РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 801 151**(13) **C1**

(51) МПК
A61K 35/30 (2015.01)
A61K 38/02 (2006.01)
B01D 7/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 35/30 (2023.02); A61K 38/02 (2023.02); B01D 7/00 (2023.02)

(21)(22) Заявка: **2022122071, 15.08.2022**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.08.2022

Дата регистрации:
02.08.2023

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **15.08.2022**

(45) Опубликовано: **02.08.2023** Бюл. № **22**

Адрес для переписки:
355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12, Ставропольский ГАУ, ОИС (патентный отдел)

(72) Автор(ы):
Федота Наталья Викторовн (RU),
Шулунова Ангелина Николаевна (RU),
Квочко Андрей Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ставропольский государственный аграрный университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2071335 C1, 10.01.1997. ЗАЯС Ю.Ф. Качество мяса и мясопродуктов / Легкая и пищевая промышленность.-М.:1981. RU 2275924 C2, 10.05.2006. RU 2049472 C1, 10.12.1995.**

(54) Способ получения биологически активного белково-полипептидного гидролизата из тканей мозга

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарной медицины, а именно к способу получения биологически активного белково-полипептидного гидролизата из свежего головного мозга убойных животных. Способ получения биологически активного белково-полипептидного гидролизата из свежего головного мозга убойных животных, включающий быстрое охлаждение головного мозга убойных животных в течение 1-2 часов при температуре минус 10°С и скорости циркуляции воздуха 1-2 м/с до температуры на поверхности ткани 1-2°С и в толще до 16-18°С, на второй стадии головной мозг доохлаждают в течение 6-8 часов при температуре воздуха минус 1-1,5°С до температуры в толще 2°С, охлажденный головной мозг оставляют при температуре 4°С в течение суток для выдержки, с последующим измельчением и гомогенизацией тканей с добавлением 1% раствора хлорида натрия в соотношение 1:1 и добавкой гидроксида натрия до pH ~ 7, полученную смесь выдерживают в течение суток при температуре не выше +6°С, проводят фильтрацию через марлю медицинскую или батист для отделения плотных нерастворимых остатков головного мозга, фильтрат подвергается сепарированию для разделения на фракции с отделением верхнего липидного слоя и оседанием мелких плотных нерастворимых остатков головного мозга, декантируют с последующей ультрафиолетовой обработкой с использованием разрядной лампы низкого давления U-образной формы с длиной волны λ=253 нм со скоростью пропускания раствора через кварцевую трубку 50 мл за одну минуту, на последнем этапе проводят шоковую сублимационную сушку, проводимую при глубокой заморозке. Вышеуказанное изобретение позволяет увеличить процент выхода белково-полипептидного комплекса в конечном растворе, повысить его активность и улучшить качественные характеристики. 3 ил., 1 пр.

RU 2801151 C1

RU 2801151 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 801 151** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 35/30 (2015.01)
A61K 38/02 (2006.01)
B01D 7/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A61K 35/30 (2023.02); A61K 38/02 (2023.02); B01D 7/00 (2023.02)

(21)(22) Application: **2022122071, 15.08.2022**

(24) Effective date for property rights:
15.08.2022

Registration date:
02.08.2023

Priority:
(22) Date of filing: **15.08.2022**

(45) Date of publication: **02.08.2023** Bull. № **22**

Mail address:
355017, g. Stavropol, per. Zootekhnicheskij, 12, Stavropolskij GAU, OIS (patentnyj otdel)

(72) Inventor(s):
Fedota Natalia Viktorovn (RU),
Shulunova Angelina Nikolaevna (RU),
Kvochko Andrei Nikolaevich (RU)

(73) Proprietor(s):
Federalnoe gosudarstvennoe biudzhetnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniia «Stavropolskii gosudarstvennyi agrarnyi universitet» (RU)

(54) METHOD OF OBTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE PROTEIN-POLYPEPTIDE HYDROLYZATE FROM BRAIN TISSUES

(57) Abstract:

