

(19) REPUBLIKA SRBIJA

(12) Patentni spis

(11) 57753 B1



ZAVOD ZA
INTELEKTUALNU SVOJINU
BEOGRAD

(51) Int. Cl
C12N 11/12 (2006.01) *D06M 11/80* (2006.01)
A61L 15/38 (2006.01) *D06M 13/322* (2006.01)
C08B 15/04 (2006.01) *D06M 13/355* (2006.01)
C08L 1/04 (2006.01) *D06M 23/00* (2006.01)
D06M 11/13 (2006.01)

(21) Broj prijave: P - 2016/0511
(22) Datum podnošenja prijave: 06.07.2016.
(43) Datum objavljivanja prijave: 31.01.2018.
(45) Datum objavljivanja patenta: 31.12.2018.
(30) Međunarodno pravo prvenstva:

(73) Nosilac patenta:
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET,
UNIVERZITET U BEOGRADU,
Karnegijeva 4,
11000 Beograd, RS

(72) Pronalazači:
KOSTIĆ, Mirjana, dr.; NIKOLIĆ, Tanja, dr.;
KORICA, Matea; MILANOVIĆ, Jovana, dr.;
KRAMAR, Ana, dr.; PETRONIJEVIĆ, Živomir, dr.

(54) Naziv: BIOLOŠKI AKTIVNA VLAKNA PAMUKA SA IMOBILISANIM TRIPSINOM

(57) Apstrakt:

Biološki aktivna vlakna pamuka sa imobilisanim tripsinom za primenu u vlažnom stanju, u medicini za topičnu upotrebu u lečenju rana, u obliku gaze, zavoja i sl., dobijena su dvostadijumskim postupkom koji uključuje oksidaciju vlakana pamuka pomoću 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) radikala i naknadnu imobilizaciju tripsina tehnikom kovalentnog i jonskog vezivanja. Postupak omogućava dobijanje nosača koji u svojoj strukturi ima definisan odnos aldehidnih i karboksilnih grupa, kao i imobilizaciju tripsina sa visokim prinosom specifične aktivnosti i povećane stabilnosti pri lagerovanju u odnosu na slobodni enzim. Pored toga, oksidacijom je značajno povećana sposobnost sorpcije i zadržavanja vode pamučnih vlakana. Vlakna pamuka sa imobilisanim tripsinom se mogu koristiti kao biomedicinski tekstilni materijali, u obliku npr. gaze, zavoja i sl., namenjena prvenstveno za tretman rana, s obzirom na to da tripsin poseduje nekrolitička, anti-inflamatorna, anti-mikrobna i drenažna svojstva.

RS 57753 B1

OBLAST TEHNIKE

Biološki aktivna vlakna pamuka sa imobilisanim tripsinom, za primenu u vlažnom stanju, u medicini za topičnu upotrebu u lečenju rana, u obliku gaze, zavoja, apsorbujućih podmetača i sl., prema pronalasku, pripadaju oblasti primenjene hemije, tačnije oblasti imobilisanih enzima ili enzima na nosačima, kao i hemijskim aspektima ili upotrebi materijala za zavoje, poveske ili apsorbujuće podmetače koji sadrže enzime. Takođe, pronalazak pripada i oblasti dobijanja modifikovane celuloze, tačnije smešama koje sadrže celulozu, modifikovanu celulozu, preciznije oksicelulozu ili derivate celuloze. Pronalazak takođe pripada oblasti obrade vlakana, niti, pređe, tkanine ili vlaknastih celuloznih proizvoda, čije su karakteristike date kroz postupak, pri čemu su materijali obrađivani sa jedinjenjima koja sadrže azot, izmenom katjona, korišćenjem organskih materijala kao izmenjivača katjona i to makromolekulskih jedinjenja celuloze i njihovih derivata.

Int.Cl.⁸: **C 12N 11/12** (2006.01); **A 61L 15/38** (2006.01); **C 08B 15/02** (2006.01);
C 08L 1/04 (2006.01); **D 06M 23/00** (2006.01); **B01J 39/22** (2006.01);

TEHNIČKI PROBLEM

Biološki aktivna vlakna pamuka sa imobilisanim tripsinom, za primenu u vlažnom stanju, prema pronalasku, rešavaju tehnički problem koji se sastoji u pronalaženju postupka aktivacije pamučnih vlakana i postupka imobilizacije tripsina na njima, tako da se ostvari visok katalitički kapacitet imobilisanog tripsina i dobiju vlakna koja će ispoljavati proteolitičku i antimikrobnu aktivnost i imati povećanu sposobnost sorpcije i zadržavanja vode i vodenih rastvora, što bi omogućilo njihovu primenu u biološkim sistemima (npr. u medicini za lečenje rana naročito za topičnu upotrebu, u obliku gaze, zavoja, apsorbujućih podmetača i sl.

