



УКРАЇНА

(19) UA (11) 89094 (13) C2
(51) МПК
A61K 35/50 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРЕПАРАТУ З ПЛАЦЕНТИ

1

(21) а200801876

(22) 13.02.2008

(24) 25.12.2009

(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.

(72) КУРИЩУК КОСТЯНТИН ВАСИЛЬОВИЧ, ДІДЕНКО НАТАЛІЯ ЮРІЇВНА

(73) КУРИЩУК КОСТЯНТИН ВАСИЛЬОВИЧ, ДІДЕНКО НАТАЛІЯ ЮРІЇВНА

(56) UA 81358 C2, 25.12.2007

UA 20041211004 C2, 15.12.2006

UA 2000074267 A, 15.02.2002

UA 2710 A1, 15.04.1994

RU 2 138 273 C1, 27.09.1999

JP 10130300 A, 19.05.1998

(57) 1. Спосіб одержання препарату з плаценти, що включає охолодження плацентарної тканини, подрібнення, екстрагування плаценти водою і змішування екстракту з натрію хлоридом, який **відрізняється** тим, що охолодження плацентарної тканини здійснюють заморожуванням її до температури -20 °С з наступним витримуванням протягом 3-10 діб при температурі 4-12 °С, екстрагування плаценти водою проводять шляхом нагрівання і витримування при температурі 90-95 °С протягом 0,5-1,0 год. при перемішуванні з наступним підвищенням температури до 100 °С і кип'ятінні протягом 1-15 хв., суміш екстракту з натрію хлоридом перемішують при температурі 100 °С

2

протягом 0,75-1,0 год. та здійснюють послідовно освітлювальну і стерилізуючу фільтрації.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що додатково перед екстрагуванням подрібнену плаценту витримують при температурі 1-5 °С протягом 5-10 год.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для екстрагування використовують воду для ін'єкцій.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що натрію хлорид додають у кількості 0,0067-0,0082 г/мл.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перемішування при екстрагуванні плаценти здійснюють зі швидкістю обертання мішалки 12-18 об./хв.

6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перемішування екстракту плаценти з натрію хлоридом здійснюють зі швидкістю обертання мішалки 12-18 об./хв.

7. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при освітлювальній фільтрації розчин пропускають через фільтри "CUNO" марки SP 30 та SP 60, отриманий фільтрат прогрівають при температурі 100 °С і перемішуванні при 12-18 об./хв. протягом 15-30 хв., після чого пропускають через мезгу фільтрувального паперу.

8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при стерилізуючій фільтрації використовують фільтри з діаметром пор 0,45 і 0,22 мкм.

Винахід відноситься до біотехнології, зокрема до виготовлення препарату з плацентарної тканини людини чи тварини і може бути використаний в медицині, косметології, ветеринарії.

Найбільш близьким є спосіб одержання препарату з плаценти, що включає охолодження плацентарної тканини, подрібнення, екстрагування плаценти водою і змішування екстракту з натрію хлоридом (UA, патент №20274, А, кл. А61К 35/50, опубл. 15.07.1997, Бюл. №7, 1997). У відомому способі охолодження плацентарної тканини здійснюють шляхом витримування її при температурі 2°С протягом 6-ти діб, екстрагування плаценти проводять апірогенною водою шляхом кип'ятіння протягом 5-ти хв., до отриманої зависі додають хлорид натрію (до ізотонії), автоклавують при

температурі 120°С протягом 1 год. і розливають до ампул.

Недоліком відомого способу є невисока біологічна активність отриманого препарату через відсутність набору біогенних амінокислот, притаманних плацентарній тканині, та наявність домішок.

Задачею винаходу є удосконалення способу одержання препарату з плаценти, в якому за рахунок запропонованої обробки плацентарної тканини забезпечується отримання вискоєфективного препарату з набором притаманних їй біогенних амінокислот та зменшення кількості домішок.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом одержання препарату з плаценти, що включає охолодження плацентарної тканини, подрібнення, екстрагування плаценти водою і змі-

(13) C2

(11) 89094

(19) UA

шування екстракту з натрій хлоридом, в якому охолодження плацентарної тканини здійснюють заморожуванням її до температури (- 20)°C з наступним витримуванням протягом 3...10 діб при температурі 4...12°C, екстрагування плаценти водою проводять шляхом нагрівання і витримування при температурі 90...95°C протягом 0,5...1,0 год. при перемішуванні з наступним підвищенням температури до 100°C і кип'ятінні протягом 10... 15хв., розчин екстракту з натрій хлоридом перемішують при температурі 100°C протягом 0,75...1,0 год. та здійснюють послідовно освітлювальну і стерилізуючу фільтрації.

