



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 54993

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 38/55

A61K 38/56 (2006.01)

A61K 36/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІНГІБІТОРА ТРИПСИНУ

1

2

(21) 2002064738

(22) 10.06.2002

(24) 15.12.2006

(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.

(72) Діхтярьов Сергій Іванович, Маслово Наталія Федорівна, Січкач Лілія Анатоліївна, Сухінін Валентин Миколайович, Кузнецова Ірина Володимирівна, Чушенко Валентина Миколаївна

(73) Державне підприємство "Державний науковий центр лікарських засобів"

(56) Нортрон Д., Кунитц М., Хорриотт Р.М., Кристаллический ингибитор трипсина из соевых бобов.// Кн. Кристаллические ферменты, -М., : Изд. "Иностранная литература", 1950.-С.260-265

(57) 1. Спосіб одержання інгібітору трипсину з насіння сої, що включає підготовку сировини шляхом її подрібнення, екстракцію, відділення екстракту від шроту, очистку екстракту від супутніх білків, адсорбцію інгібітору трипсину та промивку його на сорбенті, елюювання інгібітору трипсину розчинником, відмивання елюату від домішок, фільтрацію очищеного елюату, висушування цільового продукту, який **відрізняється** тим, що при підготовці сировини перед подрібненням здійснюють замочування насіння сої у воді для набухання протягом 10-12 год, екстракцію сировини здійснюють водою очищеною одночасно з подрібненням, відділення екстракту від шроту проводять за допомогою центрифугування або фільтрації під вакуумом, очистка екстракту від супутніх білків включає їх

осадження шляхом додавання до екстракту лимонної кислоти або оцтової кислоти, або трихлороцтової кислоти, або сульфату кальцію, або хлориду кальцію з подальшим відділенням осаджених продуктів центрифугуванням або фільтрацією під вакуумом, обробку одержаного екстракту інгібітору трипсину на ультрафільтраційній установці шляхом його діалізації та концентрації, для адсорбції інгібітору трипсину використовують як біоспецифічні сорбенти трипсин-сефарозу або трипсин-целюлозу, або ензайт-трипсин, або трипсин-тойоперл та буфер 0,045-0,05 М трис-НСІ з рН 7,0-8,0, а промивку його на сорбенті проводять спочатку буфером 0,045-0,05 М трис-НСІ з рН 7,0-8,0, потім 0,5-0,7 М натрію хлориду та водою очищеною, елюювання інгібітору трипсину проводять підкисленою до рН 2,0-2,5 водою, або підкисленою водою з додаванням 0,15-0,20 М натрію хлориду, або 0,20-0,25 М калію хлориду, відмивання елюату від домішок здійснюють електродіалізом або діалізацією з подальшим його концентруванням, а висушування продукту здійснюють шляхом ліофілізації.

2. Спосіб згідно з п. 1, який **відрізняється** тим, що після відмивання елюату від домішок та перед висушуванням його піддають стерильній фільтрації у випадку створення стерильних лікарських засобів, таких як ін'єкційні та інфузійні розчини або стерильні мазі та інші стерильні місцеві засоби.

Винахід відноситься до медицини та хіміко-фармацевтичної промисловості, зокрема, до розробки способів одержання інгібітору трипсину з рослинної сировини.

Відомий спосіб одержання з рослинної сировини інгібітору трипсину шляхом екстрагування водою очищеною подрібненого насіння гороху при перемішуванні на протязі 1 год. Отриману суспензію центрифугують, потім екстракт підкислюють соляною кислотою до рН 4,0 - 4,3, знову центрифугують. З отриманої надосадкової рідини висо-

люють сульфатом амонію фракцію 0,75. Осад суспендують у 29 - 53мл 0,1N натрію хлориду при рН 8,2, переносять у целофанові мішки та діалізують до негативної реакції на сульфат-іон. Вміст целофанових мішків (ретентат) центрифугують, надосадкову рідину наносять на колонку з діетиламіноетилцелюлозою, яку заздалегідь урівноважують трис-НСІ буфером 0,025М, рН 8,15 - 8,28 з іонною силою 0,0135. Білки елюють тим же буфером на колекторі. Хроматограмою визначили, що інгібує трипсин тільки білок другого піку. Цей білок висо-

(13) C2

(11) 54993

(19) UA

люють, діазолюють, ретентат ліофілізують. Всі операції з білками проводять на холоді (4 - 5°C), а хроматографію - при кімнатній температурі (17 - 20°C). Отримують 35мг інгібітора трипсину з питомою активністю білка 1050мЕ/мг (1).

Відомий спосіб одержання інгібітора трипсину шляхом подрібнення скошеної люцерни (у стадії бутонізації) з подальшим віджиманням соку. Сік підігрівують до 85°C. Коагульовані білки осаджують центрифугуванням, супернатант (4,2л) використовують для біоспецифічного хроматографування на трипсин-сефарозі. Колонку (150 x 15)см³ з сорбентом заповнюють порцією супер-натанту, що дорівнює 250мл (зовнішній об'єм, сорбенту). Кожну порцію (всього 17 порцій) витримують у колонці у відповідності з терміном зв'язування інгібітора з трипсином. Пігменти видаляють 8 об'ємами води, неспецифічно зв'язані білки десорбують 10 об'ємами 0,15М ацетатного буферного розчину з 0,3М хлориду натрію, рН 7,0. Десорбцію здійснюють 0,15М ацетатним буферним розчином з 0,3М хлориду натрію при рН 7,0. Хлорид натрію відділяють промивкою 6 об'ємами води. Елюють 0,08М уксусною кислотою. Отримують 53мг інгібітора трипсину, електрофоретичне гомогенного, нетоксичного: так, внутрішньовенне введення препарату в дозі 50мг, що є 20-кратною лікувальною дозою, не викликає загибелі щурів (2).

