



УКРАЇНА

(19) UA (11) 83631 (13) C2

(51) МПК

A61K 35/50 (2006.01)

C07K 1/34 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ РЕЧОВИНИ, БІОЛОГІЧНО АКТИВНА РЕЧОВИНА І  
ВОДНИЙ ЕКСТРАКТ ПЛАЦЕНТИ СВИНІ

1

(21) 20041211004

(22) 31.12.2004

(24) 11.08.2008

(46) 11.08.2008, Бюл.№ 15, 2008 р.

(72) ЗАЦ ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ, UA, ЗАЦ  
ВІКТОР ВОЛОДИМИРОВИЧ, UA, ЗАЦ ОЛЬГА ВО-  
ЛОДИМИРІВНА, UA, ІВАНОВ ЛЕОНІД ВІКТОРО-  
ВИЧ, UA, БОГЗА СЕРГІЙ ЛЕОНІДОВИЧ, UA, МИ-  
РОНОВ ОЛЕГ ЛЕОНІДОВИЧ, UA(73) ЗАЦ ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ, UA, ЗАЦ  
ВІКТОР ВОЛОДИМИРОВИЧ, UA, ЗАЦ ОЛЬГА ВО-  
ЛОДИМИРІВНА, UA

(56) UA C2 26177 07.06.1999

UA C1 15892 30.06.1997

US A4,054,678 18.10.1977

(57) 1. Спосіб отримання біологічно активної речовини, що включає механічне подрібнення і гомогенізацію плаценти свині, отримання водного екстракту гомогенізату і консервацію екстракту, який **відрізняється** тим, що водний екстракт гомогенізату отримують шляхом його розбавлення дистильованою водою в співвідношенні 0,8-1,2 масових частин води на 1 частину гомогенізату, водну суспензію гомогенізату знебарвлюють додаванням до суспензії 0,006-0,007 масових частин лимонної кислоти, витримують протягом 70-110 хвилин при перемішуванні, потім відстоюють протягом 10-20 хвилин, декантують, консервацію здійснюють шляхом додавання до супернатанту ніпагіну, супернатант з консервантом витримують протягом 45-75 хвилин, після чого з декантированого супернатанту видаляють частки з розмірами більше 3 мкм шляхом фільтрації.

2

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як консервант до супернатанту додають ніпагін в кількості 0,1-0,3 ваг. %.

3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що ніпагін додають у вигляді 5% розчину в пропіленгліколі.

4. Біологічно активна речовина, яка отримана згідно з способом за п. 1 або 2, що включає вільні амінокислоти, пептиди і низькомолекулярні органічні залишки при наступному співвідношенні компонентів, % сухої ваги:

вільні амінокислоти від 100 до 500 Д	21,6-26,6
пептиди від 1000 до 2000 Д	35,3-43,1
пептиди від 3000 до 5000 Д	16,5-20,1
низькомолекулярні органічні залишки менше 100 Д	решта.

5. Водний екстракт плаценти свині, що включає водну фракцію пептидів і вільних амінокислот тканини плаценти свині, ніпагін, пропіленгліколь і знебарвлюючу речовину як допоміжні речовини, який **відрізняється** тим, що містить біологічно активну речовину за п. 4, яка включає водну фракцію пептидів і вільних амінокислот тканини плаценти свині, при наступному співвідношенні компонентів, ваг. %:

біологічно активна речовина	0,1-0,35
ніпагін	0,18-0,22
знебарвлююча речовина	0,3-0,4
пропіленгліколь	2,5-6,0
вода	решта.

6. Водний екстракт плаценти свині за п. 5, який **відрізняється** тим, що як знебарвлюючу речовину містить лимонну кислоту.

Винахід відноситься до області косметології, фармації і медицини, зокрема, до способу отримання біологічно активної речовини, яка є частиною композиції з натуральних компонентів, що отримані з плаценти, самої біологічно активної речовини та водного екстракту плаценти.

Відомий спосіб отримання біологічно активної речовини з людської плаценти, що включає меха-

нічне подрібнення і гомогенізацію плаценти, отримання водного екстракту і обробку екстракту за допомогою електролізу протягом 1-1,5 години (патент РФ №22119903, МПК<sup>7</sup> A61K7/48, 2003р.). У результаті отримують желеподібну масу.

Недоліком цього відомого способу є використання дефіцитної сировини людської плаценти. Крім того, при електролізі водного екстракту пла-

(13) C2

(11) 83631

(19) UA

центи відбувається хімічне розщеплення пептидів, що містяться в екстракті, і появи в суміші продуктів їх розпаду у вигляді окремих амінокислот і не нативних пептидів, внаслідок чого біологічна активність продукту різко падає.

