



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

003 00  
ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ №

(19) **SU** (11) **1596769** **A1**

(51)5 C 12 N 11/14, 11/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГИИТ СССР

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4474979/31-13

(22) 28.08.88

(71) Физико-химический институт  
им. А. В. Богатского и Институт проблем  
материаловедения АН УССР

(72) Е. В. Севастьянова, Т. И. Давиденко,  
В. П. Сергеев и П. П. Кондратюк

(53) 577.15(088.8)

(56) Сергеев В. П. и др. Активирован-  
ный углеродный волокнистый материал  
медицинского назначения АУВМ "Днепр"  
МН. Тезисы IV республиканской конфе-  
ренции "Сорбенты медицинского назна-  
чения и механизмы их лечебного дейст-  
вия". Донецк, 1988, с. 31.

Давиденко Т. И. и др. Им- мобилиза-  
ция протеолитических ферментов и их  
ингибиторов на угольных ма териалах.  
Тезисы докладов III Конференции УССР.  
Днепропетровск, 1985, с. 247.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАН-  
НЫХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Изобретение относится к биотехно-  
логии, касается иммобилизации протео-  
литических ферментов на угольных ма-  
териалах и может быть использовано в  
медицине.

Целью изобретения является увели-  
чение протеолитической активности и  
связывания белка при иммобилизации,  
а также повышение стабильности целе-  
вого продукта.

Способ заключается в ковалентном  
связывании протеолитических ферментов  
на активированном углеродном волокнист-  
ом материале (АУВМ) марки "Днепр" МН,  
причем связывание проводят в присут-  
стве 36-90

2  
(57) Изобретение относится к биотехно-  
логии, касается иммобилизации протео-  
литических ферментов на угольных мате-  
риалах. Цель изобретения - увеличе-  
ние протеолитической активности и  
связывания белка при иммобилизации, а  
также повышение стабильности целевого  
продукта. Способ предусматривает ис-  
пользование в качестве носителя уголь-  
ной ткани АУВМ "Днепр" МН, проведе-  
ние иммобилизации в присутствии поли-  
этиленоксида, сшитого бурой при мас-  
совом соотношении фермент - бура - по-  
лиэтиленоксид, равном 1:0,1-0,4:0,3-  
1,1. Использование способа позволяет  
получать иммобилизованные протеолити-  
ческие ферменты на угольной ткани со  
100%-ным связыванием белка, 40-  
80%-ным сохранением протеолитической  
активности, с 70%-ным сохранением ис-  
ходной активности после  $\gamma$ -стерилиза-  
ции, стабильные при хранении. 2 табл.

ствии полиэтиленоксида после модифи-  
кации носителя бурой. Соотношение  
фермент - бура - полиэтиленоксид уста-  
навливают равным 1:0,1-0,4:0,3-1,1.

Особенность способа заключается  
в модификации полиэтиленоксидом по-  
верхности угольной ткани с последую-  
щей мягкой сшивкой бурой фермента, что  
ослабляет ингибирующее действие уголь-  
ного материала на протеолитические  
ферменты и способствует большей их  
стабильности при хранении и  $\gamma$ -стери-  
лизации.

Данный способ позволяет получить  
иммобилизованные протеолитические фер-

003 00  
SU (11) 1596769 A1

РИО

менты (металлопротеазу, щелочную протеазу, асперазу, террилитин, химотрипсин) с протеолитической активностью до 200 ПЕ/г носителя, 100%-ным связыванием белка, 40-80%-ным сохранением исходной протеолитической активности, после  $\gamma$ -стерилизации (доза 2,5 Мрад) остается ~70% протеолитической активности, после хранения в течение 4 месяцев - 60%.

**Пример 1.** Для иммобилизации используют ткань АУВМ "Днепр" МН. Особенности этого материала являются высокие емкостные и кинетические характеристики (на порядок и более превышающие аналогичные характеристики гранулированных сорбентов); высокая биосовместимость и нетоксичность; возможность получения на основе АУВМ универсальной матрицы для иммобилизации ферментов; прочность, эластичность, виброустойчивость, что делает применение этих материалов удобным и надежным.

