



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61200 (13) A

(51) 7 A61K35/16

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ ЦЕРУЛОПЛАЗМІН

1

2

(21) 2002065099

(22) 20 06 2002

(24) 17 11 2003

(46) 17 11 2003, Бюл. № 11, 2003 р.

(72) Курищук Костянтин Васильович, Бердинських  
Ніна Костянтинівна, Рядська Лариса Семенівна,  
Лялюшко Надія Максимівна(73) Курищук Костянтин Васильович, Бердинських  
Ніна Костянтинівна, Рядська Лариса Семенівна,  
Лялюшко Надія Максимівна(57) Спосіб одержання лікарського препарату це-  
рулоплазміну шляхом гомогенізації відходів вироб-  
ництва імуноглобулінів або альбумінів в розчині

хлористого натрію, сорбції на іонообміннику, елюції і очищення препарату етиловим спиртом і сумішшю спирт-хлороформу, стерилізуючої фільтрації та ліофілізації, який відрізняється тим, що сорбцію церулоплазміну проводять розчином хлористого натрію при рН 5,0-5,2, елюцію прово-  
дять 0,24-0,26М розчином хлористого натрію при рН 5,5, а розчин церулоплазміну після спиртового і спирт-хлороформного очищення піддають ульт-  
рафільтрації на порожнистих волокнах під 100 до 150кД та витримують при t=80°C протягом 10 го-  
дин

Винахід відноситься до технології одержання ферменту крові людини - церулоплазміну і може бути використаний при виробництві медичних пре-  
паратів

Церулоплазмін - мідьвмісний фермент плазми крові. Він виконує функцію транспорту міді, будучи донором іонів  $Cu^{2+}$  для ферментів дихання, окис-  
лює більшість біологічно активних сполук, має ан-  
тиоксидантні і радіопротекторні властивості, необ-  
хідний для кровотворення. Цей фермент  
відноситься до групи білків "гострої фази", що  
здійснюють захист організму від шкідливого впли-  
ву чинників хімічної, фізичної та біологічної приро-  
ди.

Як лікарський препарат, церулоплазмін був  
створений вченими Інституту експериментальної  
патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавець-  
кого НАН України та спеціалістами Київського  
державного підприємства по виробництву бакте-  
рійних препаратів "Біофарма" і зареєстрований в  
Україні 11 10 1996 року за №11/96/322/6

Церулоплазмін - ефективний препарат для лі-  
кування важкохворих (септичні процеси, серцево-  
судинні, онкологічні захворювання) і надання до-  
помоги в екстремальних ситуаціях (важкі травми,  
опіки, опромінення). Особливо показане застосу-  
вання церулоплазміну у хворих, що перенесли  
термінальний стан різного генезу (патент України

№22022, 1997). Хороші результати застосування  
церулоплазміну одержані при лікуванні хворих з  
гострим та хронічним остеомієлітом, ревматизмом,  
інфекційним ендокардитом, ішемічною хворобою  
серця

Церулоплазмін рекомендований МОЗ України  
для лікування залізодефіцитних, гемолітичних, а  
також нормохромних анемії у осіб, які працювали і  
продовжують працювати в зоні Чорнобильської  
АЕС, при цьому лікування іншими засобами, в то-  
му числі препаратами заліза, у цих хворих, як пра-  
вило, не ефективне (Інформаційне письмо  
№165-95 МОЗ України «О нововведеннях в сис-  
темі здравоохранения»)

Випускається церулоплазмін Київським дер-  
жавним підприємством по виробництву бактерій-  
них препаратів "Біофарма"

Відомі способи одержання церулоплазміну  
ґрунтуються на сорбції його на ДЕАЕ-сорбенти з  
наступним очищенням методами сольового або  
спиртового осадження, гельфільтрації, перекрис-  
талізації (патент UA №2019, 1994)

Суттєвим недоліком відомих промислових  
способів одержання церулоплазміну є великі втра-  
ти його в процесі виділення на різних технологіч-  
них етапах, відсутність стадії термічної обробки  
для забезпечення вірусологічної безпеки у відпо-  
відності з вимогами міжнародних стандартів