STANJE TEHNIKE

Poznato je da proteolitički enzim tripsin poseduje nekrolitička, anti-inflamatorna, anti-toksična i drenažna svojstva. Poznato je i da ovaj enzim čisti rane i može da ubrza rast novog

tkiva, kao i da inhibira razvoj nekih mikroorganizama (Costa i sar., u knjizi "Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine", CRC Press, Boca Raton, 2005, 358-386). U američkom patentu US 5855987 A 1999.01.05 na ime Univerzitet Bar Ilam, iz Izraela „Bioactive conjugates of cellulose with amino compounds”, opisano je rešenje u kome se polimeri koji sadrže veliki broj slobodnih hidroksilnih grupa, kao što su celuloza, agarozna ili polivinil alkohol, u odsustvu reaktanata za hidroksilne grupe, dovode u kontakt sa najmanje jednim N-heterocikličnim jedinjenjem, npr. piridinom, pirolom, piridazinom i njihovim parcijalno ili potpuno hidrogenovanim analogima, pri čemu bilo koji od njih može biti supstituisan. Ovako aktiviran polimer može naknadno da reaguje sa amino jedinjenjima koja sadrže najmanje jedan nesupstituisani atom vodonika vezan za atom azota, pri čemu se formira amino-polimerni konjugat. Pronalazak se dalje odnosi na dobijanje praha, zavoja, flastera ili sličnih obloga za nanošenje na rane, a koji su proizvedeni od polimera koji sadrže veliki broj hidroksilnih grupa, postupkom u kom se primenjuje prethodno pripremljeni amino-polimerni konjugat. Amin može biti, na primer, tripsin, himotripsin, lizozim, kolagenaza, albumin ili hijaluronidaza.

Usled niza, malo pre navedenih, pozitivnih svojstava, tripsin, kao i ostale proteaze, ima široku primenu u hirurgiji, posebno za lečenje rana. Preparati nativnih proteaza obično su u formi gela, praha ili tečnosti. Međutim, upotreba nativnih enzima u lečenju rana ograničena je brojnim nedostacima: nativni enzimi se brzo inaktiviraju, nestabilni su u vodenim rastvorima, ispoljavaju antigena i pirogena svojstva, mogu dospeti u krvotok i izazvati alergijsku reakciju, mogu ih isprati izlučevine rane i, pored toga, imaju visoku cenu (Patent US 5855987 A). Upotrebom imobilisanih proteaza značajno se smanjuje utrošak enzima (zbog produženog dejstva), povećava efikasnost terapije i smanjuju alergijske reakcije. Analiza morfoloških promena u eksperimentalnim gnojnim ranama i vremena potrebnog za čišćenje rane i potpuno zarastanje je pokazala da su imobilisani oblici enzima efikasniji od odgovarajućih nativnih preparata (Tolstykh i sar., 1994, Bull Exp Biol Med., 118(9): 1027- 1029; Belov i sar., 2008, Fibre Chem.,40(5):467-470).

Glavni faktor odgovoran za inaktivaciju tripsina, koja se dešava tokom njegove upotrebe i skladištenja, je osetljivost na autolizu (Simon i sar., 2001, Acta Biologica Szegediensis, 45(1-4):43-49). Aktivni tripsin vezan za nerastvorni inertni nosač, u poređenju sa enzimom u rastvoru, ne podleže autolizi jer su pojedinačni molekuli imobilisani na nosač i ne dolazi do njihove agregacije. Za imobilizaciju tripsina korišćene-su različite metode, kao što su adsorpcija (Kotel'nikova i sar., 2007, Russ J Appl Chem, 80:322-329), uključivanje u ograničeni prostor (Monteiro i sar., 2007, Process Biochem., 42:884-888) i kovalentno vezivanje (Cavalcante i sar., 2006, Biochem Eng J., 29:258-261; Kumar i sar., 1998, J Mol