Основные технические характеристики АУВМ "Днепр" МН следующие:

Суммарный объем

пор по бензолу, см<sup>3</sup>/г 0,8-1,2

Прочность при объеме

не пор 1,2 см<sup>3</sup>/г, Н Не менее 25.

Для иммобилизации 10x10 см<sup>2</sup> угольной ткани пропитывают раствором 200 мг буры в 6 мл дистиллированной воды, высушивают при температуре 20°С. После этого угольную ткань пропитывают раствором 2000 мг щелочной протеазы (280 мг белка) и 600 мг полиэтиленоксида в 6 мл 0,03 М фосфатного буфера, pH 7,4. Массовое соотношение протеолитический фермент - бура - полиэтиленоксид 1:0,1:0,3 (табл.1, № 1). Полученную таким образом угольную ткань с иммобилизованной щелочной протеазой высушивают при температуре 20°С. Протеолитическая активность составляет 170 ПЕ/г. После  $\gamma$ -стерилизации дозой 2,5 Мрад остается ~70% исходной активности. При хранении в течение 4 месяцев сохраняется 60% исходной протеолитической активности.

**Примеры 2-4.** Последовательность выполнения операции та же, что и в примере 1. Данные представлены в табл.1 (примеры 2-4). Примеры поясняют осуществление способа при массовых соотношениях щелочная протеаза - бура - полиэтиленоксид 1:0,4:1,1; 1:0,1:1,1; 1:0,4:0,3.

**Примеры 5-8.** Последовательность выполнения операций та же, что и в примере 1. Данные представлены в табл.1 (примеры 5-8). Примеры поясняют нецелесообразность осуществления способа при массовых соотношениях протеолитический фермент - бура - полиэтиленоксид 1:0,05:0,25; 1:0,45:1,15; 1:0,05:1,15; 1:0,45:0,25.

**Пример 9.** Выполняется аналогично примеру 1 (табл.1, пример 9), массовое соотношение протеолитический фермент - бура - полиэтиленоксид 1:0,1:0,3. Отличие в том, что используют металлопротеазу. Протеолитическая активность иммобилизованного препарата 60 ПЕ/г. После  $\gamma$ -стерилизации дозой 2,5 Мрад остается ~70% исходной активности. При хранении в течение 2 месяцев сохраняется 95% исходной протеолитической активности.

**Примеры 10-12.** Выполняется аналогично примеру 9 (табл.1, примеры 10-12). Данные примеры поясняют осуществление способа иммобилизации металлопротеазы при соотношениях 1:0,4:1,1; 1:0,1:1,1; 1:0,4:0,3.

**Примеры 13-16.** Выполняются аналогично примеру 9 (табл.1, примеры 13-16). Примеры показывают нецелесообразность осуществления способа при массовых соотношениях металлопротеаза - бура - полиэтиленоксид 1:0,05:0,25; 1:0,45:1,15; 1:0,05:1,15; 1:0,45:0,25.

**Пример 17.** Выполняется аналогично примеру 1 (табл.1, пример 17), массовое соотношение протеолитический фермент - бура - полиэтиленоксид 1:0,1:0,3. Отличие в том, что используют асперазу. Протеолитическая активность иммобилизованного препарата 33 ПЕ/г. После  $\gamma$ -стерилизации дозой 2,5 Мрад остается ~100% исходной активности. При хранении в течение 4 месяцев сохраняется 80% исходной протеолитической активности.

**Примеры 18-20.** Выполняются аналогично примеру 17 (табл.1, примеры 18-20). Данные примеры поясняют осуществление способа иммобилизации асперазы при соотношениях 1:0,4:1,1; 1:0,1:1,1; 1:0,4:0,3.

**Примеры 21-24.** Выполняются аналогично примеру 17 (табл.1, примеры 21-24). Примеры показывают нецелесообразность осуществления способа при массовых соотношениях аспераза -

бура - полиэтиленоксид 1:0,05:0,25;  
1:0,45:1,15; 1:0,05:1,15; 1:0,45:0,25.

