



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 56613

(13) A

(51) 7 A61K35/55, 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТУ ТИМОСОМІНУ

1

2

(21) 2002076360

(22) 30 07 2002

(24) 15 05 2003

(46) 15 05 2003, Бюл. №5, 2003 р

(72) Нікольський Ігор Сергійович, Васильєв Валерій Миколайович, Нікольська Валентина Василівна, Галицька Світлана Миколаївна

(73) ІНСТИТУТ ГІГІЄНИ ТА МЕДИЧНОЇ ЕКОЛОГІЇ
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб отримання препарату тимосоміну шляхом гомогенізації тканини тимусу, центрифугування, обробки ацетоном, який відрізняється тим, що гомогенізацію здійснюють в 65-75% охолоджену розчині ацетону і після центрифугування надосадову рідину упарюють, а потім здійснюють діаліз

Винахід відноситься до технології отримання лікарських препаратів з матеріалів ссавців, зокрема з виличкової залози, і може бути використаний в медицині та ветеринарії

Відомий спосіб отримання препарату з тимусу [Авторское свидетельство СССР № 662103, кл. А61К 37/00 опубл. 15 05 79] шляхом гомогенізації тканини тимусу, діалізу гомогенату, осадження баластних речовин солями двовалентної ртуті, обробки надосадовою рідиною аміаком та газоподібним сірководнем, очищення та ліофілізації, при цьому звільнення від ртуті відбувається за допомогою сірководню

Недоліком даного способу отримання препарату є використання в процесі отримання токсичних речовин

Відомий спосіб отримання імуностимулятора [Авторское свидетельство СССР № 1112606, кл. А61К 37/02, 37/24, опубл. 1984г.], що складається з гомогенізації тканини тимусу, екстракції протягом 60 годин 3% оцтовою кислотою в присутності хлористого цинку, обробки надосадовою рідиною п'ятьма об'ємами ацетону і витримку 20 годин

Недоліками виділеного імуностимулятора є невисока активність, наявність баластних речовин і потреба в значних витратах часу на його отримання

Найбільш близьким до запропонованого способу за суттю є спосіб отримання препарату Т-активіну з тканини тимусу [Иммунобиология гормонов тимуса под ред. Ю.А. Гриневича, Б.Э. Чеботарева - Киев Здоров'я, 1989 - С 103-106] шляхом гомогенізації, аутолізу, багаторазового

центрифугування, осадження ацетоном, ліофілізації, розділення на колонці з сефадексом

Недоліком даного способу отримання препарату є довготривалість (в середньому процес отримання готового продукту займає 72 - 120 годин). Виконання способу потребує складного апаратурного оформлення та значних енерговитрат

В основу створення винаходу ставиться завдання отримання препарату тимосоміну шляхом гомогенізації в 65 - 75% охолоджену розчині ацетону, центрифугування, упарювання надосадовою рідиною та діалізу, що дозволить отримати високоактивний ліпосомний препарат гормонів тимусу

Покладене завдання досягається тим, що в способі отримання препарату тимосоміну шляхом гомогенізації тканини тимусу, центрифугування, обробки ацетоном, гомогенізація здійснюється в 65-75% охолоджену розчині ацетону і після центрифугування надосадову рідину упарюють та діалізують

В лабораторних умовах отримання препарату здійснювалось наступним чином

Тканини тимусу подрібнювали і заливали охолодженим до -15 - -20°C 65 - 75% розчином ацетону при співвідношенні тканини до розчину ацетону 1,2,5 - 3,0 та гомогенізували. Отриману після гомогенізації суміш витримували на протязі 20хв при 5 - 10°C і потім центрифугували при 2500 - 3000об/хв на протязі 30 - 40хв при 5 - 10°C. Осад відкидали, а надосадову рідину упарювали при 40°C на роторному випарюванні або на водяній бані при 60 - 70°C для часткового видалення ацетону

(13) A

(11) 56613

(19) UA

Після упарювання розчин центрифугували та звільняли від залишків ацетону діалізом проти 0,14М фосфатного буферу (pH7,6) Після діалізу отримали опалесцюючий розчин, який містив навантажені тимічними гормонами ліпосоми