Відомий також спосіб отримання плацентарного протеїну, що включає отримання гомогенату тканини плаценти свині, центрифугування, хроматографування, елюювання пов'язаного білка, осадження елюату і повторне центрифугування, при цьому з хроматографії використовують афінну хроматографію на сефарозі з іммобілізованим конго-червоним носієм, елюювання проводять 1,0 М розчином хлориду калію з додаванням 5% гліцерину, осадження елюату здійснюють при 90%-ном насиченні сульфатом амонію, а після центрифугування осадок додатково піддають фракціюванню в 0,1 М амоній-бікарбонатному буфері з подальшим збором фракцій, що містять цільовий продукт, і їх діалізом (патент РФ №2007417, МПК<sup>5</sup> C07K 3/02, 1994). Цей спосіб дозволяє отримати специфічний плацентарний протеїн свині 2 (ППС-2), який є плаценто специфічним антигеном і може бути використаний як маклер для ранньої діагностики поросності свині, але не як біологічно активна речовина широкого спектра дії, що застосовується в косметології, фармації і медицині.

Відомий спосіб отримання низькомолекулярної фракції з тканин плаценти свині заснований на отриманні низькомолекулярної фракції вагою не більше за 300-350 атомних одиниць за допомогою попереднього подрібнення тканини на кріомлині при температурі від мінус 80°C до мінус 120 °C з подальшим кріосублимаційним фракціонуванням при температурі від мінус 10°C до мінус 20°C у вакуумних камерах при тиску 0,1 мм. рт. ст. і подальшій кріоконденсації на кріогенній панелі, що охолоджується рідким азотом (патент РФ № 2228759, МПК<sup>7</sup> А61К35/50, 05.20.2004.).

Недоліком цього способу є те, що продукт містить фракції, молекулярна маса яких не перевищує 300-350 атомних одиниць, оскільки більш важкі молекули неможливо витягнути методом низькотемпературної сублімації. Тобто в продукті відсутні біологічно активні речовини, наприклад, пептиди з молекулярною масою вище за 300-350 атомних одиниць, які, як відомо, володіють протизапальною дією, є регуляторними обмінних процесів. Низька продуктивність способу і використання складних і кріогенних технологій, що дорого коштують, обумовлюють високу вартість кінцевого продукту, що також є серйозною перешкодою для промислового використання цього відомого способу.

Відповідно, вказані вище недоліки відомого способу обмежують також можливості застосування біологічно активних плацентарних речовин в косметичній і фармакології.

Задачею винаходу є створення нового способу отримання біологічно активної речовини з плаценти свині, який дозволить простим способом отримувати цінний продукт при невисокій вартості.

Іншою задачею винаходу є отримання біологічно активної речовини з новою по складу композицією нативних пептидів плаценти, що володіє високою біологічною активністю при відносно простій технології і невисокій вартості продукту.

Третьою задачею винаходу є створення водного екстракту плаценти свині, при отриманні якого біологічно активна речовина з плаценти свині може бути використана безпосередньо без додаткової обробки або значної зміни складу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі отримання біологічно активної речовини, що включає механічне подрібнення і гомогенізацію плаценти свині, отримання водного екстракту гомогенізату і консервацію екстракту, водний екстракт гомогенізату отримують шляхом його розбавлення дистильованою водою в співвідношенні 0,8-1,2 масових частин води на 1 частину гомогенізату, водну суспензію гомогенізату знебарвлюють додаванням до суспензії 0,006-0,007 масових частин лимонної кислоти, витримують протягом 70-110 хвилин при перемішуванні, потім відстоюють протягом 10-20 хвилин, декантують, консервацію здійснюють шляхом додання до супернатанту ніпагіну, супернатант з консервантом витримують протягом 45-75 хвилин, після чого з декантованого супернатанта видаляють частки з розмірами більше 3 мкм шляхом фільтрації.

Переважає як консервант до супернатанту додають ніпагін в кількості 0,1 - 0,3 ваг. % у вигляді 5% розчину ніпагіну в пропіленгліколі.

Поставлена задача також вирішується тим, що біологічно активна речовина, що отримана згідно з описаним вище способом, включає вільні амінокислоти, пептиди і низькомолекулярні органічні залишки при наступному співвідношенні компонентів, % сухої ваги:

Вільні амінокислоти від 100 до 500 Д	21,6-26,6
Пептиди від 1000 до 2000 Д	35,3-43,1
Пептиди від 3000 до 5000 Д	16,5-20,1
Низькомолекулярні органічні залишки менше за 100 Д	решта.