Пример 25. Порядок выполнения операций аналогичен примеру 1 (табл.1, пример 25), массовое соотношение протеолитический фермент - бура - полиэтиленоксид 1:0,1:0,3. Отличие в том, что используют террилитин. Протеолитическая активность иммобилизованного препарата - 58 ПЕ/г. После  $\gamma$ -стерилизации дозой 2,5 Мрад остается 60% исходной активности. При хранении в течение 4 месяцев сохраняется 90% исходной протеолитической активности.

Примеры 26-28. Выполняются аналогично примеру 25 (табл.1, примеры 26-28). Данные примеры поясняют осуществление способа иммобилизации террилитина при массовых соотношениях 1:0,4:1,1; 1:0,1:1,1; 1:0,4:0,3.

Примеры 29-32. Выполняются аналогично примеру 25 (табл.1, примеры 29-32). Примеры показывают нецелесообразность осуществления способа при массовых соотношениях террилитин - бура - полиэтиленоксид 1:0,05:0,25; 1:0,45:1,15; 1:0,05:1,15; 1:0,45:0,25.

Пример 33. Порядок выполнения операций аналогичен примеру 1 (табл.1, пример 33), массовое соотношение протеолитический фермент - бура - полиэтиленоксид 1:0,1:0,3. Отличие в том, что используют химотрипсин. Протеолитическая активность иммобилизованного препарата 223 ПЕ/г. После  $\gamma$ -стерилизации дозой 2,5 Мрад остается ~70% исходной активности. При хранении в течение 4 месяцев сохраняется 75% исходной протеолитической активности.

Примеры 34-36. Выполняются аналогично примеру 33 (табл.1, примеры 34-36). Данные примеры поясняют осуществление способа иммобилизации химотрипсина при массовых соотношениях 1:0,4:1,1; 1:0,1:1,1; 1:0,4:0,3.

Примеры 37-40. Выполняются аналогично примеру 33 (табл.1, примеры 37-40). Примеры поясняют нецелесообразность осуществления способа при массовых соотношениях химотрипсин:бура:полиэтиленоксид 1:0,05:0,25; 1:0,45:1,15; 1:0,05:1,15; 1:0,45:0,25.

Для иммобилизации используют следующие протеолитические ферменты: металлопротеазу и щелочную протеазу производства Ладыжнинского завода ферментных препаратов; асперазу производства

Харьковского НИИ химии и технологии лекарственных средств, террилитин производства "Мосмедпрепарат" им.Л.Я.Карпова, химотрипсин Олайнского завода химических реактивов, полиэтиленоксид 1500 производства Харьковского химико-фармацевтического объединения "Здоровье", завод "Красная звезда".

Эффективность иммобилизации зависит также от pH, который должен соответствовать pH-стабильности иммобилизуемых ферментов.

В табл.2 представлены результаты, полученные при лечении гнойных кожно-мышечных ран у крыс. Как следует из этих данных, использование иммобилизованного по описанному выше способу террилитина позволяет сократить сроки заживления ран до 16,0 дней (очищения ран 4,0 по сравнению с 22,5 и 8,2 днями соответственно для нативного фермента и с 18,2 6,8 днями соответственно для самой угольной ткани. Для контрольных животных (без лечения) средние сроки (дни) заживления ран составляли 29,4, а очищение ран 11,6, т.е. при использовании иммобилизованного на угольной ткани террилитина наблюдается уменьшение сроков заживления и очищения гнойных кожно-мышечных ран.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет получить иммобилизованные протеолитические ферменты с протеолитической активностью до 200 ПЕ/г носителя, со 100%-ным связыванием белка, 40-80%-ным сохранением протеолитической активности, с сохранением после  $\gamma$ -стерилизации ~70% исходной активности, после хранения в течение 4 месяцев 60% протеолитической активности. Тогда как в прототипе степень связывания белка составляет 40%, процент сохранения протеолитической активности 10-20%, при  $\gamma$ -стерилизации и хранении практически полностью теряется протеолитическая активность.

