

УДК 577.152.313; 577.15.08:615.4

## Иммобилизация щелочной фосфатазы. Перспективы биомедицинского использования иммобилизованного фермента

© 2017 г. Э.А. ЕФИМЦЕВА, Т.И. ЧЕЛПАНОВА\*

ФГБУН «Институт физиологии», Коми научный центр, Уральское отделение Российской академии наук, Сыктывкар, 167982

e-mail: chelpanova@physiol.komisc.ru\*

Поступила 24.08.2016 г.

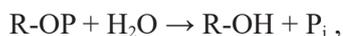
Принята в печать 20.10.2016 г.

В обзоре представлена краткая информация о современных материалах (в том числе полисахаридных матриксах в виде гелей, животных белков и липидов) и методах (включая адсорбцию, ковалентную иммобилизацию, кросс-сшивку и инкапсулирование) иммобилизации ферментов. Более детально освещены современные данные о материалах и способах иммобилизации щелочной фосфатазы. Обсуждаются возможности использования иммобилизованного фермента как источника эффективных биоматериалов для заместительной и регенеративной терапии, препаратов противовоспалительного действия, а также медицинских диагностикумов, высокочувствительных аналитических систем и селективных биосенсоров.

*Ключевые слова:* щелочная фосфатаза, иммобилизация, материалы, способы, биомедицинское приложение.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-4-54-75

Щелочная фосфатаза (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, щелочная фосфомоноэстераза, ЩФ, КФ 3.1.3.1) относится к классу гидролаз, катализирующих гидролиз сложноэфирной связи большого числа различных эндогенных и экзогенных моноэфиров фосфорной кислоты при щелочных значениях рН согласно реакции:



где R-OP – моноэфир ортофосфорной кислоты, P<sub>i</sub> – неорганический фосфат, R-OH – спирт, фенол, сахар или другое соединение с гидроксильной группой.

С участием данного фермента при определенных условиях также происходят реакции трансфосфорилирования.

Фермент млекопитающих является гликозилированным гомодимером с молекулярной массой 130–220 кДа. В каталитическом и аллостерическом участках его молекулы присутствуют ионы Zn<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, которые необходимы для активности и стабильности ЩФ. Обсуждаемые в ряде работ гипотетические 3D-модели молекул отдельных щелочных фосфатаз, полученные на основе рентгеноструктурного анализа кристаллов ферментов, основаны на наличии в активном центре ЩФ аминокислотной последовательности Thr-Asp-Ser-Ala,

*Список сокращений:* БСА – бычий сывороточный альбумин; ГА – глутаровый диальдегид; α-ГФ, β-ГФ – α- и β-глицерофосфат, соответственно; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ЛПС – липополисахарид, бактериальный эндотоксин; ММ – молекулярная масса; п-НФФ – п-нитрофенилфосфат; ПС – природный полисахарид; СМ – степень метилэтерификации; ЩФ – щелочная фосфатаза; ЭДАК – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид; GalA – галактуронозная кислота; LM-пектины (Low-Methoxy-esterified pectins) – низкометилэтерифицированные пектины; P<sub>i</sub> – фосфат неорганический; PP<sub>i</sub> – пиррофосфат.

внутри которой выделяют каталитически эффективный Ser102. Гидроксильная группа этого остатка активируется ионом  $Zn^{2+}$  на металлсвязывающем участке M2 и осуществляет нуклеофильную атаку на фосфатную часть субстрата с образованием ковалентного фосфосерил-интермедиата. Данный интермедиат затем гидролизуется молекулой воды, активированной ионом  $Zn^{2+}$ , на металлсвязывающем участке M1 через образование нековалентного энзим-фосфатного комплекса, который затем диссоциирует на фермент и свободный  $P_i$ . Таким образом, ионы  $Zn^{2+}$  непосредственно участвуют в катализе, тогда как ионы  $Mg^{2+}$  предположительно влияют на ориентацию Ser102, меняя конформацию белка [1–4].

Фермент обладает широкой субстратной специфичностью, но не все его физиологические субстраты известны или достаточно четко идентифицированы. Кроме нативных субстратов (пиридоксаль-5-фосфат и другие производные витамина  $B_6$ , фосфатиды, фосфонуклеотиды, глюкозо-6-фосфат,  $\beta$ -ГФ, фосфоэтанолламин, пирофосфат  $PP_i$  и др.) ЩФ гидролизует различные искусственные фосфомоноэфиры, среди которых отдельные синтетические субстраты успешно используются для измерения активности фермента в биологическом материале [5, 6].

ЩФ у млекопитающих представлена изозимами, которые кодируются независимыми генами [6–8]. Некоторые из изозимов обнаруживаются преимущественно в определенных тканях: кишечнике (кишечный изозим, мембраносвязанный, локализованный в мембранах щеточной каймы энтероцитов), плаценте (плацентарный изозим) или эмбрионе (эмбриональный изозим). Другие изозимы не имеют четко выраженной тканевой специфичности, например, неспецифический изозим фермента, состоящий в основном из печеночной, костной и почечной изоформ, который обнаруживается в крови и в различных органах (печени, почках, легких, костях и др.) [6, 9]. Препараты ЩФ выделены из отдельных тканей некоторых животных и человека, а также из ряда микроорганизмов и в качестве коммерческих препаратов, снабженных биохимической спецификацией, предложены для использования.

В зависимости от тканевой и видовой принадлежности ЩФ различаются по локализации и биохимическим характеристикам. У человека и животных ЩФ является гликопротеином и связана посредством гликозилфосфатидилинозитольного якоря с апикальной клеточной мембраной, отделяясь от которой фермент способен функци-

онировать вне клеточного пространства, а также в свободном виде в цитоплазме клеток и различных биологических жидкостях [4]. В отличие от фермента млекопитающих ЩФ *E. coli* локализуется в периплазматическом пространстве клетки. Кроме того, ЩФ млекопитающих обладает более высокой специфической активностью и более высокими значениями  $Km$ , более щелочным рН-оптимумом, но и меньшей термостабильностью по сравнению с бактериальным ферментом [4, 6].

Несмотря на то, что точная физиологическая функция ЩФ неизвестна, выявлено участие фермента в различных жизненно важных процессах. Наиболее детально роль ЩФ изучена в транспорте фосфора, связанном с кальцификацией костей [4, 5, 10, 11].

Широкий диапазон свойств этого мультифункционального фермента определяет практическое приложение ЩФ как в различных областях народного хозяйства, так и в медико-биологических исследованиях. В некоторых случаях, однако, пептидная или белковая природа ферментов обуславливает их лабильность и ограничивает их использование. Иммобилизация (закрепление на подложках из различных материалов) позволяет успешно стабилизировать структуру ферментов и в течение длительного времени поддерживать их в активном состоянии.

Имобилизованные белки находят применение в различных отраслях промышленности, в том числе в химической, фармацевтической, пищевой промышленности, в биотехнологических производствах, а также в сельском хозяйстве. Имобилизованные ферменты востребованы в медицине для диагностических целей в качестве высокочувствительных биосенсоров и в клинических исследованиях как тест-системы для выявления различных патологий, в заместительной терапии при ферментативной недостаточности и в качестве лечебных препаратов при некоторых поражениях организма. Кроме того, иммобилизованные белки используются в аналитических целях: в экологическом мониторинге в составе тест-систем для выявления загрязнения окружающей среды и пищевых продуктов опасными для здоровья человека веществами (пестициды, микотоксины, ионы тяжелых металлов и др.), а также в иммунохимических исследованиях и генетической инженерии [12, 13].

В данном обзоре представлена информация о методах и эффективных приемах иммобилизации ферментов, включая ЩФ, а также о различных материалах, используемых в качестве подложек

и носителей фермента. Обсуждаются возможности биомедицинского использования иммобилизованной щелочной фосфатазы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

### Материалы

Используемые для иммобилизации материалы классифицируются согласно их химической природе на неорганические и органические; последние, в свою очередь, подразделяются на натуральные и синтетические. Для иммобилизации белков применяют такие материалы неорганической природы, как металлы, оксиды металлов, глины, керамика, стекло, силикагель, графиты, активированный уголь и др. Из материалов на органической основе широкое распространение получили различные синтетические (полиметиленовые, полиамидные, полиэфирные) и природные полимеры.

Иммобилизация ферментов на нерастворимых синтетических полимерах и носителях неорганической природы чаще всего связана с получением новых типов гетерогенных катализаторов, обеспечивающих их успешное технологическое использование, и направлена на создание различных аналитических устройств для детекции определенных веществ [12].

С точки зрения биомедицины особый интерес в качестве материала для иммобилизации представляют натуральные биополимеры, характеризующиеся наличием множества реакционноспособных функциональных групп. Преимущество природных полимеров животного и растительного происхождения (белковых, липидных, полисахаридных) перед синтетическими при их использовании для создания биологически активных систем состоит в том, что первые биосовместимы, нетоксичны, неиммуногенны и биodeградируемы в физиологических условиях. Такие требования предъявляются, например, к веществам, используемым в качестве носителей пероральных терапевтических агентов для их доставки к месту действия [14].

Носители различных лекарственных субстанций, в том числе и терапевтических белков, должны обеспечивать их целенаправленное высвобождение в целевом органе или ткани. С этой точки зрения в качестве носителей привлекательны такие натуральные материалы, как целлюлоза, крахмал, агар, агароза, инулин, пектин, альгиновая кислота и ее соли (альгинаты), камеди, карра-

гинан, хитин, хитозан, полиэлектролиты и/или полиэлектролитные пары ПС. Часто используют и другие природные биополимеры, как однородные, так и в составе композитных материалов [15].

Для фиксации и доставки лечебных субстанций особенно технологически удобны ПС, обладающие к тому же широким спектром собственной биологической активности. Некоторые из них классифицированы как пищевые волокна и пребиотики и одобрены в качестве фармацевтических наполнителей. Кроме того, определенные полисахаридные носители имеют предсказуемую картину деградации в ЖКТ, что важно при адресной доставке пероральных лечебных средств, в том числе ферментосодержащих препаратов [16].

В настоящее время особый интерес для биомедицинских исследований представляют ПС, которые рассматриваются и изучаются в качестве возможных носителей для различных лечебных субстанций и перспективных материалов для тканеинженерных конструкций (скаффолдов, имплантов и др.) и эффективных материалов-сорбентов. К таким биосовместимым и биodeградируемым полисахаридным материалам относятся пектины. Эти соединения, выделяемые из клеточных стенок высших растений, представляют собой гетерополисахариды из группы гликаногалактуронанов – кислых растительных ПС. Они характеризуются преимущественным содержанием линейного 1,4- $\alpha$ -D-галактуронана, в котором часть карбоксильных групп остатков D-галактуроновой кислоты (GalA) метилэтерифицированы. Пектиновая макромолекула (ММ которой обычно находится в интервале 100–1000 кДа) включает различные фрагменты с линейной и разветвленной структурой. По степени метилэтерификации (СМ) различают высокометилэтерифицированные пектины, которые содержат более 50% метилэтерифицированных остатков GalA, и низкометилэтерифицированные (LM) пектины, у которых таких остатков менее 50% [17]. LM-пектины обладают уникальной способностью формировать в присутствии двухвалентных ионов металлов достаточно прочные сетчатые трехмерные гидрогели, структура которых описывается моделью «яичной коробки» (egg box) [18–20].

Прочные гели с высокой степенью гидратации образуют также альгинаты – соли альгиновых кислот, полученные из бурых морских водорослей. Альгиновая кислота – линейный ПС из группы гликуроанов; этот гетерополимер состоит из остатков гликуроновых кислот –  $\beta$ -D-маннуровой (рК<sub>a</sub> 3,38) и  $\alpha$ -L-гулуровой (рК<sub>a</sub> 3,2),

соединенных  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями. Альгинат представляет собой линейный анионный блок-сополимер, состоящий из гомополимерных полиманнуриновых и полигулуриновых областей. В отличие от пектиновых гидрогелей альгинатные гели с их гидродинамическими свойствами и мягкой консистенцией близки по своим характеристикам к природным тканям [21].

Широкое распространение при иммобилизации различного рода биоматериалов получил хитозан – деацетилованное производное хитина, основного компонента наружного скелета членистоногих. Молекула хитина состоит из N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминовых мономеров, связанных  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями. Физико-химические свойства хитозанов определяются ММ и степенью деацетилирования [22].