Поставлена задача також вирішується тим, що водний екстракт плаценти свині, який містить водну фракцію пептидів і вільних амінокислот тканини плаценти свині, ніпагін, пропіленгліколь і знебарвлюючу речовину, як допоміжні речовини, згідно з винаходом, містить описану вище біологічно активну речовину, яка включає водну фракцію пептидів і вільних амінокислот тканини плаценти свині, при наступному співвідношенні компонентів, (ваг. %):

Біологічно активна речовина	0,1 -0,35
Ніпагін	0,18-0,22
Знебарвлююча речовина	0,3 - 0,4
Пропіленгліколь	2,5-6,0
Вода	решта.

Переважає, як знебарвлюючу речовину водний екстракт містить лимонну кислоту.

Більш детально винахід описаний за допомогою приведеного нижче прикладу.

Приклад

Розморожену і ретельно відмиту від крові тканину плаценти свині в кількості 10 кг очистили від слизу, подрібнили ножицями до часток розміром приблизно 50х50 мм і гомогенізували за допомогою електром'ясорубки. Отриманий гомогенізатор залили 10 л охолодженої до 15° С дистильованою водою, ретельно перемісили до отримання однорідної суспензії і додали 70 г лимонної кислоти для знебарвлення суспензії. Для екстракції водорозчинних пептидів суспензію плаценти витримали в ємності протягом 1,5 годин при повільному перемішуванні, після чого дали відстоятися протягом 15 хвилин.

Біологічно-активно речовину у вигляді супернатанту в кількості 10 л декантували і додали до нього 0,5 кг розчину, який містить 20 г нипагіну (як консерванту), що розчинений в 0,5 кг пропіленгліколю. Суспензію ретельно перемішали і витримали протягом 1 години.

Отриманий водний екстракт плаценти відфільтровували за допомогою мембранних фільтрів типу "Мілліпор" з діаметром пір 1-3 мкм.

Отримали 10 л чистого пептидного екстракту плаценти. Водний екстракт розлили по ємностях і вмістили на зберігання в морозильну камеру з температурою мінус 28° С.

Отриманий водний екстракт плаценти є прозорою, злегка жовтуватою, рідиною з характерним слабким запахом, має рН від 3.8 до 4.5.

Сухий залишок складає не менше за 6 і не більше за 7%.

Отриманий водний екстракт плаценти досліджували з допомогою гель-проникаючої високоефективної рідинної хроматографії (ГПВЕРХ).

За даними гель-хроматографії був визначений фракційний склад (по молекулярній масі) водного екстракту плаценти свині.

Прилади і матеріали

Для визначення фракційного складу водного екстракту плаценти використали рідинний хроматограф Waters "Alliance", з програмним забезпеченням Міленіум 32, версія 51.

Умови аналізу:

- колонка TSK SW 2000, розміром 7,5 x 600 мм;

- рухлива фаза: фосфатний буферний розчин з сульфатом натрію - ацетонітрил (90:10), дегазована будь-яким зручним способом.

- швидкість рухливої фази 1мл/хв.;

- об'єм проби 20 мкл.

Приготування рухливої фази

32,21г натрію фосфорнокислого однозаміщеного двоховдного вміщують в мірну колбу місткістю 1 л, розчиняють в 500 мл води, доводять об'єм водою до мітки і перемішують (розчин А).

71,64г натрію фосфорнокислого двозаміщеного дванадцативдного вміщують в мірну колбу місткістю 1л, розчиняють в 500 мл води, доводять об'єм водою до мітки і перемішують (розчин Б).

32,22г натрію сірчаноокислого десятиводного вміщують в мірну колбу місткістю 1 л, розчиняють в 300 мл води, додають 312,5 мл розчину А і 187,5 мл розчину Б, перемішують, додають 100 мл ацетонітрилу, перемішують і доводять об'єм розчину водою до мітки. Результати аналізу представлені в таблиці.

Таблиця

Фракційний склад (по молекулярній масі) водного екстракту плаценти за даними гель-хроматографії ( $\lambda=254$  нм)

Час витримки речовин на колонці (хвилини)	Площа під хроматограф. піком	Площа під хроматограф. піком (в %)	Орієнтовна молекулярна маса, (дальтон)
18.576	2075501	18.29	3000<M<5000
20.062	2332345	39.2	2000<M<1000
20.479	2116487		
21.569	2749469	24.22	100<M<500 (вільні амінокислоти)
22.879	967350	8.52	M<100 (Низькомолекулярні сполуки)
24.471	608547	5.36	
25.571	500830	4.41	

Отриманий водний екстракт відрізняється тим, що містить оптимальну і оригінальну по складу композицію біологічно активних речовин, що включає вільні амінокислоти, пептиди і

низькомолекулярні органічні речовини і придатна для використання у виробництві високоефективних фармацевтичних препаратів і широкого спектру косметичних засобів.