Перед екстрагуванням подрібнену плаценту краще витримати при температурі 1...5°C протягом 5... 10 год., а для екстрагування використовувати воду для ін'єкцій.

Натрій хлорид додають у кількості 0,0067...0,0082г/мл.

Перемішування при екстрагуванні плаценти та перемішування екстракту плаценти з натрій хлоридом здійснюють зі швидкістю обертання мішалки 12...18об./хв.

При освітлювальній фільтрації розчин пропускають через фільтри «CUMO» марки SP 30 та SP 60, отриманий фільтрат прогрівають при температурі 100°C і перемішуванні три 12...18об./хв. протягом 15...30хв., потім розчин пропускають через мезгу фільтрувального паперу.

При стерилізуючій фільтрації використовують фільтри з діаметром пор 0,45 і 0,22мкм.

Експериментально нами встановлено, що проведення екстрагування плаценти водою в режимі нагрівання і витримування при температурі 90...95°C з наступним кип'ятінням у сукупності з наступними освітлювальною і стерилізуючою фільтраціями екстракту плаценти з хлоридом натрію, відбувається ефективно при попередньому охолодженні плацентарної тканини до температури (- 20)°C з наступним витримуванням при температурі 4...12°C.

Спосіб здійснюється таким чином.

Плацентарну тканину охолоджують заморожуванням до температури (- 20)°C і витримуванням протягом 3...10 діб при температурі 4...12°C. Омити і звільнену від оболонки плацентарну тканину подрібнюють і, краще, витримують при температурі 1...5°C протягом 5... 10 год. Подрібнену плацентарну тканину поміщають до реактору з мішалкою, додають воду, краще воду для ін'єкцій, нагрівають і витримують при температурі 90...95°C протягом 0,5...1,0 год. при обертанні мішалки зі швидкістю 12...18об./хв., після чого температуру доводять до 100°C і кип'ятять протягом 10...15хв. Суспензію плаценти фільтрують через нутч-фільтр і збирають до реактору з мішалкою. До фільтрату додають натрій хлорид у кількості 0,0067...0,0082г/мл і перемішують при температурі 100°C протягом 0,75...1,0 год. при швидкості обертання мішалки 12...18об./хв. Отриманий розчин подають на освітлювальну і стерилізуючу фільтрації. При освітлювальній фільтрації розчин спочатку пропускають через фільтри «CUNO» марки SP 30 та SP 60, отриманий фільтрат прогрівають при температурі 100°C і перемішуванні при 12...18об./хв. протягом

15...30хв., розчин пропускають через мезгу фільтрувального паперу, збирають в ємність та подають на стерилізуючу фільтрацію, яку здійснюють через фільтри з діаметром пор 0,45 і 0,22мкм.

Отриманий препарат з плаценти характеризується набором притаманних плаценті біогенних амінокислот та зменшеною кількістю домішок. Для контролю біогенних амінокислот в запропонованому препараті плаценти використовували метод ВЕЖХ з використанням передколоночної дериватизації з 2,4-динітрофторбензолом. При цьому хроматографія проводилась за умов:

колонка Kromasil C18 розміром 150х4,6мм, заповнена сорбентом з розміром частинок 5мкм;

рухома фаза 0,045М розчин додецилсульфату натрію, що містить 15% (об./об.) льодяної оцтової кислоти;

довжина хвилі детектування - 360нм; температура колонки - 40°C; швидкість рухомої фази - 1,0мл/хв.

Пробу препарату плаценти готували таким чином: 2,0мл препарату плаценти поміщали в мірну колбу (на 25мл), додавали 5мл боратного буфера з рН 9,18, додають 5мл метанолу і 1мл 1%-ного розчину 2,4-динітрофторбензолу в ізопропані. Розчин витримували на киплячій водяній бані протягом 70хв. Потім розчин охолоджували і доводили до мітки рухомою фазою.

Вміст пептидів визначали таким чином. Препарат з плаценти у кількості 1мл поміщали в мірну колбу місткістю 10мл, розчиняли у 0,9%-ному розчині хлориду натрію, доводили об'єм розчину тим самим розчинником до мітки і перемішували. Потім 1мл одержаного розчину поміщали в пробірку, додавали 3,5мл розчину реактиву 1 (ГФ Х1, вип.2, с. 34), перемішували і витримували при кімнатній температурі 10хв. До розчину додавали 0,5мл розчину реактиву ФОЛІНА розбавленого водою у співвідношенні 1:1. Через 40хв. вимірювали оптичну густину одержаного розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 750нм в кюветі з товщиною шару 10мм.