Примечательно, что полисахридные матриксы в виде гидрогелей устойчивы к действию кислой среды желудка и пищеварительных соков тонкой кишки; поэтому они способны защитить лечебные белковые препараты от деградации в ЖКТ при их транзите, а также предотвратить высвобождение инкорпорированного лечебного средства в верхних отделах ЖКТ и тем самым увеличить биодоступность лечебной субстанции в месте приложения ее действия (биомишени) [16, 20, 23, 24].

Среди биосовместимых и нетоксичных материалов для иммобилизации привлекательны и другие биополимеры, а именно белки животного происхождения. К таким белкам относится фибрин, играющий важную роль при свертывании крови; в виде гидрогеля его часто используют в качестве вместилища для роста и функционирования хондроцитов, а также для контролируемой доставки различных факторов роста при регенерационных процессах в тканях [25].

Коллаген – фибриллярный белок соединительной ткани организма человека и животных – механически достаточно прочный и эластичный материал, который легко подвергается физической и химической модификации. Он обладает способностью поддерживать рост и дифференцировку клеток, а потому является перспективным материалом для регенерации тканей [26]. Конструкции из таких биосовместимых и биodeградируемых материалов, содержащие не только терапевтические белки, но и имплантированные клетки (хондроциты, фибробласты, мезенхимные стромальные клетки) и биологические факторы роста, пытаются использовать для заполнения свободных пространств при различных тканевых дефектах. Находят применение в качестве биodeградируе-

мых носителей и такие белки, как кератин, альбумин, белок шелка – фиброин, содержащие достаточное количество функциональных групп, которые могут быть использованы для связывания ферментов [15].

В качестве природных носителей для иммобилизации белков на основе гидрофобных и электростатических взаимодействий представляют интерес липиды (лецитин, фосфатидилхолин и др.), используемые чаще всего в виде пленочных структур и покрытий липосом. Липидные биodeградируемые носители ферментных белков удобны для использования в условиях *in vivo* благодаря способности имитировать условия функционирования ферментов на клеточных биомембранах, однако липосомные препараты недолговечны (они быстро разрушаются в кислой среде желудка и элиминируются из кровотока) [27].

Подбор материала, используемого в качестве носителей белков (ферментов) в системах доставки биомолекул к мишени, в каждом конкретном случае представляет специальную задачу. Носители (матриксы) для иммобилизации белковых субстанций должны обладать определенными свойствами: механической прочностью, гидрофильностью, функционально активной поверхностью, способностью к активации, пористостью, отличной проницаемостью для фермента и субстрата и др. [13, 14]. В зависимости от предполагаемых целей носителям придают форму микро- и наночастиц, микросфер, гранул, дисков, пленок, капсул или губок.

## Методы

Для иммобилизации белков (ферментов) применяют различные физические и химические методы. Наиболее распространенные из них – физическая адсорбция, ковалентная сшивка ферментов с поверхностью носителя, включение ферментов в полимерные гели, включение их в комплексы с полиэлектролитами, поперечное сшивание молекул фермента, а также инкапсулирование биомолекул, обеспечивающее наилучшую устойчивость включенных в капсулы белковых субстанций к условиям окружающей среды, в частности, к био- и кислотной деградации в ЖКТ в случае применения белка в качестве перорального лечебного препарата.

Широко испытываются и применяются комбинации различных методов иммобилизации и сочетание разных материалов, например, при получении мультифункциональных конъюгатов, многослойных полиэлектролитных пленок и капсул.

Кроме того, капсулам как носителям биомолекул можно придавать дополнительные нужные свойства введением специфических молекул или коллоидных частиц (например, флуоресцентных или магнитных). Иммобилизация придает ферментам необходимые физико-химические свойства, позволяющие им функционировать длительно и непрерывно, а именно структурную стабильность, пространственную ориентацию, повышенную термостабильность и устойчивость к изменению рН среды [12]. Ниже рассматриваются достоинства и недостатки указанных подходов.

Прочность связывания ферментного белка с носителем и сила его удерживания зависят от разнообразных факторов. Одним из основных является наличие в молекуле белка различных реакционноспособных групп: COOH-группы C-концевых аминокислотных остатков полипептидных цепей, а также остатков Asp и Glu боковых цепей,  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группы N-концевых остатков аминокислот полипептидных цепей и других аминокислот,  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группы остатков Lys, SH-группы Cys, OH-группы Tyr, гуанидиновых групп остатков Arg, имидазольной группы остатка His, а также функциональных групп поддерживающего матрикса (NH<sub>2</sub>-, COOH-, SH-, OH-группы и др.) [12]. Кроме того, большое значение для связывания имеют свойства материала, структура и химия его поверхности (гидрофильность, заряд, удельная поверхность и пористость носителя, размеры сформированных пор), а также условия иммобилизации (рН среды, ионная сила раствора фермента, его концентрация, порядок внесения в среду, время и температура проведения процедуры связывания). Нарушение баланса указанных факторов может привести к резкому ослаблению взаимодействия фермента с носителем и его преждевременному высвобождению из матрикса [24, 27, 28].

Каждый из способов иммобилизации имеет свои достоинства и недостатки. Так, при физической адсорбции, отличающейся простотой исполнения, между ферментом и матриксом могут возникнуть комбинированные взаимодействия: образование водородных связей, электростатические и гидрофобные эффекты. При этом существует зависимость степени адсорбции от pI фермента и матрикса, которая проявляется в случае, если возникающих сил связывания оказывается недостаточно для предотвращения преждевременной десорбции белка [29].

Ковалентное прикрепление вовлекает в связывание активные функциональные группы аминокислотных остатков белка (фермента) и поддер-

живающего матрикса. Ковалентное связывание эффективно для сорбента с крупными порами и большой поверхностью, где субстрат и продукт могут свободно диффундировать без угрозы их вымывания. Но жесткое ковалентное прикрепление ферментов к матриксу часто снижает активность иммобилизованного фермента, оказывая влияние на конформацию белковых молекул [12].

Поперечная сшивка молекул фермента между собой (или с другими белками) с помощью бифункциональных агентов позволяет стабилизировать неустойчивые молекулы (например, склонные к диссоциации) с образованием более устойчивых агрегатов в виде слоев (пленок), которые иммобилизуются на носителе или используются без подложки. Такие агрегаты находят применение в биосенсорах и в инженерной энзимологии. При данной процедуре, однако, также не исключена возможность инактивации фермента [30].

Инкапсулирование обеспечивает длительную защиту белка от денатурации и вымывания белковой субстанции из матрикса и способствует пролонгированному действию иммобилизованного фермента. Однако необходимо учитывать, что если размер молекул фермента больше размера пор матрикса, то фермент адсорбируется в основном на внутренней поверхности носителя; если наоборот, то фермент легко вымывается из матрикса капсул [31].

Высвобождение иммобилизованного белка из носителя после его целевой доставки происходит с помощью различных механизмов: набухания гидрофильного матрикса (увеличения размера пор), контролируемой диффузии белка, а также энзиматической деструкции биодеградируемых носителей. Кроме того, для десорбции фермента с носителя часто используют увеличение ионной силы, особенно при ионообменных процедурах, и другие стимулирующие воздействия [32–34].

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Для иммобилизации ЩФ на различных носителях используются практически все известные физические и химические методы, среди которых преобладают адсорбция, включение в гель, кросс-сшивание с носителем и инкапсулирование. Однако практически всегда, когда речь идет о конкретном ферменте, в используемые способы вносятся определенные модификации: активация носителей и кросс-сшивка бифункциональными

агентами, а также применение соответствующих химических веществ для покрытий и вставок в качестве линкеров и спейсеров.

Активность свободного и иммобилизованного фермента обычно оценивается по гидролизу субстрата *п*-нитрофенилфосфата (НФФ), кроме отдельных случаев с применением других субстратов, которые указаны в тексте.

### Иммобилизация ЩФ на неорганических материалах

ЩФ была иммобилизована методом физической адсорбции при pH 8,0 на частицах активированного алюминия диаметром 403 мкм со средним размером пор 100 Å и площадью поверхности 320 м<sup>2</sup>/г частиц [35]. Авторы не обнаружили существенных различий между кинетическими параметрами свободной и иммобилизованной ЩФ, что указывало на отсутствие изменений конформации молекул фермента при иммобилизации. Десорбция фермента и связанная с этим потеря энзиматической активности иммобилизованным ферментом была относительно небольшой (≈14%).

Коммерческий препарат ЩФ кишечника быка иммобилизовали на золь-гель-матриксах, полученных из тетраметилортосиликата. С помощью технологии формирования золь-геля можно получать матриксы определенной пористости в форме блоков, частиц и пленок различной толщины. Микроинкапсулирование белка позволило использовать иммобилизованный фермент в качестве чувствительной системы для обнаружения ионов тяжелых металлов, фосфорорганических пестицидов, карбаматов и других веществ [36].

Адсорбция препарата ЩФ кишечника телят была проведена на различных кремнеземах, модифицированных 3-аминопропилтриэтоксисиланами, аскорбиновой кислотой и хитозаном с полученными амино- и карбонильными группами на поверхности материалов. Наиболее перспективным носителем оказался аминоорганокремнезем, эффективность иммобилизации фермента на котором была самой высокой (1 мг белка на 1 г носителя) [37].

ЩФ иммобилизовали также на аминированных стекловолоконистых дисках под вакуумом [38]. Согласно этой процедуре были сформированы амидные связи между карбоксильными группами фермента и свободными аминогруппами поверхности аминированного стекла. Иммобилизация фермента была проведена при pH в диапазоне 7,0–9,0 и различной ферментной нагрузке на носитель. Для образования ковалентных

связей наилучшим линкерным агентом оказался 3-глицидоксипропилтриметоксисилан. Наивысшую активность ЩФ проявляла при иммобилизации в следующих условиях: 10%-ная концентрация линкера, 2 г диоксида кремния и 1,5 Е/мл, или 2,59 мг/мл ЩФ (pH 9,0). В зависимости от емкости носителя и количества связавшегося фермента выход иммобилизации составлял от 48% до 82%. Высокая эффективность иммобилизации ЩФ на поверхности стекловолоконистых дисков позволяет использовать их в биосенсорах для обнаружения фосфатов. Была показана возможность многократного применения иммобилизованного фермента без существенной потери активности.

Другие исследователи [39] попытались иммобилизовать ЩФ с помощью ковалентного связывания на гладких аминированных стеклянных дисках и дисках, покрытых мезопористыми пленками, модифицированными триалкоксисиланами с функциональными амино-, эпокси- и уреидо-группами. Авторы предполагают, что возможен электростатический тип связывания белка с поверхностным мезопористым покрытием стекол, но не исключают и образование ковалентных связей между карбоксильными группами фермента и аминогруппами покрытия дисков. Мезопористое (размер пор 6–7 нм) структурированное покрытие стекол, модифицированное силанами с 3-аминопропилсилильными остатками, способствовало максимальной эффективности связывания с ферментным белком (63 ± 8 нг/см<sup>2</sup>).

Успешное инкапсулирование ЩФ было проведено с использованием мезопористого кальций-фосфатного криогеля. Внутри частиц (размером 436 ± 97 нм и со средним диаметром пор 44 ± 2 нм) этого апатитного геля оставалось до 85% активности ЩФ от исходной ферментной нагрузки на носитель. Пористость геля не влияла на активность ЩФ, поскольку через поры матрикса к активному ферменту без затруднения проникали малые по размеру молекулы субстрата PP<sub>i</sub>. Авторы полагают, что в дальнейшем следовало бы оценить потенциал этого материала с иммобилизованной ЩФ для стимуляции формирования кости в культуре клеток-остеобластов [40].

ЩФ из слизистой кишечника быка была ковалентно иммобилизована на ЭДАК/Н-гидроксисульфосукцинимид-активированных парамагнитных микросферах. В микрореакторе проводили мониторинг фосфорилирования пептидной смеси с использованием иммобилизованного фермента, который продемонстрировал очень высокие показатели рабочей эффективности, полностью

отщепляя фосфат от монофосфорилированных стандартных пептидов за 15 с и от мультифосфорилированных пептидов за 40 с. Кроме того, ферментный препарат мог храниться с достаточно высокой активностью при 4°C в течение 5 дней [41].