Catal B-Enzym, 5:289-294; Villalonga i sar., 2000, J Mol Catal B-Enzym, 10:483-490; Van Leemputten i Horisberger *Biotechnology and bioengineering*, Vol XVI (1974) 997-1003) i različiti nosači: silika gel naslojen hitozanom (Xi i sar., 2005, *Process Biochem.*, 40: 2833-2840), poliestarski netkani materijal (Nouaimi i sar., 2001, *Enzyme Microb Technol*, 29:567-574), hitozan i celuloza (Zelenetskii i sar., 2003, *Russ. Chem. Bull*, 52:2073-2077), derivati i kopolimeri celuloze (Liu Y i Chen J Y, - *Bioactive and Compatible Polymers*, Vol. 31 (6) (2016) 553-567; Sharma R.K. i saradnici - *BioResources* 5(4) 2010, 2547 - 2555). Fizičko-hemijska svojstva, aktivnost i stabilnost svakog pojedinačnog enzima zavise od tipa nosača i metode imobilizacije.

Izbor nosača za imobilizaciju enzima u velikoj meri zavisi od namene proizvoda. Medicinski zahtevi značajno ograničavaju broj nosača koji se mogu koristiti za imobilizaciju enzima za terapijske svrhe. Takvi nosači treba da su biokompatibilni, netoksični, nekancerogeni i da ni na koji način ne ugrožavaju biološko okruženje. Pored toga, od nosača se zahteva hidrofilitnost, postojanost prema mikroorganizmima, ali i laka dostupnost, niska cena i jednostavna proizvodnja. Navedene karakteristike u potpunosti ispunjavaju vlakna na bazi celuloze, kao što su pamučna vlakna.

Malo je informacija u literaturi o pripremi heterogenih biokatalizatora na bazi celuloznih vlaknastih materijala i tripsina: tripsin imobilisan na pamučna vlakna koja su prethodno aktivirana tosilhloridom (Innocent i sar., 2006, u knjizi "Proteins at solid-liquid interfaces", Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 199-230) i na perjodatom oksidisanom pamuku (Seabra i sar., 2007, *Braz. J. Pharm. Sci.*, 43(4):535-542). U patentnom spisu EP1380310 A1 2004.01.14 autora FILATOV V.N i RYLTSEV V. iz Rusije i SIMENHAUS Z. iz Izraela, opisan je postupak za dobijanje zavoja za rane, tako što se u prvoj fazi vrši aktivacija tekstilnog nosača u cilju uvođenja funkcionalnih grupa, u opsegu od 0.026 do 0.06 mg-equiv. aldehidnih grupa po gramu nosača, koje su ravnomerno raspoređene po zapremini i površini nosača. Aktivirani nosač se impregnira rastvorom koji sadrži barem jedan bioaktivni enzim. Sušenjem impregniranog tekstilnog nosača sa enzimom, dobija se zavoj u kome je sorbovan enzim, što omogućava otpuštanje enzima u efektivnim količinama, u najkraćem periodu od tri dana nakon postavljanja zavoja na ranu.

O nosaču, na perjodatom oksidisanom pamuku, imamo i razmatranja u doktorskoj disertaciji Nikolić, T. J. „Dobijanje biološki aktivnih vlakana na bazi selektivno oksidisanе celuloze“ TMF, 2012., gde je proučena oksidacija pamučnih i viskozniх pređa natrijum- perjodatom pri različitim uslovima, u cilju dobijanja informacija o uticaju perjodatne oksidacije na svojstva prirodnih i regenerisaniх celuloznih vlakana. Dejstvo perjodatne oksidacije na hemijska i fizička svojstva pamučne i viskozne prede ocenjeno je određivanjem

sadržaja aldehidnih grupa, finoće i prekidne jačine pređe. Promene u sorpcionim svojstvima pamučne i viskozne pređe okarakterisane su određivanjem sorpcije vlage, sposobnosti zadržavanja vode i sorpcije joda. Takođe, ispitane su i promene površine oksidisanih celuloznih supstrata primenom SEM tehnike. Pamučna pređa oksidisana Na-perjodatom sa namenom da se koristi kao nosač za imobilizaciju tripsina prikazana je i u radu Nikolic T. i sar. (Carbohydrate Polymers, 82(2010): 976-981).

