



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВО

(19) UA (11) 26534 (13) C1

(51)6 C 12 N 9/96, C 12 N 9/36

ОПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ДИМЕРУ ЛІЗОЦИМУ

1

(21) 94020529  
(22) 08.01.90  
(24) 11.10.99  
(86) /US 90/00140 (08.01.90)  
(46) 11.10.99. Бюл. № 6  
(56) European Journal of Biochemistry, v. 124, N 1, 1982, p. 184.  
(72) Херманн Петер (CH), Клайн Петер (CH)  
(73) НІКА ХЕЛТ ПРОДАКТС ЛТД (LI)  
(57) 1. Способ получения димера лизоцима, предусматривающий приготовление раствора лизоцима путем добавления мономера лизоцима к буферному раствору, димеризацию мономера лизоцима в растворе, pH которого поддерживают на требуемом уровне, добавление суберимида, остановку реакции димеризации в заданный момент, очистку полученного раствора димеризованного лизоцима посредством ионообменной хроматографии через колонку с декстрановой матрицей, элюирование и сбор очищенного продукта димерного лизоцима, отличающийся тем, что pH буферного раствора устанавливают по меньшей мере равным 9 и поддерживают по меньшей мере на этом уровне в течение процесса димеризации, а димеризацию останавливают посредством снижения pH до примерно 7,0, при этом полученный раствор димеризованного лизоцима предварительно очищают ионообменной хроматографией через колонку с агарозной матрицей, элюируют и собирают фракции, существенно содержащие димерную форму лизоцима.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что pH раствора мономера лизоцима доводят и/или поддерживают на уровне примерно 10.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что pH устанавливают и/

2

/или поддерживают посредством добавления NaOH.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что буферный раствор получают из дигидрата динатрийфосфата.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что добавляют суберимидат в количестве 4 – 6 г.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что димеризацию проводят при комнатной температуре.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что димеризацию проводят при непрерывном перемешивании раствора.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что реакцию димеризации прекращают путем добавления ингредиента, выбранного из группы, включающей в себя HCl, раствор ацетата аммония или их комбинацию.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что осуществляют фильтрацию нерастворенных после димеризации частиц с помощью пористого фильтра.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что размер пор фильтра составляет примерно 0,4 – 0,5 мкм.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что приготавливают раствор мономера лизоцима, содержащий 40 – 60 г мономера лизоцима, 4 – 6 л буфера и 4 – 6 г суберимида.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что элюирование проводят в катионообменной колонке, заполненной S-сефарозой FF.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что элюирование проводят в ионообменной колонке, заполненной сефадексом G 50 F.

(19) UA (11) 26534 (13) C1

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что фракции, собранные после элюирования в катионообменнике, анализируют на содержание лизоцима гель-электрофорезом.

15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что фракции, собранные после элюирования в ионообменнике, анализируют на содержание лизоцима гель-электрофорезом.

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что фракции, собранные после элюирования в катионообменной колонке, концентрируют с помощью системы с тангенциальным потоком.

17. Способ по п.1, отличающийся тем, что фракции, собранные после элюирования в ионообменной колонке, концентрируют с помощью системы с тангенциальным потоком.

18. Способ по п.1, отличающийся тем, что очищенный димер лизоцима, собранный после элюирования на ионообменнике, лиофилизируют.

19. Способ по п.1, отличающийся тем, что после димеризации недимеризованные мономеры лизоцима собирают и возвращают в повторный цикл процесса димеризации.

Изобретение относится к способам приготовления и очистки димера лизоцима, которые могут, в частности, использоваться для лечения вирусных и бактериальных инфекций.

Непрерывный рост числа бактериальных штаммов и вирусных заболеваний, устойчивых к антибиотикам, обуславливает необходимость разработки новых лекарств для лечения человека и животных. Среди множества современных средств для лечения различных заболеваний используются ферменты в мономерной форме. Ферменты являются каталитически активными белками, ответственными почти за все основные жизненные процессы в организме. Так, многие ферменты, взятые как отдельно, так и в определенных комбинациях, были выделены на основании их физиохимического, физиологического или биологического действия.