Рекомбинантная бактериальная ЩФ *E. coli* была ковалентно зафиксирована на поверхности аминированных магнитных частиц при помощи ферментативной реакции, катализируемой микробной транслугтаминазой, через  $\gamma$ -карбоксамидную группу глутамина субстратного сайт-специфического пептида, внедренного в молекулу фермента. Поверхность магнитных частиц была предварительно модифицирована диэтиленгликоль-бис-(3-аминопропиловым) эфиром для подавления неспецифической адсорбции фермента со связанным субстратным пептидом. Разработанная система обеспечивала высокую, более чем 90%-ную, эффективность иммобилизации фермента. Активность иммобилизованного фермента сохранялась на этом уровне в течение 10 циклов использования [42].

Коммерческий препарат ЩФ из слизистой кишечника быка был ковалентно прикреплен к поверхности суперпарамагнитных наночастиц диаметром 390 нм, приготовленных из оксидов  $Fe_3O_4$  и  $SiO_2$ . Наночастицы покрывали 3-аминопропилдиэтилэтоксисиланом и активировали 5%-ным раствором ГА в течение 1 ч. Промытые аминированные магнитные наночастицы помещали в раствор карбонатного буфера, pH 8,5, содержащего 2,5 мг/мл ЩФ и цианоборгидрид натрия, и инкубировали в течение 2 ч. Цианоборгидрид снижал формирование оснований Шиффа, индуцируя образование устойчивых связей вторичных аминов между иммобилизованным ферментом и магнитными частицами [43].

ЩФ была успешно иммобилизована на поверхности дисков титана (диаметр 12 мм и толщина 1,5 мм) и пластинах политетрафторэтилена (10×10×1 мм), покрытых тонким слоем полидопамина. Допамин способен адсорбироваться на поверхностях различных органических и неорганических материалов и самополимеризоваться в тонкие гидрофильные пленки с сильными адгезивными свойствами. Использовали одностадийную и двухстадийную процедуры иммобилизации. В первом случае самополимеризация допамина происходила в присутствии ЩФ, что приводило к гомогенному ковалентному связыванию фермента со слоем полидопамина. Во втором – сначала осуществляли полимеризацию матрикса в течение 16 ч и только потом добавляли ЩФ. Коли-

чество фермента, закрепленного на поверхности дисков титана при использовании одностадийной процедуры, было в 2–3 раза выше по сравнению с таковым при двухстадийной иммобилизации и в 10 раз выше, чем при использовании физической адсорбции фермента. Аналогичную тенденцию наблюдали и при иммобилизации на политетрафторэтилене. В течение 28 дней активность иммобилизованного фермента сохранялась на уровне 60–70% от исходной [44].

### Иммобилизация ЩФ на синтетических полимерных материалах

Коммерческий препарат ЩФ из слизистой кишечника быка был ковалентно иммобилизован путем прямой фиксации и с помощью спейсеров на пленках из полиэтилена низкой плотности (0,05 мм толщиной) с привитыми циклическим винилкарбонатом и N-винил-N-метилацетамидом (для большей гидрофильности матрикса). В качестве спейсеров, связывающих циклические карбонатные группы матрикса с аминогруппами фермента, использовали водорастворимые алкилдиамины разной длины. Исследователи опробовали также прием предобработки пленок БСА перед окончательной процедурой фиксации фермента. Присоединение ЩФ к «плечам спейсера» или к слою БСА на пленках увеличивало количество удерживаемой активной ЩФ благодаря созданию стерически более благоприятного микроокружения фермента. Наивысшая концентрация активной ЩФ, присоединенной к активированной ГА поверхности пленок, была достигнута благодаря тому, что спейсер диаминогексан был помещен между слоями преимобилизованного БСА и фермента. В результате ковалентной иммобилизации некоторые физико-химические свойства ЩФ были заметно улучшены по сравнению с нативным ферментом, что позволило заключить, что такие модифицированные пленки можно успешно использовать в качестве матрисов для иммобилизации и других ферментов [45]. Эти же авторы получили тонкую дисперсию гидрогель-подобных полимеров с реакционноспособными циклическими карбонатными группами путем кросс-сшивки поливинилкарбоната с полиэфирами (Jeffamine®) различной ММ в эмульсии силиконового масла и диметилформамида. Продукты этой реакции – неактивированные пленки и микросферические гидрогелевые частицы (размером 4–20 мкм) с высокими содержанием воды и концентрацией реакционноспособных групп – использовали в качестве

матриц для иммобилизации ЩФ. Эти структуры в зависимости от условий проявляли значительную емкость при связывании ЩФ и хорошую способность к удерживанию активного фермента. Выход активности при иммобилизации фермента составлял ~50% при pH 9,0. У иммобилизованной ЩФ была выявлена большая термостабильность, чем у нативного, и высокая активность после повторного использования [46].

В работе [47] авторы прибегли к процедуре активированной самосборки монослоя липоевой кислоты на поверхности частиц золота, покрывающих слоем толщиной 600 Å микропористые (размер пор 0,2 мкм) нейлоновые диски диаметром 6 мм. Белок ЩФ был «заякорен» на поверхности полученных дисков, покрытых частицами золота, с помощью реакции, опосредованной ЭДАК, через амидную связь с терминальной карбоксильной группой адсорбированной липоевой кислоты. На покрытых золотом и активированных ЭДАК нейлоновых дисках с монослоем липоевой кислоты сохранялось 70,3% исходной ферментативной активности ЩФ, тогда как на аналогичных неактивированных мембранах – только 26,4%, а на покрытых золотом нейлоновых дисках без монослоя и химической обработки – 59,4% от исходной активности используемого коммерческого препарата фермента.

Были опробованы различные способы иммобилизации кишечной ЩФ теленка на полимерных укороченных нановолокнах из нейлона (средняя длина 4 мкм, средний диаметр 80 нм) [48], а именно: физическая адсорбция с простым и послойным (используя катионный полимер Sapphire II™) электростатическим (нековалентным) прикреплением фермента к нановолокнам (LbL-сборка); ковалентное связывание с использованием поперечной сшивки ГА с предварительно модифицированным 3-(диметиламино)-1-пропиламино нейлоном и сочетание ГА-сшивки с применением различных спейсеров (1,6-диаминогексана и полиэтиленimina). Эффективность прямой адсорбции ЩФ на нейлоновых носителях оказалась наиболее высокой (30–33%), тогда как при ковалентном связывании ЩФ с нановолокнами посредством ГА она составила 2,8%, а в комбинации ГА со спейсерами – около 11–13%. По мнению авторов, доступ флуорогенного субстрата (CSPD™) к активному центру адсорбированной ЩФ оказался более легким в отличие от доступа к ферменту, иммобилизованному методом жесткой ковалентной сшивки, в результате которой его молекулы претерпели конформационные изменения,

судя по измененным кинетическим показателям ферментативной реакции (константа Михаэлиса и максимальная скорость).

Синтетические полиакриламидные гидрогели, обладающие амидной связью и двойной связью, сопряженной с карбонилем, были опробованы в качестве матриц для иммобилизации ЩФ. При этом в присутствии субстрата α-ГА на гидрофильном полимере поли-2-гидроксиэтил-метакрилате наблюдали активное накопление минерала (гидроксипатита) в условиях *in vitro* [49]. Фермент попытались инкапсулировать в микрочастицы с диаметром 6,2 и 1,4 мкм, полученные с помощью метода эмульсионной полимеризации акриламида и акриловой кислоты через фазу диспергирования концентрированной эмульсией [33]. В результате двухфазной процедуры активность ЩФ в полиакриламидных частицах составляла 12% от исходной. Причиной снижения активности при иммобилизации авторы сочли денатурацию фермента в процессе полимеризации акриламида и последующих промывок метанолом и ацетоном, а также относительно слабое сцепление белка с гелевыми частицами.

Компактные полиэлектролитные комплексы были получены копреципитацией полиакриловой кислоты (полианиона), полиаллиламина гидрохлорида (поликатиона) и коммерческого препарата плацентарной ЩФ человека с последующим уплотнением преципитата [28]. Фермент, закрепленный в этих комплексах на основе электростатического взаимодействия противоположно заряженных ионогенных групп белка и полииона, не только оставался активным, но и отличался повышенными активностью и стабильностью. По-видимому, полученные компактные матрицы эффективно защищали ЩФ от инактивации при высоких температурах, позволяя неоднократно использовать иммобилизованный препарат. В полиэлектролитные комплексы авторы, кроме того, внедряли магнитные наночастицы, что представляло еще одно преимущество для их использования как в качестве скаффолдов, так и при катализируемых ферментом процессах. Эффективность иммобилизации зависела от соотношения, концентрации и порядка добавления компонентов в среду (в особенности от того, на каком этапе процедуры ЩФ вносили в комплексообразующий раствор) и составляла от 17,3 до 34% от исходной активности фермента.

Была осуществлена попытка [50] иммобилизовать кишечную ЩФ быка на пористых метакрилатных сферических частицах торговых марок

Immobeads-150, Sepabeads EC-EP и Sepabeads EC-NA. Первые два носителя содержат реактивные короткоцепочечные эпокси-группы, способные, по мнению авторов, реагировать с аминоклассами остатков лизина на поверхности молекулы фермента, а третий включает более длинный линкер с функциональной аминоклассой, которая вступает в реакцию с ГА во время активации матрикса. Фермент удалось иммобилизовать в течение 4 ч только на альдегид-активированных сферах Sepabeads EC-NA, у которых альдегидная группа спейсера взаимодействовала с аминоклассами остатков лизина в молекуле фермента. ЩФ, иммобилизованная на Sepabeads EC-NA, была менее восприимчива к инактивации  $P_i$  и успешно опробована в мультиферментных каскадных реакциях синтеза углеводов при pH 8,0, начиная с фосфорилирования дигидроксиацетона или глицерина с использованием  $PP_i$  в качестве донора фосфата.

#### Иммобилизация ЩФ на натуральных биополимерных носителях

В ранних исследованиях для иммобилизации ЩФ пытались использовать аффинные носители на основе агарозных гелей. Агароза обладает высокой гидрофильностью, и ее полимерные нити склонны образовывать водородные связи. Так, ЩФ *E. coli* была ковалентно связана с бромциан-активированной сефарозой 4В. Иммобилизованный фермент оказался более стабильным при нагревании в присутствии 10 мМ  $Mg^{2+}$ , чем исходная растворимая ЩФ. Иммобилизованный и растворимый фермент в среде с казеином отщепляли от фосфопротеина почти одинаковое количество  $P_i$  (75% и 77%, соответственно), но иммобилизованный фермент можно было использовать многократно. Эффективность иммобилизации ЩФ составила 70% от массы растворимого фермента и 38% – от исходной активности [51]. Вдвое выше (около 69% удерживаемой активности от исходной) оценивалась другими авторами [52] эффективность иммобилизации фермента из *E. coli* на сефарозе 4В, активированной бромцианом. Отмечают, что связанная с данным активированным носителем бактериальная ЩФ обладала высокими стабильностью и активностью даже после 3 месяцев хранения [53].

ЩФ яйцеклеток морского ежа была включена в гели из различных природных ПС. Наиболее эффективными оказались гели разной концентрации, полученные из картофельного крахмала

(2,5%, 3,5 и 4,55%), агарозы (0,2%, 0,45 и 0,85%) и каррагинана (0,45 и 0,85%). Наибольший выход иммобилизованной энзиматической активности (100%) был получен для 2,5%-ного крахмального геля, наименьший – для геля из каррагинана, в котором, по мнению авторов, активность ЩФ ингибировалась на 35% от исходной этим сульфатированным ПС. Фермент, включенный в пространственную структуру гелей, был довольно стабилен [54].

Особый интерес представляет получение ферментных препаратов, иммобилизованных на биодеградируемых материалах, применение которых физиологически безопасно (например, пектинах, альгинатах и др.).

Гелеобразующая способность пектинов зависит от многих факторов: структуры и концентрации полисахаридных макромолекул, СМ и степени амидирования карбоксильных групп остатков GalA, концентрации ионов металлов, ионной силы растворов, pH, температуры и других условий [18–20].

Для получения прочных гидрогелей, которые могли бы служить в качестве носителей ферментных белков, обычно используют LM-пектины с СМ меньше 30%, а также модифицированные пектины [19], или же проводят деэтерификацию пектинов с образованием пектатов [32], либо активируют пектины с помощью бифункциональных агентов [55].