Відомий спосіб виділення інгібітора трипсину з курячих яєць, який здійснюють таким чином. З 13мл курячого білку механічно відділяють 6мл рідкого білка, екстрагують його у 20мл 2N розчину хлориду натрію протягом 30хв. при перемішуванні при 4 - 5°C. Отриманий екстракт підкислюють 0,5N соляною кислотою до рН 1,5, потім центрифугують 45хв. при 5500g. Надосадочну рідину відділяють і витримують 28год при 4 - 5°C, потім знову центрифугують. Отриману надосадочну рідину діалізують у целофанових мішках роти дистильованої води, підлученої до рН 10,0 (до отримання негативної реакції на сульфатіон). Вміст целофанових мішків центрифугують, а надосадкову рідину ліофілізують. Отримують 115мг препарату інгібітора трипсину, який має питому активність 290,2мЕ/мг білка (3).

Відомий спосіб одержання Інгібітора трипсину з зерен ячменю, який здійснюють таким чином: 300г зерен ярового ячменю сорту „Чорноморець” подрібнюють і екстрагують 1,8л 0,1М соляної кислоти. Після діалізу проти 20-кратного надлишку дистильованої води на протязі 20год. збирають осад шляхом центрифугування. Із сухого осаду інгібітор здобувають 0,1М триетаноламіновим буфером рН 8,0 трикратними порціями по 75; 50 і 25мл. Об'єднані екстракти прогривають на киплячій водяній бані 15хв., після чого денатуровані білки відділяють центрифугуванням. До надосадкової рідини додають 31г сульфату амонію (до 40% насичення) і після відстоювання на холоді на протязі ночі відділяють осад центрифугуванням. До осаду додають 100мл 0,1М амоній-ацетатного буферу рН 6,0, перемішують 45хв., центрифугують, супернатант ліофілізують висушують. Отримують 132г інгібітора трипсину з питомою активністю 0,61 (4).

Відомий спосіб одержання інгібітора трипсину з вегетативних органів люцерни, який здійснюють

таким чином. Зелену масу люцерни подрібнюють, під пресом віджимають сік, підкислюють 1N. HCl до рН 4,2 і відділяють коагульовані білки центрифугуванням. Отриманий сік підкислюють 20% трихлорцтовою кислотою до кінцевої концентрації 2%, центрифугують, осад відкидають, надосадну рідину діалізують на холоді проти 0,1М ацетатного буферу рН 5,0. Хроматографію на колонці з КМ-целюлозою (3,5 x 20)см³ проводять в 0,1М ацетатному буфері, рН 5,0. Білок елюють, використовуючи безперервний градієнт концентрації розчину натрію хлориду 0,1 - 0,5М. Афинну хроматографію інгібітора трипсину здійснюють на трипсин-сефарозі 4В. Сорбцію інгібітора проводять при рН 5,0 в 0,1М ацетатном буфері, що містить 0,22М натрію хлориду і 0,01М кальцію хлориду. Елювання інгібітора здійснюють розчином, що містить 0,01N соляну кислоту, рН 2,0, 1М натрію хлориду і 15% (по об'єму) ізопропілового спирту. Гель-хроматографію очищеного інгібітора трипсину проводять на колонці з сефадексом G-100, урівноважений 0,05М цитратним буфером, рН 2,7 і колонці з акрилексом П-60, урівноважений 0,1М ацетатним буфером, рН 5,0. Диск-електрофорез препаратів ферменту проводять у системі гелів: 7,5% поліакриамідний розподіляючий гель, лужна система буферів, 1 - 5мА на 1 стовпчик гелю. Активність інгібітора трипсину виражають у кількості трипсину (мг), інгібованого 1мг білка препарату інгібітора (5).

Відомий спосіб одержання інгібіторів цистеїнових протеїназ із соєвих бобів сорту "Приморська 491", який здійснюють таким чином.

1. Отримання препарату спирторозчинних білків. Подрібнену сировину знежирюють ацетоном, білки екстрагують 60% спиртом етиловим при 55°C. Після доведення рН екстракту до 5,3 (за допомогою концентрованої HCl) білки висаджують двома об'ємами охолодженого ацетону при 0°C, відстоюють 2,0 - 2,5год. при 0°C, осад відокремлюють. Отриманий осад розчиняють у мінімальній кількості води, діалізують, висушують ліофілічно.

2. Виділення інгібіторів типу Баумана-Бірк. Для отримання очищених інгібіторів препарат спирторозчинних білків розчиняють у 0,1М фосфатному буфері (рН 8,0), наносять на колонку з хімотрипсин-сефарозой 4В. Колонку промивають тим же буфером, який містить 0,5М натрію хлориду, потім проводять елюцію інгібітора 0,2М калію хлоридом при рН 2,0.

3. Виділення інгібіторів цистеїнових протеїназ. Препарат фіцину активують у розчині, що містить 0,1М фосфатний буфер (рН 6,0), 2мМ цистеїн та 0,1мМ ЕДТА, протягом 1год. при 20°C і обробляють іодацетамідом до кінцевої концентрації 10мМ. Отримане неактивне похідне фіцину приєднують до CNBr-активованої сефарози 4В у стандартних умовах. Препарат спирторозчинних білків розчиняють у 0,1М фосфатному буфері рН 8,0 і перемішують з суспензією фіцин-сефарози протягом 18год. при 4°C. Потім сорбент переносять на хроматографічну колонку і промивають 0,1М фосфатним буфером (рН 8,0), який містить 0,5М NaCl. Елюцію інгібіторів проводять 0,1М NaCl при рН 12,0. Елюат доводять до рН 7 - 8 за допомогою 0,24М KH₂PO₄ (6).

Відомий спосіб одержання інгібітора трипсиноподібних протеаз, який здійснюють таким чином: легені білих мишей промивають від крові фосфатним буфером (рН 7,5) при температурі 4°C, потім подрібнюють, додають фосфатний буфер, гомогенізують ультразвуком протягом 30 - 60сек. і центрифугують. Супернатант заморожують до температури -18 -20°C, до осаду додають 1% розчин тритону X-100, перемішують і поміщають на холод при температурі 4 - 6°C на 18 - 20год. Після цього осад гомогенізують і центрифугують при вказаних вище параметрах. I і II супернатанти об'єднують і піддають розподілу протеази та інгібітора за допомогою іонообмінної хроматографії. Очистку інгібітора протеаз до гомогенного стану проводять за допомогою гельфільтрації на сефадексах з подальшою афінною хроматографією на трипсин-сефарозі 4В. Десорбцію білків проводять фосфатним буфером і діалізом проти води з подальшою ліофільною сушкою та ампулюванням (7).