В настоящее время показано, что лизоцим, известный с 1922 года, наряду с другими ферментами, обладающими лечебным действием, может быть использован для лечения различных заболеваний, требующих физиологического и биологического воздействия. Было обнаружено, что лизоцим обладает различными терапевтическими свойствами, такими, как антивирусное, антибактериальное, противовоспалительное и антигистаминное действие. Антибактериальное действие лизоцима, по-видимому, обусловлено гидролизом бета-1-4-гликозидной связи между н-ацетилмураминовой кислотой и н-ацетилглюкозамином, находящимися в бактериальной оболочке.

К сожалению, огромный потенциал возможного лечебного действия лизоцима при его использовании не реализуется прежде всего из-за заметного цитотоксического эффекта, присущего мономерной форме этого фермента. Так, в опытах с культурами фибробластов наблюдалось заметное цитотоксическое действие лизоцима в мономерной форме даже в очень малых дозах. Таким образом, приобретает актуальность поиск возможной максимизации потенциального лечебного действия с помощью разработки эффективного способа ограничения цитотоксических свойств мономера.

Недавно было обнаружено, что антивирусные или антибактериальные препараты, не обладающие цитотоксическим действием, могут быть изготовлены на основе лизоцима, т.е. посредством получения композиции, содержащей димерную форму фермента. Использование димера лизоцима позволяет создать препарат, пригодный для лечения ряда инфекционных заболеваний и не обладающий сильными цитотоксическими свойствами, обычно ассоциирующимися с мономером лизоцима. Использование димера лизоцима в различных терапевтических препаратах раскрывается в одновременно рассматриваемой заявке PCT Application us 88/01785.

Хотя способы получения димерной формы лизоцима из мономера известны, однако потребность в недорогом и эффективном производстве больших количеств димера лизоцима остается актуальной. Таким образом, крайне желательна разработка технологии изготовления и анали-

за больших количеств очищенного димера лизоцима, не содержащего мономерной или полимерной форм фермента или других загрязнений.

Краткое содержание изобретения.

В соответствии с настоящим изобретением предлагается эффективный метод изготовления очищенного димера лизоцима, состоящий из следующих стадий:

а) приготовление раствора лизоцима путем добавления мономера лизоцима к буферному раствору, имеющему pH по меньшей мере около 9;

б) добавление сшивающего реагента – суберимидата, такого как диметилсуберимидат, для димеризации мономеров лизоцима в растворе, pH которого поддерживается на уровне 9 и выше;

в) снижение pH до значения, близкого к 7, для прекращения реакции димеризации в заданный момент времени;

г) очистка раствора димеризованного лизоцима с помощью первой стадии элюирования, при проведении которого раствор пропускают через ионообменную колонку и собирают фракции, содержащие преимущественно димерную форму лизоцима;

е) фильтрование фракций, собранных в первой стадии очистки, путем проведения вторичного элюирования, при котором собранные фракции снова пропускают через ионообменную колонку;

ф) сбор высокоочищенного димера лизоцима, полученного на второй стадии выделения.

С помощью описанного выше метода можно получать значительные количества очищенного димера лизоцима, который может быть использован при лечении ряда вирусных и бактериальных заболеваний.

Краткое описание прилагаемых фигур.

На фиг. 1 представлен профиль элюции, полученный на первой стадии элюирования, проведенного в соответствии с настоящим изобретением.

На фиг. 2 представлен профиль элюции, полученный на второй стадии элюирования, проведенного в соответствии с настоящим изобретением.

Подробное описание предпочтительного осуществления способа.

При получении димеров лизоцима в соответствии с настоящим изобретением в качестве исходного сырья могут быть использованы любые подходящие для этой цели мономеры. В представленном изобретении лизоцим в форме мономера по-

лучали от Serva Feine Biochemicsa. GmbH Heidelberg, каталожный номер N 28260. Перед добавлением сшивающего реагента к мономеру, раствор лизоцима получали в мензурке, растворяя мономер в растворе фосфатного буфера при комнатной температуре, и непрерывно перемешивая при этом в течение по меньшей мере двух часов. Используемый фосфатно-буферный раствор состоит предпочтительно из 0.1 М раствора дигидрата двузамещенного фосфорнокислого натрия. Указанный буферный раствор получали путем растворения 70 г дигидрата двузамещенного фосфорнокислого натрия в 1000 мл H<sub>2</sub>O. Хотя реальные количества реагентов и растворителей, используемых в предложенном изобретении, могут варьироваться, реакцию димеризации, осуществленную в соответствии с настоящим изобретением, проводили с использованием примерно от 40 до 60 г мономера лизоцима, растворенного в химическом стакане с 5 л буферного раствора дигидрата двузамещенного фосфорнокислого натрия. Необходимо также, чтобы pH раствора мономера был доведен, по меньшей мере, до 9, а лучше всего – до 10. Для регулировки pH может быть использован раствор основания, например, 1 N NaOH.