U doktorskoj disertaciji Praskalo, J. „Dobijanje celuloznih vlakana specijalnih svojstava metodama hemijskog modifikovanja“, TMF, 2010, u eksperimentalnom delu proučavan je uzajamni odnos i uticaj TEMPO-oksidacije na hemijski sastav, strukturu i svojstva različitih celuloznih vlakana. Od prirodnih vlakana modifikovana su vlakna pamuka i konoplje, a od hemijskih liocel vlakna. Nemodifikovana i modifikovana vlakna okarakterisana su sa aspekta gubitka mase, sadržaja karbonilnih (Ca-acetatna, Cu-broj i GPC/CCOA metoda) i karboksilnih grupa (Ca-acetatna, potencimetrijska i GPC/FDAM metoda) raspodele molekulskih masa (GPC tehnika), stepena kristalnosti (jodni broj) i promene površine vlakana (SEM tehnika). Takođe, određena su geometrijska (finoća), fizičko-mehanička (prekidna jačina i izduženje) i sorpciona (sorpcija vlage, vode, joda) svojstva, kao i sposobnost sorpcije različitih jona. Dobijeni rezultati ukazali su na efikasnu mogućnost primene selektivne TEMPO-oksidacije u cilju dobijanja oksiceluloze, koja predstavlja polaznu osnovu za dobijanje širokog spektra vlakana specijalne namene, jer dobijena oksiceluloza sa povećanim sorpcionim svojstvima omogućava vezivanje značajnih količina različitih jona ili molekula, što je potvrđeno sorpcijom jona srebra, koje je odabrano u cilju postizanja antimikrobnih svojstava oksidisanih vlakana, a što ih čini veoma pogodnim za dobijanje bioaktivnih i medicinskih vlakana, pri čemu je antimikrobna aktivnost ispitana *in vitro* i dokazana prema mikroorganizmima *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*.

Praskalo, J. sa saradnicima je u naučnom radu „Sorpciona svojstva TEMPO-oksidisanih prirodnih i hemijskih celuloznih vlakana“ objavljenom u Carbohydrate Polymers 77 (2009) 791-798; vlakna pamuka i liocela, pod različitim uslovima, oksidisala TEMPO-oksidacijom, koja podrazumeva upotrebu natrijum-hipohlorita, natrijum-bromida i katalitičku količinu 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksi radikala (TEMPO), po kome je i ceo proces oksidacije i dobio naziv. Nakon primene TEMPO-oksidacije, modifikovana celulozna vlakana analizirana su i okarakterisana sa aspekta gubitka mase, sadržaja uvedenih aldehidnih i karboksilnih funkcionalnih grupa i promene sorpcionih svojstava. Uvedene aldehidne i karboksilne grupe u oksidisanim pamučnim vlaknima bile su u opsegu do 0,321 do 0,795 mmol/g, a u oksidisanim vlaknima liocela od 0,634 do 0,7 mmol/g. Gubitak mase kod

modifikovanih pamučnih vlakana bio je do 12%, dok su kod oksidisanih liocel vlakana dobijeni veći gubici mase, do 27%. Dobijeni rezultati pokazali su da je sposobnost sorpcije vlage oksidisanih vlakana povećana, 1,55 i 2,28 puta, respektivno za vlakana pamuka i liocela, u odnosu na odgovarajuća polazna tj. nemodifikovana vlakna. Takođe, povećana je i sposobnost zadržavanja vode oksidisanih vlakana, do oko 85% za pamuk i čak 335% za liocel, dok su vrednosti sorpcije joda oksidisanih vlakana bile niže, do 35% za pamuk i do 18% za liocel, u poređenju sa polaznim, nemodifikovanim vlaknima.

Naučni radovi na temu imobilizacije tripsina na viskozi (Nikolić i sar., 2014, *Cellulose*, 21(3):1369-1380), kao i imobilizacije tripsina uključivanjem u polisaharidni film, upotrebom celuloze (gaze) kao podloge (Monteiro i sar., 2007, *Process Biochem.*, 42:884- 888) su takođe veoma retki. Rezultujući katalitički kapacitet zavisi od dva parametra, relativnog sadržaja tripsina vezanog za nosač i gubitka specifične aktivnosti koji je izazvan hemijskim modifikovanjem nativnog enzima ili relativnom orijentacijom molekula enzima na nosaču. Pamučna gaza sa sadržajem tripsina od 0,3 do 1,5 mg/g ispoljila je visok nivo terapijske efikasnosti (Patentni spis EP1380310 A1). Međutim, imobilizacija tripsina i drugih enzima često je praćena smanjenjem njegove specifične aktivnosti, koje može iznositi i 50% od vrednosti specifične aktivnosti slobodnog enzima (Leuba i sar., 1979, *Biotechnol. Lett.*, 1:109-114), ali i više (Cavalcante i sar., 2006, *Biochem Eng J.*, 29:258-261).