Найбільш близьким до заявляемого є спосіб одержання інгібітора трипсину з соєвих бобів, який здійснюють таким чином.

1. Промивка 80% спиртом етиловим. 1000г обробленої на холоді знежиреної муки з соєвих бобів додають до суміші з 2400мл 95% спирту етилового, охолодженого до 5°C та 450мл води дистильованої. Суспензію ретельно перемішують і залишають при 20 - 25°C на 30хв. Потім фільтрують під вакуумом, фільтрат відкидають.

2. Екстракція 0,25N сірчаною кислотою. Напівсуху муку знову суспендують у 5000мл 0,25N сірчаної кислоти при 20 - 25°C і залишають на 1год. при кімнатній температурі, періодично перемішуючи. Суспензію знову фільтрують під вакуумом, осад відкидають.

3. Видалення інертного білка. До кислого фільтрату додають 20г суміші, що вміщує рівні частини бентоніту і супер-селу, і перемішують 10хв. Одержану суспензію фільтрують, отримують фільтрат. Осад промивають двома порціями по 125мл води (промивні води). Осад відкидають.

4. Адсорбція інгібітора на бентоніті.

До фільтрату, який об'єднали з промивними водами після операції №3, повільно додають при перемішуванні 100г суміші бентоніту і супер-селу, продовжують перемішувати ще 10хв., після чого суспензію фільтрують, а осад на фільтрі промивають двома порціями води по 125мл. Фільтрат і промивні води відкидають.

5. Елюція піридином та діаліз.

Бентонітовий осад розмішують у 270мл води, суспензію нагрівають до 25°C, додають при перемішуванні 30мл піридину, фільтрують, осад на фільтрі промивають 200мл 5% розчину піридину у воді. Фільтрат об'єднують з промивною рідиною, діалізують проточною водою протягом 10 - 12год. у целофанових трубках довжиною 30см.

6. Видалення інертного матеріалу при рН 5,3.

Діалізований розчин, вільний від клейкого осаду, доводять до рН 5,3 додаванням приблизно 2мл 1N соляної кислоти. У розчині перемішують 4г суміші бентоніту і супер-селу, фільтрують під вакуумом, осад промивають водою і відкидають.

7. Перше осадження інгібітора при рН 4,65.

Фільтрат і промивні води (операція №6) об'єднують, охолоджують до 5°C, титрують 1N соляною кислотою до рН 4,65. Відфільтровують осад, що утворився. Фільтрат відкидають. Вага осаду складає 10 - 12г.

8. Друге осадження інгібітора при рН 4,65.

Отриманий осад суспендують при перемішуванні у 100мл води, охолодженої до 5°C, додають по краплям 1N розчин гідроксиду натрію до повного розчинення осаду (рН не вище 6,4). Прозорий розчин нагрівають до 25°C, титрують до утворення осаду, додають 2г супер-селу. Осад відфільтровують, промивають на фільтрі декількома мл води. Фільтрат і промивні води об'єднують, охолоджують до 5°C, титрують до рН 4,65. Одержаний осад відфільтровують, вихід становить 8 - 10г. Фільтрат відкидають.

9. Кристалізація.

Отриманий від операції №8 осад (приблизно 10г) розтирають у 10мл холодної води до отримання суспензії, потім нагрівають до 35°C. Додають по краплям при ретельному перемішуванні 0,5N розчин гідроксиду натрію до повного розчинення осаду і до рН 5,2, залишають для кристалізації при 35 - 37°C протягом 5 - 6год. Осад відділяють за допомогою центрифугування.

10. Перекристалізація.

Отриманий кристалічний осад розмішують у подвійній кількості холодної води та титрують 0,5N розчином гідроксиду натрію до одержання прозорого розчину і до рН 6,0. Прозорий розчин нагрівають до 35°C і титрують 0,5N розчином соляної кислоти до рН 5,1 до отримання слабкого осаду, додають 2г супер-селу і фільтрують до тих пір, поки розчин не стане прозорим. У фільтрат додають затравку і залишають при 36 - 37°C. Поступово утворюється густа суспензія кристалів, яку через 5 - 6год. відділяють центрифугуванням. Осад зберігають при 5°C. Додаванням 1 - 2 крапель розчину 0,2N соляної кислоти доводять рН відстою до рН 5,1, вводять затравку і розчин залишають ще на декілька годин при 36 - 37°C для отримання додаткової порції кристалів, яку відділяють таким же чином, як описано вище. Можна ще отримати кристали з кінцевого відстою, якщо його охолодити до 5°C і додати 0,25 об'єму холодного 95% спирту етилового, як описано у наступному розділі.

11. Кристалізація з розбавленого спирту.

Отримані кристали розмішують у п'ятикратному об'ємі холодної води і додають по краплям розчин 0,5N гідроксиду натрію до повного розчинення кристалів до рН розчину не вище 6,6. Прозорий розчин титрують 0,2N соляної кислоти до рН 5,2, до утвореного осаду додають супер-сел з розрахунку 4г на 100мл розчину, осад відділяють і промивають на фільтрі незначною кількістю води. Фільтрат охолоджують до 5°C, повільно додають чверть об'єму охолодженого 95% спирту етилового для утворення осаду. Додаванням розчину 0,2N соляної кислоти доводять рН суміші до 5,0 і залишають її при 30°C. Аморфний осад перетворюється на протязі 2год. у кристалічний, який швидко осідає на дно ємності. Відстій розчину кожну годину декантують, доводять розчином соляної кислот до рН 5,0 і повертають до основної ємності. Так повторюють протягом декількох годин до повного

припинення появи осаду при рН 5,0. Після цього суміш, яка кристалізується, витримують ще 30хв. при 30°C. Утворений осад відфільтровують і висушують при кімнатній температурі протягом 24год.