Реакцию димеризации осуществляли путем добавления подходящего сшивающего реагента – суберимидата – в соответствующих пропорциях к мономеру лизоцима, поддерживая при этом pH на уровне 9 или выше. В соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно использовать диметилсуберимидат. К раствору, приготовленному как описано выше, добавляли 4–6 г диметилсуберимидата, при этом растворение происходит в течение примерно одной минуты. Реакция полимеризации происходит в течение 60 минут при комнатной температуре (25±5°C) при непрерывном перемешивании с помощью магнитной или другой мешалки.

Реакция димеризации может быть остановлена в заданный момент путем понижения pH до 7 (±0.2), осуществляемом добавлением 1 M HCl и/или 0.2 M раствора ацетата аммония (примерно 250 мл). Соответствующий раствор ацетата аммония получали путем растворения 15 г вещества в 1000 мл H<sub>2</sub>O. Как правило, реакция димеризации протекает в течение 1 часа, хотя этот период может быть больше или меньше в зависимости от точного количества вводимых веществ и от природы использованных реагентов и растворов.

На этой стадии необходимо, чтобы вся реакционная смесь, обладающая значительной мутностью, как правило, была бы пропущена через мембранный фильтр для отделения нерастворенных частиц. Обычно это является необходимой операцией, так как раствор на этой стадии содержит примесь нерастворимых полимеров. Для отделения полимеров и других нерастворенных частиц необходимо использовать фильтры с размерами пор примерно 0.4–0.5  $\mu\text{m}$ .

Были проведены гель-электрофорезные исследования образцов, взятых через различные промежутки времени после добавления сшивающего реагента к раствору мономера лизоцима. Исследования показали, что хотя мономерная форма четко видна в почти каждой проанализированной фракции, полоса, соответствующая димерной форме лизоцима, становится различима через 10 минут после начала реакции и по мере развития реакции увеличивается. Молекулярный вес лизоцима примерно 14000, а полоса димера соответствует молекулярному весу, равному 30000. Как показали электрофоретические исследования, имеет место также образование полимерных форм.

Для получения значительных количеств очищенного димера лизоцима предпочтительно чтобы раствор прошел, по крайней мере, две дополнительные стадии очистки для выделения димеризованного лизоцима и удаления мономеров лизоцима или других примесей. В представленном изобретении предполагается, что удаленные недимеризованные мономеры лизоцима могут быть собраны и рециклированы для максимизации эффективности производства димера лизоцима.

Первая стадия очистки производится с помощью ионообменной хроматографии. На этом этапе раствор димера лизоцима, полученный в результате процесса димеризации так, как описано выше, вводится в колонку с ионообменной смолой, представляющую собой Сефарозу или другие катиониты. В предпочтительном варианте колонка диаметром примерно 10 см и высотой 25 см заполняется S-Сефарозой FF (Pharmacia) объемом около 2.1 л, уравновешенной 4.2 л 50 мМ раствора К-фосфатного буфера с pH равным 7. Примерно 5 литров димеризованного раствора пропускают через ионообменную колонку и элюирование происходит с предпочтительной скоростью элюирования около 60 мл/мин. Желательно, чтобы элюирование происходило с использованием солевого

градиента – 1.5–1 М NaCl в 50 мМ К-фосфатном буфере. На этой стадии фракции собирали с помощью коллектора фракций (марки LKB 2211 Suprec) и хранили в стерильных колбах. Профиль элюции регистрировали, используя самописец LKB 2210, работающий на скорости 1 мМ в минуту, и полученный профиль элюции может быть использован при определении точного состава собранных фракций. Поглощение собранных растворов предпочтительно измерять при 280 nm с помощью прибора LKB 2238 UVICOR S11.

