



УКРАЇНА

(19) UA (11) 76069 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
B01J 20/20  
B01J 20/22  
A61K 33/44

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ДНК-ВМІСНОГО СОРБЕНТУ

1

(21) а200501788  
(22) 28.02.2005  
(24) 15.06.2006  
(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.  
(72) Снежкова Єлизавета Олександрівна, Ніколаєв Володимир Григорович  
(73) Снежкова Єлизавета Олександрівна, Ніколаєв Володимир Григорович  
(56) UA 60899, 28.03.2003  
SU 1101737 A, 07.07.1984

2

SU 1230187 A1, 07.06.1989  
SU 1683767 A1, 15.10.1991  
(57) Спосіб одержання ДНК-вмісного сорбенту, який включає обробку сорбенту розчином ДНК, наступну сушку та промивку готового продукту, який **відрізняється** тим, що після сушки сорбент інкубують в середовищі абсолютного спирту з фіксуєчим агентом не менше 12 годин при температурі вище 20°C.

Винахід відноситься до медицини, а саме, до області імуносорбції і може бути використаний для очищення крові або плазми крові хворих від ДНК-тропних речовин.

Відомо, що підвищений рівень згаданих речовин зумовлює тяжкість хвороби і їх видалення з організму сприяє покращанню клінічного стану пацієнтів. [Gaubitz, M., Schneider, K. M. Immunadsorption in systemic lupus erythematosus: different techniques and their current role in medical therapy. Therap Apher Dial, 2003, 7, 2, p. 183-8), (Amosova V.N., Iaremenko O.B., Snezhkova E.A., Drannik G. V. Efficacy of immunosorption in patients with systemic lupus erythematosus: double blind controlled trial. Terapevticheskii Arkhiv. 1997, 69 (12), 18-22].

Відомі способи отримання ДНК-вмісних адсорбентів, призначених для клінічного застосування. Так згідно способу [J. Traeger et al. Extracorporeal immunoadsorption of DNA-antibodies on DNA-coated collagen films. In "Plasmapheresis" Ed. by Y. Nose, P. Malchesky, J. Smiths. ISAO Press, Cleveland, USA, 1983, p. 155-166] отримують ДНК іммобілізовану на колаген. Спосіб зводиться до трьох стадійного активування бокових карбоксильних груп колагену ацил-азидним методом з наступним зшиванням двоспиральної денатурованої ДНК. При цьому на 1 г колагенової плівки фіксують лише 0,35-0,5 г ДНК. Спосіб відносно складний, потребує для реалізації кількох днів і пов'язаний з використанням такого дефіцитного матеріалу, як

хімічно чистий колаген. Крім того, колагенові матриці практично не мають власної сорбційної активності. Внаслідок цього лікувальний ефект від застосування ДНК-сорбенту буде пов'язаний виключно з присутністю в матеріалі десорбованої ДНК.

Метод по [D.C. Terman, D. Petty, R. Harbeck et al. Specific removal of DNA antibodies in vivo by extracorporeal circulation over DNA immobilized in collodion charcoal. Clin. Immunol. Immunopathol, 1977, v.8, 1, p.90-96] заключається у нанесенні розчину ДНК і розчину колодію на активоване вугілля з послідуною сушкою у вакуумі і вилученні залишку розчинника шляхом промивання їх трис-буфером та інкубації у 0,15 М розчині NaCl при 4°C протягом 48 годин. Але цим способом можна іммобілізувати тільки малу кількість ДНК на вугілля від 0,1 мг до 0,2 мг на 1 г.

По способу [Е.А. Снежкова, В.Г. Николаев, В.М. Юдин, Ю.В. Волощенко, П.П. Кондратюк, В.Н. Клевцов, И.Н. Гаврик, В.Ф. Литвинов. Способ получения ДНК-содержащего углеродного гемосорбента. SU 164973 A1], який заключається у нанесенні розчину ДНК, сушці та промиванні готового продукту, можна отримати лише ДНК-вмісний вуглецевий сорбент тільки на основі волокна.

За прототип обрано спосіб одержання вуглецевого гемосорбента шляхом іммобілізації ДНК на активоване вугілля. [Е.А. Снежкова, В.Г. Николаев, Г.Г. Пухова. Способ получения ДНК-содержащего углеродного гемосорбента. SU 1398160 A1]. Цей

(13) C2  
(11) 76069  
(19) UA

спосіб найбільш близький по технічній суті до способу, що заявляється, і заключається у нанесенні розчину ДНК на вуглецевий гемосорбент, сушці та ультрафіолетовому опромінюванні висушеного сорбенту в абсолютному спирті із послідовним відмиванням готового продукту. Слабкою ланкою цього способу є стадія ультрафіолетового опромінювання в середовищі абсолютного спирту. Для його здійснення необхідне конструювання спеціального реактора, який повинен забезпечити надійність та безпечність опромінювання вуглецевого гемосорбента.