FIELD: veterinary medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the method of obtaining a biologically active protein-polypeptide hydrolyzate from the fresh brain of slaughter animals. A method of obtaining a biologically active protein-polypeptide hydrolyzate from a fresh brain of slaughter animals, including rapid cooling of the brain of slaughter animals for 1–2 hours at a temperature of minus 10°C and air circulation speed of 1–2 m/s to the temperature on the surface of the tissue of 1–2°C and in thickness up to 16–18°C, at the second stage, the brain is cooled down for 6–8 hours at an air temperature of minus 1–1.5°C to core temperature of 2°C, the cooled brain is left at a temperature of 4°C during the day for exposure, followed by grinding and homogenization of tissues with the addition of 1% sodium chloride solution in a ratio of 1:1 and the addition of sodium hydroxide to pH ~7, the resulting mixture is kept for a day at a temperature not higher than +6°C, filtration is carried out through medical gauze or cambric to separate dense insoluble brain residues, the filtrate is separated into fractions with separation of the upper lipid layer and settling of fine dense insoluble brain residues, decanted, followed by ultraviolet treatment using a low-pressure discharge U-shaped lamp with a wavelength of λ=253 nm with a rate of passing the solution through a quartz tube of 50 ml per minute, at the last stage, shock freeze drying is carried out at deep freezing.

EFFECT: above invention allows to increase the yield of the protein-polypeptide complex in the final solution, increase its activity and improve its quality characteristics.

1 cl, 3 dwg, 1 ex

RU 2801151 C1

RU 2801151 C1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области ветеринарной медицины и предназначено для получения биологически активного белково-полипептидного гидролизата из тканей мозга.

Уровень техники

Известен способ получения препарата, сущность которого состоит в том, что кору головного мозга убойных животных замораживают, замороженную ткань гомогенизируют, проводят экстракцию гомогената раствором уксусной кислоты в присутствии хлористого цинка, сепарируют, обрабатывают надосадочную жидкость ацетоном, промывают образовавшийся осадок ацетоном, высушивают осадок, проводят экстракцию полипептидов из высушенного порошка водой для инъекций с последующей фильтрацией, стерилизацией и лиофилизацией целевого продукта [Патент РФ №2275924, Опубл.: 10.05.2006, Бюл. №13. Способ получения комплекса биологически активных полипептидов для нормализации функций головного мозга и фармацевтическое средство на его основе].

Недостатком данного способа является много стадийность процесса. Способ избирателен только к определенным белкам, так как экстрагирование проводят кислым растворов приводящим к переходу в раствор только щелочной фракции. Также в данном способе проводят двойную сушку, а также стерилизацию, что может сказаться на качестве белковой фракции.

Известен способ получения препарата из коры головного мозга убойных животных, обладающего восстанавливающей активностью при нарушении функций головного мозга, который включает следующие операции. Исходное сырье (ткань, содержащая серое вещество полушарий головного мозга) обрабатывают ацетоном при температуре от -10 до -4°С и соотношении ткани мозга и ацетона 1:5 в течение 18-30 ч, далее проводят операции гомогенизации и экстрагирования гомогената 2-4%-ным раствором уксусной кислоты в течение 48-72 ч при pH 3,5-4,5 в присутствии хлористого цинка в концентрации 0,6-1,2 г/л и при соотношении гомогената и раствора уксусной кислоты 1:(8-4), центрифугирования, осаждения биологически активных веществ ацетоном при температуре от -3 до -5°С и соотношении супернатанта и ацетона 1:(7-5) и ионообменной хроматографии полученного осадка на катионите "Биокарб". В результате ионообменной хроматографии получают фракцию, содержащую щелочные полипептиды, которые обладают стимулирующим (или восстанавливающим при снижении активности мозга) действием на клетки коры головного мозга [Патент РФ №1298979 «Способ получения препарата, обладающего восстанавливающей активностью при нарушении функции головного мозга»; 16.02.1993 г.].

Однако описанный известный способ не позволяет извлечь из коры головного мозга кислые и нейтральные полипептиды и получить биологически активные вещества, обладающие другим действием (например, противосудорожной активностью).