Приклад 1

До 100г подрібненої тканини тимусу додавали 300мл охолодженого до -15 - -20°C 65% розчину ацетону та гомогенізували (14000об/хв, 1хв, 4°C) Отриману суміш витримували 20 хвилин при 5°C та центрифугували (3000об/хв, 35хв, 5°C) Отриману надосадову рідину (280мл) упарювали на водяній бані при 60°C Упарений розчин (82мл) центрифугували (3000об/хв, 35хв, 5°C) та діалізували проти 0,14М фосфатного буферу (pH7,6) Після діалізу отримали опалесцюючий розчин (78мл)

Концентрація білка [O H Lowry et al, 1946]- 2,06мг/мл

Активність препарату визначали за тестом [Bach J P et al, 1973] відновлення чутливості спонтанних розеткоутворюючих клітин селезінки тимектомованих мишей до анти-Thy-1-сироватки Активність препарату складала 1,28мкг/мл, тобто та його мінімальна концентрація, при якій спостерігалась 50% редукція кількості розеткоутворюючих клітин

Приклад 2

До 100г подрібненої тканини тимусу додавали 300мл охолодженого до -15 - -20°C 70% розчину ацетону та гомогенізували (14000об/хв, 1хв, 4°C) Отриману суміш витримували 20 хвилин при 5°C та центрифугували (3000об/хв, 35хв, 5°C) - Отриману надосадову рідину (278мл) упарювали на водяній бані при 60°C Упарений розчин (81мл) центрифугували (3000об/хв, 35хв, 5°C) та діалізували проти 0,14М фосфатного буферу (pH7,6) Після діалізу отримали опалесцюючий розчин (76мл)

Концентрація білка - 1,85мг/мл

Активність препарату складала 1,33мкг/мл

Приклад 3

До 100г подрібненої тканини тимусу додавали 300мл охолодженого до -15 - -20°C 75% розчину ацетону та гомогенізували (14000об/хв, 1хв, 4°C) Отриману суміш витримували 20 хвилин при 5°C та центрифугували (3000об/хв, 35хв, 5°C) Отриману надосадову рідину (286мл) упарювали на водяній бані при 60°C Упарений розчин (89мл) центрифугували (3000об/хв, 35хв, 5°C) та діалізували проти 0,14М фосфатного буферу (pH7,6) Після діалізу отримали опалесцюючий розчин (81мл)

Концентрація білка - 1,52мг/мл

Активність препарату складала 1,46мкг/мл

Приклад 4

До 100г подрібненої тканини тимусу додавали 300мл охолодженого до -15 - -20°C 80% розчину ацетону та гомогенізували (14000об/хв, 1хв, 4°C) Отриману суміш витримували 20 хвилин при 5°C та центрифугували (3000об/хв, 35хв, 5°C) Отриману надосадову рідину (290мл) упарювали на водяній бані при 60°C Упарений розчин (94мл) центрифугували (3000об/хв, 35хв, 5°C) та діалізували проти 0,14М фосфатного буферу (pH7,6) Після діалізу отримали опалесцюючий розчин (89мл)

Концентрація білка - 7,8мг/мл

Активність препарату складала 82мкг/мл

Приклад 5

До 100г подрібненої тканини тимусу додавали 300мл охолодженого до -15 - -20°C 80% розчину ацетону та гомогенізували (14000об/хв, 1хв, 4°C) Отриману суміш витримували 20 хвилин при 5°C та центрифугували (3000об/хв, 35хв, 5°C) Отриману надосадову рідину (274мл) упарювали на водяній бані при 60°C Упарений розчин (78мл) центрифугували (3000об/хв, 35хв, 5°C) та діалізували проти 0,14М фосфатного буферу (pH7,6) Після діалізу отримали опалесцюючий розчин (70мл)

Концентрація білка - 0,1мг/мл

Активність препарату складала 475мкг/мл

Порівняльна характеристика препарату тимосому та препарату Т-активіну (див табл

Таблиця

Препарат тимосомін	Препарат Т-активін
Ліпосомний препарат	Розчинний препарат
Розмір ліпосом 20 - 100нм, кількість в 1мл препарату $2,1 - 8,5 \times 10^8$	
Білкова частина препарату представлена набором поліпептидів з молекулярною масою від 1200 до 6000 дальтон - 25,7кД	Препарат містить суміш поліпептидів з молекулярною масою від 1200 до 6000 дальтон
Активність препарату 1,2 - 1,5мкг/мл	Активність препарату 1 - 5мкг/мл

Таким чином, запропонований спосіб отримання препарату тимосому дозволяє отримати високоактивний (1,2 - 1,5мкг/мл) препарат гормонів тимусу в ліпосомній формі