(13) A

(11) 61200

(19) UA

Найбільш близьким способом того ж призначення до заявленого способу, який ми беремо за прототип, є спосіб одержання церулоплазміну, що включає гомогенізацію відходів виробництва імуноглобулінів в розчині хлористого натрію, сорбцію на іонообміннику, елюцію і очищення препарату етиловим спиртом і сумішшю хлороформ-етиловий спирт, стерилізуючу фільтрацію та ліофілізацію (Патент України №1319, МПК<sup>6</sup> А61К35/16, 1989) Ця технологія забезпечує досить низький вихід церулоплазміну (в межах 0,4-0,5г на 1кг осаду)

Причини, що перешкоджають при використанні прототипу одержати очікуваний технічний результат, обумовлені тим, що умови сорбції і елюції церулоплазміну з іонообмінника не дозволяють досягти оптимального виходу церулоплазміну і очистки його від баластних білків Крім того, за відомою технологією не забезпечуються необхідні вимоги міжнародного стандарту щодо вірусологічної безпеки препаратів, оскільки, недостатня очистка церулоплазміну за відомим способом призводила б до втрати ферментативної активності в умовах довготривалого витримувannya його при високій температурі

В основу винаходу, що заявляється покладено завдання удосконалення способу одержання церулоплазміну шляхом зміни рН та молярності розчину хлористого натрію при сорбції та елюції, умов ультрафільтрації та стерилізуючої фільтрації забезпечити збільшення виходу кінцевого продукту, не погіршуючи його фізико-хімічних характеристик, спрощення і здешевлення технології та дотримання міжнародних норм стерилізації для одержання лікарського апрогенного препарату

Поставлене завдання вирішується тим, що у відомому способі одержання церулоплазміну шляхом гомогенізації відходів виробництва імуноглобулінів в розчині хлористого натрію, сорбції на іонообміннику, елюції і очищення етиловим спиртом і сумішшю хлороформ-етиловий спирт, стерилізуючої фільтрації та ліофілізації, згідно з винаходом сорбцію церулоплазміну проводять розчином хлористого натрію при рН 5,0-5,2, а елюцію проводять 0,24-0,26М розчином хлористого натрію при рН 5,5, а розчин церулоплазміну після спиртового і спирт-хлороформного очищення піддають ультрафільтрації на порожнистих волокнах від 100 до 150кД і витримують при  $t=60^{\circ}\text{C}$  протягом 10 годин

При сорбції 0,07-0,09М розчином хлористого натрію при рН 5,0-5,2 досягається оптимальна сорбція церулоплазміну і не відбувається суттєвої сорбції інших білків

Елюція 0,24-0,26М розчином хлористого натрію при рН 5,5 перешкоджає вимиванню баластних білків з іонообмінника, що дозволяє на даному етапі одержати максимально чистий розчин церулоплазміну

На етапі ультрафільтрації на порожнистих волокнах від 100 до 150кД після спиртового і спирт-хлороформного очищення доводять ступінь очистки до такого рівня, що подальше витримувannya його при  $t=60^{\circ}\text{C}$  протягом 10 годин, як це вимагається за міжнародним стандартом для досягнення вірусологічної безпеки, не призводить до втрати

церулоплазміном фізико-хімічних властивостей і його ферментативної активності

Спосіб одержання церулоплазміну здійснюється шляхом гомогенізації відходів виробництва імуноглобулінів або альбумінів, як донорської так і ретроплацентарної крові в 0,05М розчині хлористого натрію, сорбції церулоплазміну на ДЕАЕ-целюлозі при рН 5,0-5,2 і відмивання баластних білків 0,07-0,09М розчином хлористого натрію при рН 5,0-5,2, елюції церулоплазміну 0,24-0,26М розчином хлористого натрію при рН 5,5, осадження білків етанолом в кінцевій концентрації 65-75 об%, розчинення осаду в 0,25 М розчині хлористого натрію, осадження баластних денатурованих білків сумішшю етанол-хлороформ (24-26об% і 2-4об% відповідно) при рН 5,2-5,3 і  $t=24-26^{\circ}\text{C}$ , відділення осаду центрифугуванням, осадження кінцевого продукту із надосадної рідини, витримуючи її протягом 12 годин при  $t=-10^{\circ}\text{C}$  в присутності етилового спирту з кінцевою концентрацією 45-55об%, розчинення осаду в фізіологічному розчині, ультрафільтрації розчину на порожнистих волокнах від 100 до 150кД та прогрівання розчину при  $t=60^{\circ}\text{C}$  протягом 10 годин Одержаний розчин церулоплазміну після стерилізуючої фільтрації розливають в ампули чи флакони і зберігають у вигляді розчину чи ліофілізують

