



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **13770** (13) **U**  
(51) **МПК (2006)**  
**A61K 36/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

### ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

#### (54) СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ МАНОЗОСПЕЦИФІЧНИХ ЛЕКТИНІВ

1

2

(21) u200510008

(22) 24.10.2005

(24) 17.04.2006

(46) 17.04.2006, Бюл. № 4, 2006 р.

(72) Антонюк Володимир Олександрович

(73) Антонюк Володимир Олександрович

(57) Спосіб очищення манозоспецифічних лектинів, що включає проведення афінної хроматографії

фії на сорбентах, що містять D-манозу, який **відрізняється** тим, що очищення здійснюють на гелі, одержаному шляхом співполімеризації частково гідролізованого крохмалю та дріжджового манану, а десорбцію лектинів з гелю проводять 0,1М калієборатним буферним розчином рН 8,2 при температурі +40°C.

Корисна модель відноситься до фармацевтичної промисловості та біохімії, а саме до одержання манозоспецифічних лектинів з рослин родини амарилісових та лілійних, які знаходять застосування в створенні препаратів для лікування ВІЛ-інфекцій.

Існують способи очищення манозоспецифічних лектинів амарилісових та лілійних, в яких застосовують як афінні сорбенти манозо-сефарозу [1] або тиреоглобулін-сефарозу [2], а елюцію здійснюють розчином манози або кислим буфером.

Найближчим до запропонованої корисної моделі за технічною суттю є спосіб очищення лектину з цибулин підсніжника (*Galanthus nivalis* L.), що використовується рядом зарубіжних фірм, згідно з яким головною стадією очищення цього лектину є афінна хроматографія на сорбентах, які вміщують D-манозу, зокрема, використовують манозо-сефарозу. Відповідно до цього способу, цибулини підсніжника гомогенізують в 1М розчині  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , далі гомогенат центрифугують 15хв. при 20000g і освітлений екстракт заморожують при -80°C. Після розморожування для видалення сформованого осаду екстракт повторно центрифугують при цих же умовах. Далі освітлений екстракт очищають шляхом афінної хроматографії на манозо-сефарозі в присутності 1М розчину  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Промивку афінного сорбенту проводять до тих пір, поки поглинання при 280nm не знизиться до значень 0,01. Елюцію сорбованого лектину проводять за допомогою незабуференого 20mM діамінопропану або 0,2М розчином D-манози. Остаточне очищення лектину від фенольних сполук здійснюють за допомогою гідрофобної хроматографії на

фенілсефарозі в присутності 1М розчину  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [1].

До недоліків вказаного способу відноситься те, що отриманий за ним продукт не має достатньої гомогенності і чистоти.

В основу корисної моделі поставлено завдання підвищення чистоти та гомогенності цільового продукту.

Поставлене завдання досягається тим, що у способі очищення манозоспецифічних лектинів, що включає проведення афінної хроматографії на сорбентах, які вміщують D-манозу, згідно з корисною моделлю, очищення здійснюють на гелі, одержаному шляхом співполімеризації частково гідролізованого крохмалю та дріжджового манану, а десорбцію лектинів з гелю проводять 0,1М калієборатним буферним розчином рН8,2 при температурі +40°C.

Лектини амарилісових та лілійних є чутливі до низьких значень рН і тому десорбція лектину з афінного сорбенту буферними розчинами з рН нижче 5,0 приводить до порушення його структури, що супроводжується утворенням полімерних високомолекулярних формувань у лектинових препаратах, які характеризуються пониженою розчинністю після ліофільного висушування. Десорбція лектину з афінного сорбенту D-манозою або  $\alpha$ -метил-D-манопіранозидом є малоефективною внаслідок низької афінності цих вуглеводів до лектинів названої групи. Застосування складних олігосахаридів манози, які володіють високою афінністю до цієї групи лектинів є дуже дорогим і малодоступним задоволенням. В той час слаболужні боратні буферні розчини можуть десорбувати лектин з афінних сорбентів, не приводячи до

(13) **U**  
(11) **13770**  
(19) **UA**

порушень їх структури. Для підвищення ефективності десорбції її проводять при температурі +40°C, яку лектини витримують без пошкоджень структури.