U praksi se često javlja potreba za vlaknastim materijalima sa kombinovanom biološkom aktivnošću. Veoma interesantna za medicinsku praksu su vlakna sa kombinovanim proteolitičkim i antimikrobnim dejstvom koja bi mogla efikasno da reše problem skraćanja vremena lečenja rana. Materijali sa kombinovanom enzimsko-antimikrobnom aktivnošću dobijeni su na bazi celuloznih i poliestarskih vlakana i sadržali su imobilisanu proteazu C i visokomolekulski antimikrobni poliheksametilenguanidin hidrohlorid (Yudanova i sar., 1999, *Fibre Chem.*, 31(2):90-95). Antimikrobno svojstvo se može dati materijalima sniženjem njihove pH vrednosti, kao što je postignuto sa celulozom u čiju strukturu su oksidacijom uvedene karboksilne grupe (C6 oksiceluloza) (Spangler i sar., 2004, *Surg Infect*, 4:255-262; Bajerovala i sar., 2009, *Adv Polym Tech*, 28:199-208). Kisela pH sredina je fiziološki nepovoljna za mnoge mikroorganizme, poznate uzročnike bolničkih infekcija. Osim toga, kisela pH vrednost materijala za tretman rana je poželjna s obzirom na to da je pH vrednost naročito hroničnih rana blago alkalna, što usporava njihovo zarastanje (Gethin, 2007, *Wounds UK*, 3: 52-56).

Hidrofilnost je bitna karakteristika materijala za previjanje rana, što je jedan od razloga za tradicionalnu primenu celuloznih vlakana za previjanje. Modifikovanjem celuloze u cilju uvođenja aktivnih grupa za imobilizaciju biomolekula menjaju se i njena sorpciona

svojstva. Modifikovanje celuloze npr. perjodatima dovodi do smanjenja njene sposobnosti zadržavanja vode, dok TEMPO-oksidisana celuloza (C6 oksiceluloza) ima značajno poboljšana sorpciona svojstva.

Rad na doktorskim disertacijama pojedinih članova tima pronalazača, kroz teorijska razmatranja, a najviše kao veliki broj eksperimentalnih rezultata (dobijen u saradnji sa ostalim članovima tima), bili su polazna osnova za iskorišćenje naših stečenih znanja u oblasti TEMPO-oksidacije različitih celuloznih supstrata i imobilizacije tripsina na celuloznom supstratu, a našim daljim naučno istraživačkim radom došli smo do novog proizvoda, prema ovom pronalasku, a prema našim saznanjima, u literaturi nema podataka o pripremi biološki aktivnih vlakana upotrebom TEMPO-oksidisane celuloze kao nosača za imobilizaciju tripsina.

OPIS PRONALASKA

Izlaganje suštine pronalaska

Pronalazak se odnosi na nov proizvod, biološki aktivna vlakna pamuka sa imobilisanim tripsinom koja poseduju proteolitičku i antimikrobnu aktivnost i imaju značajno veću sposobnost zadržavanja vode u poređenju sa nemodifikovanim pamučnim vlaknima. Proizvod je dobijen postupkom koji uključuje TEMPO-oksidaciju pamučnih vlakana i imobilizaciju tripsina na njima kovalentnim i jonskim vezama. Vlakna pamuka oksidisana TEMPO-radikalom, pri precizno definisanim uslovima, predstavljaju pogodan nosač koji omogućava imobilizaciju tripsina praktično bez gubitka specifične aktivnosti. Pored toga, karboksilne grupe uvedene u vlakna TEMPO-oksidacijom obezbeđuju kiselu pH vrednost proizvodu, što smanjuje rizik od infekcije i ubrzava zarastanje rana, i značajno poboljšavaju sorpciona svojstva pamučnih vlakana. Imobilizacijom je takođe stabilisana aktivnost enzima u dužem vremenskom periodu lagerovanja.

