



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 88561

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 35/30

A61P 7/06 (2009.01)

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

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АНТИГЕМОЛІТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ

1

(21) а200802820

(22) 04.03.2008

(24) 26.10.2009

(46) 26.10.2009, Бюл.№ 20, 2009 р.

(72) ІВАНОВА НІНА МИКОЛАЇВНА

(73) ІВАНОВА НІНА МИКОЛАЇВНА

(56) SU 1267655 A 21.12.84

SU 957908 A 15.09.1982

SU 1080825 A 23.08.1984

(57) Спосіб одержання антигемолітичного препарату, який включає гомогенізацію мозку великої рогатої худоби, його зневоднювання ацетоном, екстракцію ліпідів петролейним ефіром, видалення петролейного ефіру, обробку осаду, який утворився, хлороформом, видалення домішок, осадження ліпідів, розчинення осаду та осадження цільового

2

продукту, який відрізняється тим, що екстракцію ліпідів виконують спочатку етанолом, видаляють етанол та петролейний ефір упарюванням, 1/3 об'єму спиртово-хлороформного розчину ліпідів випарюють до зникнення запаху хлороформу, залишають на 18 годин при температурі $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ для випадання осаду ліпідів, осад ліпідів знову розчинюють в хлороформі, потім ліпіди осаджують етанолом при співвідношенні 1:4, знову залишають на 18 годин при температурі $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, видаляють спиртово-хлороформний розчин центрифугуванням, одержаний осад розчиняють в хлороформі, хлороформ випарюють, додають фізіологічний розчин та багаторазово обробляють препарат до одержання ліпосом розміром 160-180 нм, ліпосоми стерилізують.

Винахід відноситься до медичної промисловості та стосується способу одержання антигемолітичного препарату, який може бути використаним в медицині.

Відомий спосіб одержання препарату фосфатидилетаноламіну, який включає обробку сировини ацетоном з наступною екстракцією фосфоліпідів та виділенням цільового продукту (З. №34449870/28-13, 30.03.1982).

Однак вміст фосфатидилетаноламіну в одержаному комплексі складає тільки 18-23 %, що недостатньо для використання такого фосфоліпідного комплексу в якості антигемолітичного засобу.

Відомий також спосіб одержання препарату фосфатидилетаноламіну, який включає обробку сировини ацетоном з наступною екстракцією фосфоліпідів і виділенням цільового продукту. В якості сировини використовують головний мозок великого рогатого скота. Із обробленої ацетоном сировини екстракцію фосфоліпідів проводять петролейним ефіром при співвідношенні сировини і петролейного ефіру 1:4-1:6 та виділяють цільовий продукт обробкою екстракту спочатку ацетоном при співвідношенні екстракту та ацетону 1:1,5-1:2,5, а згодом етанолом при співвідношенні екст-

ракту і етанолу 1:2-1:3 (А.с. №1104707 А, 25.02.1983).

Відомий спосіб одержання препарату фосфатидилетаноламіну, який включає гомогенізацію мозку великого рогатого скота, зневоднювання його ацетоном, екстракцію фосфоліпідів петролейним ефіром, видалення петролейного ефіру, обробку осаду, який утворився, органічним розчинником, видалення домішок, осадження фосфоліпідів ацетоном, розчинення осаду в органічному розчиннику і осадження цільового продукту етанолом. В якості органічного розчинника використовують хлороформ. Осад фосфоліпідів змішують з сухим осадом дицетилфосфату і розчиняють в хлороформі. Згодом осаджують фосфоліпіди етанолом, випарюють хлороформ, додають фізіологічний розчин та обробляють суміш фосфоліпідів з фізіологічним розчином ультразвуком. Таким чином підвищують антифосфоліпазну активність цільового продукту (А.с. №1267655 А, 21.12.1984).

Даний спосіб одержання антигемолітичних препаратів є найбільш близьким до того, що заявляється, по технічній суті та результату, який може бути отриманим, тому його обрано в якості прототипу.

(13) C2

(11) 88561

(19) UA

В основу винаходу покладено задачу розширення арсеналу способів підвищення антигемолітичної активності цільового продукту.

