



УКРАЇНА

(19) UA (11) 17197 (13) C1

(51)6 A 61 K 35/48

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІД(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКУВАЛЬНОГО ЗАСОБУ, ЩО РЕГУЛЮЄ ДИФЕРЕНЦІАЦІЮ
КЛІТИН

1

(21) 94053260

(22) 16.05.94

(24) 30.04.99

(46) 30.04.99. Бюл. № 2

(56) FR, 2 451 193, 10.10.80.

(72) Іванов Олександр Павлович, Кузьменко Іван Іванович, Панічев Олександр Георгійович, Губченко Станіслав Володимирович, Найштетик Володимир Якович

(73) Товариство з обмеженою відповідальністю "НІР"

(57) Спосіб получения лечебного средства, регулирующего дифференциацию клеток, заключающийся в измельчении эмбриональных тканей животного, их гомогенизации и экстракции в физиологическом растворе, отделении осадка от раствора, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что в качестве эмбриональных тканей берут мышечные ткани животного, гомогенат выдерживают в течение 10-20 часов, а после экстракции

2

выдерживание раствора осуществляют в течение $24 \pm 0,5$ часа, затем после отделения образовавшегося осадка полученный раствор дополнительно разбавляют физиологическим раствором до достижения концентрации белка в нем 15-25 мг/мл и добавляют к нему консервант в количестве не менее 0,05%, после отделения образовавшейся взвеси раствор выдерживают в течение 48 часов, стерилизуют и термостатируют его в течение не менее 3-х суток при температуре 36°C , после чего раствор выдерживают 30-40 суток при температуре, не превышающей 15°C , и удаляют образовавшуюся взвесь, а раствор подвергают взаимодействию с иммобилизованным протеолитическим ферментом, причем режим указанного взаимодействия устанавливают исходя из контрольной пробы получаемого средства.

Изобретение относится к медицине, а именно к биоорганической химии, конкретно к способу экстрагирования эмбриональных тканей.

Прототипом предлагаемого способа могут служить способы экстрагирования кожи эмбриона теленка, при температуре $60-75^{\circ}\text{C}$ в течение 15 часов в водной среде с pH 4 (за счет добавления органических кислот). Экстракт отделяется от нерастворимого осадка и лиофилизируется, а также способ получения экстракта из зародышевых органов, разбавлением или ультрафильтрацией сырого экстракта органов, извлеченных из зародыша на первой половине стадии его

развития физиологическим раствором и содержащем не менее одного антибиотика.

Недостатками прототипа является проведение экстракции при температуре $60-75^{\circ}\text{C}$, в присутствии органических кислот.

Задачей изобретения является способ выделения белково-пептидных компонентов как биологически активных веществ из эмбриональных тканей с целью расширения ассортимента средств воздействия на живой организм.

Поставленная задача достигается тем, что предлагаемый способ позволяет получить из эмбриональных органов и тканей раствор оптимального комплекса свобод-

(19) UA (11) 17197 (13) C1

ных аминокислот и низкомолекулярных пептидов как нативных, так и получаемых в результате аутолиза и ограниченного ферментативного протеолиза высокомолекулярных предшественников, который образует активное вещество – белково-пептидный комплекс (БПК). БПК в виде субстанции не выделяется, а используется в качестве раствора, как биологически активное вещество.

Способ включает следующие операции:

1. Отобранное сырье измельчают и гомогенизируют при температуре не выше 8°C.

2. Гомогенат выдерживают в течение 10 часов при температуре 4–8°C и разбавляют охлажденным до 10°C физиологическим раствором в соотношении 1:4 по объему, с последующей выдержкой в течение 24 часов при температуре 4–8°C.

3. К полученной смеси добавляется консервант.

4. В качестве фильтрующего материала используют фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

5. Процесс аутолиза белковых компонентов проводят в течение 3 суток при температуре $36 \pm 0,2^\circ\text{C}$ с последующей выдержкой при температуре 4–8°C.

6. Надосадочная жидкость после центрифугирования фильтруется через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и подвергается протеолизу на колонке, заполненной носителем с иммобилизированным ферментом.

7. Полученный продукт в асептических условиях стерилизуют фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

В патентных и научных источниках информации отсутствуют сведения об аналогичном способе выделения комплекса биологически активных компонентов из эмбриональных тканей.

Полученный продукт представляет собой прозрачную жидкость с желтым оттенком, без запаха, которая может смешиваться с водой и физиологическим раствором в любых соотношениях с образованием однородных смесей.

