

Винахід належить до фармації, а саме до способу одержання рибонуклеотидів, які можуть використовуватися для лікування захворювань, що пов'язані з нестачею рибонуклеотидів: тапеторетинальних абіотрофій, хвороби Шегрена, нервово-м'язових дистрофій та ін.

Відомий спосіб одержання рибонуклеотидів (Вестник Академии медицинских наук СССР, 1971, Медицина, №7, с.63-69). Спосіб складається з того, що проводять гідроліз розчину дріжджової рибонуклеїнової кислоти панкреатичною рибонуклеазою, потім діаліз отриманого гідролізату з подальшим відділенням та концентруванням продукту. Вихід цільового продукту становить 40-43%. Причини, що перешкоджають використанню зазначеного способу: низький вихід цільового продукту, його низька ступінь чистоти та висока пірогенність.

Найбільш близьким способом того ж призначення до заявленого об'єкту є обраний як прототип спосіб одержання рибонуклеотидів, який включає гідроліз розчину дріжджової рибонуклеїнової кислоти панкреатичною рибонуклеазою при pH 4,5-5,5 і температурі 62-65°C протягом 5 год, осадження етиловим спиртом при температурі 25-35°C, ультрафільтрацію, обробку фільтрату 8-10-кратним об'ємом етилового спирту, висушування осаду у вакуум-сушильній шафі, розчинення в 0,55-0,65% розчині натрію хлориду, стерилізуючу фільтрацію, ампулювання та стерилізацію в автоклаві при температурі 119-122°C протягом 32-34 хв (А.с. №1575359, МПК А61К37/00, А61К31/785, С12Р19/34, 1990). Цей спосіб має ряд суттєвих недоліків: низький вихід цільового продукту, низький вміст рибонуклеотидів в цільовому продукті через їх руйнування у процесі вакуум-термічного висушування та обробці в автоклаві при зазначеному режимі, наявність пірогенних домішок, низька ступінь чистоти та нестабільність рибонуклеотидного складу продукту.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу створити спосіб одержання рибонуклеотидів, який дозволяє збільшити вихід цільового продукту (рибонуклеотидів), підвищити вміст рибонуклеотидів в цільовому продукті і його ступінь чистоти, стабілізувати рибонуклеотидний склад продукту та значно зменшити пірогенність готового препарату.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі одержання рибонуклеотидів шляхом гідролізу розчину дріжджової рибонуклеїнової кислоти панкреатичною рибонуклеазою при pH 4,5-5,5 і температурі 62-65°C, осадження етиловим спиртом, ультрафільтрації, обробки фільтрату 8-10-кратним об'ємом етилового спирту, висушування осаду, розчинення в 0,55-0,65% розчині натрію хлориду, стерилізуючої фільтрації, ампулювання та стерилізації, згідно з винаходом, гідроліз проводять протягом 8-10 год, осадження етиловим спиртом виконують при температурі 8-12°C, висушування осаду здійснюють ліофілізацією, а стерилізацію продукту виконують при температурі 110-112°C протягом 8-10 хв.

В табл.1-4 наведені дані, які обґрунтовують достатність обраних параметрів для досягнення забезпеченого винаходом технічного результату.

Таблиця 1

Залежність виходу цільового продукту і ступеню чистоти від часу провадження гідролізу

Показники	Час провадження гідролізу, год						
	5	6	8	9	10	12	13
Вихід цільового продукту, %	48	50	58	60	62	66	65,3
Співвідношення поглинання (ступінь чистоти) при							
λ260 / 230	3,15	3,1	3,8	3,7	3,7	3,0	3,1
λ260 / 280	1,6	1,64	1,7	1,72	1,75	1,4	1,35

З даних, наведених у табл.1, видно, що оптимальним є час проведення гідролізу 8-10 год. Використання часу менше зазначеного призводить до зменшення виходу цільового продукту (рибонуклеотидів). Використання часу вище зазначеного призводить до зниження ступеню чистоти продукту.