Одержання афінного сорбенту.

3г дріжджового манану, одержаного за способом, описаним раніше [3], розчиняють в 100мл води з підігріванням. Далі до підігрітого розчину додають 30г частково гідролізованого крохмалю, одержаного за способом, описаним раніше [4], суміш розмішують до гомогенної маси. Тоді додають 40мл 20% NaOH і 12мл епіхлоргідрину. Знову все старанно перемішують. Гель застигає за 15хв. Через 1 годину після вистигання гелю його перетирають через сито 0,5мм з додаванням води. Загальний об'єм гелю - 500-600мл. Його декілька разів декантують і використовують в якості афінного сорбенту. Сорбент може бути використаний для очистки манозоспецифічних лектинів з цибулин або надземної частини амарилісових та лілійних, зокрема підсніжника (*Galanthus nivalis* L.), білоцвіту весняного (*Leucojum vernum* L), видів нарцису (*Narcissus* sp.), крокуса весняного (*Crocus vernus*), кореневища купини багатоквіткової (*Polygonatum multiflorum* L./All), тощо.

Приклади очистки лектинів.

Приклад 1

2,0кг надземної частини підсніжника (*Galanthus nivalis* L.), зібраної в фенофазі цвітіння, гомогенізують в міксері з 5л 1% NaCl, що містить 50г тіосечовини. Екстракт підкислюють до pH5,0, осад видаляють, надосадову рідину доводять до pH8-9,2, з наступним видаленням осаду. Далі pH повертають до 6,5 і наносять на колонку афінного сорбенту, одержаного шляхом співполімеризації частково гідролізованого крохмалю та дріжджового манану. Об'єм сорбента - 100см<sup>3</sup> на 1кг свіжої надземної частини рослини. Швидкість протікання екстракту - 1-2л за годину. Колонку промивають 0,1М ацетатним буфером pH6,0-7,0 до зниження екстинції при 280нм в рідині, що витікає, до значень менше 0,1. Знімання сорбованого на колонці лектину здійснюють 0,1М калій-боратним буферним розчином pH8,2 при температурі +40°C. Контроль виходу лектину з колонки здійснюють на спектрофотометрі при 280нм або за аглютинацією еритроцитів кролика. Одержані фракції, що містять лектин, об'єднують, його висолюють сульфатом амонію (600г/л). Осад центрифугують, розчиняють в невеликій кількості води і діалізують проти 0,05М фосфатного буферу pH7,0 і наносять на колонку ДЕАЕ-тойоперлу, врівноважену тим же буфером, і промивають буфером. Лектин з колонки іонообмінника знімають 0,2М фосфатним буферним розчином pH7,0.

Фракції, що містять лектин, об'єднують, висолюють сульфатом амонію і після діалізу проти дистильованої води ліофільно висушують. Вихід лектину становить 200мг/кг трави підсніжника, зібраного на початку цвітіння, і 50мг/кг трави підсніжника, зібраного в фенофазу плодоношення.

Приклад 2

2,0кг надземної частини білоцвіту весняного (*Leucojum vernum* L), зібраної в фенофазі цвітіння, гомогенізують в міксері з 5л 1% NaCl, що містить 50г тіосечовини. Екстракт підкислюють до pH5,0

осад видаляють, надосадову рідину доводять до pH8-9,2 з наступним видаленням осаду. Далі pH повертають до 6,0-7,0 і наносять на колонку афінного сорбента, як і в прикладі 1. Об'єм сорбенту - 100см<sup>3</sup> на кожні 1кг свіжої надземної частини рослини. Швидкість протікання екстракту - 1-2л за годину. Колонку промивають 0,1М ацетатним буфером pH6,0-7,0 до зниження екстинції при 280нм в рідині, що витікає, до значень менше 0,1. Знімання сорбованого на колонці лектину здійснюють 0,1М калій-боратним буферним розчином pH8,2 при температурі +40°C. Контроль виходу лектину з колонки здійснюють на спектрофотометрі при 280нм або за аглютинацією еритроцитів кролика. Одержані фракції, що містять лектин, об'єднують, його висолюють сульфатом амонію (600г/л). Осад центрифугують, розчиняють в невеликій кількості води і діалізують проти 0,05М фосфатного буферу pH7,0 і наносять на колонку ДЕАЕ-тойоперлу, врівноважену тим же буфером, і промивають буфером. Лектин з колонки іонообмінника знімають 0,2М фосфатним буферним розчином pH7,0. Фракції, що містять лектин, об'єднують, висолюють сульфатом амонію і після діалізу проти дистильованої води ліофільно висушують. Вихід лектину становить 200мг/кг трави білоцвіту весняного, зібраного на початку цвітіння і 50-70мг/кг трави білоцвіту весняного, зібраного в фенофазу плодоношення.