Цей спосіб повністю задовольняє вимоги міжнародних стандартів щодо вірусологічної безпеки препаратів

Суть винаходу пояснюється конкретними прикладами виконання

#### Приклад I

3кг фракції IV по Кону сироватки донорської крові гомогенізують в 30л 0,05М розчину хлористого натрію при  $t=5^{\circ}\text{C}$  До гомогенату додають 0,3кг ДЕАЕ-целюлози Доводять рН до 5,0 додаванням 0,135л 1н соляної кислоти Суміш залишають при слабкому перемішуванні на 18 годин при  $t=5^{\circ}\text{C}$  Церулоплазмін, сорбований целюлозою відмивають від баластних білків на нутч-фільтрі через бавовняну тканину охолодженням до  $t=5^{\circ}\text{C}$  0,07М розчином хлористого натрію при рН 5,0 до тих пір, поки оптична щільність промивної рідини на виході стане не менше 0,1 при  $E_{280}$  Потім сорбент переносять в хроматографічну колонку і проводять елюцію церулоплазміну 0,25М розчином хлористого натрію при рН 5,5 і  $t=0^{\circ}\text{C}$  Одержують 1,3л елюату з оптичною щільністю при  $E_{610}$  рівною 0,275 і рН 5,42 Доводять рН суміші до 6,8 додаванням 2мл 1н пугу (NaOH), додають 3,9л охолодженого до  $t=-2^{\circ}\text{C}$  98% етилового спирту (кінцева концентрація 75об%) і перемішують протягом 1 години Після витримувannya протягом 1 години при  $t=-2^{\circ}\text{C}$  суміш центрифугують протягом 2-х годин при 16000об/хв Потім 51г осаду розчиняють в 0,5л 0,25М розчину хлористого натрію при  $t=5^{\circ}\text{C}$  і центрифугують протягом 2-х годин при 16000об/хв для відокремлення денатурованих баластних білків, що не розчинилися Доводять рН надосадної рідини до 5,2 1н розчином соляної кислоти і додають 0,13л 96% етилового спирту і 0,28л хлороформу (кінцева концентрація спирту 24-26об% і хлороформу 2-4об%) Суміш перемішують протягом 30 хвилин і осад, що утворився, відділяють центрифугуванням при 16000об/хв протягом 1 го-

дини 0,65л центрифугату перемішують з 0,89л 96% етилового спирту (кінцева концентрація спирту 55%), витримують 12 годин при  $t = -10^{\circ}\text{C}$  і центрифугують 1 годину при 16000об/хв. Осад церулоплазміну, що утворився розводять в 70% етиловому спирті і відділяють центрифугуванням протягом 1 години при 3000об/хв і потім розчиняють його в 0,155л 0,85М фізіологічного розчину хлористого натрію і центрифугують протягом 30 хвилин при 3000об/хв.

Для видалення слідів хлороформу і спирту церулоплазмін піддають ультрафільтрації через порожнисті волокна від 100 до 150кД. Одержують 0,156л розчину церулоплазміну з концентрацією 20,1мг/мл. Вихід цільового препарату приблизно 1,3г на 1кг осаду, оптичний коефіцієнт 0,036 біологічна активність 16 одиниць. Розчин церулоплазміну витримують протягом 10 годин при  $t = 60^{\circ}\text{C}$ , піддають стерилізуючій фільтрації і розливають в ампули.