12. Перекристалізація із спирту етилового.

Сухі кристали суспендують у тридцятикратному (по відношенню до їх ваги) об'ємі холодної води, витримують 5 - 10хв., а потім обробляють таким же чином, як і в операції №11.

Вихід кристалів інгібітора трипсину змінюється у залежності від сорту муки і, в середньому, становить приблизно 1г з 1000г сировини - 0,1% (8).

До недоліків способу-прототипу слід віднести багатостадійність, значну тривалість процесу, невисокий вихід цільового продукту, великі енерго- та трудовитрати, екологічну забрудненість виробництва.

В основу винаходу поставлено завдання створення способу одержання з рослинної сировини інгібітора трипсину шляхом підбору технологічних операцій у такій послідовності та взаємозв'язку і з такими режимами та параметрами, які б забезпечили підвищення виходу цільового продукту, спрощення технологічного процесу шляхом зменшення кількості стадій і їх тривалості у часі, скорочення енерго- і трудовитрат, екологічну чистоту виробництва.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі одержання інгібітора трипсину з рослинної сировини, що включає підготовку насіння сої шляхом його подрібнення, екстракцію, відділення екстракту від шроту, очистку екстракту від супутніх білків, адсорбцію інгібітора трипсину та промивку його на сорбенті, елюювання інгібітора трипсину розчинником, відмивання елюату від домішок, фільтрацію очищеного елюату, висушування цільового продукту, згідно з винаходом, при підготовці сировини перед подрібненням здійснюють замочування насіння сої у воді для набухання протягом 10 - 12год., екстракцію сировини здійснюють водою очищеною одночасно з подрібненням, відділення екстракту від шроту проводять за допомогою центрифугування або фільтрації під вакуумом, очистка екстракту від супутніх білків включає їх осадження шляхом додавання до екстракту, лимонної кислоти або оцтової кислоти, або трихлороцтової кислоти, або сульфату кальцію, або хлориду кальцію з подальшим відділенням осаджених продуктів центрифугуванням або фільтрацією під вакуумом, обробку одержаного екстракту інгібітора трипсину здійснюють на ультрафільтраційній установці шляхом його діалізації та концентрації, для адсорбції інгібітора трипсину використовують як біоспецифічні сорбенти трипсин-сефарозу або трипсин-целюлозу, або ензайт-трипсин, або трипсин-тойоперл та буфер 0,045 - 0,05М трис-НСІ з рН 7,0 - 8,0, а промивку його на сорбенті проводять спочатку буфером 0,045 - 0,05М трис-НСІ з рН 7,0 - 8,0, потім 0,5 - 0,7М натрію хлориду та водою очищеною, елюювання інгібітора трипсину проводять підкисленою до рН 2,0 - 2,5 водою, або підкисленою водою з додаванням 0,15 - 0,20М натрію хлориду, або 0,20 - 0,25М калію хлориду, відмивання елюату від домішок здійснюють електродіалізом або діалізацією з подальшим його концентруванням, а ви-

сушування продукту здійснюють шляхом ліофілізації, причому після відмивання елюату від домішок та перед висушуванням його піддають стерильній фільтрації у випадку створення стерильних лікарських засобів, таких, як ін'єкційні та інфузійні розчини або стерильні мазі та інші стерильні місцеві засоби.

Технічний результат, якого досягають при здійсненні винаходу, полягає у розробці способу одержання інгібітора трипсину з рослинної сировини, який, за рахунок підбору технологічних операцій у такій послідовності та взаємозв'язку і з такими режимами та параметрами, забезпечує підвищення виходу цільового продукту, спрощення технологічного процесу шляхом зменшення кількості стадій і їх тривалості у часі, скорочення енерго- і трудовитрат, екологічну чистоту виробництва.

Наводимо конкретні приклади здійснення винаходу.

Приклад 1. 5кг промитого насіння сої замочують у воді очищеній при температурі 4°C для набухання протягом 10год. Воду зливають, а розбухле насіння сої заливають 50л води очищеної і екстрагують, одночасно подрібнюючи сировину у середовищі екстрагенту. Отриману суміш центрифугують або фільтрують під вакуумом для відділення екстракту від шроту, після чого отриманий екстракт інгібітора трипсину передають на стадію очистки, яку здійснюють у декілька етапів. Спочатку для осадження супутніх білків до екстракту додають при перемішуванні кислоту лимонну до рН 3,5 - 4,0, після чого осаджені білки відділяють на центрифугу при 1000g протягом 15хв. або фільтрують під вакуумом. Одержаний прозорий екстракт інгібітора трипсину на ультрафільтраційній установці діалізують до відсутності білків і пігментів і концентрують до 1,0л. Подальшу очистку одержаного концентрату інгібітора трипсину здійснюють методом афінної хроматографії на хроматографічній колонці, що заповнена біоспецифічним сорбентом трипсин-сефарозою з попереднім урівноваженням 0,045М трис-НСІ буфером з рН 7,0. Колонку відмивають від неспецифічно зв'язаних білків цим же буфером з подальшою промивкою розчином 0,5М натрію хлориду. Видаляють буфер водою очищеною і елюють інгібітор трипсину підкисленою до рН 2,0 водою. Одержаний елюат відмивають від кислоти електродіалізом або діалізацією, концентрують, розливають у ємності і ліофілізують. Вихід інгібітора трипсину становить 8,0.