Приклад 3

200г цибулин *Crocus vernus*, зібраних в фенофазу відносного спокою, гомогенізують в міксері з 1л 1% NaCl, що містить 10г тіосечовини. Екстракт підкислюють до pH4,5-5,0, осад видаляють, надосадову рідину доводять до pH8-9,2, з наступним видаленням осаду. Далі pH повертають до 6,0-7,0 і наносять на колонку афінного сорбента, що використано і в прикладі 1. Об'єм сорбенту - 100см<sup>3</sup>. Швидкість протікання екстракту - 1л за годину. Колонку промивають 0,1М ацетатним буфером pH6,0-7,0 до зниження екстинції при 280нм в рідині, що витікає, до значень менше 0,1. Зняття сорбованого на колонці лектину здійснюється 0,1М калій-боратним буферним розчином pH8,2 при температурі +40°C. Контроль виходу лектину з колонки здійснюють на спектрофотометрі при 280нм або за аглютинацією еритроцитів кролика. Одержані фракції, що містять лектин, об'єднують, його висолюють сульфатом амонію (600г/л). Осад центрифугують, розчиняють в невеликій кількості води і діалізують проти 0,05М фосфатного буферу pH7,0 і наносять на колонку ДЕАЕ-тойоперлу, врівноважену тим же буфером, і промивають буфером. Лектин з колонки іонообмінника знімають 0,2М фосфатним буферним розчином pH7,0. Фракції, що містять лектин, об'єднують, висолюють сульфатом амонію і після діалізу проти дистильованої води ліофільно висушують. Вихід лектину - 80-100мг на 100г сирих цибулин.

Чистоту одержаних препаратів оцінювали методом електрофорезу в градієнті 5-15% ПААГ в присутності 0,1% ДДС - натрію з додаванням або без бета-меркаптоетанолу. Результати електрофорезу представлені на ілюстративному матеріалі, де цифрами зліва позначено значення мол. маси в кДа, а цифрами знизу позначено положен-

ня відповідних білків-маркерів та зразків лектинів підданих аналізу, а саме:

1-яєчний лізоцим ( $M_r=14,3$ ), 2 - лектин сочевиці ( $M_r=5,7+17,5$ ), 3 - еритроаглютинін насіння квасолі ( $M_r=32$ ), 4 - лектин виноградного слимака ( $M_r=13$  і  $26$ ), 5 і 6 - лектин підсніжника без та в присутності меркаптоетанолу, 7 і 8 - те ж для лектину білоцвіту, 9 і 10 - те ж для лектину крокусу, 11 і 12 - те ж для лектину нарцису.

Аналіз одержаних препаратів вказує на гомогенність та високу чистоту манозоспецифічних лектинів при застосуванні запропонованого способу.

Джерела інформації:

1. Van Damme E., Allen A.K., Peumans W. Isolation and characterization of a lectin with

exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. //FEBS Lett, 1987. -V.215, No1, p.140-144.

2. Антонюк Л.Я. Очистка и некоторые свойства лектинов из подснежника белоснежного (*Galanthus nivalis* L.) и белоцветника весеннего (*Leucojum vernum* L.). //Биохимия -1993 -Т.58, №3.- С.367-375.

3. Биохимические методы анализа растений /под ред. Запромётова М.М.- Москва: Из-во ИЛ. - 1960, с.228-230.

4. Антонюк В.О. Синтез сорбенту на основі поречно-зшитого крохмалю для афінного очищення глюкозо (маннозо)специфічних лектинів. //Укр. біохім. журн. -1991. -Т.63, №6. -С.97-100.