Задачу, яку покладено в основу винаходу, вирішують тим, що у відомому способі одержання антигемолітичного препарату, який включає гомогенізацію мозку великого рогатого скота, його зневоднювання ацетоном, екстракцію ліпідів петролейним ефіром, видалення петролейного ефіру, обробку осаду, який утворився, хлороформом, видалення домішок, осадження ліпідів, розчинення осаду та осадження цільового продукту, згідно з винаходом, екстракцію ліпідів виконують спочатку етанолом, видаляють етанол та петролейний ефір упарюванням, 1/3 об'єму спиртово-хлороформного розчину ліпідів випарюють до зникнення запаху хлороформу, залишають на 18 годин при температурі $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ для випадання осаду ліпідів, осад ліпідів знову розчиняють в хлороформі, з тим ліпідом осаджують етанолом при співвідношенні 1:4, знову залишають на 18 годин при температурі $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, видаляють спиртово-хлороформний розчин центрифугуванням, одержаний осад розчиняють в хлороформі, хлороформ випарюють, додають фізіологічний розчин та багаторазово продавляють препарат до одержання ліпосом розміром 160-180 нм, ліпосоми стерилізують.

Спосіб, що заявляється, здійснюють наступним чином:

Бичачий мозок відділяють від сполучної тканини та мозкової оболонки. Тонко нарізають і гомогенізують в охолодженому ацетоні для зневоднювання. Затим ацетон декантирують, до осаду додають охолоджений ($-1,0^{\circ}\text{C}$) ацетон і шуттелірують при 0°C в перебігу 2 годин. Суміш центрифугують при 3000 об/хв. на холоді, видаляючи ацетон. До залишку додають етанол і екстрагують ліпіди в перебігу 2 годин при кімнатній температурі і безперервному перемішуванні. Осад відділяють, центрифугуванням, одержують розчин ліпідів в етанолі, а до осаду додають петролейний ефір і екстрагують ліпіди. Затим осад відділяють центрифугуванням, а до осаду додають ще раз петролейний ефір та повторно екстрагують ліпіди. Спиртовий та петролейні екстракти об'єднують, випарюють на роторному випарнику під вакуумом при температурі не вище 37°C до сухого залишку. Одержаний залишок розчиняють в хлороформі, додають ацетон та залишають на 18 годин при 4°C . Залишок, який випав, розчиняють в хлороформі, осаджують етиловим спиртом. Випарюють 1/3 об'єму спиртово-хлороформного розчину ліпідів до зникнення запаху хлороформу. Залишають на 18 годин при температурі $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Видаляють спиртовий розчин центрифугуванням. Одержаний осад розчиняють в хлороформі, ліпіди знову осаджують етанолом, осад знову розчиняють в хлороформі. Із одержаного ліпідного комплексу випарюванням видаляють залишок хлороформу, до суміші ліпідів додають фізіологічний розчин, озвучують. Фільтрують на стерилізуючих фільтрах.

Спосіб ілюструють наступні приклади:

Приклад 1. 1 кг свіжозамороженого мозку великої рогатої худоби відокремлюють від сполучної тканини і мозкової оболонки, тонко нарізають і

гомогенізують в 5 л охолодженого ацетону для зневоднювання, потім ацетон декантирують, а до осаду додають 5 л охолодженого ацетону ($-1,0^{\circ}\text{C}$) і шуттелірують при 0°C в перебігу 2 годин, суміш центрифугують при 3000 об/хв на холоді, видаляючи ацетон. До залишку додають 3 л етанолу й екстрагують ліпіди протягом 2 годин при кімнатній температурі і безупинному перемішуванні, осад відокремлюють центрифугуванням, одержують розчин ліпідів в етанолі, а до осаду додають 5 л петролейного ефіру й екстрагують ліпіди. Потім осад відокремлюють центрифугуванням, а до осаду додають ще раз 5 л петролейного ефіру і повторно екстрагують ліпіди. Спиртовий і петролейні екстракти поєднують, випарюють на роторному випарнику під вакуумом при температурі не вище 37°C до сухого залишку, одержуючи 300 г продукту. Отриманий залишок розчиняють у 500 мл хлороформу, додають 2500 мл ацетону і залишають на 30 хв. при 4°C , осад, що випав, розчиняють у хлороформі і повторно осаджують ацетоном, виділяють 150 г ліпідного комплексу, який розчиняють у 300 мл хлороформу, додають 1200 мл етанолу, випарюють на 1/3 частину обсягу до зникнення запаху хлороформу, залишають на 18 годин при 4°C для випадання осаду ліпідів. Розчиняють осад ліпідів, що випав (100 г), у 300 мл хлороформу і знову осаджують ліпіди 1500 мл етанолу, залишають на 18 годин при 4°C для випадання осаду ліпідів. Розчиняють осад ліпідів, що випав, у 300 мл хлороформу, додають 300 мл 0,1% розчину NaCl, перемішують, видаляють домішки. З отриманого ліпідного комплексу (80 г) випарюванням видаляють залишок хлороформу, до суміші ліпідів додають 1 л фізіологічного розчину, суспендують і продавляють отриманий препарат на екструдері протягом 30 хвилин до одержання прозорого опалесцентного розчину ліпосом з розміром часток 160 нм, після чого проводять стерилізуючу фільтрацію на фільтрах «Millipore» для одержання стерильного антигемолітичного ліпідного препарату.