Иммобилизация белков на пектине осуществляется благодаря электростатическому взаимодействию отрицательно заряженных групп полисахарида с положительно заряженными аминоклассами белка. В силу амфотерных свойств белки в зависимости от pH могут являться как поликатионами, так и полианионами [23]. При нейтральных значениях pH пектин заряжен отрицательно, и хотя общий заряд белков в этих условиях также отрицателен, у них имеются положительно заряженные аминоклассы, которые и взаимодействуют с карбоксильными группами ПС. При снижении значения pH до pI белка и ниже образуется растворимый белок-полисахаридный комплекс. Однако дальнейшее уменьшение pH приводит к снижению общего отрицательного заряда комплекса и к образованию двухфазной системы, состоящей из нерастворимого компонента, в котором большая часть зарядов полиэлектролита компенсирована за счет взаимодействия с белком (белок-полиэлектролитный комплекс «стехиометрического» состава), и водной фазы, в которой растворен избыток ПС.

При значениях pH 3,5, что ниже  $pK_a$  пектина, происходит протонирование его карбоксильных групп и связывание не происходит [56].

В качестве энтрапирующего агента был опробован LM-пектин, выделенный из листьев *Aloe vera*. Конъюгат ЩФ–антитело был успешно иммобилизован в/на сферических частицах с диаметром около 1 мкм, полученных методом иотропного гелеобразования. ЩФ высвобождалась из пектиновых гидрогелей только в солевом растворе (0,15 М NaCl) или при pH 7,0–7,4, т.е. в условиях, близких к физиологическим условиям функционирования фермента [57].

Коммерческий препарат ЩФ из слизистой кишечника быка был иммобилизован методами адсорбции и включения в сферические гидрогели (диаметр частиц 2,3–3,2 мкм), приготовленные из яблочного и амидированного цитрусового LM-пектинов. Эффективность адсорбции фермента на гидрогелях из амидированного цитрусового пектина составляла 40,8%, а на активированных ГА гидрогелях – около 56% от исходной активности ЩФ. Эффективность адсорбции и включения фермента в сферические частицы, полученные из яблочного LM-пектина, была равна 20–23% от исходного уровня ЩФ [58].

Альгинаты образуют гели при низком значении pH за счет водородных связей, а также посредством ионных взаимодействий с поливалентными ионами металлов, которые действуют в качестве сшивающих агентов между соседними полимерными цепями. Гель на основе альгината образуется в мягких условиях при комнатной температуре без добавления органических растворителей [21].

ЩФ инкапсулировали в обычные липосомы (размером  $13,4 \pm 0,1$  мкм), полученные традиционным методом гидратации сухих пленок дипальмитоилфосфатидилхолина, и в липосомы, нагруженные альгинатом (размером  $30,8 \pm 3,1$  мкм). Внесение альгината, поперечно-сшитого ионами  $Ca^{2+}$ , в липосомную эмульсию способствовало формированию альгинатного гелевого ядра внутри везикул. Авторы пришли к выводу, что образование гелевого ядра в липосомах минимизирует диффузию фермента из частиц и позволяет обеспечить защиту белка при пероральном введении терапевтического агента. Действительно, анализ высвобождения инкапсулированного фермента в искусственной гастральной среде (pH 2,0; 2,5 ч) показал, что в стандартных липосомах, менее устойчивых к кислой среде, сохранялось до 55% от исходной активности, тогда как в липосомах с

альгинатным гелем внутри частиц – до 80%. Наличие альгинатного геля позволяет системе быть достаточно стабильной, доставлять фермент и освобождать его в нужном месте ЖКТ (альгинатный гель легко подвергается биodeградации в физиологических условиях) и, кроме того, обеспечивать его пролонгированное действие, что особенно важно для пероральных средств доставки лекарств в организм [59].

Известно, что ЩФ вовлечена в процесс образования костей, освобождая из фосфорсодержащих соединений неорганический фосфат, необходимый для минерализации костной ткани. В этой связи были разработаны кальций-альгинатные гелевые частицы сферической формы размером 420–480 мкм, в которые были введены фосфаты и субстрат фермента –  $\beta$ -ГФ. Для того, чтобы стимулировать процесс энзиматического образования гидроксиапатита в 3D-альгинатном матриксе, в данные композитные пористые шарики успешно инкапсулировали ЩФ слизистой кишечника теленка, которая гидролизовала субстрат  $\beta$ -ГФ. Образовавшийся  $P_i$  осаждался внутри частиц в виде нанокристаллов гидроксиапатита [60].

Коммерческий препарат ЩФ из слизистой кишечника коровы был инкапсулирован в гидрогелевые сферические микрочастицы (с размером 4 мкм и диаметром пор 50 нм), приготовленные из альгината и гидроксипропилцеллюлозы (4:1 по массе) в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  как кросс-сшивающего агента [61]. Эффективность иммобилизации была равна 19,1% от исходной активности ЩФ. Размер пор у полученных частиц оказался больше, чем размер молекул ЩФ, поэтому авторы не исключили возможность вымывания фермента из гелевого матрикса за счет его диффузии. Для того, чтобы избежать преждевременного высвобождения фермента из микросфер, в процесс иммобилизации были внесены дополнительные процедуры: покрытие гидрогелевых частиц ультратонким слоем хитозана и обработка их поперечно-сшивающим реагентом ГА. Покрытие хитозаном создавало дополнительный барьер для первоначальной «вспышки» высвобождения фермента, а кросс-сшивание ограничивало чрезмерное набухание гидрогелевых частиц и увеличение размера пор. Выход фермента в среду с  $\alpha$ -ГФ хотя и происходил, но был равномерным и длительным. В условиях *in vitro* при этом был индуцирован процесс минерализации, судя по локальному образованию в среде гидроксиапатита. Альгинатные микросферы с инкапсулированной

ЩФ, покрытые хитозаном, авторы исследования сочли наиболее эффективными для дальнейшего получения трехмерных структур и создания скаффолдов, востребованных при регенерации костной ткани.

Способность хитозана формировать прочные комплексы с белками, анионными ПС, а также хелатные комплексы с металлами позволяет применять его в качестве материала для изготовления различных медицинских препаратов и получения детоксицирующих сорбентов. Эта способность в значительной степени обусловлена наличием в молекуле хитозана большого количества свободных аминогрупп, что позволяет ему связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд. Благодаря катионной природе хитозан способен образовывать нерастворимые полиэлектролитные комплексы с анионными полимерами, что успешно используется в технологиях капсулирования. При ацилировании хитозана производными дикарбоновых кислот получают поперечно-сшитые гели, удобные для включения в них различных терапевтических агентов, в том числе ферментов. Белки могут быть ковалентно связаны на хитозане с использованием как amino-, так и гидроксильных групп носителя, способных к химической модификации с помощью бифункциональных сшивающих агентов [22].

Так, ЩФ из кишечника теленка была иммобилизована в гелях хитозана при использовании для его активации 25%-ного ГА в массовом соотношении фермент–хитозан–ГА = 1:1:8 или моноальдегида акролеина в соотношении фермент–хитозан–акролеин (1:1:1,6). Выход иммобилизации составлял 50% от активности свободного фермента. Иммобилизованная ЩФ была активной в более широкой области pH среды (5,5–12) и имела более высокую термостабильность по сравнению с нативным ферментом. Иммобилизованный препарат сохранял до 95% активности при четырехкратном ежедневном использовании в течение 5 дней [62]. Применение других моноальдегидов, таких как ацетальдегид и формальдегид, делала иммобилизацию фермента невозможной.

Для иммобилизации биомолекул и клеток привлекательны так называемые «омагниченные» носители, которые в магнитном поле способны доставлять к мишени прикрепленные вещества. Так, ЩФ из *E. coli* и ЩФ из кишечника цыпленка были иммобилизованы прямой адсорбцией и ковалентным связыванием на хитиновых и хитоза-

новых подложках, а также на модифицированных «омагниченных» хитозанах (магнитные свойства носителя обеспечивались наличием ферромагнетита, полученного из оксидов Fe(II) и Fe(III)) [63]. Наилучшие результаты были получены авторами для кишечной ЩФ, адсорбированной на «омагниченных» хитозанах: эффективность иммобилизации достигала 98%. Уровень активности для ковалентно связанного фермента доходил до 85% от исходного. Эффективность иммобилизации бактериальной ЩФ с использованием аналогичных методов оказалась ниже, чем кишечного фермента. Ковалентно связанные ферменты были более стабильными, чем адсорбированные, при этом кишечный фермент оказался более устойчивым, чем бактериальный. Активность иммобилизованных ферментов сохранялась в течение длительного времени при 4°C и многократном использовании препаратов.

Кросс-сшитые и активированные ГА пористые микрочастицы (от 200 до 800 мкм), приготовленные из хитозанов различной ММ и степени деацетилирования, были использованы для иммобилизации бактериальной ЩФ (коммерческий препарат из *E. coli*). Методом механического захвата и с помощью ковалентного связывания удалось достаточно успешно иммобилизовать ЩФ на микрочастицах с ММ 70 кДа и 2000 кДа: выход иммобилизации составил 38,0–39,4% от активности нативного фермента. Оптимальными матриксами для ЩФ авторы сочли кросс-сшитые и активированные ГА (2,65 весовых частей ГА на 1 часть хитозана) микрочастицы с ММ 750 кДа, обеспечивавшие выход иммобилизации, равный 49,5% от исходной активности препарата [64].

ЩФ из слизистой кишечника свиньи иммобилизовали в полиионных капсулах, приготовленные из биосовместимых материалов – хитозана различной ММ (поликатион) и бактериального ПС геллана (полианион) [65]. Исследователи варьировали количественное соотношение этих ПС и порядок внесения фермента в гелеобразующий раствор, в котором должны были формироваться капсулы. При определенных условиях были образованы сферические капсулы диаметром 3–5 мм с инкапсулированной в них ЩФ. Авторы подчеркивают, что возвращение активного фермента в раствор зависело как от порядка внесения ЩФ, так и от ММ хитозана: при использовании капсул хитозана с ММ 210 кДа фосфатазная активность иммобилизованного фермента была равна  $53,8 \pm 6,2\%$  от исходной; для хитозана

с ММ 1310 кДа –  $49,4 \pm 10,1\%$ , для хитозана с ММ 1580 кДа –  $34,2 \pm 7,1\%$ , тогда как для хитозана ММ 1800 кДа –  $35,1 \pm 6,5\%$  активности от начального уровня. Более низкий уровень активности иммобилизованной ЩФ наблюдали при внесении фермента в раствор хитозана в гелеобразующую среду с гелланом. Авторы объясняли это тем, что растворы хитозанов имели рН около 2,5–3,0, что негативно влияло на активность фермента; внесение же ЩФ в раствор геллана в среду с хитозаном было более успешным, так как растворы геллана имели рН 6,8, более благоприятный для кислотолабильного фермента. Проверка проницаемости капсул показала, что высвобождение из них стандартных белков наблюдалось, если их ММ белков не превышала 30 кДа, тогда как ММ ЩФ составляет около 140 кДа. Активность инкапсулированной ЩФ (субстрат 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат) сохранялась на уровне 35–54% от исходной в течение более 1 мес при 4°C, а в высушенных капсулах после их гидратации наблюдали до 80% от исходной фосфатазной активности. Авторы полагают, что такие не требующие химических модификаций капсулы, защищающие пептидную субстанцию от действия протеаз, безопасны в качестве носителей и могут применяться путем непосредственного введения в организм.

Рекомбинантную ЩФ из *E. coli* иммобилизовали на комбинированных наночастицах, приготовленных из хитозана и сополимера молочной и гликолевой кислот. Успешное закрепление фермента на наночастицах с помощью кросс-сшивающего агента (4%-ного ГА) в течение 2 ч с общей продолжительностью всего процесса иммобилизации 9 ч позволило получить иммобилизованный препарат ЩФ, сохраняющий 76,2% активности от исходного уровня с улучшенными термо- и рН-стабильностью [66].

Хитозановые наночастицы размером около 100 нм, полученные путем иотропного гелеобразования с использованием триполифосфата натрия, также активировали различными концентрациями ЭДАК. В результате, используя 25 мкг/мл данного реагента, удалось ковалентно связать до 76,23% ферментного белка и повысить эффективность иммобилизации до 54,6% от исходного уровня активности ЩФ [67].