Для раствора БПК характерны реакции на наличие белково-пептидного комплекса с использованием метода электрофореза и основана на способности белково-пептидных компонентов к разделению во внешнем электрическом поле. Значения электрофо-

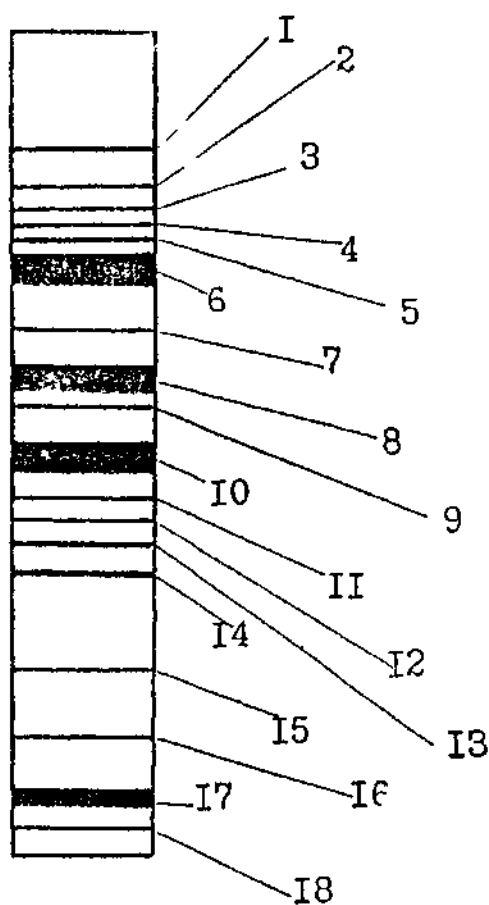
ретической подвижности на электрофореграмме сравнивают со стандартным образцом. Электрофореграмма прилагается.

Раствор БПК при температуре $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$ имеет плотность с номинальным значением $1,0106 \text{ г/см}^3$, показатель преломления при температуре $20 \pm 0,3^\circ\text{C}$ должен находиться в пределах $1,3410 \pm 0,0004$, водородный показатель pH раствора должен быть в пределах от 6,5 до 7,0.

Количественное содержание БПК в 1 мл раствора должно быть не менее 15 мг и основано на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса ионов двухвалентной меди с пептидными связями молекулы белка (биуретовым реактивом).

Пример 1. Для получения препарата используют эмбриональные ткани крупного рогатого скота. Отобранное сырье измельчают и гомогенизируют при температуре не выше 8°C. После выдерживания в течение 10 часов при температуре 4–8°C гомогенат разбавляют охлажденным до 10°C физиологическим раствором в соотношении 1:4 по объему и выдерживают при постоянном перемешивании и температуре 4–8°C в течение 24 часов. Затем осадок отделяют центрифугированием при 3000 г в течение 1 часа при температуре 2–4°C. К надосадочной жидкости добавляют консервант из расчета 100 мл 1%-ного раствора хинозола в физиологическом растворе на 1 л. Добавление консерванта проводят по каплям со скоростью 10 мл/мин. Полученный раствор в асептических условиях пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм в стерильные емкости, герметически закрывают и помещают в термостат для аутолиза в течение 3 суток при температуре $36 \pm 0,2^\circ\text{C}$, после чего центрифугируют при 3000 г в течение 30 мин при температуре 2–4°C. Надосадочную жидкость фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и пропускают через колонку (при температуре 25–30°C), заполненную агарозой 4 В, иммобилизированный трипсином. Скорость элюции устанавливают при сравнении электрофорограммы элюата с контрольной электрофорограммой БПК, которые должны быть идентичны.

Полученный препарат в асептических условиях стерилизуют фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, разливают в ампулы и запаивают.



Контрольная электрофореграмма
 (Электрофорез в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Объем нанесенного раствора белка – 0,03 мл, сила тока – 80 мА, напряжение – 20 В, продолжительность электрофореза – 2 часа).

Электрофоретическая подвижность компонентов БПК (см):
 1 – 1,6; 2 – 2,1; 3 – 2,4; 4 – 2,6; 5 – 2,8; 6 – 3,0; 7 – 4,0; 8 – 4,5; 9 – 5,0;
 10 – 5,5; 11 – 6,2; 12 – 6,5; 13 – 6,8; 14 – 7,2; 15 – 8,5; 16 – 9,4;
 17 – 10,1; 18 – 10,6.

Упорядник

Техред М.Келемеш

Коректор О. Обручар

Замовлення 4675

Тираж

Підписне

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

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