Задачею винаходу є вдосконалення технології одержання ДНК-вмісного сорбента при збереженні високого вмісту ДНК і сорбційних якостей матриці, шляхом використання фіксуючого агенту для іммобілізації ліганда на активований сорбент.

Задачу винаходу вирішують завдяки тому, що іммобілізацію ліганда на активований сорбент виконують шляхом інкубації протягом не менше 12 годин при температурі не нижче 20°C в середовищі абсолютного спирту, що містить фіксуючий агент.

Суть винаходу полягає в наступному: активований сорбент обробляють розчином ДНК, сушать, потім інкубують в розчині фіксуючого агенту в абсолютному спирті не менше 12 годин при температурі не нижче 20°C і готовий продукт промивають.

Суть винаходу розкривають наступні приклади:

#### Приклад 1

750 мг активованого вугілля СКН-2К ( $V_s$  по бензолу 1,0 см<sup>3</sup>/г, розмір гранул (0,5-1мм) змішують з 10мл розчину ДНК (13мг ДНК) та поміщають на чашку Петрі, висушують у струмі холодного повітря та інкубують в бюксі з притертою кришкою з 20мл абсолютного спирту без фіксуючого агента, протягом 12 годин при 20°C. Потім спирт вилучають за допомогою воронки Бюхнера. Так само обробляли 750мг активованого вугілля ГСГД ( $V_s$  по бензолу 2,0см<sup>3</sup>/г, розмір гранул (0,5-1мм), кістчковий сорбент КАУ ( $V_s$  по бензолу 0,5см<sup>3</sup>/г, розмір гранул (0,5-1мм).

Для визначення міцності зв'язку ДНК з матрицею, одержаний сорбент інкубують і промивають 50мл 0,15М р-ну NaCl, 50мл 1,5 М р-ну NaCl, і 6 М р-ном сечовини.

В етанолі та перелічених елюатах визначають концентрацію ДНК за методом Спіріна. Кількість десорбованої ДНК визначають у прикладах як різницю між вихідною її кількістю, нанесеною на сорбент, та кількістю препарату, знайденого в етанолі та елюатах.

% десорбції ДНК від її вихідної кількості, нанесеної на сорбент, наведено у таблиці 1:

Таблиця 1

сорбент	% десорбції ДНК
СКН-2К	95
ГСГД	90
КАУ	95

Як видно із таблиці 1 іммобілізувати ДНК на матрицю практично не вдається.

#### Приклад 2

750мг активованого сорбента СКН-2К ( $V_s$  по бензолу 1,0см<sup>3</sup>/г, розмір гранул (0,5-1мм) змішують з 10мл розчину ДНК (13мг ДНК), висушують у струмі холодного повітря та інкубують в бюксі з притертою кришкою з 20мл абсолютного спирту який містить 2% глютарового альдегіду або 2% формальдегіду протягом 12 годин при 20°C.

Так само обробляли активований сорбент ГСГД ( $V_s$  по бензолу 2,0 см<sup>3</sup>/г, розмір гранул (0,5-1мм) та кістчкове вугілля КАУ ( $V_s$  по бензолу 0,5 см<sup>3</sup>/г, розмір (0,5-1мм). Потім спирт вилучають за допомогою воронки Бюхнера, інкубують, промивають та розраховують кількість десорбованої ДНК, як описано у прикладі 1. Десорбція ДНК, що дорівнює або менше 50% обрано як критерій доцільності виконання методу. Бо слід вважати, що втрата більше ніж 50% ліганда економічно і практично необґрунтована.

% десорбції ДНК від її вихідної, нанесеної на сорбент кількості наведено у таблиці 2:

Таблиця 2

сорбент	% десорбції ДНК	
	2% розчин глютарового альдегіду	2% розчин формальдегіду
СКН-2К	45	50
ГСГД	45	40
КАУ	50	48

Таким чином при введенні в систему фіксуючого агенту вдається іммобілізувати на сорбент не менше 50 % від нанесеної ДНК при інкубації 12 годин при 20°C.

#### Приклад 3

750мг активованого сорбента СКН-2К ( $V_s$  по бензолу 1,0 см<sup>3</sup>/г, розмір гранул (0,5-1мм) змішують з 10мл розчину ДНК (13мг ДНК), висушують у струмі холодного повітря та інкубують в бюксі з притертою кришкою з 20мл абсолютного спирту який містить 2% глютарового альдегіду або 2% формальдегіду протягом 12 годин при 19°C.