Примечательно, что такие структурные белки, как фиброин, фибрин, коллаген, кератин, используемые в качестве носителей ферментов, обладают не только способностью к биодеградации, но и очень важным положительным свойством –

отсутствием иммуногенности. Кроме того, иммобилизацию ферментов на таких носителях можно проводить как в присутствии сшивающих агентов, так и без них.

Коммерческий препарат ЩФ из кишечника теленка был иммобилизован на фиброине (шелковых волокнах *Bombux mori*). Для того, чтобы сформировались ковалентные связи между ферментом и носителем, волокна шелка предварительно химически модифицировали с помощью диазобромида (диазотирование) или бромциана; в последнем случае нитрогруппы в фиброине преобразовывались в аминогруппы для получения аминированных волокон. Фиброин состоит из остатков различных аминокислот и поэтому на носителе имеется много реакционноспособных участков (амино-, карбоксильных, фенольных и имидазольных групп). Авторы определили оптимальные условия для ковалентного связывания фермента с химически модифицированным носителем: длительность процесса 1 ч, нагрузка ферментом 1–2 мг/мл, рН 7,0–7,5. Выход иммобилизованной ЩФ при диазотировании был равен 17,6%, при использовании бромциана – 17,2% от исходной активности. В результате иммобилизации наблюдался сдвиг рН-оптимума активности фермента в кислую сторону и увеличение термостабильности ЩФ (выше 50°C). Кроме того, активность иммобилизованного фермента сохранялась на указанном уровне в течение 45–60 дней при 4°C [68].

Была осуществлена попытка иммобилизовать коммерческую ЩФ на активированных гелевых частицах диаметром от 25 до 150 мкм, покрытых гепарином (affi-gel heparin beads, BioRad) [69]. Сферические частицы были модифицированы с помощью техники наложения слоя за слоем (LbL-метод) полиэлектролитов – поли-L-лизина и поли-L-глутаминовой кислоты, а фермент был адсорбирован как на поверхности, так и внутри полиэлектролитных слоев. В капсуле под пятью слоями полиэлектролитов ЩФ сохраняла 30% первоначальной активности в течение 3 мес при 4°C, тогда как 80% активности фермента, иммобилизованного на внешней поверхности полиэлектролитных слоев, десорбировалось в течение нескольких дней. Стабильные капсулы с иммобилизованной ЩФ, по мнению авторов, можно было бы использовать в клеточной биологии для стимуляции и контроля циклов клеточных культур.

В качестве носителя кишечной ЩФ опробован фибрин, предварительно активированный с помощью ЭДАК и N-гидроксисукцинимидом

и закрепленный на полиметилметакрилатных сферах (200–250 мкм), полученных с помощью матричной технологии (sphere-template technology). Конструкции в виде ковалентно иммобилизованного фермента на пористом (размер пор от 40 до 80 нм) нановолокнистом биоматериале тестировали на роль скаффолдов в условиях *in vitro* в средах для минерализации костной ткани с  $\alpha$ -ГФ и культурой первичных костных клеток, а также в условиях *in vivo* – на лабораторных мышцах с моделированным костным дефектом, для коррекции которого использовали полученные скаффолды (диаметром 5 мм и толщиной 0,5 мм). Иммобилизованная на фибриновых нановолокнах ЩФ сохраняла 50% от первоначальной активности в течение 7 дней и до 30% активности в течение 35 дней после инкубации в средах минерализации. Показано, что эти биодеградируемые матриксы с иммобилизованной ЩФ поддерживают пролиферацию остеобластоподобных клеток и их дифференциацию *in vitro*, а также регенерацию дефектной кости у мышей, повышая локальную концентрацию  $P_i$ . Наблюдаемое после 35 сут снижение активности иммобилизованной ЩФ объясняется рядом причин: длительностью инкубационного эксперимента, отложением в матриксах минерала, блокирующего доступ субстрата к активному центру фермента, и изменением конформации молекул из-за ковалентного связывания фермента с матриксом [70].

Аналогичный метод кросс-сшивки был применен для иммобилизации коммерческого препарата кишечной ЩФ на предварительно активированных бифункциональными реагентами матриксах из коллагена (тип I). Молекула коллагена имеет карбоксильные (у Glu) и аминные (у Lys и Arg) функциональные группы, которые могут участвовать в реакции связывания белка. Ковалентно связанный с биосовместимым матриксом фермент обладал более высокой термостабильностью, чем исходный. После девяти циклов использования он сохранял до 50% активности от начального уровня и около 40% – после хранения иммобилизованной ЩФ в течение месяца при комнатной температуре [26].

Таким образом, иммобилизация ЩФ может осуществляться с использованием различных материалов, методов и приемов, которые обеспечивают эффективность данного процесса и получение технологически удобных и стабильных форм для применения в биомедицине.

## ПЕРСПЕКТИВЫ БИМЕДИЦИНСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Стратегии иммобилизации ЩФ на нетоксичных биосовместимых и биодеградируемых материалах постоянно совершенствуются, расширяя с каждым годом возможности биомедицинского использования фермента.

Традиционно функцию ЩФ *in vivo* связывают со стимулированием минерализации костной ткани. Механизм этого процесса включает энзиматическое отщепление с помощью ЩФ фосфатных групп от органических источников фосфата, а также разрушение ингибиторов минерализации, например,  $PP_i$ . В результате реакций, катализируемых ЩФ, происходит увеличение локальной концентрации  $P_i$  и индуцируется образование и осаждение кальций-фосфатных нанокристаллов [71].

Процесс инициации костеобразования имеет особое значение при гипофосфатазии, обусловленной генетическим дефицитом костно-печечно-почечного изозима ЩФ. При данном состоянии выявлены нарушения обмена фосфоэтанолamina, пиридоксаль-5-фосфата и  $PP_i$ . Ожидают, что применение иммобилизованного фермента для заместительной терапии в сочетании с другими иммобилизованными остеогенными и остеоиндуктивными факторами будет способствовать торможению процесса остеопороза при дефиците ЩФ [10, 72, 73].

В связи с повышением продолжительности жизни современного человека возникает необходимость создания разного рода биосовместимых имплантов на основе скаффолдов. Эти тканеинженерные конструкции должны обладать способностью к оптимальной интеграции в соответствующие ткани, вызывая при этом минимальные побочные реакции [44]. Отмечается высокая эффективность различных типов композитных скаффолдов на основе биоматериалов искусственного и естественного происхождения (ортофосфатов кальция, фибрина, коллагена, пористых полисахаридных гидрогелей – хитозана, альгината и фукоидана), имитирующих внеклеточный матрикс кости. Такие скаффолды, в том числе и подвергающиеся биорезорбции, с иммобилизованными клеточным материалом и остеогенными белками (ЩФ, факторы роста, остеокальцин и др.), которые стимулируют процессы остеогенеза, интенсивно

исследуются с целью возможного их использования для устранения костных дефектов различной природы [60, 61, 70, 74, 75].

Так, в экспериментах *in vitro* было показано, что индуцированное ЩФ отложение минералов на границе раздела между гелем коллагена и поверхностью полиэфирных пластмасс может предотвратить отделение коллагеновых матриц от твердой поверхности. На границе между коллагеновым гелем и покрытой ферментом поверхностью подложек (в комбинации с фосфатом кальция и при доступности субстрата  $\beta$ -ГФ) индуцируется осаждение гидроксиапатита – основной минеральной составляющей костной ткани. Кроме того, коллагеновые волокна и фибробласты, введенные в коллагеновые гели, во время этого процесса инкорпорируются в минерализованные слои. Фиксацию коллагеновых гелей на твердой поверхности можно использовать для реконструкции сухожилий и связочных тканей и прикрепления коллагеновых связок к имплантатам [74].

Участие ЩФ, иммобилизованной на двухслойных резорбируемых мембранах Bio-Gide® и пористых гранулах остеоматрикса Bio-Oss® (коллагеновых гелях, предназначенных для направленной костной регенерации) в процессах восстановления костной ткани и минерализации тканей зуба было изучено в условиях *in vivo* на экспериментальных животных. Показано, что фермент, иммобилизованный на обоих носителях (особенно на Bio-Gide®) успешно справляется с ролью инициатора кальцификации. Применение в стоматологии таких костнозамещающих материалов с иммобилизованной ЩФ, как полагают, может повысить лечебный эффект при устранении периодонтальных дефектов [76]. Более раннее исследование иммобилизованной на синтетическом гидроксиапатите ЩФ слюны также продемонстрировало активное участие фермента в реминерализации ткани зуба. Иммобилизованная ЩФ в составе фосфатно-кальциевых композиций в гелях и пастах способна предотвращать возникновение кариеса и оказывать терапевтический эффект при заболевании [77].

Нанесение слоя карбоксиметилхитозана с иммобилизованной ЩФ на титановые пластины, покрытые полидопамином, приводило к снижению бактериальной адгезии на поверхности титана, а также к интенсификации клеточной пролиферации, причем эффект зависел от плотности поверхностного слоя иммобилизованного фермента [78].

Другими авторами [79] был исследован процесс биоминерализации костной ткани с использованием титановых дисков, на которые методом электроспрея наносили слой коллагена и слой ЩФ (по отдельности или их смесь). Иммобилизованный на поверхности дисков коллаген в смеси с ЩФ (субстрат –  $\beta$ -ГФ) формировал нановолокнистый матрикс (сходный с экстрацеллюлярным матриксом), в котором наблюдали накопление нанокристаллов фосфатов кальция, связанных с филаментами коллагена. Кроме того, был отмечен синергический эффект при использовании смеси указанных компонентов, т.е. в этом случае процесс минерализации был более эффективным, чем при покрытии дисков компонентами, взятыми по отдельности.

Распадающиеся при деградации на натуральные аминокислоты биосовместимые коллагеновые полимеры находят широкое применение в тканевой инженерии не только в виде гидрогелевых каркасов и в качестве заместительных материалов при повреждении мягких тканей, но также в форме нитей (шовного материала при операциях) и антимикробных пленок – покрытий для раневых и ожоговых поверхностей. Использование ферментных препаратов, иммобилизованных на природных полимерах, в терапии раневых поверхностей способствует снижению осложнений, связанных с воспалительной тканевой реакцией при применении лекарственных средств, иммобилизованных на синтетических полимерах. Рассматривается возможность использования ЩФ для ускорения заживления ран при оперативном вмешательстве. Разрабатываются конъюгаты коллагеновых полимеров с ЩФ для усиления в этих случаях противовоспалительных свойств лечебных препаратов. Так, коллагеновый гель в виде пористой мембраны с иммобилизованной ЩФ предлагают для покрытия ран и ожоговых поверхностей, а также используют для других целей в регенерационной медицине [80].

В настоящее время огромное внимание уделяется разработке эффективных систем направленной доставки лекарственных веществ в органы и ткани-мишени, где, освобождаясь от носителей, лечебные препараты оказывали бы необходимое локальное действие. Терапевтические пептиды, в том числе ферментные препараты и гормоны, проходя через пищеварительный тракт, неминуемо подвергаются разрушающему действию агрессивного желудочного сока и протеолитических ферментов. В этой связи разрабатываются различные приемы по защите пероральных белковых

препаратов при транзите в ЖКТ с проверкой их функциональности *in vitro* в биорелевантных средах и *in vivo* на лабораторных животных.

Важными моментами при этом являются определение оптимальной нагрузки носителей фармакологически активным белком (ферментом), минимизация его потерь при транспортировке, а также эффективность доставки и высвобождения, оцененная в течение определенного времени, приближенного к продолжительности транзита нутриентов (в т.ч. исследуемой субстанции) в отделах ЖКТ.

Определяющими факторами контролируемого высвобождения пероральных лечебных белков в пищеварительном тракте, например из полисахаридных матриц, являются гидрофильность таких носителей (способность набухать, увеличивая размер пор), их биodeградируемость (способность к деструкции под воздействием ферментов кишечной микрофлоры), а также внешние факторы – изменение температуры и pH внутренней среды ЖКТ [16, 18, 24]. В этой связи гель-матрицы на основе природных материалов (пектин, хитозан, альгинат, коллаген, фибрин, декстран и др.), можно рассматривать в качестве идеальных кандидатов на роль носителей различных лечебных субстанций, в том числе противовоспалительных агентов.