Таблиця 2

Залежність виходу цільового продукту і характеристик якості від температури осадження (1 осадження)

Показники	Температура осадження, °C						
	4	6	8	10	12	14	16
Вихід цільового продукту, %	36	44	58	60	62	66	68
Вміст рибонуклеотидів в цільовому продукті, %	87	88	85	84	86	78	74
Кольоровість 3,5% розчину гідролізату при 400nm	0,230	0,240	0,250	0,260	0,275	0,300	0,318

З даних, наведених у табл.2, видно, що оптимальною є температура осадження 8-12°C. Використання температури нижче зазначеної призводить до зменшення виходу цільового продукту (рибонуклеотидів) через випадання при низькій температурі більшої кількості рибонуклеотидів в осад. Використання температури вище зазначеної призводить до зниження вмісту рибонуклеотидів в продукті через зменшення випадіння в осад домішок нуклеотидного походження. Крім того, збільшення температури осадження призводить до підвищення кольоровості розчину гідролізату, що свідчить про нестабільність його рибонуклеотидного складу.

Таблиця 3

Залежність характеристик якості готового препарату від температури стерилізації

Показники	Температура стерилізації, °C						
	105	108	110	111	112	114	119
Кольоровість 3,5% розчину готового препарату при 400nm	0,287	0,296	0,300	0,315	0,340	0,370	0,400
Пірогенність, °C	1,4	1,5	0,3	0,4	0,5	0,5	0,4
Стерильність	Нестер.	Нестер.	Стер.	Стер.	Стер.	Стер.	Стер.

З даних, наведених у табл.3, видно, що оптимальною є температура стерилізації 110-112°C. Використання температури нижче зазначеної призводить до пірогенності продукту через нестерильність препарату. Використання температури вище зазначеної призводить до руйнування рибонуклеотидів та підвищення кольоровості розчину готового препарату, що свідчить про нестабільність його рибонуклеотидного складу.

Таблиця 4

Залежність характеристик якості готового препарату від часу стерилізації при оптимальній температурі

Показники	Час стерилізації, хв						
	4	6	8	9	10	12	14
Кольоровість 3,5% розчину готового препарату при 400nm	0,285	0,294	0,300	0,320	0,345	0,360	0,395
Пірогенність, °C	1,6	1,4	0,2	0,3	0,5	0,5	0,4
Стерильність	Нестер.	Нестер.	Стер.	Стер.	Стер.	Стер.	Стер.

З даних, наведених у табл.4, видно, що оптимальним є час стерилізації 8-10хв. Використання часу менше зазначеного призводить до пірогенності продукту через нестерильність препарату. Використання часу більш зазначеного призводить до підвищення кольоровості розчину готового препарату.

Переваги способу, що заявляється, перед способом за прототипом наведені в табл.5.

Таблиця 5

Характеристики препарату в залежності від способу одержання

Показники	Спосіб, що заявляється	Спосіб за прототипом
Вихід цільового продукту, %	58-62	48-51
Вміст рибонуклеотидів в цільовому продукті, %	84-86	70-74
Пірогенність, °C	0,2-0,5	0,7-1,2
Кольоровість 3,5% розчину готового препарату при 400nm	0,300-0,345	0,430-0,470
Кольоровість 3,5% розчину гідролізату при 400nm	0,250-0,275	0,360-0,410
Співвідношення поглинання (ступінь чистоти) при $\lambda_{260/230}$	3,7-3,8	3,15
$\lambda_{260/280}$	1,7-1,75	1,6

Як видно з табл.5, спосіб, що заявляється, має суттєві переваги перед способом за прототипом:

1. Значно вище вихід цільового продукту.  
2. Оптимізація процесів проведення гідролізу та осадження етиловим спиртом дозволили збільшити ступінь чистоти продукту (співвідношення поглинання), що підтверджується також більшим вмістом рибонуклеотидів в продукті. Крім того, це дозволило стабілізувати рибонуклеотидний склад розчину гідролізату, що підтверджується його низькою кольоровістю.

