



УКРАЇНА

(19) UA (11) 23159 (13) A

(51)5 A 61 K 37/00

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті  
на підставі Постанови Верховної Ради України  
№ 3769-XII від 23 XII 1993 рПублікується  
в редакції заявника

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФІБРИНОГЕНУ З СІРОВИНИ-ПЛАЗМИ КРОВІ ЛЮДИНИ

1

(21) 96093647

(22) 23.09.96

(24) 19.05.98

(46) 31.08.98. Бюл. № 4

(47) 19.05.98

(72) Веремеєнко Кузьма Микитович, Заболотний Дмитро Ілліч, Кізім Олександра Йосипівна, Заневська Людмила Йосипівна, Ворисевич Ольга Сергіївна

(73) Київський науково-дослідний інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка, Київська міська станція переливання крові

2

(57) Способ получения фибриногена из сырья – плазмы крови человека путем добавления к ней осадителя – полиэтиленгликоля и отличающийся тем, что в качестве сырья используют полученную из плазмы крови 1-ю фракцию белков по Кону – отходы промышленного производства препаратов крови, а в качестве осадителя добавляют полиэтиленгликоль – 6000 при его конечной концентрации, равной 4,4 %.

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано в различных областях хирургии.

Известны способы получения фибриногена из плазмы крови человека путем его осаждения глицином, этанолом, сернокислым аммонием, криопреципитацией и полиэтиленгликолем [Kazal L.A., Amsel S., Miller O.R., Tocanis L.N., Preparation and some properties of fibrinogen precipitated from human plasma by glycine. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1963. – Vol. 113 – P. 989–994; Sledentop K.H., Harris D.M., Sanchez B. Autologous fibrin tissue adhesive. // Laryngoscope. – 1985. – Vol. 95 – N 9. P. 1074–1077; Durham L.H., Wellatt Dof., Jung M.W. et al. A method for preparation of fibrin glue. // of. Laryngol. Otol. – 1987. – Vol. 101. – N 11. – P. 1182–1186;

Dresdale A., Rose E.A., Juvanandam V. et al. Preparation of fibrin glue from single-

donor fresh frozen plasma // Surgery. – 1987. – Vol. 97. – N 6. – P. 750–755;

Wiesman R.A., Torsiglieri A.J., Schreiber A.D., Epstein J.H. Biochemical characterization of autologous fibrinogen adhesive // Laryngoscope. – 1987. – № 10. – P. 1186–1190. Masri N.A., Masri S.A., Boyg N.D. Isolation of human fibrinogen of high purity and in high yield using polyethylene glycol 1000 // Tromb. Haemost. – 1983. – Vol. 42. – P. 116–119; Титаева Е.В., Добровольський А.Б., Титов В.Н. Простой метод выделения высокоочищенных препаратов фибриногена из плазмы человека // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 29–32].

Недостатками способов осаждения фибриногена криопреципитацией, этанолом, глицином, сернокислым аммонием являются:

1) использование в качестве сырья дорогостоящей плазмы крови человека;

(19) UA (11) 23159 (13) A

2) необходимость выделения фибриногена при низких температурах,

3) относительно низкие выход и чистота конечного продукта (соответственно 20–40% и 11–33%);

4) невозможность длительного хранения фибриногена в растворенном состоянии.

Наиболее близким по технической сущности является способ выделения фибриногена из плазмы крови человека путем его осаждения полиэтиленгликолем – 1000 [Weisman R.A., Torsiglieri A.J., Epstein L.H. Biochemical characterization of autologous fibrinogen adhesive// Laryngoscope. – 1987. – Vol 97. – № 1. – P. 1186–1190].

Недостатком способа, принятого за прототип, является:

1) относительно небольшой выход фибриногена – 39–64%, средняя величина – 52%;

2) невысокая чистота препарата (43–62%, в среднем 52%);

3) получение фибриногена в виде раствора, который быстро денатурируется при хранении.

Изобретение направлено на разработку такого способа выделения фибриногена, который позволит получить более дешевый конечный продукт, повысить его выход, чистоту, концентрацию, а также удлинить сроки хранения до 2–3 лет.