Известен способ получения пептидов из головного мозга скота. Согласно патенту дефростированный или свежий головной мозг измельчают и гомогенизируют в воде с нейтральным или слабощелочным значением pH (6,8-8,4) и подвергают гидролизу сериновой эндопептидазой грибкового происхождения при температуре от +40 до +50°С в течение 4-5 ч. По окончании гидролиза реакционную массу при перемешивании нагревают до +90-+95°С и выдерживают при этой температуре в течение 50 мин. После охлаждения до комнатной температуры в раствор добавляют 2,5 объема спирта и через 2 ч инкубации смесь последовательно фильтруют через мембранные фильтры с размерами пор 0,22-0,5 мкм и с молекулярным весом отсечения 5-15 кД. Спирт и воду

отгоняют под вакуумом. Добавляют консервант (0.3%фенола) и проводят стерильную фильтрацию на мембранных фильтрах с диаметром пор 0,22-0,32 мкм. Целевой продукт представляет собой раствор янтарного цвета и содержит комплекс биологически активных пептидов [РФ №2049472. Способ получения гидролизата мозговой ткани "Церебролизат", Опубл.: 10.12.1995].

Недостатками метода являются использование в технологии этилового спирта, что делает производство взрывоопасным и дорогостоящим. К недостаткам также следует отнести извлечение в процессе экстракции из тканей головного мозга веществ непептидной природы (липидной и полисахаридной природы), которые невозможно удалить при осаждении спиртом и ультрафильтрацией и которые, являясь примесями, не определяют биологическую активность и ухудшают качество целевого продукта. К тому же использование в технологических операциях спирта и фенола также ведет к ухудшению качества получаемого продукта.

Наиболее близким решением к предлагаемому является способ получения биологически активного препарата включает следующие этапы: получение свежего биогенного материала при быстром охлаждении до 2-3°С и выдерживание охлажденной ткани в течение 24-48 ч; после производится гомогенизация и разбавление стерильным изотоническим раствором до необходимой текучести, и фильтрация гомогенизата от плотных остатков тканей через несколько слоев стерильной марли. Далее следует этап облучения при использовании ртутно-кварцевых горелок путем пропускания гомогенизированной массы через двойной цилиндр из кварцевого стекла при мощности лампы 60 Вт скорость движения гомогенизата должна быть 200 мл в 1 мин. Этот способ воздействия обеспечивает стерилизацию и активацию препарата не менее чем на 70% от общей его активности. После проводится расфасовка в стерильные флаконы и сублимационная сушка, что создает условия для длительного хранения. В конце процесса включают нагрев и поддерживают при 25°С до достижения окончания сушки. Продолжительность сушки на сублимационных аппаратах различных марок допускается до 90 ч. После завершения сушки камеру через специальный фильтр, заполняют стерильным осушенным воздухом или инертным газом. После полной сублимации флаконы закрываются пробками и завальцовываются фольговыми колпачками (Прототип).

Однако в результате многочисленных опытов были выявлены недостатки данного способа, устранение которых позволило повысить процент выхода готовой продукции из обработанного сырья и повысить ее качество.

Раскрытие изобретения

Задачей предлагаемого изобретения состоит в повышении качества и процента выхода целевого продукта.

Технический результат, который может быть достигнут с помощью предлагаемого изобретения, сводится к увеличению процента выхода белково-полипептидного комплекса в конечном растворе, повышения его активности, а также улучшению качественных характеристик.

Технический результат достигается тем, что получение биологически активного белково-полипептидного гидролизата из тканей мозга включает быстрое охлаждение на первой стадии при температуре минус 10°С и скорости циркуляции воздуха 1-2 м/с до температуры на поверхности ткани 1-2°С и в толще до 16-18°С (среднее время составляет 1-2 часа), на второй стадии ткани доохлаждают при температуре воздуха минус 1-1,5°С до температуры в толще 2°С (процесс занимает 6-8 часов), охлажденную ткань оставляют при температуре 4°С в течение суток для выдержки, с последующим

измельчением и гомогенизацией тканей с добавлением 1% раствора хлорида натрия (соотношение 1:1) с добавкой гидроксида натрия до pH~7, полученную смесь выдерживают в течение суток при температуре не выше +6°С, проводят фильтрацию через неплотную ткань для отделения плотных нерастворимых остатков тканей, фильтрат подвергается сепарированию для разделения на фракции с отделением липидов (верхний слой) и оседанием мелких плотных нерастворимых остатков тканей мозга, декантируют с последующей ультрафиолетовой обработкой с использованием разрядной лампы низкого давления U-образной формы с длиной волны λ=253 нм со скоростью пропускания раствора через кварцевую трубку 50 мл за одну минуту, на последнем этапе проводят шоковую сублимационную сушку, проводимую при глубокой заморозке.