Приклад 2. 5кг промитого насіння сої замочують у воді очищеній при температурі 6°C для набухання протягом 11год. Воду зливають, а розбухле насіння сої заливають 50л води очищеної і екстрагують, одночасно подрібнюючи сировину у середовищі екстрагенту. Отриману суміш центрифугують при 1500g протягом 12хв. або фільтрують під вакуумом для відділення екстракту від шроту, після чого отриманий екстракт інгібітора трипсину передають на стадію очистки, яку здійснюють у декілька етапів. Спочатку для осадження супутніх білків до екстракту додають при перемішуванні кислоту оцтову до рН 2,0 - 4,0, після чого осаджені білки відділяють на центрифугу або фільтрують під вакуумом. Одержаний прозорий екстракт інгібітора

трипсину на ультрафільтраційній установці діалізують до відсутності білків і пігментів і концентрують до 1,1л. Подальшу очистку одержаного концентрату інгібітора трипсину здійснюють методом афінної хроматографії на хроматографічній колонці, що заповнена біоспецифічним сорбентом трипсин-сефарозою з попереднім урівноваженням 0,045М трис-НСІ буфером з рН 7,5. Колонку відмивають від неспецифічно зв'язаних білків цим же буфером з подальшою промивкою розчином 0,5М натрію хлориду. Видаляють буфер водою очищеною і елюють інгібітор трипсину підкисленою до рН 2,0 водою. Одержаний елюат відмивають від кислоти електродіалізом або діалізацією, концентрують, розливають у ємності і ліофілізують. Вихід інгібітора трипсину становить 8,5г.

Приклад 3. 5кг промитого насіння сої замочують у воді очищеній при температурі 8°C для набухання протягом 12год. Воду зливають, а розбухле насіння сої заливають 50л води очищеної і екстрагують, одночасно подрібнюючи сировину у середовищі екстрагенту. Отриману суміш центрифугують при 2000g протягом 10хв. або фільтрують під вакуумом для відділення екстракту від шроту, після чого отриманий екстракт інгібітора трипсину передають на стадію очистки, яку здійснюють у декілька етапів. Спочатку для осадження супутніх білків до екстракту додають при перемішуванні кислоту трихлороцтову до рН 2,0 - 3,0, після чого осаджені білки відділяють на центрифугу або фільтрують під вакуумом. Одержаний прозорий екстракт інгібітора трипсину на ультрафільтраційній установці діалізують до відсутності білків і пігментів і концентрують до 1,2л. Подальшу очистку одержаного концентрату інгібітора трипсину здійснюють методом афінної хроматографії на хроматографічній колонці, що заповнена біоспецифічним сорбентом трипсин-целюлозою з попереднім урівноваженням 0,05М трис-НСІ буфером з рН 7,8. Колонку відмивають від неспецифічно зв'язаних білків цим же буфером з подальшою промивкою розчином 0,6М натрію хлориду. Видаляють буфер водою очищеною і елюють інгібітор трипсину підкисленою до рН 2,0 - 2,5 водою з додаванням 0,15М натрію хлориду. Одержаний елюат відмивають від кислоти електродіалізом або діалізацією, концентрують, стерильно фільтрують (для ін'єкційних або інфузійних розчинів, або для стерильних мазей та інших стерильних місцевих лікарських засобів), розливають у ємності і ліофілізують.

Вихід інгібітора трипсину становить 9,0г.

Приклад 4. 5кг промитого насіння сої замочують у воді очищеній при температурі 4°C для набухання протягом 10год. Воду зливають, а розбухле насіння сої заливають 50л води очищеної і екстрагують, одночасно подрібнюючи сировину у середовищі екстрагенту. Отриману суміш центрифугують при 1000g протягом 15хв. або фільтрують під вакуумом для відділення екстракту від шроту, після чого отриманий екстракт інгібітора трипсину передають на стадію очистки, яку здійснюють у декілька етапів. Спочатку для осадження супутніх білків до екстракту додають при перемішуванні кальцію сульфат, після чого осаджені білки відділяють на центрифугу або фільтрують під вакуу-

мом. Одержаний прозорий екстракт інгібітора трипсину на ультрафільтраційній установці діалізують до відсутності білків і пігментів і концентрують до 1,4л. Подальшу очистку одержаного концентрату інгібітора трипсину здійснюють методом афінної хроматографії на хроматографічній колонці, що заповнена біоспецифічним сорбентом ензайт-трипсином з попереднім урівноваженням 0,05М трис-НСІ буфером з рН 8,0. Колонку відмивають від неспецифічно зв'язаних білків цим же буфером з подальшою промивкою розчином 0,7М натрію хлориду. Видаляють буфер водою очищеною і елюють інгібітор трипсину підкисленою до рН 2,0 - 2,5 водою з додаванням 0,2М натрію хлориду. Одержаний елюат відмивають від кислоти електродіалізом або діалізацією, концентрують, стерильно фільтрують (для ін'єкційних або інфузійних розчинів, або для стерильних мазей та інших стерильних місцевих лікарських засобів), розливають у ємності і ліофілізують. Вихід інгібітора трипсину становить 9,5г.

Приклад 5. 5кг промитого насіння сої замочують у воді очищеній при температурі 8°C для набухання протягом 12год. Воду зливають, а розбухле насіння сої заливають 50л води очищеної і екстрагують, одночасно подрібнюючи сировину у середовищі екстрагенту. Отриману суміш центрифугують при 1000g протягом 15хв. або фільтрують під вакуумом для відділення екстракту від шроту, після чого отриманий екстракт інгібітора трипсину передають на стадію очистки, яку здійснюють у декілька етапів. Спочатку для осадження супутніх білків до екстракту додають при перемішуванні кальцію хлорид, після чого осаджені білки відділяють на центрифугу або фільтрують під вакуумом. Одержаний прозорий екстракт інгібітора трипсину на ультрафільтраційній установці діалізують до відсутності білків і пігментів і концентрують до 1,5л. Подальшу очистку одержаного концентрату інгібітора трипсину здійснюють методом афінної хроматографії на хроматографічній колонці, що заповнена біоспецифічним сорбентом трипсин-топерлом з попереднім урівноваженням 0,05М трис-НСІ буфером з рН 8,0. Колонку відмивають від неспецифічно зв'язаних білків цим же буфером з подальшою промивкою розчином 0,5М натрію хлориду. Видаляють буфер водою очищеною і елюють інгібітор трипсину підкисленою до рН 2,0 водою з додаванням 0,20 - 0,25М калію хлориду. Одержаний елюат відмивають від кислоти електродіалізом або діалізацією, концентрують, стерильно фільтрують (для ін'єкційних розчинів або стерильних мазей та інших місцевих засобів), розливають у ємності і ліофілізують.