Одержують 1,0 л готового препарату.

Визначення антигемолітичної активності проводять за наступною схемою:

До еритроцитів барана додають гемолітичну сироватку і комплемент. Потім до однієї частини суміші додають антигемолітичний ліпідний препарат, а в контрольні пробірки додають в такій же кількості фізіологічний розчин. У контрольних пробірках без ліпідного препарату еритроцити цілком руйнуються, а в присутності препарату еритроцити не лізуються.

До еритроцитів хворих на пароксизмальну нічну гемоглобінурію додають сироватку здорових людей і 0.2 % розчин HCl. Потім до однієї частини суміші додають антигемолітичний ліпідний препарат, а в контрольні пробірки додають в такій же кількості фізіологічний розчин. У контрольних пробірках без ліпідного препарату еритроцити руйнуються, а в присутності препарату еритроцити не лізуються.

До еритроцитів барана додають 0.0041 % розчин лаурилового сульфату, оскільки саме ця концентрація викликає повний гемоліз у межах 10 хв. Потім до однієї частини суміші додають антигемо-

літичний ліпідний препарат, а в контрольні пробірки додають в такій же кількості фізіологічний розчин. У контрольних пробірках без ліпідного препарату еритроцити цілком руйнуються, а в присутності препарату еритроцити не лизуються.

До еритроцитів барана додають деіонізовану воду. Кількість води розраховують для одержання гемолізу протягом 10 хвилин при 20°C. Потім до однієї частини суміші додають антигемолітичний ліпідний препарат, а в контрольні пробірки додають в такій же кількості фізіологічний розчин. У контрольних пробірках без ліпідного препарату еритроцити цілком руйнуються, а в присутності препарату еритроцити не лизуються.

Отриманий комплекс показує 100%-ну антигемолітичну активність.

Приклад 2. Виділення ліпідного комплексу проводять, як у прикладі 1. До залишку додають 3,5 л етанолу й екстрагують ліпіди протягом 2 годин при кімнатній температурі і безупинному перемішуванні, осад відокремлюють центрифугуванням, одержують розчин ліпідів у етанолі, а до осаду додають 5 л петролейного ефіру й екстрагують ліпіди. Потім осад відокремлюють центрифугуванням, а до осаду додають ще раз 5 л петролейного ефіру і повторно екстрагують ліпіди. Спиртовий і петролейний екстракти поєднують, випарюють на роторному випарнику під вакуумом при температурі не вище 37°C до сухого залишку, одержуючи 300 г продукту. Отриманий залишок розчиняють у 500 мл хлороформу, додають 2500 мл ацетону і залишають на 30 хв. при 4°C, осад, що випав, розчиняють у хлороформі і повторно осаджують ацетоном, виділяють 150 г ліпідного комплексу, який розчиняють у 300 мл хлороформу, додають 1200 мл етанолу, випарюють на 1/2 частину обсягу до зникнення запаху хлороформу, залишають на 18 годин при 4°C для випадання осаду ліпідів. Розчиняють осад ліпідів, що випав (100 г), у 300 мл хлороформу і знову осаджують ліпіди 1500 мл етанолу, залишають на 18 годин при 4°C для випадання осаду ліпідів. Розчиняють осад ліпідів, що випав, у 300 мл хлороформу, додають 300 мл 0,1% розчину NaCl, перемішують, видаляють домішки. З отриманого ліпідного комплексу (80 г) випарюванням видаляють залишок хлороформу, до суміші ліпідів додають 1 л фізіологічного розчину, суспендирують і продавляють отриманий препарат на екструдері протягом 35 хвилин до одержання прозорого опалесцентного розчину ліпосом з розміром часток 180 нм, після чого проводять стерилізуючу фільтрацію на фільтрах «Millipore» для одержання стерильного антигемолітичного ліпідного препарату.