#### Формула изобретения

Способ получения иммобилизованных протеолитических ферментов, включающий ковалентное связывание фермента с предварительно модифицированным сшивающим реагентом угольным носителем, отличающийся тем, что

с целью увеличения протеолитической активности и связывания белка при иммобилизации, а также повышения стабильности целевого продукта, в качестве угольного носителя используют активированный углеродный волокнистый

материал "Диепр" МН, в качестве связывающего реагента используют буру, а связывание проводят в присутствии полиэтиленоксида, устанавливая соотношение фермент - бура - полиэтиленоксид, равным 1:0,1-0,4:0,3-1,1.

Т а б л и ц а 1

Влияние массового соотношения протеолитический фермент - бура - полиэтиленоксид на сохранение протеолитической активности (рН 7,4)

При- мер	Массовое соотношение про- теолитический фермент - бура - полиэтиленоксид	Сохранение про- теолитической активности, % мак- симальной актив- ности
1	2	3
Щелочная протеаза		
1	1:0,1:0,3	100
2	1:0,4:1,1	100
3	1:0,1:1,1	90
4	1:0,4:0,3	100
5	1:0,05:0,25	72
6	1:0,45:1,15	81
7	1:0,05:1,15	60
8	1:0,45:0,25	70
Металлопротеаза		
9	1:0,1:0,3	100
10	1:0,4:1,1	100
11	1:0,1:1,1	95
12	1:0,4:0,3	95
13	1:0,05:0,25	73
14	1:0,45:1,15	61
15	1:0,05:1,15	80
16	1:0,45:0,25	72
Аспераза		
17	1:0,1:0,3	95
18	1:0,4:1,1	100
19	1:0,1:1,1	90
20	1:0,4:0,3	100
21	1:0,05:0,25	61
22	1:0,45:1,15	70
23	1:0,05:1,15	72
24	1:0,45:0,25	63
Террилитин		
25	1:0,1:0,3	100
26	1:0,4:1,1	100
27	1:0,1:1,1	100
28	1:0,4:0,3	100
29	1:0,05:0,25	67
30	1:0,45:1,15	63
31	1:0,05:1,15	72
32	1:0,45:0,25	70
Химотрипсин		
33	1:0,1:0,3	90
34	1:0,4:1,1	95

Продолжение таблицы I

1	2	3
35	1:0,1:1,1	100
36	1:0,4:0,3	95
37	1:0,05:0,25	64
38	1:0,45:1,15	72
39	1:0,05:1,15	67
40	1:0,45:0,25	60

Т а б л и ц а 2

Результаты лечения гнойных кожно-мышечных ран у крыс\*  
с применением иммобилизованного на угольной ткани  
террилитина

Метод лечения раневого процесса	Средние сроки, дни			
	очищение ран	проявление грануляций	начало эпителизации	заживление ран
Контроль (без лечения)	11,6±1,4	18,5±2,0	20,1±1,9	29,4±2,1
Угольная ткань	6,8±0,3	8,8±0,4	10,1±0,8	18,2±0,9
Нативный фермент	8,2±1,0	10,0±1,0	11,2±0,8	22,5±1,8
Иммобилизованный на угольной ткани террилитин	4,0±0,6	5,5±0,5	6,5±0,8	16,0±0,8

\*Под мягким наркозом в межлопаточной области наносится стандартная кожно-мышечная рана площадью 400 мм<sup>2</sup> (диаметром 22,6 мм), в рану вносятся 2,0x10<sup>9</sup> микробных тел стандартной культуры патогенного стафилококка шт. 209. После внесения микробной культуры на рану накладывается стерильная вазелиновая повязка. Через 48 ч после нанесения и инфицирования раны развивалась классическая картина гнойного воспаления. В эти же сроки начинали лечение животных.

Редактор Л.Павлова      Составитель В.Муронец  
Техред М.Дидык      Корректор В.Гирняк

Заказ 3201/ДСП      Тираж 311      Подписное  
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35; Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101