Точное содержание белка в каждой фракции, собранной на первой стадии элюции, описанной выше, анализируется главным образом, с помощью гель-электрофореза, например, в полиакриламидном геле с ДСН (ДСН – ПААГ), описанного Thomas et al. PNAS 72, 2626 (1979). При электрофоретическом исследовании предпочтительно около 50 мкл каждой фракции смешивают с 50 мкл буфера для сенсibilизации, и смесь нагревают 10 минут при около 95°C. Затем 25 мкл этой смеси вносят в ячейку с гелем. После проведения электрофореза в течение примерно около 4 часов при токе 20–35 mA полосы белка разделяются и становятся видимыми при подкрашивании таким красителем, как кумасси голубой (Coomassie-Blue R250 (Мерк.)).

Используя гель-электрофорез на ДСН можно разделить мономеры, димеры и полимеры лизоцима. Электрофоретический анализ может быть использован для идентификации собранных фракций, которые содержат, главным образом, димерные формы лизоцима. Фракции, состоящие, в основном, из димеров лизоцима, собирают и предпочтительно концентрируют до получения около 800 мл в системе с тангенциальным потоком.

На этой стадии, для дальнейшей очистки димерного продукта целесообразно провести следующий этап фильтрации. В предпочтительном варианте собранные от первой стадии элюции продукты лизоцима концентрируют с использованием тангенциального потока и снова пропускают через ионообменную колонку. Предполагается, что в данном случае будет использована колонка с Сефадексом Sephadex G 50 F (Pharmacia), размером, приблизительно 25 см в диаметре и 120 см высотой. Колонка уравнивается объемом около 60 литров 5 мМ буферного раствора ацетата аммония, который способствует поддержанию pH, равным при-

мерно 5. Соответствующий буферный раствор ацетата аммония был приготовлен из 4 г ацетата аммония, растворенного в 1000 мл воды с pH, доведенным до 5 с помощью раствора 3 г уксусной кислоты в около 1000 мл дистиллированной воды.

Раствор димера лизоцима, собранный после первой стадии элюирования и концентрированный в системе в тангенциальном потоке, пропускают через ионообменную колонку при скорости элюции в уравнивающем буфере около 70 мл в минуту. Как и в случае первого элюирования, фракции собирают и накапливают и примерно 50 мл каждой фракции анализируют путем ДСН-электрофореза в ПААГ, описанного выше. Кроме того, профиль элюции опять регистрируют на самописце, работающем при скорости примерно 0.5 мм/мин. Поглощение также измеряется при 280 нм. Профиль элюции, полученный для фракций, взятых после второго этапа очистки, имеет три пика, но, в основном, профиль состоит из среднего пика, представляющего фракцию димера лизоцима. На этом этапе остаются только минимальные количества полимерных и мономерных форм лизоцима. Димерные фракции с высокой степенью чистоты, как это видно из средних пиков профиля элюции, собирают и снова концентрируют в системе с тангенциальным потоком. В конечном счете, очищенный димер лиофилизуют и сохраняют до использования.

Весь этот процесс может быть повторен столько раз, сколько необходимо для получения соответствующего количества димерного продукта. Отдельные серии димеров после очистки могут быть растворены в дистиллированной воде, а затем лиофилизованы. Таким путем можно получать гомогенные партии лизоцима, которые могут быть эффективно использованы при лечении многих вирусных и бактериальных заболеваний. В дополнение к антивирусным и антибактериальным свойствам, лизоцим в димерной форме обладает и другими терапевтическими действиями такими как, противовоспалительные и антигистаминные, причем он не обнаруживает цитотоксического действия, характерного для мономерной формы лизоцима. Таким образом, представленный способ может быть использован для эффективного производства больших количеств очищенного полезного продукта - димера лизоцима. Благодаря способности димерного продукта, полученного методом, предложенным в настоящем

изобретении разрушать бактерии можно проверив его эффективность путем введения димера в суспензию микроорганизмов с последующим наблюдением за уменьшением количества микроорганизмов после введения димера фермента (с помощью спектрофотометра). Испытания, проведенные описанным способом, показали, что димер лизоцима, полученный способом, изложенным в настоящем изобретении, обладает ценными свойствами, которые могут быть использованы для лечения вирусных и бактериальных заболеваний.