Эндогенная ЩФ является одной из молекулярных структур, участвующих в защите макроорганизма от бактериальных инфекций [81]. Защитная функция ЩФ в организме осуществляется как за счет активации синтеза фермента в большинстве пораженных воспалительным процессом органов, так и за счет способности фермента дефосфорилировать бактериальный эндотоксин – липополисахарид, источником которого являются грамотрицательные бактерии. Детоксикация ЛПС происходит посредством реакции дефосфорилирования липида А в составе бактериального токсина (компонента клеточных стенок грамотрицательных бактерий), который, как показано, является одним из нативных субстратов ЩФ [82, 83]. В результате гидролиза данного субстрата образуется дефосфорилированный (монофосфорилированный) ЛПС, который в отличие от нативного является менее токсичным и пирогенным или же вообще нетоксичным [82, 84, 85]. Фермент, функционируя в качестве противовоспалительного фактора, не только ослабляет патологический процесс, индуцированный ЛПС, но и поддерживает благоприятные условия для жизнедеятельности нормальной кишечной микрофлоры [81, 86, 87].

Кишечная ЩФ обладает и локальным, и системным действием: она дефосфорилирует ЛПС в кишечнике и, кроме того, ослабляет ЛПС-индуцированные эффекты в других органах. Эта антиэндотоксиновая защита может осуществляться как самим кишечным ферментом, так и другими изозимами ЩФ [86].

В последнее время идея возможного использования фермента в качестве терапевтического средства при бактериальных инфекциях привлекает внимание исследователей. Предпринимаются попытки наряду с различными антибактериальными средствами использовать ЩФ в качестве противовоспалительного препарата [85, 88–90]. Введение в организм экзогенной ЩФ перорально, в кровоток или другими способами может обеспечить увеличение данной ферментативной активности и, следовательно, более эффективную детоксикацию бактериального ЛПС посредством его энзиматического дефосфорилирования как при локальном воспалении, так и при сепсисе. Доставка ЩФ в очаг воспаления может, таким образом, оказаться перспективной стратегией ограничения бактериальных инфекций [85, 91, 92].

На модели индуцированного колита у мышей было показано, что при пероральном введении животным «незащищенного» от среды ЖКТ препарата кишечной ЩФ быка только 10% дозы достигало толстого кишечника в энзиматически активной форме. И все-таки фермент, со значительными потерями достигший толстого кишечника, ослаблял воспалительный процесс, судя по снижению продукции провоспалительных цитокинов [93]. В то же время, экспериментально подтверждено, что ЩФ, иммобилизованная в обычных липосомах и липосомах с альгинатным ядром, в значительной степени сохраняла на довольно высоком уровне активность в растворе, имитирующем гастральную среду [59].

Как было сказано выше, повышенный локальный уровень ЩФ важен не только для детоксикации люминального эндотоксина, но и для предотвращения проникновения его в общую циркуляцию [94–96]. Устойчивый к протеолитической деградации и доставленный к биомишени иммобилизованный фермент в таких случаях может обладать пролонгированным эндотоксин-нейтрализующим действием и способствовать предотвращению септических осложнений [58].

При воспалительном процессе в толстом кишечнике (язвенный колит, болезнь Крона и др.) энзиматическая деструкция некрахмальных полисахаридных матриц или полисахаридных

покрытий лечебного препарата под действием гидролитических ферментов кишечной микрофлоры приобретает особое значение [17, 18, 34, 97]. В результате ферментации ПС происходит медленное высвобождение иммобилизованной лечебной субстанции и осуществляется ее пролонгированное действие на пораженный кишечный эпителий. Образовавшиеся в результате энзиматического гидролиза некрахмальных ПС короткоцепочечные жирные кислоты способны, в свою очередь, улучшать состояние слизистой толстого кишечника, оказывать противовоспалительное действие [98] и эффективно ингибировать пролиферацию раковых клеток толстой кишки, снижая тяжесть проявлений заболевания и вызывая приостановку патологического процесса в ранней фазе [99, 100].

Для пролонгированной энзимотерапии воспалительного процесса в кишечнике особенно удобны микрокапсулированные препараты, оболочки которых нерастворимы в желудочной среде. Полисахаридные носители лечебных препаратов в виде мультчастиц имеют медленный желудочно-кишечный транзит, и лечебная субстанция более длительно контактирует с очагом воспаления, чем, например, при введении препарата в форме единичной дозы [24].

Пектиновые вещества, альгинаты и хитозаны сами по себе обладают широким спектром физиологической активности: выводят из организма токсины, осуществляют противовоспалительное действие, обеспечивают защиту слизистой оболочки ЖКТ, снижают уровень холестерина, нормализуют обмен глюкозы, оказывают иммуностимулирующее и противоопухолевое действие и др. [17, 24]. Выступая одновременно и в роли носителя лечебного агента, и в качестве дополнительного терапевтического средства полисахаридные материалы фактически обладают двойным эффектом и заслуживают пристального внимания при получении иммобилизованных ферментных препаратов [16, 101].

Привлекательна идея использования ЩФ, иммобилизованной в многослойных полиэлектролитных капсулах, для целенаправленной доставки и активации пролекарств с их последующим энзиматическим гидролизом и превращением в эффективные терапевтические средства, например, путем конверсии нетоксичного препарата доксорубицинофосфата (предшественника противоракового средства) в противораковый доксорубицин. Кроме того, с помощью ЩФ, иммобилизованной в полиэлектролитных оболочках капсул,

возможна визуализация опухолей в результате накопления внутри капсул флуоресцеина – продукта гидролиза нефлуоресцирующего субстрата флуоресцеиндифосфата [102]. Целенаправленная доставка капсул в клетки опухоли возможна с помощью, например, белков-коннекторов, вирусных векторов или конъюгатов ЩФ–антитело.

Иммобилизованная ЩФ находит применение в процедурах молекулярного клонирования для дефосфорилирования РНК и ДНК (отщепления 5'-фосфатов от фрагментов ДНК с целью предотвратить сшивание концов одной молекулы) [52], а также в иммунохимических исследованиях, например, для обнаружения гибридизации ДНК с использованием электродов, модифицированных углеродными нанотрубками [103].

В настоящее время наблюдается повышенный спрос на различного рода биосенсоры, широко используемые в аналитических целях. Создаются ферментные электроды для диагностических целей клинической биохимии, иммуоферментного анализа [104], а также мониторинга вредных для здоровья человека веществ [105]. Ферментные электроды с иммобилизованными конъюгатами антител и антигенов, меченных ЩФ (с применением флуоресцентных субстратов для лучшей детекции сигнала), предлагаются для использования в качестве тест-систем при диагностике как отдельных инфекционных агентов, например вируса гепатита В [106], так и специфических онкобелков репродуктивных органов, например белка Vcl-2 при раке яичников [107] и других онкомаркеров. Разработан биосенсор с иммобилизованным на поверхности магнитных микрочастиц конъюгатом ЩФ–стрептавидин для обнаружения онкогена BRCA1, связанного с раком груди [108].

На основе ЩФ, иммобилизованной на поверхности полистирол/акрилового матрикса, покрытого наночастицами золота, разработан биосенсор для определения биомаркера патологических процессов – фактора некроза опухоли. Матричная композитная пленка с конъюгатом, содержащим фермент, была нанесена на поверхность стеклянного угольного электрода. Сконструированный иммуносенсор имеет высокую чувствительность – до 0,01 нг/мл цитокина [109].

С помощью электрохимических биосенсоров, в конструкции которых использована иммобилизованная на различных материалах ЩФ, предлагается определять ионы металлов ( $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Va^{2+}$ ) [110–113], а также пестициды, микотоксины и другие ксенобиотики и поллютанты, опасные для здоровья человека [36, 114–116].

Таким образом, перспективы биомедицинского применения иммобилизованной ЩФ связаны с тканевой инженерией, созданием новых безопасных терапевтических средств с целенаправленной доставкой и пролонгированным действием, компенсацией ферментативной недостаточности, процессами детоксикации организма и другими прикладными областями.

Иммобилизованная ЩФ совместно с биологически активными молекулами (остеогенные белки, факторы роста) и остеобластными клетками представляет интерес для создания эффективных остеопластических материалов для заместительной и реминерализующей терапии, а также биологических имплантов, востребованных в регенерационной медицине.

Многообещающие результаты получены при использовании биохимических препаратов ЩФ в качестве эндотоксин-нейтрализующих средств на экспериментальных моделях повреждений, вызванных действием ЛПС, а также в клинических испытаниях при инфекциях и септических осложнениях, вызываемых эндотоксинами грамотрицательных бактерий [88, 93, 95, 117]. Лекарственные средства в виде иммобилизованных ферментов характеризуются большей стабильностью, пониженными иммуногенностью и аллергенностью по сравнению с «незащищенными» белковыми пероральными лечебными препаратами. Применение иммобилизованных форм позволяет снизить курсовую дозу лекарственных средств и уменьшить частоту проявления побочных реакций, а также обеспечить адресную доставку лечебных препаратов в определенный участок организма, пролонгируя их терапевтическое действие в очаге поражения [16, 17].

Иммобилизация ЩФ на соответствующих материалах открывает путь к созданию медицинских диагностикумов, высокочувствительных аналитических систем и селективных биосенсоров.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Stec B., Holtz K.M., Kantrowitz E.R. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *J. Mol. Biol.*, 2000, 299(5), 1303–1311. doi: 10.1006/jmbi.2000.3799
2. Le Du M.H., Stigbrand T., Taussig M.J., et al. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1,8 Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(12), 9158–9165. doi: 10.1074/jbc.M009250200
3. Harada T., Koyama I., Matsunaga T., et al. Characterization of structural and catalytic differences in rat intestinal alkaline phosphatase isozymes. *FEBS J.*, 2005, 272(10), 2477–2486. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04668.x
4. Millán J.L. Mammalian alkaline phosphatases: from biology to applications in medicine and biotechnology. Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. RGA, 2006, 3–322. doi: 10.1002/3527608060
5. McComb R.B., Bowers G.N., Posen S. Alkaline Phosphatase. New York/London, Plenum Press, 1979, 1–986. ISBN 0-306-40214-9
6. Millan, J.L. Alkaline phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal.*, 2006, 2(2), 335–341. doi:10.1007/s11302-005-5435-6
7. Griffin C.A., Smith V., Henthorn P.S., et al. Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37. *Am. J. Hum. Genet.*, 1987, 41(6), 1025–1034. <http://escholarship.org/uc/item/01s9d9tg>
8. Smith M., Weiss M.J., Griffin C.A., et al. Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1-p34. *Genomics*, 1988, 2(2), 139–143. doi: 10.1016/0888-7543(88)90095-X
9. Fishman W.H. Alkaline phosphatase isozymes: recent progress. *Clin. Biochem.*, 1990, 23(2), 99–104. doi: 10.1016/0009-9120(90)80019-F
10. Millan J.L., Whyte M.P. Alkaline phosphatase and hypophosphatasia. *Calcif. Tissue. Int.*, 2016, 98(4), 398–416. doi: 10.1007/S00223-015-0079-1
11. Buchet R., Millan J.L., Magne D. Multisystematic functions of alkaline phosphatases. *Meth. Mol. Biol.*, 2013, 1053, 27–51. doi: 10.1007/978-1-62703-562-0\_3
12. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы. Москва, Россия, Издательство Моск. ун-та. 1976, 1, 4–296
13. Bosio V.E., Islan G.A., Martinez Y.N. et al. Nanodevices for the immobilization of therapeutic enzymes. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2016, 36(3), 447–464. doi: 10.3109/07388551.2014.990414
14. Costa, S.A., Azevedo, H.S., and Reis, R.L. Enzyme immobilization in biodegradable polymers for biomedical applications. In: Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine [Eds. R.L. Reis, E. San Roman]. Boca Raton, USA: CRS Press, 2004, 301–324. doi: 10.1201/9780203491232.Ch17
15. Полимеры в биологии и медицине. Москва, Россия, Научный мир, 2011, 13–255.
16. Liu L., Fishman M.L., Kost J., and Hicks K.B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials.*, 2003, 24(19), 3333–3343. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00213-8
17. Thakur, B.R., Singh R.K., Handa A.K., Rao M.A. Chemistry and uses of pectin – a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1997, 37(1), 47–73. doi: 10.1080/10408399709527767