#### Приклад II

30кг фракції III по Кону сироватки ретроплацетарної крові гомогенізують в 300л 0,05М розчину хлористого натрію при  $t = 5^{\circ}\text{C}$ . До гомогенату додають 3кг ДЕАЕ-целюлози. Доводять рН суміші до 5,0 додаванням 1,350л 1н соляної кислоти. Суміш залишають при слабкому помішуванні на 18 годин при  $t = 5^{\circ}\text{C}$ . Целюлозу з сорбованим на ній церулоплазміном відмивають від баластних білків на нутч-фільтрі через бавовняну тканину охолодженням до  $t = 5^{\circ}\text{C}$  розчином 0,09М хлористого натрію при рН 5,2 до того часу, поки оптична щільність промивної рідини на виході не стане меншою 0,1 при  $E_{280}$ . Потім сорбент переносять в хроматографічну колонку і проводять елюцію церулоплазміну 0,26М розчином хлористого натрію при рН 5,5 і  $t = 0^{\circ}\text{C}$ . Одержують 12л елюату з оптичною щільністю 0,275 при  $E_{610}$ . Доводять рН суміші до 6,8 додаванням 20мл 1н лугу (NaOH), додають 36л охолодженого до  $t = -2^{\circ}\text{C}$  96% етилового спирту (кінцева концентрація 75об%). Після витримання протягом 1 години при  $t = -2^{\circ}\text{C}$  суміш центрифугують при 16000об/хв протягом 2-х годин. Потім 470г осаду розчиняють в 5л 0,25М розчину хлористого натрію при  $t = 5^{\circ}\text{C}$  і центрифугують при 16000об/хв протягом 2-х годин для відділення денатурованих білків, що не розчинилися. Доводять рН надосадної рідини до 5,2 додаванням 1н розчину соляної

кислоти і підігривають до  $t = 25^{\circ}\text{C}$  додають 1,3л 96% етилового спирту і 0,28л хлороформу (кінцева концентрація спирту 24-26об% і хлороформу 2-4об% відповідно). Суміш перемішують протягом 30 хвилин і осад, що утворився, відділяють центрифугуванням при 16000об/хв протягом 1 години. 6л центрифугату перемішують з 7,9л 96% етилового спирту (кінцева концентрація 55%), витримують 12 годин при  $t = -10^{\circ}\text{C}$  і центрифугують 1 годину при 16000об/хв. Осад церулоплазміну, що утворився, розводять в 70 % етиловому спирті і відділяють центрифугуванням протягом 1 години при 3000об/хв, потім розчиняють його в 1,550л 0,85М розчином хлористого натрію і центрифугують протягом 30 хвилин при 3000 об/хв.

Для видалення слідів хлороформу і етилового спирту розчин церулоплазміну піддають ультрафільтрації через порожнисті волокна від 100 до 150кД з розміром пор 0,220мкм. Одержують 1,530л розчину церулоплазміну з концентрацією 20,2мг/мл.

Вихід цільового препарату приблизно 1г на 1кг осаду, оптичний коефіцієнт 0,04, біологічна активність 18 одиниць. Розчин церулоплазміну витримують протягом 10 годин при  $t = 60^{\circ}\text{C}$ , піддають стерилізуючій фільтрації і розливають в ампули.

Як видно з прикладів, вихід цільового продукту збільшився майже в два рази в порівнянні зі способом-прототипом, при цьому біологічна активність препарату не знизилась.

Заявлений спосіб одержання церулоплазміну не вимагає додаткового обладнання і фінансових витрат.

Київське державне підприємство по виробництву бактерійних препаратів "Біофарма" має всі можливості для одержання церулоплазміну заявленим способом. Результати дослідної перевірки церулоплазміну наведені в таблиці. В результаті перевірки дослідних серій церулоплазміну встановлено, що його фізико-хімічні характеристики відповідають вимогам Фармкомітету і Тимчасової фармакопейної статті і зберігаються протягом 2-х років.

Результати випробувань п'яти серій препарату "Розчин церулоплазміну" 2% виготовленого на Державному Київському підприємстві "Біофарма" в процесі зберігання.

