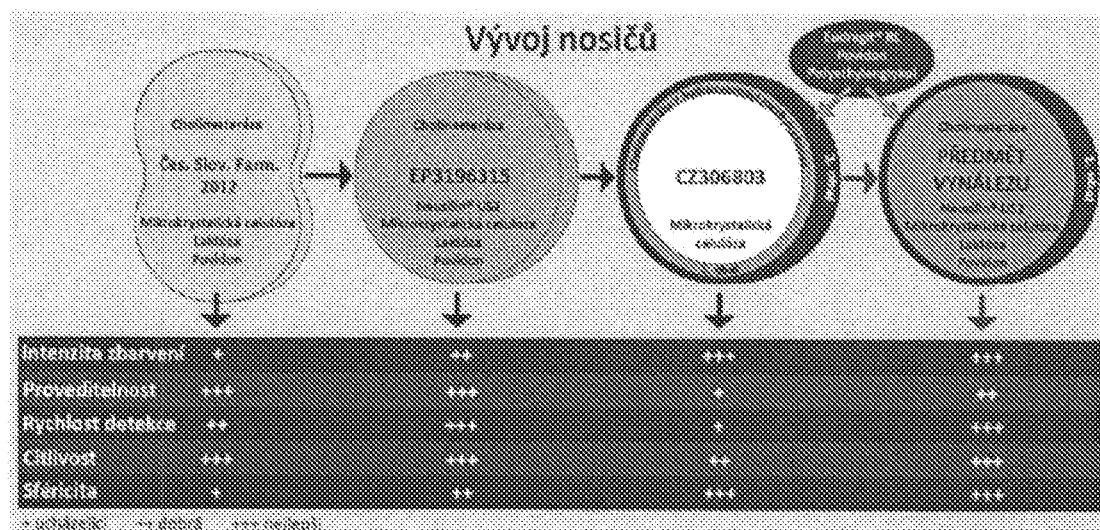
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4