Detaljan opis pronalaska

Pronalazak se odnosi na dobijanje biološki aktivnih vlakana pamuka sa visokim prinosom imobilisane aktivnosti tripsina, antimikrobnim i poboljšanim sorpcionim svojstvima, postupkom koji se sastoji iz sledeće dve faze:

1. dobijanje nosača koji sadrži i aldehidne i karboksilne grupe,
2. imobilizacija tripsina na nosač.

1. Dobijanje nosača koji sadrži i aldehidne i karboksilne grupe

Nosač za imobilizaciju enzima koji sadrži i aldehidne i karboksilne grupe dobijen je katalitičkom oksidacijom pamučnih vlakana upotrebom 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) radikala. Za oksidaciju 10 g pamučnih vlakana pripravljena je reakciona smeša rastvaranjem 0,025 g TEMPO i 0,25 g NaBr u 750 ml destilovane vode. Rastvaranje je vršeno na sobnoj temperaturi, lagano uz mešanje magnetnom mešalicom. U pripremljeni rastvor su potopljena vlakna, a nakon toga je, uz neprekidno mešanje, dodavana potrebna količina 13 % NaClO kojoj odgovara koncentracija od 0,30, 2,42, 4,84 i 9,67 mmol NaClO/g celuloze. Za vreme trajanja reakcije pH vrednost je održavana na $10,5 \pm 0,1$ dodavanjem 0,5 M NaOH, a praćena je na potenciometru Titrim 848 (Metrohm, Švajcarska). Oksidacija je izvođena na sobnoj temperaturi u različitim vremenskim intervalima, od 15 min do 4 h. Nakon isteka planiranog vremena, oksidacija je zaustavljena dodatkom etanola (ca. 5 ml). Oksidaciono sredstvo je potpuno uklonjeno ispiranjem vlakana destilovanom vodom, a zatim i etanolom. Najbolji rezultati su dobijeni oksidacijom sa NaClO koncentracije 4,84 mmol/g celuloze u toku 3 h. Vlakna oksidisana pod navedenim uslovima imaju visok sadržaj karboksilnih (0,67 mmol/g) i aldehidnih grupa (0,12 mmol/g) u svojoj strukturi, tri puta veću sposobnost zadržavanja vode u odnosu na nemodifikovana pamučna vlakna i očuvanu početnu morfologiju.

Prisustvo i sadržaj aldehidnih grupa u oksidisanim vlaknima određen je po metodi opisanoj u literaturi (Parks i sar., 1972, Tappi J, 55:1510-1514; Saito i sar., 2004, Biomacromolecules, 5:1983-1989), a sadržaj karboksilnih grupa modifikovanom kalcijum-acetatnom metodom (Yackel i sar., 1942, J Am Chem Soc, 64:121-127; Kumar i sar., 2002, Carbohydr Polym, 48:403-412; Praskalo i sar., 2009, Carbohydr Polym, 77:791-798). Prisustvo disosovanih karboksilnih grupa dokazano je merenjem zeta potencijala pamučnih vlakana (SurPASS, Anton Paar GmbH, Austria). Zadržavanje vode određeno je standardnom metodom ASTM D 2402-78 1978. Morfologija vlakana je ispitana skenirajućom elektronskom mikroskopijom na 20 kV (FESEM, Tescan MIRA 3 XMU).

Oksidisana vlakna se čuvaju u vlažnom stanju na 4°C do dalje upotrebe.

2. Imobilizacija tripsina na nosač

Biološki aktivna vlakna pamuka sa imobilisanim tripsinom se dobijaju vezivanjem tripsina na aldehidne i karboksilne grupe uvedene u vlakno-nosač u prethodnoj fazi postupka. Pri tome je potrebno obezbediti uslove koji će omogućiti imobilizaciju enzima i kovalentnim i jonskim vezama.