Нижче наведені приклади демонструють винахід, але не обмежують його.

Приклад 1

40кг плацентарної тканини заморожують до температури (- 20)°C, розміщують в холодильній камері при температурі 12°C у нержавіючому сталюму закритому контейнері і витримують протягом 5 діб. Потім плацентарну тканину омивають у нержавіючій сталій ємності, звільняють від оболонок, подрібнюють і витримують при температурі 1°C протягом 10 год.

Подрібнену плацентарну тканину поміщають до реактору з мішалкою додають 210л води для ін'єкцій, нагрівають при перемішуванні зі швидкістю 14об./хв. до температури 90°C протягом 0,5 год. Потім температуру доводять до 100°C і кип'ятять протягом 10хв.

Суспензію плаценти фільтрують через нутч-фільтр і збирають до реактору з мішалкою. До фільтрату додають 1,8кг натрій хлориду і перемішують при 12об./хв. при температурі 100°C протягом 1,0 год.

Отриманий розчин подають на освітлювальну і

стерилізуючу фільтрації. Спочатку розчин пропускають через фільтри «CUNO» марки SP 30 та SP 60, отриманий фільтрат збирають до реактору з мішалкою і прогрівають при перемішуванні зі швидкістю 12об./хв. і температурі 100°C протягом 30хв. Потім розчин пропускають через мезгу фільтрувального паперу і збирають до нержавіючої сталльної ємності. Із нержавіючої сталльної ємності розчин подають на стерилізуючу фільтрацію, яку здійснюють через фільтри з діаметром пор 0,45 і 0,22мкм.

Отримують стерильний прозорий препарат плаценти. Вихід препарату з плаценти - 160л.

Вміст біогенних амінокислот та пептидів визначали як описано вище. Отримані дані наведені у Таблиці.

Приклад 2.

10кг плацентарної тканини заморожують до температури (- 20)°C, розміщують в холодильній камері при температурі 8°C у нержавіючому сталльному закритому контейнері і витримують протягом 7 діб. Потім плацентарну тканину омивають у нержавіючій емальованій ємності, звільняють від оболонок, подрібнюють і витримують при температурі 4°C протягом 5 год.

Подрібнену плацентарну тканину поміщають до реактору з мішалкою додають 100л води для

ін'єкцій, нагрівають при перемішуванні зі швидкістю 18об./хв. до температури 90°C протягом 0,6 год. Потім температуру доводять до 100°C і кип'яють протягом 15хв.

Суспензію плаценти фільтрують через нутч-фільтр і збирають до реактору з мішалкою. До фільтрату (85л) додають 800г натрій хлориду і перемішують при 18об./хв. при температурі 100°C протягом 1,0 год.

Отриманий розчин подають на освітлювальну і стерилізуючу фільтрації. Спочатку розчин пропускають через фільтри «CUNO» марки SP 60 та SP 30, отриманий фільтрат збирають до реактору з мішалкою і прогрівають при перемішуванні зі швидкістю 18об./хв. і температурі 100°C протягом 15хв. Потім розчин пропускають через мезгу фільтрувального паперу і збирають до нержавіючої сталльної ємності. Із нержавіючої сталльної ємності розчин подають на стерилізуючу фільтрацію, яку здійснюють через фільтри з діаметром пор 0,45 і 0,22мкм.

Отримують стерильний прозорий препарат плаценти. Вихід препарату з плаценти - 65л.

Вміст біогенних амінокислот та пептидів визначали як описано вище. Отримані дані наведені у Таблиці.

Таблиця

ПОКАЗНИКИ	ВМІСТ, мг/мл	
	ПРИКЛАД 1	ПРИКЛАД 2
АМІНОКИСЛОТИ		
гістидин	0,152	0,125
аргінін	0,415	0,340
орнітин	0,000	0,000
О-пролін	0,100	0,000
аспарагінова кислота	0,452	0,350
треонін	0,229	0,210
серин	0,245	0,230
глутамінова кислота	0,635	0,540
пролін	0,288	0,210
гліцин	0,350	0,350
аланін	0,301	0,270
цистин	0,005	0,008
валін	0,213	0,008
метіонін	0,070	0,050
ізолейцин	0,168	0,220
лейцин	0,402	0,310
тироксин	0,143	0,086
фенілаланін	0,208	0,165
ПОЛІПЕПТИДИ		
	1,2	1,15

Як видно з Таблиці, запропонований спосіб забезпечує отримання високоефективного препа-

рату з плаценти, що має набір притаманних плаценті біогенних амінокислот та пептидів.