3. Визначений режим стерилізації та заміна вакуум-сушильної обробки ліофілізацією дозволили значно стабілізувати рибонуклеотидний склад готового препарату, що підтверджується низькою кольоровістю розчину готового препарату.

4. Визначені параметри дозволили значно зменшити пірогенність готового препарату.

Можливість здійснення винаходу ілюструється наступними прикладами:

Приклад 1.

7кг дріжджової рибонуклеїнової кислоти розчиняють в 50л води для ін'єкцій. Доводять рН розчину 2н натрієм гідроксиду до 5,4. Додають 20г панкреатичної рибонуклеази і проводять гідроліз при температурі 62-65°C протягом 8год. Потім гідролізат охолоджують до температури 8°C і додають 15л етилового спирту (1 осадження), охолодженого до температури 8°C. Суміш витримують при зазначеній температурі протягом 2-4год, осад відділяють фільтрацією. Отриманий прозорий розчин піддають ультрафільтрації крізь пористі волокна з порогом відсічення 1500 дальтон. Фільтрат охолоджують до температури 0-4°C і додають 8-10-кратний об'єм охолодженого до температури 0-4°C етилового спирту (2 осадження). Суміш витримують

протягом 12-14 год при зазначеній температурі. Осад відділяють фільтрацією, промивають охолодженим до температури 0-4°C етиловим спиртом та розчиняють у воді для ін'єкцій (1кг осаду на 3л води). Одержаний розчин піддають ліофілізації. Одержаний цільовий продукт являє собою субстанцію суміші рибонуклеотидів білого або біло-жовтого кольору. Вихід цільового продукту (субстанції) складає 58%. Кольоровість 3,5% розчину гідролізату при 400нм - 0,250. Співвідношення поглинання (ступінь чистоти) при

$\lambda_{260/230}$  -3,7;

$\lambda_{260/280}$  -1,7.

Вміст рибонуклеотидів в цільовому продукті (субстанції) складає 84%.

З отриманої субстанції виробляють готову лікарську форму. Для цього 4 кг субстанції суміші рибонуклеотидів розчиняють у 96л 0,55-0,65% розчину натрію хлориду в воді для ін'єкцій. Одержаний розчин світло-жовтого кольору піддають фільтрації крізь фільтри з розміром пор 0,45мкм та 0,22мкм. Розчин розливають в стерильних умовах в ампули по 3,0мл та піддають обробці в автоклаві при температурі 110°C протягом 8 хв. Одержаний препарат містить від 3,3 до 3,5% рибонуклеотидів, пірогенність - 0,2°C. Кольоровість 3,5% розчину готового препарату при 400нм-0,300.

Приклад 2.

7кг дріжджової рибонуклеїнової кислоти розчиняють в 50л води для ін'єкцій. Доводять рН розчину 2н натрієм гідроксиду до 5,4. Додають 20г панкреатичної рибонуклеази і проводять гідроліз при температурі 62-65°C протягом 9 год. Потім гідролізат охолоджують до температури 10°C і додають 15л етилового спирту (1 осадження), охолодженого до температури 10°C. Суміш витримують при зазначеній температурі протягом 2-4 год, осад відділяють фільтрацією. Отриманий прозорий розчин піддають ультрафільтрації крізь пористі волокна з порогом відсічення 1500 дальтон. Фільтрат охолоджують до температури 0-4°C і додають 8-10-кратний об'єм охолодженого до температури 0-4°C етилового спирту (2 осадження). Суміш витримують протягом 12-14 год при зазначеній температурі. Осад відділяють фільтрацією, промивають охолодженим до температури 0-4°C етиловим спиртом та розчиняють у воді для ін'єкцій (1кг осаду на 3л води). Одержаний розчин піддають ліофілізації. Одержаний цільовий продукт являє собою субстанцію суміші рибонуклеотидів білого або біло-жовтого кольору. Вихід цільового продукту (субстанції) складає 60%. Кольоровість 3,5% розчину гідролізату при 400нм-0,260. Співвідношення поглинання (ступінь чистоти) при

$\lambda_{260/230}$  -3,8;

$\lambda_{260/280}$  -1,75.