В качестве иллюстрации настоящего изобретения представляются следующие примеры, которые, однако, не ограничивают объема настоящего изобретения.

Пример 1. Приготовление димера лизоцима.

50 г мономера лизоцима (Serva Feine, каталожный номер N 28260) растворяли в закрытом сосуде с использованием 5 л в 0.1 М буферного раствора дигидрата двузамещенного фосфорнокислого натрия при непрерывном помешивании в течение 2 часов при 25°C. Фосфатный буфер получали из 70.98 г дигидрата двузамещенного фосфорнокислого натрия  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merk. P.A.), растворенного в 1000 мл  $\text{H}_2\text{O}$ . pH раствора был доведен до 10 с помощью 1 N NaOH. Затем к раствору белка добавляли 5 г сшивающего реагента - диметилсуберимидата (Sioma), и pH раствора постоянно поддерживали равным 10. Реагент полностью растворялся в течение 1 минуты, а реакция димеризации протекала в течение 60 минут при комнатной температуре (25°C) при непрерывном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Реакцию прекращали путем понижения pH раствора до 7 путем добавления 1 M HCl и около 250 мл 0.2 M раствора ацетата аммония. 0.2 M раствор ацетата аммония получали путем растворения 15.42 г ацетата аммония (Merk. P.A.) в 1000 мл  $\text{H}_2\text{O}$ . На этой стадии весь раствор был очень мутный, и поэтому для отделения нерастворенных частиц, его пропускали через мембранный фильтр с размерами пор около 0.45 мкм. Нерастворенные частицы представляли собой полимеры, присутствующие в нерастворенной форме, как было выяснено посредством ДСН-гель-электрофореза.

После добавления сшивающего реагента в разные моменты времени образцы отбирали и анализировали с помощью гель-электрофореза. В каждом записанном образце ясно видна мономерная фор-

ма лизоцима. Мономерная форма представлена более низкой полосой, имеющей относительный молекулярный вес, равный 14000 (молекулярный вес лизоцима равен 14386). Во втором образце, взятом через 10 минут после начала реакции, наблюдается двойная димерная полоса, эта полоса становится больше по мере прохождения реакции. Димерная полоса соответствует молекулярному весу примерно 30000. Кроме того, в последних пробах можно было наблюдать также полимерную полосу.

Для того, чтобы провести предварительную очистку, 5 литров полученного продукта пропускали через катионообменную колонку с С-Сефарозой FF (Pharmacia). Колонка диаметром 10 см и высотой 25 см имеет объем 2.1 литр, уравновешенный 4.2 литрами 40 мМ К-фосфатного буфера при pH, равном 7.5 литров димеризованного раствора, подавали в колонку и элюировали со скоростью потока, равном 60 мл в минуту, при градиенте 0.15–1 м NaCl в К-фосфатном буфере при pH, равном 7.

Солевой градиент устанавливался и контролировался с использованием в качестве смесителя регулятора LKB 2152 следующим образом. Первый приготовленный раствор (раствор А) состоял из 50 мМ К-фосфатного буфера с pH, равном 7, и с нулевым содержанием NaCl, второй раствор (раствор В) состоял из 50 мМ К-фосфатного буфера с pH, равным 7, и 1 М NaCl. В начальный момент времени ( $t_0$ ) доля раствора В в элюционном буфере составляла 15%; спустя 1 час ( $t_1$ ) доля равномерно увеличивалась до 50% в течение 3.5 часов ( $t_{3.5}$ ), затем поддерживалась в течение 30 минут ( $t_{30}$ ). В течение последующего часа ( $t_1$ ) доля поднималась до 100% и оставалась постоянной в течение одного часа ( $t_1$ ). Затем, в течение 5 минут ( $t_{0.5}$ ) доля раствора падала приблизительно до 0%. Затем колонку промывали в течение 90 минут ( $t_{90}$ ) раствором, содержащим 0% NaCl.