Rastvor tripsina za imobilizaciju (koncentracije 0,8 mg/ml) pripreman je neposredno pre upotrebe, rastvaranjem enzima u ohlađenom (4°C) Tris-HCl puferu (koncentracije 10 mM i 100 mM, pH 8,2 i 9,2) koji sadrži 10 mM CaCl₂. Korišćen je tripsin iz pankreasa govečeta (EC 3.4.21.4) u obliku praha (T9201, Trypsin from bovine pancreas, "Sigma Aldrich", St. Louis, SAD). Oksidisana pamučna vlakna, bez prethodnog sušenja, inkubirana su sa rastvorom tripsina pri odnosu 1:25 (w/v) na 4°C u toku 18 h. Nakon imobilizacije, vlakna su ispirana više puta istim puferom koji je korišćen za imobilizaciju do potpunog uklanjanja nevezanog tripsina. Najbolji rezultati su dobijeni imobilizacijom iz rastvora tripsina u 10 mM Tris-HCl puferu pH 8,2. Pod navedenim uslovima, najbolji rezultati su dobijeni imobilizacijom tripsina na oksidisano pamučno vlakno koje u svojoj strukturi sadrži aldehidne i karboksilne grupe u količini od 0,12 mmol/g i 0,67 mmol/g, respektivno: količina imobilisanog proteina je iznosila 6,5 mg/g suvog vlakna, a imobilisana aktivnost 5,0 U/g suvog pamučnog vlakna, što je 94 % specifične aktivnosti tripsina u rastvoru. Vlakna sa imobilisanim tripsinom čuvaju se u istom puferu na 4°C.

Prisustvo i aktivnost imobilisanog tripsina dokazani su korišćenjem UV-VIS spektroskopije.

Količina imobilisanog tripsina određena je iz bilansa mase, kao razlika između količine proteina u rastvoru pre imobilizacije (polazni rastvor enzima) i sume proteina u istom rastvoru posle imobilizacije (supernatant) i u svim vodama od ispiranja. Sadržaj proteina određen je Bradford-ovom metodom (Bradford, 1976, Anal. Biochem., 72:248-254), merenjem apsorpcije rastvora na 595 nm (UV-VIS spektrofotometar SP6-550 Pye Unicam) i korišćenjem BSA (albumina iz seruma govečeta) kao standarda.

Katalitička aktivnost imobilisanog tripsina dokazana je u reakciji sa supstratom *N*-α-benzoil-DL-arginin-p-nitroanilid hidrohlorid (BAPNA, B4875, C₁₉H₂₂N₆O₄ • HCl, ≥ 98 %, M = 434,88 g/mol, "Sigma Aldrich", St. Louis, SAD). Reakciona smeša se sastojala od 3 ml 10 mM natrijum-fosfatnog pufera pH 7,0, 15 μl 100 mM rastvora BAPNA u dimetilsulfoksidu i vlakana sa vezanim enzimom mase približno 5 mg. Reakcija je izvedena na 37°C. Oslobođeni p-nitroanilin meren je na 410 nm upotrebom spektrofotometra (SP6-550 Pye Unicam). Jedinica aktivnosti tripsina (U) izražena je kao ona količina enzima koja kao rezultat hidrolize supstrata BAPNA stvara 1 μmol p-nitroanilina u 1 min na 37°C, koristeći molarni koeficijent apsorpcije p-nitroanilina na 410 nm od 8800 M⁻¹·cm⁻¹.

Poboljšana stabilnost imobilisanog u odnosu na tripsin u rastvoru dokazana je periodičnim ispitivanjem njihovih aktivnosti tokom 8 nedelja lagerovanja.

NAČIN INDUSTRIJSKE ILI DRUGE PRIMENE PRONALASKA

Biološki aktivna vlakna pamuka sa imobilisanim tripsinom se mogu koristiti u vlažnom stanju, u medicini, za topičnu upotrebu, u obliku gaze, zavoja i sl., za lečenje rana. Proizvod šire može naći primenu u biološkim sistemima, gde je potrebno kombinovano proteolitičko i antimikrobno dejstvo.

ПАТЕНТНИ ЗАХТЕВИ

1. Биолошки активна влакна са имобилисаним трипсином, назначен тиме, која садрже влакно-носач са односом алдехидних 0,12 mmol/g и карбоксилних група 0,67 mmol/g, где 1 g влакна садржи 6,5 mg трипсина.
2. Биолошки активна влакна са имобилисаним трипсином, према патентном захтеву 1, назначен тиме, која испољавају 94 % активности нативног ензима.
3. Биолошки активна влакна са имобилисаним трипсином, према патентном захтеву 1, назначен тиме, где је носач добијен оксидацијом памучних влакана употребом 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМРО) радикала.
4. Биолошки активна влакна са имобилисаним трипсином, према патентном захтеву 1, назначен тиме, где се на носач трипсин везује и ковалентним и јонским везама.
5. Биолошки активна влакна са имобилисаним трипсином, према патентним захтевима 1-4, за употребу у поступку лечења рана у облику **газе, завоја или сличних облога.**