Вихід інгібітора трипсину становить 10,0г. У значній мірі вихід інгібітора залежить від якості сировини, тобто вмісту інгібітора трипсину в ній.

Заявляємим способом отримують цільовий продукт (інгібітор трипсину) - порошок білого або білого з жовтуватим відтінком кольору.

Інгібітор трипсину, одержаний по заявляемому способу, проявляє інгібуючу активність по відношенню до таких ферментів, як трипсин, хімотрипсин і фібринолізин (плазмін) і може бути використаний у різних лікарських формах: у формі

ін'єкційних та інфузійних розчинів, у таблетованій формі, у капсулах, супозиторіях, мазях та ін. Фармакологічними дослідженнями встановлено, що отриманий інгібітор трипсину є нетоксичним.

Білкові інгібітори протеолітичних ферментів грають важливу роль у підтримці гомеостазу. Вони беруть участь у регулюванні функцій протеаз шлунково-кишкового тракту, кровоносної системи, клітин шкіри та інших органів і тканин. Численними доклінічними і клінічними дослідженнями доведено, що активація протеаз є основним фактором у ланцюзі патогенезу таких тяжких захворювань людини, як панкреатити різної етіології, захворювання системи згортання крові, шоків та алергічні стани, різні запальні процеси та ін. Уведення до схеми лікування цих захворювань препаратів на основі інгібіторів протеолітичних ферментів дозволяє швидко купірувати біль і знизити розвиток патологічного процесу. З цієї метою застосовують інгібітори синтетичного і тваринного походження. Зараз у клініках використовують такі препарати, як контрикал, трасілол, гордокс, амінокапронову кислоту та ін.

Потреба в інгібіторах протеаз задовольняється, в основному, за рахунок препаратів тваринного походження, що імпортуються, і які часто є недоступними для населення через високу вартість, а також можуть ставати джерелом алергізації організму через присутність у їх складі супутніх білків, пігментів та інших домішок. У зв'язку з цим актуальною є задача створення вітчизняних антипротеазних препаратів, особливо, на основі рослинної сировини, а також розробки ефективних способів їх одержання.

Заявляємий спосіб одержання інгібітора трипсину має такі переваги перед прототипом і аналогами:

- збільшення виходу цільового продукту за рахунок оптимізації технологічного процесу;

- спрощення процесу одержання цільового продукту за рахунок зменшення кількості технологічних стадій, скорочення термінів їх проведення (наприклад, відсутність стадії знежирення сировини органічними розчинниками, які негативно впливають на організм людини);

- комплексна переробка рослинної сировини;

- екологічна чистота технології (наприклад, за рахунок підібраних для проведення процесу умов і реактивів, які не проявляють негативного впливу на організм людини), що дозволяє використовувати відходи виробництва (шрот, білки після стадії осадження) як харчові продукти (окара, тофу - соєвий сир);

- отримання цільового продукту високої якості шляхом використання для його виробництва обладнання, що вже є у наявності на вітчизняних хіміко-фармацевтичних підприємствах.

Взаємозв'язок і послідовність технологічних операцій заявляемого способу, підбір режимів і параметрів повністю забезпечують виконання поставленого завдання.

Попереднє набухання насіння сої у середовищі води інтенсифікує технологічний процес одержання інгібітора трипсину.

Вода є найбільш прийнятним розчинником для проведення процесу набухання, тому що являєть-

ся найбільш біологічно придатною складовою частиною рослинної сировини, завдяки чому швидко відбувається її дифузія у клітини і міжклітинний простір. Термін процесу замочування насіння сої, що становить 10 - 12 год., необхідний для повноцінного набухання сировини з метою оптимізації процесу подрібнення, а також підвищення виходу цільового продукту. При тривалості замочування менше заявляємих значень не досягається необхідний рівень набухання насіння, при значеннях більше заявляємих - у воду для замочування відбувається небажане виділення (екстракція) цільового продукту.

Використання води для проведення екстракції обумовлено належною розчинністю цільового продукту у воді, а також необхідністю збереження високого рівня біологічної активності інгібітора трипсину, економією сировини, енерго- і трудовитрат. При цьому зберігається необхідний фармако-терапевтичний ефект цільового продукту.

Подрібнення сировини у середовищі екстрагенту скорочує тривалість технологічного процесу і спрощує його за рахунок об'єднання стадій подрібнення і екстрагування.

Екстрагування цільового продукту водою з подальшим осадженням супутніх білків харчовими кислотами (наприклад, оцтової, лимонної) дозволяє використовувати відходи виробництва (шрот, білки після осадження) як харчові продукти (окара, тофу).

Для успішного здійснення заявляемого способу велика увага була приділена умовам подрібнення рослинної сировини, водної екстракції та очищення цільової речовини, як найвразливішим стадіям процесу, при яких можуть спостерігатися втрати цільового продукту.

Подрібнення і екстракція за заявляємим способом здійснювалися у "щадящому" режимі із застосуванням інтенсивної технології - подрібнення проводилося одночасно з екстракцією при оптимальному співвідношенні екстрагент-сировина, у певних температурних і часових умовах екстрагування, завдяки чому зберігається біологічна активність цільового продукту. Таким чином, в заявляемому способі не застосовували подрібнення рослинної сировини загальноприйнятими способами, при яких спостерігається місцеве перегрівання, окислення і осмолування сировини, внаслідок чого відбувається розклад діючої сполуки і зменшується її біологічна активність, а отже, погіршується якість цільового продукту.

Відділення екстракту від шроту проводять за допомогою центрифугування у зв'язку з тим, що при цьому зменшуються втрати екстракту, отримується більш очищений екстракт, скорочуються терміни проведення стадії фільтрації.

Очистку екстракту від супутніх білків здійснюють шляхом додавання лимонної або оцтової, або трихлороцтової кислот, або сульфату кальцію, або хлориду кальцію, концентрації яких підібрані експериментальним шляхом. Додавання кислот, наприклад, лимонної або оцтової (до рН 2,0 - 4,0) обумовлено вибірковою денатурацією супутніх білків при очищенні інгібітора трипсину, які осаджуються у кислому середовищі, а додавання сульфату чи хлориду кальцію (до концентрації 0,20 -

0,25%) обумовлено виборчим осадженням супутніх білків іонами цих солей. Менша концентрація цих реагентів не дозволяє повністю осадити супутні білки, більша - недоцільна.