После элюирования через катионит – С-сефарозу – через 10 минут из потока отбирались фракции в объеме примерно 600 миллилитров и собирались в стерильных 2-литровых колбах Шотта. Сбор производился с помощью коллектора фракций (LKB 2211 Suprec). Профиль элюции записывали при помощи самописца KB 2210Б, работавшем со скоростью 1 мл в минуту. Поглощение измеряли на 280 нм на LKB 2239 UVICOR S11. Профиль элюции, записанный на первой стадии

элюирования, показан на фиг. 1. Фракции, содержащие димерную форму лизоцима, обозначены на фиг. 1 штриховкой под жирной линией. Градиент соли указан тонкой линией.

Белковый состав каждой пробы анализировали с помощью гель-электрофореза в ПААГ с ДСН так, как описано Thomas et al. PNAS 72:2626 (1975). Для этой цели 50  $\mu$ л каждой фракции смешивали с 50  $\mu$ л буфера для сенсibilизации и нагревали в течение 10 минут при температуре 95°C. Затем 25  $\mu$ л полученной смеси вводили в ячейку с гелем. В качестве белковой смеси использовалась стандартная смесь белков Standard IV (Merck).

Буфер-носитель состоял из следующих компонентов:

0.72 г трис HCl (0.06 М)  
0.136 г ЭДТА (III) (5 мМ)  
0.18 г глицерина (10%)  
5 г ДСН (5%)  
pH доведен до 7.2 (добавлено 90 мд

H<sub>2</sub>O)  
10 тл бета-меркаптоэтанол (10%)

Для гель-электрофореза готовили 18% разделяющий гель, на который наслаивали 3.9% собирающий гель. Раствор разделительного геля для 18% акриламида состоял из следующих компонентов:

9 г акриламида  
0.045 г бис-акриламида  
0.136 г трис HCl с pH 8.8 (0.325 М)  
0.03 г SDS  
200  $\mu$ л 10% раствора персульфата аммония

20  $\mu$ л TEMED  
Раствор собирающего геля для 3.9% акриламида имеет следующий состав:

0.39 г акриламида  
10.4 м г бис-акриламида  
10 мх SDS  
100  $\mu$ л 10% раствора персульфата аммония

10  $\mu$ л TEMED

ДСН – полиакриламидный гель приготавливали следующим образом: две стеклянные пластины размером 20 · 20 тщательно промывали, споласкивали этанолом и размещали одна над другой. Две разделительные полоски толщиной 1 мм (длиной 20 см, шириной 1 см) помещали между пластинами, образуя объем для заполнения гелем между пластинами. Полоски помещались с правой и левой стороны стеклянных пластинок. Нижний край скреплялся липкой лентой, и все три края закреплялись зажимами. Край дополнительно заливали 1-процентным раствором

агарозы. После застывания агарозы приготавливали разделяющий раствор, промежуток между пластинами, расположенными вертикально, заполняли гелем до уровня приблизительно на 3 см ниже верхнего края стеклянных пластин и покрывали слоем воды с помощью пастеровской пипетки. Гель полимеризовался в течение 30 мин. Затем водное покрытие сливали и край геля промывали один раз раствором собирающего геля, описанного выше.

После этого собирающий раствор геля заливали до края и тефлоновый затвор помещали таким образом, чтобы нижний конец ячейки образца находился на расстоянии примерно 1 см над передним краем слоя разделяющего геля. После примерно 15 минут собирающий гель полимеризуется и затвор может быть убран. Затем липкую ленту снимали и гель в вертикальном положении соединяли с установкой для электрофореза. Буферную камеру наполняли электрофоретическим буфером (6 г трис-основание, (0,05 M); 28,5 г глицина (0,38 M); 1 г SDS (0.1%); и 1000 мл  $H_2O$ ), а ячейку с гелем промывали один раз с помощью струи буфера. Образцы димера лизоцима нагревали в течение примерно 10 минут в буферном носителе и помещали в контейнер или в ячейку для тестируемого образца, соответствующую ячейке для геля.