Одержують 1,0 л готового препарату.

Отриманий комплекс показує 100%-ну антигемолітичну активність і цілком затримує гемоліз еритроцитів, викликаний дією комплекменту і гемолітичної сироватки, детергентом (лаурил сульфат)

і при гіпотонії (додавання деіонізованої води), а також гемоліз еритроцитів хворих на пароксизмальну нічну гемоглобінурію.

Приклад 3. Виділення ліпідного комплексу проводили, як у прикладі 1. До залишку додають 2,8 л етанолу й екстрагують ліпіди протягом 2 годин при кімнатній температурі і безупинному перемішуванні, осад відокремлюють центрифугуванням, одержують розчин ліпідів в етанолі, а до осаду додають 5 л петролейного ефіру й екстрагують ліпіди. Потім осад відокремлюють центрифугуванням, а до осаду додають ще раз 5 л петролейного ефіру і повторно екстрагують ліпіди. Спиртовий і петролейний екстракти поєднують, випарюють на роторному випарнику під вакуумом при температурі не вище 37 °C до сухого залишку, одержуючи 300 г продукту. Отриманий залишок розчиняють у 500 мл хлороформу, додають 2500 мл ацетону і залишають на 30 хв. при 4°C, осад, що випав, розчиняють у хлороформі і повторно осаджують ацетоном, виділяють 150 г ліпідного комплексу, який розчиняють у 300 мл хлороформу, додають 1200 мл етанолу, випарюють на 1/4 частину обсягу до зникнення запаху хлороформу, залишають на 18 годин при 4°C для випадання осаду ліпідів. Розчиняють осад ліпідів, що випав (100 г), у 300 мл хлороформу і знову осаджують ліпіди 1500 мл етанолу, залишають на 18 годин при 4°C для випадання осаду ліпідів. Розчиняють осад ліпідів, що випав, у 300 мл хлороформу, додають 300 мл 0,1% розчину NaCl, перемішують, видаляють домішки. З отриманого ліпідного комплексу (80 г) випарюванням видаляють залишок хлороформу, до суміші ліпідів додають 1 л фізіологічного розчину, суспендирують і продавляють отриманий препарат на екструдері протягом 35 хвилин до одержання прозорого опалесцентного розчину ліпосом з розміром часток 170 нм, після чого проводять стерилізуючу фільтрацію на фільтрах «Millipore» для одержання стерильного антигемолітичного ліпідного препарату.

Одержують 1,0 л готового препарату.

Отриманий комплекс показує 100%-ну антигемолітичну активність і цілком затримує гемоліз еритроцитів, викликаний дією комплекменту і гемолітичної сироватки, детергентом (лаурил сульфат) і при гіпотонії (додавання деіонізованої води), а також гемоліз еритроцитів хворих на пароксизмальну нічну гемоглобінурію.

Визначення кількісного і якісного складу проводять за допомогою препаративної ТСХ у системі розчинників: хлороформ : метанол : вода (65:25:4) для фосфо- і гліколіпідів, петролейний ефір : діетиловий ефір : оцтова кислота (8:20:1) для нейтральних ліпідів. Ідентифікацію ліпідів проводять за допомогою природних і синтетичних ліпідів, а також за допомогою кольорових реакцій на визначення ліпідних сполучень. Концентрацію всіх ліпідів визначають по сухих залишках.

Фізико-хімічні властивості препарату приведені в таблиці

Фізико-хімічні та біологічні властивості	Прототип	Препарат, який заявляється
Антигемолітична активність, %	75	100
Концентрація, %	4	2,6
В'язкість, відн. од.	1,8	1,5
Індекс окисленості	0,1-0,3	0,1-0,2
pH	6,7-7,2	7-7,2
Токсичність	Нетоксичний	Нетоксичний
Пирогенність	Апирогенний	Апирогенний
Нешкідливість	Нешкідливий	Нешкідливий
Стерильність	Стерильний	Стерильний

Таким чином, із таблиці видно, що у порівнянні прототипом, антигемолітична активність збільшилася в 1,5 рази.

з препаратом, отриманим за способом-