18. Sriamornsak P., Nunthanid J. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery. I. Preparation and *in vitro* release studies. *Int. J. Pharm.*, 1998, 160(2), 207–212. doi: 10.1016/S0378-5173(97)00310-4
19. Capel F., Nicolai T., Durand D., et al. Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. *Food Hydrocoll.*, 2006, 20, 901–907. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.09.004
20. Morris G.A., K ok S.M., Harding S.E., Adams G.G. Polysaccharide drug delivery system based on pectin and chitosan. *Biotechnol. Cent. Eng. Rev.*, 2010, 27(1), 257–284. doi: 10.1080/02648725.2010.10648153
21. Rinaudo M. Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quim. Biol.*, 2014, 17(1), 92–96. doi: 10.1016/S1405-888X(14)70322-5
22. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, 35(2–3), 126–139. doi: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013
23. Shukla S., Jain D., Verma K., Verma S. Pectin-based colon drug delivery. *Chron. Young Scientists.*, 2011, 2(2), 83–89. doi: 10.4103/2229-5186.82978
24. Sriamornsak P. Application of pectin in oral drug delivery. *Expert. Opin. Drug Rev.*, 2011, 8(8), 1009–1023. doi 10.1517/17425247.2011.584867
25. Osathanon T., Giachelli C.M., Somerman M.J. Immobilization of alkaline phosphatase on microporous nanofibrous fibrin scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2009, 30(27), 4513–4521. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.022
26. Hanachi P., Jafary F., Jafary F., Motamedi S. Immobilization of the alkaline phosphatase on collagen surface via cross-linking method. *Iran J. Biotechnol.*, 2015, 13(3), 32–38. doi: 10.15171/ijb.1203
27. Mozafari M.R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2005, 10(4), 711–719. <http://www.cmbi.org.pl>
28. Tirado P., Reisch A., Roger E., et al. Catalytic saloplastics: alkaline phosphatase immobilized and stabilized in compacted polyelectrolyte complexes. *Adv. Funct. Mater.*, 2013, 23(38), 4785–4792. doi: 10.1002/adfm.201300117
29. Tran D.N., Balkus K.J. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *ACS Catal.*, 2011, 1(8), 956–968. doi: 10.1021/cs200124a
30. Маслова Н.Е., Крылова Т.С., Гараева М.Я., Мамичев В.А. Методы функционализации поверхности сенсоров биологическими молекулами. *Молек. медицина*. 2013, (5), 8–15.
31. Cabrera J.C., Cambier P., van Cutsem P. Drug encapsulation in pectin hydrogel beads – a systematic study of simulated digestion media. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2011, 3(Suppl. 5), 292–299. [http:// www.ijppsjournal.com/vol-3Suppl5/2795.pdf](http://www.ijppsjournal.com/vol-3Suppl5/2795.pdf)
32. Gemeiner P, Kurilova L., Malovikova A., et al. Properties of spherical calcium pectate and alginate gels and their use in diffusion chromatography, solids separations and immobilization of enzymes and cells. *Folia Microbiologica*, 1989, 34(3), 214–227. doi: 10.1007/BF02821295
33. Gomez A.T., Retama B.J.R., Ruiz B.L., et al. Encapsulation of alkaline phosphatase in polyacrylamide microparticles using the concentrated emulsion polymerization. *Progr. Colloid. Polym. Sci.* 2004, 123, 169–173. doi: 10.1007/b11755
34. Sharma A., Amit J.K. Colon targeted drug delivery using different approaches. *Int. J. Pharm. Studies and Res.* 2010, 1(1), 60–66.
35. Koga J., Yamaguchi K., Gondo S. Immobilization of alkaline phosphatase on activated alumina particles. *Biotechnol. Bioeng.*, 1984, 26(1), 100–103. doi: 10.1002/bit.260260118
36. Sanchez F.G., Diaz A.N., Peinado R.M.C., Belledone C. Free and sol-gel immobilized alkaline phosphatase-based biosensor for the determination of pesticides and inorganic compounds. *Anal. Chim. Acta.*, 2003, 484(1), 45–51. doi: 10.1016/S0003-2670(03)00310-6
37. Береза-Киндзерская Л.В., Кондакова Л.В., Янишпольский В.В., Тертых В.А. Модифицированные кремнеземные носители для иммобилизации щелочной фосфатазы. *Хим. физ. технол. поверхности*, 2007, (13), 99–104.
38. Sharmin F., Rakshit S.K., Jayasuriya H.P.W. Enzyme immobilization on glass surfaces for the development of phosphate detection biosensors. *Agr. Eng.*, 2007, 9, 6–19.
39. Ehlert N., Muller P.P., Stieve M., Behrens P. Immobilization of alkaline phosphatase on modified silica coating. *Microporous Mesoporous Mater.*, 2010, 131(1–3), 51–57. doi: 10.1016/j.micromeso.2009.11.040
40. Jiang P.J., Wynn-Jones G., Grover L.M. A calcium phosphate cryogel for alkaline phosphatase encapsulation. *J. Mater. Sci.*, 2010, 45(19), 5257–5263. doi: 10.1007/s10853-010-4568-3
41. Wojcik R., Vannatta M., Dovichi N.J. Automated enzyme-based diagonal capillary electrophoresis: application to phosphopeptide characterization. *Anal. Chem.*, 2010, 82(4), 1564–1567. doi:10.1021/ac100029u
42. Moriyama K., Sung K., Goto M., Kamiya N. Immobilization of alkaline phosphatase on magnetic particles by site-specific and covalent cross-linking catalyzed by microbial transglutaminase. *J. Biosci. Bioeng.*, 2011, 111(6), 650–653. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.02.002
43. Wang S., Su P., Huang J., et al. Magnetic nanoparticles coated with immobilized alkaline phosphatase for enzymolysis and enzyme inhibition assays. *J. Mater. Chem., B*. 2013, 1(12), 1749–1754. doi: 10.1039/C3TB00562C
44. Nijhuis A.W.G., van den Beucken J.J.J.P., Boerman O.C., et al. 1-step versus 2-step immobilization of alkaline phosphatase and bone morphogenetic protein-2 onto

- implant surfaces using polydopamine. *Tissue Eng. Part C: Methods.*, 2013, 19(8), 610–619. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0313
45. Chen G., van der Does L., Bantjes A. Investigations on vinylene carbonate. V. Immobilization of alkaline phosphatase onto LDPE films cografted with vinylene carbonate and N-vinyl-N-methylacetamide. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1993, 47(1), 25–36. doi: 10.1002/app.1993.070470105
  46. Chen G., van der Does L., Bantjes A. Investigation on vinylene carbonate. VI. Immobilization of alkaline phosphatase onto poly(vinylene carbonate)–Jeffamine® hydrogel beads. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1993, 48(7), 1189–1198. doi: 10.1002/app.1993.070480707
  47. Duan C., Meyerhoff M.E. Immobilization of proteins on gold coated porous membranes via an activated self-assembled monolayer of thioctic acid. *Mikrochim. Acta.*, 1995, 117(3), 195–206. doi: 10.1007/bf01244890
  48. Mark S.S., Stolper S.I., Baratti C., et al. Bioconjugation of alkaline phosphatase to mechanically processed, aqueous suspendible electrospun polymer nanofibers for use in chemiluminescent detection assays. *Macromol. Biosci.*, 2008, 8(6), 484–498. doi: 10.1002/mabi.200800016
  49. Filmon R., Basle M.F., Barbier A., Chappard D. Poly (2-hydroxy ethyl methacrylate)-alkaline phosphatase: A composite biomaterial allowing *in vitro* studies of bisphosphonates on the mineralization process. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 2000, 11(8), 849–868. doi: 10.1163/156856200744057
  50. Babich L., Peralta J.L.V.M., Hartog A.F., Wever R. Phosphorylation by alkaline phosphatase: immobilization and synthetic potential. *Int. J. Chem.*, 2013, 5(3), 87–89. doi: 10.5539/ijc.v5n3p87
  51. Basheeruddin K., Rothman V., Margolis S. Immobilized *E. coli* alkaline phosphatase. Its properties, stability and utility in studying the dephosphorylation of proteins. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1985, 11(2), 133–140.
  52. Zubriene A., Budriene S., Lubiene J., Dienys G. Immobilized alkaline phosphatase for molecular cloning. *Biocatal. Biotransform.*, 2002, 20(6), 423–427. doi: 10.1080/1024242021000040873
  53. Shan Y., McKelvie I.D., Hart B.T. Characterization of immobilized *Escherichia coli* alkaline phosphatase reactors in flow injection analysis. *Anal. Chem.* 1993, 65(21), 3053–3060. doi: 10.1021/ac00069a018
  54. Сейткалиева А.В., Мензорова Н.И. Разработка иммобилизованного реагента на основе щелочной фосфатазы из яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии. Мат-лы X Региональной конф. студ., асп. вузов и науч. орг. Дальнего Востока России. Владивосток: Изд-во Дальневосточного ун-та. 2011, 245–249.
  55. Das S., Ng K.-Y., Ho P.C. Design of pectin-based micro-particle formulation using zinc ions as the cross-linking agent and glutaraldehyde as the hardening agent for colonic-specific delivery of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *J. Drug Target.*, 2011, 19(6), 446–457. doi: 10.3109/1061186X.2010.504272
  56. Tolstogusov V.B. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocoll.*, 1991, 4(6), 429–468. doi: 10.1016/S0268-005X(09)80196-3
  57. Ni Y., Yates K.M., Zarzycki R. Aloe pectins. Patent of USA, 5929051, A 61 K 31/725. 1999.
  58. Челпанова Т.И., Ефимцева Э.А. Иммобилизация щелочной фосфатазы на сферических пектиновых гидрогелях. *Прикл. микробиол. биохим.*, 2016, 52(1), 44–52. doi: 10.7868/S0555109916010049
  59. Smith F.M., Jaime-Fonseca M.R., Grover L.M., Bakalis S. Alginate-loaded liposomes can protect encapsulated alkaline phosphatase functionally when exposed to gastric pH. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58(8), 4719–4724. doi: 10.1021/jf904466p
  60. Xie M., Olderooy M.O., Zhang Z., et al. Biocomposites prepared by alkaline phosphatase mediated mineralization of alginate microbeads. *RSC Adv.*, 2012, 2(4), 1457–1465. doi: 10.1039/c1ra00750e
  61. Karewicz A., Zasada K., Bielska D., et al. Alginate-hydroxypropylcellulose hydrogel microbeads for alkaline phosphatase encapsulation. *J. Microencapsul.*, 2014, 31(1), 68–76. doi: 10.3109/02652048.2013.805841
  62. Hirano S., Miura O. Alkaline phosphatase and pepsin immobilized in gels. *Biotechnol. Bioeng.* 1979, 21(4), 711–714. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260210415>
  63. Surinenaite B., Bendikiene V., Juodka B. Immobilization of alkaline phosphatases on various supports. In: Progress in Biotechnology, 15. Stability and Stabilization of Biocatalysts [Eds. A. Ballesteros, F.J. Plou, J.L. Iborra, P.J. Halling]. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V., 1998, 577–582. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0921-0423\(98\)80087-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-0423(98)80087-7)
  64. Zubriene A., Budriene S., Gorochovceva N., et al. Immobilization of hydrolases onto chitosan microparticles. *Chemija (Vilnus)*. 2003, 14(4), 226–230.
  65. Fujii T., Ogiwara D., Ohkawa K., Yamamoto H. Alkaline phosphatase encapsulated in gellan-chitosan hybrid capsules. *Macromol. Biosci.*, 2005, 5(5), 394–400. doi: 10.1002/mabi.200400190
  66. Gao Q., Li H., Chen H., et al. Study on the technology of CS-PLGA nanospheres immobilized alkaline phosphatase. *Biotechnol. Bull.*, 2013, 1(5), 199–204. <http://biotech.caas.cn/EN/Y2013/V1/I5/199>
  67. Jafary F., Varshosaz J., Panjehpour M., Yaghmaei P. Immobilization of alkaline phosphatase using chitosan nanoparticles for enhancing its stability. *Russ. J. Appl. Chem.*, 2014, 87(11), 1719–1725. doi: 10.1134/S107042721411024X
  68. Asakura T., Kanetake J., Demura M. Preparation and properties of covalently immobilized alkaline phosphatase on *Bombyx mori* silk fibroin fiber. *Polym. Plast. Technol. Eng.*, 1989, 28(4), 453–469.