Электрофорез проводили при токе около 20 мА в течение 4 ч. В том случае, если необходимо было проводить электрофорез в течение ночи, ток понижали до 6–8 мА. Подвижный фронт делали видимым, подмешивая 0.02% бромифенол-синий в буфер-носитель. Электрофорез прекращали, когда подвижный фронт процесса достигал края геля. Разделительный гель вырезали, окрашивали в течение 30 минут в фиксирующем растворе и затем опять обесцвечивали в течение 2 часов в отбеливающем растворе, состоящем из 400 мл метанола, 140 мл уксусной кислоты, 2000 мл  $H_2O$ . Фиксирующий раствор получали путем смешивания 500 мл отбеливающего раствора с 12 мл раствора красителя, состоящего из 1 г кумарина – синего (R250, Merck), 50 мл  $H_2O$  и 50 мл метанола. Полосы белков делали видимыми, окрашивали, как описано выше. На препаратах, полученных методом ДСН-электрофореза в ПААГ, отчетливо видно постепенное увеличение количества димеризованного лизоцима в образцах, последние из которых включали фракции, содержащие также и полимеры.

Фракции, содержавшие, главным образом, лизоцим в димерной форме, собирали и концентрировали в системе с тангенциальным потоком до получения 800 мл. Установка, изготовленная фирмой Millipore, состоит из фильтрованного фильтра 10000 d, углеводородной мембраны с сопротивлением на разрыв, равным 7 бар, и насоса Verder 80 W (Type 20-3-N 60079). Входное давление было равно 2 барам, а выходное давление минимальным, менее 0.2 бар. Рабочая мощность была примерно 1 л/ч. Система имеет балластный объем, равный 400 мл, так что перед окончанием работы при промывании мембраны 400 мл раствора общий объем составляет 1200 мл.

Димеры лизоцима затем очищались фильтрацией на ионообменнике, заполненном Сефадексом G 50 F (Pharmacia). При этом колонка (диаметром 25.2 см, высотой 120 см) была уравновешена с 60 л 5 mM ацетатно-аммонийного буфера при pH, равном 5. Весь объем раствора в 1,2 л подавали и элюировали при скорости потока – 70 мл/мин в равновесном буфере. Были собраны фракции объемом примерно 700 мл, и из каждой фракции 50  $\mu$ л отбирали и анализировали с помощью описанного выше ДСН – электрофореза в ПААГ.

Профиль элюции для вышеизложенной процедуры фильтрации записывали на самописце при скорости 0.5 мм/мин и поглощение измеряли на 280 nm. Записанный профиль элюции показан на фиг. 2. Толстая линия на фиг. 2 представляет абсорбционный профиль растворов лизоцима с более чувствительным детектированием, чем для тонкой линии. Хотя этот профиль элюции содержит три пика, именно средний из них – значительно выше остальных, и этот пик представляет димерные фракции. Первый и последующий пики относятся к меньшим по количеству полимерной и мономерной формам лизоцима, остающихся в носителе.

Наконец, фракции, содержащие высокоочищенные димеры лизоцима (фракции 8–13 в профиле элюирования) собирали и концентрировали в системе описанной выше. После концентрации очищенный димер лиофилизировали. После многократного повторения процедуры отдельные партии димера очищали, помещали в дистиллированную воду и затем снова лиофилизировали, в результате чего получали однородную партию димера лизоцима.



**П р и м е р 2.** Тестирование активности фермента.

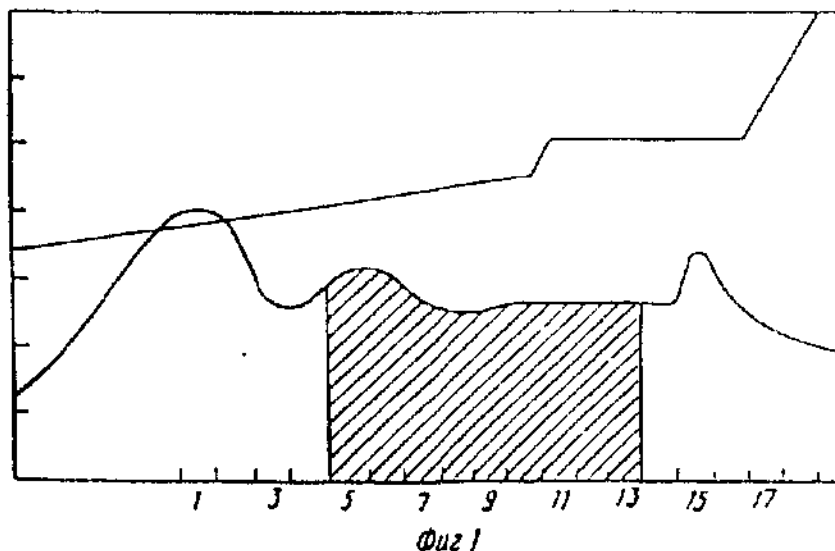
Ферментная активность димера лизоцима, полученного по методу, изложенному в представленной заявке, может быть испытана согласно описанного в работе Verkamme et al. International Pharmacy Journal Vol 2:5 (1988). Этот тест основан на разрушении микроорганизма *Micrococcus luteus* до растворимых продуктов распада в результате вызванного ферментом лизиса клеточной оболочки микроорганизма. Постепенное уменьшение или полное исчезновение мутности на длине волны 450 nm, измеряемой на спектрофотометре, служило в качестве показателя активности фермента.