Вміст рибонуклеотидів в цільовому продукті (субстанції) складає 85%.

З отриманої субстанції виробляють готову лікарську форму. Для цього 4кг субстанції суміші рибонуклеотидів розчиняють у 96л 0,55-0,65% розчину натрію хлориду в воді для ін'єкцій. Одержаний розчин світло-жовтого кольору піддають фільтрації крізь фільтри з розміром пор 0,45мкм та 0,22мкм. Розчин розливають в стерильних умовах в ампули по 3,0мл та піддають обробці в автоклаві при температурі 111°C протягом 9хв. Одержаний препарат містить від 3,3 до 3,5% рибонуклеотидів, пірогенність - 0,4°C. Кольоровість 3,5% розчину готового препарату при 400нм-0,320.

Приклад 3

7 кг дріжджової рибонуклеїнової кислоти розчиняють в 50л води для ін'єкцій. Доводять рН розчину 2н натрієм гідроксиду до 5,4. Додають 20г панкреатичної рибонуклеази і проводять гідроліз при температурі 62-65°C протягом 10 год. Потім гідролізат охолоджують до температури 12°C і додають 15л етилового спирту (1 осадження), охолодженого до температури 12°C. Суміш витримують при зазначеній температурі протягом 2-4 год, осад відділяють фільтрацією. Отриманий прозорий розчин піддають ультрафільтрації крізь пористі волокна з порогом відсічення 1500 дальтон. Фільтрат охолоджують до температури 0-4°C і додають 8-10-кратний об'єм охолодженого до температури 0-4 °C етилового спирту (2 осадження). Суміш витримують протягом 12-14 год при зазначеній температурі. Осад відділяють фільтрацією, промивають охолодженим до температури 0-4°C етиловим спиртом та розчиняють у воді для ін'єкцій (1кг осаду на 3л води). Одержаний розчин піддають ліофілізації. Одержаний цільовий продукт являє собою субстанцію суміші рибонуклеотидів білого або біло-жовтого кольору. Вихід цільового продукту (субстанції) складає 62%. Кольоровість 3,5% розчину гідролізату при 400нм-0,275. Співвідношення поглинання (ступінь чистоти) при

$\lambda_{260/230}$  -3,8;

$\lambda_{260/280}$  -1,75

Вміст рибонуклеотидів в цільовому продукті (субстанції) складає 86%.

З отриманої субстанції виробляють готову лікарську форму. Для цього 4кг субстанції суміші рибонуклеотидів розчиняють у 96л 0,55-0,65% розчину натрію хлориду в воді для ін'єкцій. Одержаний розчин світло-жовтого кольору піддають фільтрації крізь фільтри з розміром пор 0,45мкм та 0,22мкм. Розчин розливають в стерильних умовах в ампули по 3,0мл та піддають обробці в автоклаві при температурі 112°C протягом 10хв. Одержаний препарат містить від 3,3 до 3,5% рибонуклеотидів, пірогенність - 0,5°C. Кольоровість 3,5% розчину готового препарату при 400нм-0,345.

З огляду на викладене вище і з урахуванням розкритого причинно-наслідкового зв'язку між сукупністю ознак винаходу, що заявляється, та технічним результатом, що отриманий за їх допомогою, можна стверджувати, що задача, поставлена в основу створеного способу одержання рибонуклеотидів, цілком виконана, бо такий спосіб дозволяє збільшити вихід цільового продукту (рибонуклеотидів), підвищити вміст рибонуклеотидів в цільовому продукті і його ступінь чистоти, стабілізувати рибонуклеотидний склад продукту та значно зменшити пірогенність готового препарату.