Так само обробляли активований сорбент ГСГД ( $V_s$  по бензолу 2,0см<sup>3</sup>/г, розмір гранул (0,5-1мм) та кістчкове вугілля КАУ ( $V_s$  по бензолу 0,5см<sup>3</sup>/г, розмір гранул (0,5-1мм). Потім спирт вилучають за допомогою воронки Бюхнера, інкубують, промивають та розраховують кількість десорбованої ДНК, як описано у прикладі 1.

% десорбції ДНК від її вихідної, нанесеної на сорбент кількості наведено у таблиці 3:

Таблиця 3

сорбент	% десорбції ДНК	
	2 % розчин глютарового альдегіду	2 % розчин формальдегіду
СКН-2К	55	57
ГСГД	56	55
КАУ	55	58

Таким чином при температурі нижче 20°C при інкубації 12 годин вдається іммобілізувати на сорбент менше 50% від нанесеної ДНК.

## Приклад 4

750мг активованого сорбента СКН-2К ( $V_s$  по бензолу  $1,0\text{см}^3/\text{г}$ , розмір гранул (0,5-1мм) змішують з 10мл розчину ДНК (13мг ДНК), висушують у струмі холодного повітря та інкубують в бюксі з притертою кришкою з 20мл абсолютного спирту який містить 2% глютарового альдегіду або 2% формальдегіду протягом 11 годин при  $20^\circ\text{C}$ .

Так само обробляли активований сорбент ГСГД ( $V_s$  по бензолу  $2,0\text{см}^3/\text{г}$ , розмір гранул (0,5-1 мм) та кісточкове вугілля КАУ ( $V_s$  по бензолу  $0,5\text{см}^3/\text{г}$ , розмір гранул (0,5-1мм). Потім спирт вилучають за допомогою воронки Бюхнера, інкубують, промивають та розраховують кількість десорбованої ДНК, як описано у прикладі 1.

% десорбції ДНК від її вихідної, нанесеної на сорбент кількості наведено в таблиці 4:

Таблиця 4

сорбент	% десорбції ДНК	
	2 % розчин глютарового альдегіду	2 % розчин формальдегіду
СКН-2К	57	57
ГСГД	56	55
КАУ	58	58

Таким чином при інкубації менше 12 годин при температурі  $20^\circ\text{C}$  вдається іммобілізувати на сорбент менше 50 % від нанесеної ДНК.

## Приклад 5

750мг активованого сорбента СКН-2К ( $V_s$  по бензолу  $1,0\text{см}^3/\text{г}$ , розмір гранул (0,5-1мм) змішують з 10мл розчину ДНК (13мг ДНК), висушують у струмі холодного повітря та інкубують в бюксі з притертою кришкою з 20мл абсолютного спирту який містить 1% глютарового альдегіду або 1% формальдегіду протягом 10 діб при  $60^\circ\text{C}$ .

Так само обробляли активований сорбент ГСГД ( $V_s$  по бензолу  $2,0\text{см}^3/\text{г}$  розмір гранул (0,5-1мм) та кісточкове вугілля КАУ ( $V_s$  по бензолу  $0,5\text{см}^3/\text{г}$ , розмір гранул (0,5-1мм). Потім спирт вилучають за допомогою воронки Бюхнера, інкубують, промивають та розраховують кількість десорбованої ДНК, як описано у прикладі 1.

% десорбції ДНК від її вихідної, нанесеної на сорбент кількості наведено в таблиці 5:

Таблиця 5

сорбент	% десорбції ДНК	
	1 % розчин глютарового альдегіду	1 % розчин формальдегіду
СКН-2К	5	7
ГСГД	4	5
КАУ	10	11

Таким чином запропонованим способом отримують ДНК-вмісні сорбенти з високим змістом ДНК, приблизно 16мг на 1г матриці

## Приклад 6

Для оцінки збереження властивостей вихідних вуглецевих матриць синтезованих імуносорбентів проводять вивчення кінетики поглинання маркера-вітаміну  $B_{12}$ .

Результати поглинання вітаміну  $B_{12}$  відображені в таблиці 6.

Як видно з приведених даних, запропонований спосіб дозволяє отримати ДНК-вмісні вуглецеві гемосорбенти з високим вмістом ДНК при збереженні поглинальних властивостей активованих сорбентів та замінити стадію ультрафіолетового опромінювання в абсолютному спирті, яка потребує конструювання спеціального вибухонебезпечного реактору, на інкубацію в звичайному термостаті.

Таблиця 6

Тип вуглецевого сорбента	Кількість ДНК на 1г сорбента, у мг	Кількість вітаміну $B_{12}$ (мкг), яка поглинута сорбентом у стандартних умовах із розчину, який містить 1000 мкг $B_{12}$ , протягом інкубації (хвил.)			
		5	15	30	60
СКН-2К	0	250	500	750	815
СКН-2К+ДНК, синтезований по способу, що заявляється	16	225	460	700	720
СКН-2К+ДНК, синтезований по способу-прототипу	16	230	470	710	720