Для указанного теста приготавливали суспензию *Micrococcus luteus*. Примерно 30 мг *M. luteus* (ATCC 4698, живая, лиофилизованная, производства Boehringer Mannheim) измельчали, переносили примерно с 25 мл фосфатного буфера в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и медленно перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре с помощью магнитной мешалки. Затем суспензию центрифугировали в течение 1 минуты при скорости 500 оборотов в минуту и супернатант декантировали в другой сосуд. Небольшие конгломераты бактерий, которые не суспендировались, оставались в осадке. Затем суспензию перемешивали и во избежание осаждения разбавляли фосфатным буфером. В качестве образца сравнения использовали воздух: толщина слоя — 1 см. Соответствующие типичные пробы, разведенной таким образом и непрерывно перемешиваемой суспензии, отбирали для контрольных измерений.

Растворы образцов, содержащие димеры лизоцима, получали в концентрации 1 мг/мл воды. Исследуемый образец растворяли в воде непосредственно перед измерением, и соответственно активность уменьшалась в дистиллированной воде до ~ 1:250 или 1:25. Измерения проводили при постоянной температуре 25°C. Для этого все растворы должны иметь температуру 25°C, и измерение проводится в терморегулируемой кювете. Объем кюветы 3 мл, толщина слоя исследуемого раствора — 1 см, уменьшение мутности по мере протекания реакции измеряли при 450 nm в течение 7 минут. Уменьшение мутности в минуту фиксировали на спектрофотометре (Spetronic 1001, Bausch & Lomb). Реакционную смесь получали из 2.95 мл суспензии *M. luteus* и 0.05 мл контрольного образца. Каждое измерение повторяли дважды и затем определяли среднюю величину.

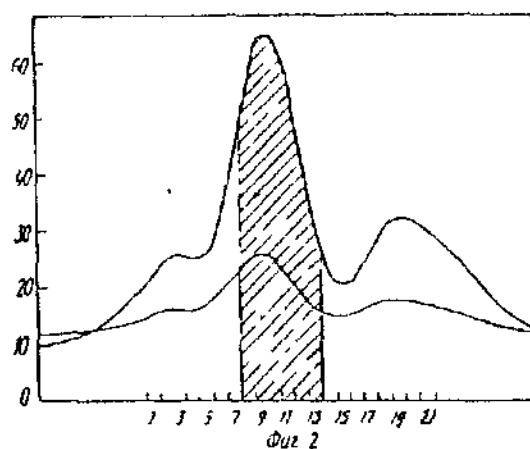
Ферментативная активность, определяемая по уменьшению мутности, определялась начиная с начального линейного участка, а анализировалась ДЕ (Е — экстинкция бактерии)/мин. Величина ДЕ/мин составляла меньше, чем 0.03 и степень разбавления образца должна выбираться соответствующим образом. Уменьшение мутности определяли также и в контрольном образце (*M. luteus* в воде), и величина, получаемая при измерениях, должна вычитаться из значений, полученных для исследуемых образцов.

Проведенное тестирование показало значительную ферментативную активность суспензии *M. luteus* с раствором димера, не наблюдавшуюся в контрольных образцах, содержащих суспензию *M. luteus* с водой.





26534



Упорядник

Техред М. Келемеш

Коректор М. Самборська

Замовлення 514

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