Очистку екстракту від супутніх білків здійснюють також шляхом центрифугування та діалізації до відсутності в ультрафільтраті білків та пігментів. Метод діалізації дозволяє швидко видалити кислоту з екстракту і очистити цільовий продукт від низькомолекулярних домішок (білків, пігментів) з подальшим концентруванням екстракту для стадії афінної хроматографії.

Адсорбція інгібітора трипсину на біоспецифіч-

ному сорбенті дозволяє скоротити кількість стадій при очищенні цільового продукту. Умови проведення афінної хроматографії визначені експериментально. При використанні інших посадкових буферів зі значенням рН менше заявляємим не відбувається сорбції інгібітора на сорбенті, при значеннях рН більше заявляємим відбувається денатурація ліганду (трипсину), зв'язаного з матрицею сорбенту.

При значеннях рН елююючого буферу вище заявляємим не відбувається процес десорбції цільового продукту з колонки.

Порівняльний аналіз заявляемого способу і способу-прототипу

Спосіб-прототип		Заявляємий спосіб	
Стадія	Тривал. год	Стадія	Тривал. год
1. Подрібнення насіння сої до одержання муки.	0,1	1. Замочування 5 кг насіння сої при температурі (4 - 8)°C для набухання протягом 11 год., після чого воду зливають.	11,0
2. Знежирення соєвої муки.	12,0	2. Заливка насіння сої 50л води очищеної і подрібнення сировини у середовищі екстрагенту до отримання частинок не більше 15 - 20мкм.	0,5
3. Промивка 80% спиртом етиловим 1000г знежиреної муки з насіння сої при перемішуванні при 20 - 25°C протягом 30хв., фільтрація під вакуумом (фільтрат відкидають).	0,5	3. Відділення екстракту шляхом центрифугування отриманої маси при 1000 - 2000g протягом 10 - 15хв. або фільтрацією під вакуумом.	0,5
	0,5		
4. Екстракція знежиреної муки шляхом суспендування у 5000мл 0,25N сірчаної кислоти при 20 - 25°C протягом 1год. при періодичному перемішуванні.	1,0	5. Видалення (осадження) супутніх білків з екстракту шляхом додавання до екстракту лимонної кислоти або оцтової кислоти, або трихлороцтової кислоти, або сульфату кальцію, або хлориду кальцію.	1,0
5. Відділення екстракту від шроту фільтрацією під вакуумом (осад відкидають).	1,0	6. Відділення осаду білків від екстракту центрифугуванням при 1000 - 2000g протягом 10 - 15хв. або фільтрацією під вакуумом.	0,5
6. Видалення (осадження) супутніх білків з екстракту шляхом додавання до кислого фільтрату 20г суміші, що вміщує рівні частини бентоніту і супер-селу, перемішування протягом 10хв.	0,1	7. Обробка одержаного екстракту інгібітора трипсину на ультрафільтраційній установці шляхом його діалізації та концентрації до 1,0 - 1,5л.	2,0
7. Фільтрація отриманої суспензії (отримання фільтрату), промивки осаду двома порціями по 125мл води (промивні води). Осад відкидають.	0,5	8. Очищення інгібітора трипсину за допомогою афінної хроматографії.	3,5
8. Адсорбція інгібітора на бентоніті шляхом повільного додавання при перемішуванні 100г суміші бентоніту і супер-селу до фільтрату, який об'єднали з промивними водами після операції №3.	0,5	8.1. Сорбція на хроматографічній колонці з трипсин-сефарозою (або з трипсин-целюлозою, або ензайт-трипсином, або трипсин-тойоперлом) з попереднім урівноваженням 0,045 - 0,050M трис-HCl буфером з рН 7,0 - 8,0.	1,5
9. Фільтрація отриманої суспензії, промивка осаду на фільтрі двома порціями по 125мл води (фільтрат і промивні води відкидають).	0,5	8.2. Відмивання колонки від неспецифічно зв'язаних білків цим же буфером з подальшою промивкою розчином 0,5 - 0,7M натрію хлориду. Видаляють буфер водою очищеною.	1,0

Стадія	Тривал. Год	Стадія	Тривал. Год
10. н фу піридином і діаліз шляхом розмішування бентонітового осаду у 270мл води, підігрівання отриманої суспензії до 25°C, додавання при перемішуванні 30мл піридину.	2,0	8.3. Елюювання інгібітора трипсину підкисленою до pH 2,0 – 2,5 водою або підкисленою водою з додаванням 0,15 – 0,20М натрію хлориду або 0,2 – 0,25М калію хлориду.	2,0
11. Фільтрація (декілька годин), промивка осаду на фільтрі 200мл 5% розчину піридину у воді, об'єднання фільтрату з промивною рідиною.	3,0	9. Відмивання елюату електродіалізом або діафільтрацією з подальшим концентруванням.	1,0
12. Відмивання елюату діалізом проточною водою на протязі 10 – 12год. У целофанових трубках.	10 – 12	10. Стерильна фільтрація (для ін'єкційних або н фузійних розчинів, або для стерильних мазей та інших стерильних місцевих лікарських засобів), розливання у ємності.	0,5
13. Видалення інертного матеріалу з діалізованого розчину шляхом доведення до pH 5,3 додаванням соляної кислоти, з подальшим додаванням при перемішуванні 4г суміші бентоніту і супер-селу.	0,5	14. Висушування продукту шляхом ліофілізації.	36,0
14. Фільтрація під вакуумом, промивка осаду водою (осад відкидають).	1,0	Вихід інгібітора трипсину становить 8,0 – 10,0г з 5кг сировини (0,16 – 0,20)%.	Всього 61 год.
15. Перше осадження інгібітора з об'єданого фільтрату і промивної води (з операції №11) шляхом охолодження до 5°C, доведення 1N соляною кислотою до pH 4,65, фільтрації (фільтрат відкидають). Вага осаду 10 – 12г.	12,0		
16. Друге осадження інгібітора шляхом суспендування отриманого осаду при перемішуванні у 100мл води, охолодженої до 5°C, додаванням по краплям 1N розчину гідроксиду натрію до повного розчинення осаду (pH не вище 6,4), нагріванні прозорого розчину до 25°C, титрування 1N соляною кислотою до слабого осаду, додаванням 2г супер-селу, фільтрації осаду, промивки на фільтрі водою; шляхом об'єднання фільтрату та промивної води, охолодження до 5°C, титрування до pH 4,65, фільтрації (фільтрат відкидають). Вихід осаду становить 8 – 10г.	12,0		
	0,5		
17. Кристалізація шляхом розтирання осаду в 10мл холодної води до отримання суспензії, нагрівання до температури 35° С, додавання по краплям при ретельному перемішуванні 0,5N розчину гідроксиду натрію до повного розчинення осаду і до pH 5,2, кристалізації при 35 – 37°C протягом 5 – 6год., відділення осаду за допомогою центрифугування.	6,0		