69. Derbal L., Lesot H., Voegel J.C., Ball V. Incorporation of alkaline phosphatase into layer-by-layer polyelectrolyte films on the surface of Affi-gel heparin beads: physico-chemical characterization and evaluation of the enzyme stability. *Biomacromolecules.*, 2003, 4(5), 1255–1263. doi: 10.1021/bm034070k
70. Osathanon T, Linnes M.L., Rajachar R.M., et al. Micro-porous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.*, 2008, 29(30), 4091–4099. doi:10.1016/j.biomaterials. 2008.06.030
71. Orimo H. The mechanism of mineralization and role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon. Med. Sch.*, 2010, 77(1), 4–12. doi: 10.1272/jnms.77.4
72. Golub E.E., Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr. Opin. Orthop.*, 2007, 18(5). 444–448. doi: 10.1097/BCO.0b013e3282630851
73. Simao A.M.S., Yadav M.C., Ciancaglini P., Millan J.L. Proteoliposomes as matrix vesicles' biomimetics to study the initiation of skeletal mineralization. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2010, 43(3), 234–241. <http://producao.usp.br/handle/BDPI/6761>
74. Berendsen A.D., Smit T.H., Hoeben K.A., et al. Alkaline phosphatase-induced mineral deposition to anchor collagen fibrils to a solid surface. *Biomaterials*, 2007, 28(24), 3530–3536., doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.04.031
75. Venkatesan, J., Bhatnagar I., Kim S.-K. Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering. *Mar. Drugs*, 2014, 12, 300–316. doi: 10.3390/md12010300
76. Oortgiesen D.A.W., Plachokova A.S., Geenen C., et al. Alkaline phosphatase immobilization onto Bio-Gide® and Bio-Oss® for periodontal and bone regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 2012, 39(6), 546–555. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01877.x
77. Житков М.Ю. Влияние иммобилизованной щелочной фосфатазы слюны на процессы реминерализации. *Стоматология*, 1999, (5), 12-15.
78. Zheng D., Neoh K.G., Kang En-Th. Bifunctional coating based on carboxymethyl chitosan with stable conjugated alkaline phosphatase for inhibiting bacterial adhesion and promoting osteogenic differentiation on titanium. *Appl. Surf. Sci.*, 2016, 360, 86–97. doi: 10.1016/j.apsusc.2015.11.003
79. Bosco R., Leeuwenburgh S.C.G., Jansen J.A., van den Beucken J.J.J.P. Configurational effects of collagen/ALP coatings on enzyme immobilization and surface mineralization. *Appl. Surf. Sci.*, 2014, 311, 292–299. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.05.057
80. Jefferies S.R., Gutmann J.M., Heatfield B.M. Collagen-enzyme conjugates that exhibit no-inflammatory response and method for making the same. Patent of USA, 4.409.332, C12N 9/96. 1983.
81. Lalles J.P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr. Rev.*, 2014, 72, 82–94. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/nure.12082>
82. Poelstra K., Bakker W.W., Klok P.A., et al. A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification. *Labor. Invest.*, 1997, 76(3), 319–327.
83. Geddes K., Philpott D.J. A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterolog.*, 2008, 135(1), 8–12. doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.006
84. Rietscheld E.T., Kirikae T., Schade F.U., et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J.*, 1994, 8, 217–225.
85. Bentala H, Verweij W.R., Huizinga-Van der Vlag A., et al. Removal of phosphate from lipid A as strategy to detoxify lipopolysaccharide. *Shock.*, 2002, 18, 561–566. doi: 10.1097/01.shk.00000043623.17707.47
86. Goldberg R.F., Austen W.G., Zhang X., et al. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defence factor maintained by enteral nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(9), 3551–3556. doi: 10.1073/pnas.0712140105
87. Malo M.S., Nasrin Alam S., Mostafa G., et al. Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut.*, 2010, 59(11), 1476–1484. doi: 10.1136/gut.2010.211706
88. Tuin A., Poelstra K., de Jager-Krieken A., et al. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut.*, 2009, 58(3), 379–387. doi: 10.1136/gut.2007.128868
89. Lukas M., Drastich P., Konecny M., et al. Exogenous alkaline phosphatase for the treatment of patients with moderate to severe ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2010, 16(7), 1180–1186. doi: 10.1002/ibd.21161
90. Riggle K.M., Rentea R.M., Welak S.R., et al. Intestinal alkaline phosphatase prevents the systemic inflammatory response associated with necrotizing enterocolitis. *J. Surg. Res.*, 2013, 180(1), 21–26. doi: 10.1016/j.jss.2012.10.042
91. Ефимцева Э.А., Челпанова Т.И. Щелочная фосфатаза: участие в детоксикации бактериального эндотоксина. *Успехи соврем. биологии*, 2015, 135(3), 279–296.
92. Eriksson H.J.C., Verweij W.R., Poelstra K., et al. Investigations into the stabilisation of drugs by sugar glasses: II Delivery of an inulin-stabilised alkaline phosphatase in the intestinal lumen via the oral route. *Int. J. Pharm.*, 2003, 257(1–2), 273–281. doi: 10.1016/S0378-5173(03)00152-2
93. Fiechter D. Alkaline Phosphatase: mechanism of action and implication for the treatment of LPS-mediated diseases [Ed. D. Fiechter]. Utrecht, The Netherlands, Utrecht University, 2007, 9–123. ISBN 978-90-393-4514-6
94. Pickkers P., Snellen F., Rogiers P., et al. Clinical pharmacology of exogenously administered alkaline phosphatase. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2009, 65(4), 393–402. doi: 10.1007/s00228-008-0591-6
95. Su F., Brands R., Wang Z., et al. Beneficial effects of alkaline phosphatase in septic shock. *Crit. Care Med.*, 2006, 34(8), 2182–2187. doi: 10.1097/01.CCM.0000229887.70579.29

96. Peters E., van Elsas A., Heemskerk S., et al. Alkaline phosphatase as a treatment of sepsis-associated acute kidney injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2013, 344(1), 2–7. doi: 10.1124/jpet.112.198226
97. Jain A., Gupta A.Y., Jain S.K. Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site-specific drug delivery to the colon. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 2007, 10(1), 86–128. <http://www.cspscanada.org/>
98. Fukunaga T., Sasaki M., Araki Y., et al. Effects of the soluble fibre pectin on intestinal cell proliferation, fecal short chain fatty acid production and microbial population. *Digestion.*, 2003, 67(1–2), 42–49. doi: 10.1159/000069705
99. Hague A., Elder D.J.E., Hicks D.J., and Paraskeva C. Apoptosis in colorectal tumor-cells. Induction by the short-chain fatty-acids butyrate, propionate and acetate and by the bile-salt deoxycholate. *Int. J. Cancer.*, 1995, 60(3), 400–406. doi: 10.1002/ijc.2910600322
100. Vandamme T.F., Lenoury A., Charrueau C., and Chaummeil J.C. The use of polysaccharide target drugs to the colon. *Carbohydr. Polym.*, 2002, 48(3), 219–231. doi: 10.1016/s0144-8617(01)00263-6
101. Wong T.W., Colombo G., Sonvico F. Pectin matrix as oral drug delivery vehicle for colon cancer treatment. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2011, 12(1), 201–214. doi: 10.1208/s12249-010-9564-z
102. Sukhorukov G.B., Rogach A.L., Garstka M., et al. Multifunctionalized polymer microcapsules: novel tools for biological and pharmacological applications. *Small.*, 2007, 3(6), 944–955. doi: 10.1002/sml.200600622
103. Wang J., Kawde A.-N., Jan M.R. Carbon-nanotube-modified electrodes for amplified enzyme-based electrical detection of DNA hybridization. *Biosens. Bioelectron.* 2004, 20(5), 995–1000. doi: 10.1016/j.bios.2004.06.016
104. Couvreur P., Barrat G., Fattal E., Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2002, 19(2), 99–134. doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v19.i2.10
105. Klos-Witkowska A. Enzyme-based fluorescent biosensors and their environmental, clinical and industrial applications. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2015, 24(1), 19–25. doi: 10.15244/pjoes/28352
106. Tu Z., Ke L.H., He G. The application of alkaline phosphatase labeled HBV probe in serum detection. *Virus Genes.* 2004, 28(2), 151–156. doi: 10.1023/B:VIRU.0000016853.87337.7c
107. Kruck P. Detection of cancer by elevated levels of BCL-2. Patent of USA, US8034549 B2, CI2Q1/00. 2011.
108. Wang J., Liu G., Jan M.R. Ultrasensitive Electrical Biosensing of Proteins and DNA: Carbon-Nanotube derived Amplification of the Recognition and Transduction Events. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126(10), 3010–3011. doi: 10.1021/ja031723w
109. Yin Z., Liu Y., Jiang L.-P., Zhu J.-J. Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor alkaline phosphatase functionalized nanospheres. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26(5), 1890–1894. doi: 10.1016/j.bios.2010.03.025
110. Zhavoronkova A.M., Muginova S.V., Veselova I.A., Shekhovtsova T.N. Determination of Zinc (II) Using Native and Immobilized Alkaline Phosphatases of Different Origin. *J. Anal. Chem.*, 2003, 58(1), 77–84. doi: 10.1023/A:1021846517607
111. Веселова И.А., Жаворонкова А.М., Мугинова С.В., Шеховцова Т.Н. Тест-методы определения цинка (II) и свинца (II) на основе иммобилизованных щелочных фосфатаз различного происхождения. *Журн. аналит. химии*, 2003, 58(7), 740–741. doi: 10.1023/A:1024743700738
112. Muginova S.V., Zhavoronkova A.M., Polyakov A.E., Shekhovtsova T.N. Application of alkaline phosphatases from different sources in pharmaceutical and clinical analysis for the determination of their cofactors: zinc and magnesium ions. *Anal. Sci.*, 2007, 23(3), 357–363. doi: 10.2116/analsci.23.357
113. Alvarado-Gamez A.L., Alonso-Lomillo M.A., Dominguez-Renedo O., and Arcos-Martinez M.J. A disposable alkaline phosphatase-based biosensor for vanadium chronoamperometric determination. *Sensors.*, 2014, 14(2), 3756–3767. doi: 10.3390/s140203756
114. Будников Г.К., Евтюгин Г.А. Экспресс-тестовые методы определения ингибиторов гидролитических ферментов с помощью электрохимических биосенсоров. *Рос. хим. журн.*, 2001, XLV(4), 86–94.
115. Shyuan L.K., Heng L.Y., Ahmad M., et al. Evaluation of pesticide and heavy metal toxicity using immobilized enzyme alkaline phosphatase with an electrochemical biosensor. *Asian J. Biochem.*, 2008, 3(6), 359–365. doi: 10.3923/ajb.2008.359.365
116. Медянцева Э.П., Май Тхи Тхань Х., Варламова Р.М., et al. Амперометрический биосенсор на основе щелочной фосфатазы и углеродных нанотрубок для определения некоторых микотоксинов. *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*, 2014, 80(2), 5–12.
117. Van Veen S.Q., Dinant S., van Vliet A.K., and van Gulik T.M. Alkaline phosphatase reduces hepatic and pulmonary injury in liver ischaemia – reperfusion combined with partial resection. *Brit. J. Surg.*, 2006, 93(4), 448–456. doi: 10.1002/bjs.5275

# Immobilization of Alkaline Phosphatase: Perspective of Biomedical Application of Immobilized Enzyme

E.A. EFIMTSEVA, and T.I. CHELPANOVA\*

*Institute of Physiology, Komi Science Centre, Russian Academy of Sciences, Ural Branch, 167982 Syktyvkar, Russia*

*e-mail: chelpanova@physiol.komisc.ru\**

Received August 24, 2016

Accepted October 20, 2016

**Abstract**—The information about current materials (including polysaccharide carriers in the form of gels, animal proteins and lipids) and ways of immobilization (adsorption, cross-linkage and encapsulation) of enzymes is reviewed. The data on the alkaline phosphatase immobilization are highlighted in more detail. The potential applications of the immobilized enzyme as effective biomaterials for replacement and regenerative therapies, anti-inflammatory preparations and also medical diagnosticums, high-sensitive analytical systems and selective biosensors are discussed.

*Key words:* alkaline phosphatase, immobilization, materials, methods, biomedical application.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-4-54-75