Задача состоит в том, чтобы разработать способ получения высокоочищенного, лиофильно высушенного препарата фибриногена в стерильном виде из дешевого сырья, что позволит его использовать в качестве основного компонента полимера фибрина – лекарственного средства, обладающего склеивающим, кровоостанавливающим и стимулирующим заживлением ран свойством.

Реализация данного изобретения позволит повысить технологию и КПД получения препарата, снизить его стоимость, что позволит применить его в составе полимера фибрина при различных хирургических операциях.

Для решения поставленной задачи разработан способ, в котором, согласно изобретению, в качестве дешевого сырья для получения фибриногена используют 1-ую фракцию белков плазмы крови по Кону, осадитель – полиэтиленгликоль – 6000, а также получают белок в лиофилизированном виде.

Отличительной особенностью предлагаемого способа является та, что фибриноген с высоким выходом (61–90%), относительно высокой концентрацией (34–52 мг/мл) и чистоты (61–80%) получают из отходов промышленного производства препаратов

крови, что значительно удешевляет стоимость конечного продукта.

Использование линейного полимера полиэтиленгликоля – 6000 имеет то преимущество перед другими осадителями, что позволяет избирательно осадить фибриноген при комнатной температуре, не вызывая денатурации белка. Применение ПЭГ–6000, а не ПЭГ–1000, в прототипе, и ПЭГ–6000, как в работе Титаевой Е.В. и соавт. (1988), позволяет повысить выход конечного продукта с 39–64 и 30% до 61–90%.

Получение фибриногена в лиофильном виде при помощи заявляемого способа способствует удлинению срока хранения без потери функциональной активности белка.

Промышленная применимость данного белка. При помощи заявляемого способа получен лиофильно высушенный стерильный препарат фибриноген, который найдет применение как компонент полимера фибрина – лекарственного средства, повышающего результативность оперативных вмешательств в различных областях хирургии благодаря адгезивному, гемостатическому и ускоряющему процессы регенерации в поврежденных тканях средству.

Пример. Получение фибриногена из 1-й фракции белков плазмы крови по Кону.

50 г навески замороженной 1-й фракции белков плазмы крови по Кону суспендируют в 200 мл, 0,9%-ного раствора натрия хлорида, помещают в водяную баню (37°C) и растворяют при помешивании. Нерастворимые частицы 1-й фракции удаляют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость используют как источник фибриногена. К 200 мл надосадочной жидкости по каплям добавляют 160 мл 10%-ного раствора полиэтиленгликоля – 6000 (ПЭГ–6000), инкубируют 30 мин при температуре 20–23°C, затем центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. (Конечная концентрация ПЭГ–6000 составляет 4,4%). Полученный осадок (концентрат фибриногена) растворяют в 200 мл 0,06 М цитрата натрия, разливают по 5 мл во флаконы и лиофилизируют. После завальцовки флаконов содержимое стерилизуют. Количество белка, свертываемого тромбином, определяют по методу В.А. Белицера и соавт. (1983), а общий белок – по биурету. Характеристика препаратов фибриногена, полученным заявляемым способом приведена в таблице. Из нее видно, что содержание белка, свертываемого тромбином в конечном продукте варьировало от 34 до 52 мг/мл, что превышает аналогичную величину в прототипе, – 13,4–47,5 мг/мл. Соотношение фибриногена к общему белку, по которому

судят о чистоте препарата, было также выше (61–90%), чем в прототипе (39–64%). Эти данные свидетельствуют о том, что заявляе-

мый способ получения фибриногена является более эффективным по сравнению с прототипом и аналогами.

Характеристика препаратов фибриногена, полученных заявляемым способом и в прототипе

Препараты фибриногена	Концентрация белка в конечном продукте, мг/мл	Концентрация белка, свертываемого тромбином, мг/мл	Соотношение фибриногена к общему белку, %	Выход фибриногена, %
Полученные	Пределы колебаний			
предлагаемым способом	41,3–71,0	34,1–52,0 М <sub>среднее</sub>	61,0–87,0	61,0–90,0
	53,8	39,0	72,0	74,2
Полученные по прототипу	21,7–110	13,4–47,5 М <sub>среднее</sub>	43,0–62,0	39,4–64,6
	61,0	31,8	52,0	52,4

Упорядник

Техред М.Келемеш

Коректор М. Керецман

Замовлення 4526

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