Стадія	Тривал. Год	Стадія	Тривал. Год
18. Перекристалізація отриманого кристалічного осаду при розмішуванні у подвійній кількості холодної води і титруванні 0,5N розчином гідроксиду натрію (pH 6,0) до отримання прозорого розчину, який нагрівають до 35°C і титрують 0,5N розчином соляної кислоти (pH 5,1) до отримання слабого осаду, додавання 2г супер-селу, фільтрація; додавання до фільтрату затравки, витримання при температурі 36 - 37°C на протязі 5 - 6год. (поступово утворюється густа суспензія кристалів); центрифугування; додавання розчину 0,2N соляної кислоти до pH 5,1, вводять затравку і розчин залишають ще на декілька годин при 36 - 37°C для отримання додаткової порції кристалів, яку відділяють так, як описано вище (можна ще отримати кристали з кінцевого відстою, якщо його охолодити до 5°C і додати 0,25 об'єму холодного 95% спирту етилового, як описано у наступному розділі).	12,0		
19. Кристалізація з розбавленого спирту розмішуванням отриманих кристалів у п'ятикратному об'ємі холодної води і додаванням по краплям розчину 0,5N гідроксиду натрію до повного розчинення кристалів (pH не вище 6,6). Титрування прозорого розчину 0,2N соляної кислоти (pH 5,2), додавання до утвореного осаду супер-селу з розрахунку 4г на 100мл розчину, відділення осаду, промивання його на фільтрі водою; охолодження фільтрату до 5°C, додавання 1/4 об'єму охолодженого 95% спирту етилового для утворення осаду; додавання розчину 0,2N HCl до pH 5,0 і витримання суміші при 30°C (аморфний осад перетворюється на протязі 2год. у кристалічний). Відстій розчину кожну годину декантують, доводять розчином соляної кислоти до pH 5,0 і повертають до основної ємності. Так повторюють на протязі декількох годин до повного припинення появи осаду при pH 5,0; після цього суміш, яка кристалізується, витримують ще 30хв. при 30°C).	0,5		
	0,5		
	1,0		
	2,0		
	4,0		
	0,5		
20. Фільтрація осаду, висушування при кімнатній температурі протягом 24год.	24,0		
21. Перекристалізація із спирту етилового сухих кристалів шляхом суспендування у тридцятикратному об'ємі холодної води, витримання 5 - 10хв і кристалізація з розбавленого спирту по операції №19.	26		
Вихід інгібітора трипсину становить 1,0г з 1000г сировини (0,1%).	Всього 136,2год.		

Виходячи з даних порівняльної таблиці, завдяки заявляемому способу одержання інгібітора трипсину вихід цільового продукту підвищується у 1,5 - 2,0 рази, кількість стадій технологічного процесу

значно зменшується, тривалість у часі скорочується більше, ніж у 2 рази. Крім того, у заявляемому способі відсутні екологічно- та пожежонебезпечні розчинники, які є необхідними для здійснення спо-

субу-прототипу, наприклад, піридин, етиловий спирт, розчинники, що застосовуються для знежирення соєвої муки.

Результати доклінічних досліджень свідчать, що специфічна активність цільового продукту, одержаного по заявляемому способу з рослинної сировини, співвідносна з активністю препарату порівняння "Контрикал" на основі сировини тваринного походження.

Таким чином, у заявляемому винаході повністю виконується задача по створенню високоефективного способу одержання інгібітора трипсину з рослинної сировини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Авторское свидетельство СССР N 698623, кл. А 61 К 37/64. Оpubл. 25.11.79. Бюл. "Открытия, изобретения, промышленные образцы, товарные знаки", N43.
2. Авторское свидетельство СССР №1162081, кл. А 61 К 35/78. Оpubл. офиц. бюл. „Открытия, изобретения", 1985, №22.

3. Авторское свидетельство №1439782, кл. А 61 К 37/64. Оpubл. офиц. бюл. „Открытия, изобретения", 1988, №43.

4. Авторское свидетельство СССР №1412063, кл. А 61 К 37/64. Оpubл. офиц. бюл. „Открытия, изобретения", 1988, №27.

5. Сухинин В.Н., Березин В.А., Новиков Ю.Ф. и др. Очистка и некоторые свойства ингибитора трипсина из вегетативных органов люцерны. // Ж. Биохимия, 1981, Т. 46, вып. 7, с. 1183 - 1187.

6. Зимачева А.В., Мосолов В.В. Ингибиторы цистеиновых протеиназ из семян сои. Ж. Биохимия, 1995, Т. 60, вып. 1, с. 118 - 123.

7. Патент України №23548, кл. А 61 К 35/00. Оpubл. офиц. бюл. "Промислова власність", 1998, №4.

8. Нортрон Д., Кунитц М., Хорриотт Р.М. Кристаллический ингибитор трипсина из соевых бобов. // Кн. Кристаллические ферменты, - М.; Изд. "Иностранная литература", 1950. - С. 260 - 265 (прототип).