Таблица

Районная комиссия на базе АНТ																				
Инициалы серия	Дата привода в суд	Период привода в суд	Описание привода в суд	Справедливость	Продолжительность	Количество	Место привода в суд	Вид привода в суд	Назначение привода в суд	Степень привода в суд	Примечание	Ток привода в суд	Жизненный привод в суд	Назначение привода в суд	К привода в суд	Формирование привода в суд	Выводы привода в суд			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
0-05	15.03- 27.03.96	Вид Провода	Позитивная	Позитивная	Непереносимая	0,38	Видовая	Видовая	Степень	Примечание	Ток	Жизненный	Назначение	К	Формирование	Выводы				
10.09- 24.09.96	6 мес	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,38	Теж	7,0	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,05	0,046	0,03	11	а-53,62% б-46,38%	
18.01- 31.03.97	12 мес	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,38	Теж	6,9	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,04	0,045	0,028	10,5	а-53,62% б-46,38%	
23.01- 7.10.97	18 мес	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,375	Теж	6,95	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,1	0,045	0,026	10,5	а-53,62% б-46,38%	
19.01- 2.04.98	24 мес	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,38	Теж	6,95	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,1	0,045	0,26	10	а-53,62% б-46,38%	
23.01- 5.08.98	27 мес	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,36	Теж	7,0	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,1	0,046	0,025	10	а-53,62% б-46,38%	
26.05- 10.06.96	Вид	Она-лестная рида близ кого ко-льору	Позитивная	Позитивная	Непереносимая	0,5	Видовая	Видовая	Степень	Примечание	Ток	Жизненный	Назначение	К	Формирование	Выводы				
3.12- 17.12.96	6 мес	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,49	Теж	7,0	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,1	0,045	0,029	14,8	а-53,62% б-46,38%	
6.05- 20.05.97	12 мес	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,48	Теж	7,0	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,1	0,045	0,027	14,5	а-53,62% б-46,38%	
25.11- 9.12.97	18 мес	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,48	Теж	7,05	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,1	0,045	0,027	14,0	а-53,62% б-46,38%	
18.05- 1.06.98	24 мес	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,45	Теж	7,0	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,1	0,044	0,027	13,6	а-53,62% б-46,38%	
18.05- 1.06.98	27 мес	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,45	Теж	7,0	Теж	Теж	Теж	Теж	Теж	0,1	0,044	0,027	13,5	а-53,62% б-46,38%	

Продовження таблиці

21297	2.12-26.12.97	Вих	Прозора рідина безжовтого кольору	Позитивна	Позитивна	Позитивна	Не перевищує	0,426	Відповідає	7,12	Відповідає	Відповідає	Стерильний	Апірогенний	Не токсичний	0,005	0,044	0,030	19	$\alpha$ -53,97% $\beta$ -46,03
	4.06-18.06.98	6 міс.	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	0,41	Те ж	7,1	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	0,005	0,04	0,029	17,9	$\alpha$ -53,97% $\beta$ -46,03%
	8.12-22.12.98	12 міс.	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	0,41	Те ж	7,1	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	0,004	0,04	0,029	17,0	$\alpha$ -53,97% $\beta$ -46,03%
	7.06-21.06.99	18 міс.	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	0,4	Те ж	7,0	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	0,004	0,04	0,028	17,0	$\alpha$ -53,97% $\beta$ -46,03%
	13.12-27.12.99	24 міс.	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	0,4	Те ж	7,12	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	0,004	0,04	0,028	15,9	$\alpha$ -53,97% $\beta$ -46,03%
	14.02-28.02.00	27 міс.	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	0,4	Те ж	7,1	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	Те ж	0,005	0,04	0,025	15,5	$\alpha$ -53,97% $\beta$ -46,03%

Зберігання В сухому місці при температурі не вище +5°C

Пакування Серії 30396, 40496 по 5мл в ампули типу ІІ-5, ТУ У 004809-005-96

Серії 50696, 10997, 21297 у флакон ФО ТУ-64-2-10-87