Чертежи и иные материалы

На фиг. 1 - Определение биологической активности белково-полипептидного комплекс, полученного заявленным способом.

На фиг. 2 - Определение биологической активности препарата, полученного по прототипу.

На фиг. 3 - Определение токсического действия белково-полипептидного комплекса.

Осуществление изобретения

Способ получение препарата состоит в том, что свежий головной мозг убойных животных охлаждают. Быстрое охлаждение необходимо для снижения скорости автолитических процессов, в ходе посмертных изменений, так как в тканях высвобождается значительное количество тепла, и температура повышается на 2-3°С, также оно способствует замедлению или полному прекращению процессов развития микрофлоры, что выгодно отличается с санитарно-гигиенической точки зрения. ВНИИМПом разработан способ быстрого двухстадийного охлаждения. Охлаждение на первой стадии производится при температуре минус 10°С и скорости циркуляции воздуха 1-2 м/с до температуры на поверхности ткани 1-2°С и в толще до 16-18°С (среднее время составляет 1-2 часа). На второй стадии ткани доохлаждают при температуре воздуха минус 1-1,5°С до температуры в толще 2°С (процесс занимает 6-8 часов). Затем по методике Филатова, охлажденную ткань оставляют при температуре 4°С в течение суток для образования биогенных стимуляторов. Выдержка тканей по методике Филатова более семи суток приводит, при любых условиях хранения, к аутолизу, что связано с химическими изменениями, в частности следует отметить гидролитическую и окислительную порчу жира, распад белковых соединений протекающие под действием тканевых ферментов и процессы окисления различных веществ под действием кислорода воздуха. Деятельность микроорганизмов при температуре, близкой к 0°С, хотя и замедляется, но не прекращается. Поэтому если нет возможности ткани сразу переработать, то после выдержки по Филатову их следует заморозить.

После охлаждения и выдержки проводят измельчение и гомогенизацию тканей. В гомогенат добавляется 1% раствор хлорида натрия (соотношение 1:1) с добавкой гидроксида натрия до pH~7. Доведение pH среды до близко нейтральной необходимо для более полного процесса извлечения белковых и биогенных веществ. Добавление гидроксида натрия необходимо для нейтрализации получаемой кислой среды при распаде тканей. Полученную смесь выдерживают в течение суток при температуре не выше +6°С. В ходе данной процедуры происходит образование биогенных веществ и достигается наибольший выход пептидов в жидкую фазу, что способствует получению экстракта с высокой активностью и со значительным расширенным спектром его действия. Последовательность данных операций позволяет извлекать пептиды не только

низкой, но и более высокой молекулярной массы. После водно-солевого экстрагирования проводим фильтрацию через неплотную ткань (ГОСТ 9412-2021 Марля медицинская, сложенная в несколько слоев или ГОСТ 29298-2005 Ткани хлопчатобумажные и смешанные (батист), в один слой) для отделения плотных нерастворимых остатков тканей. Фильтрат подвергается сепарированию для разделения на фракции: в верхней части собираются липиды, которые легко собрать; в низу оседают мелкие плотные нерастворимые остатки тканей, которые легко отделяются от основного раствора. Биологически активная субстанция представляет собой белково-полипептидный комплекс (БПК) с молекулярной массой входящих в него белково-полипептидных компонентов в интервале 0,5-200 кДа, с содержанием среднемолекулярной фракции в интервале 10-150 кДа не менее 80%. Водную фракцию, содержащую БПК декантируют с последующей ультрафиолетовой обработкой (УФО). Для УФО используется разрядная лампа низкого давления U-образной формы с длиной волны λ=253 нм. По сравнению с ранее использованными ультрафиолетовыми лампами, лампы нового образца эффективнее почти в 4 раза. Узкая длина волны позволяет избежать образования озона - токсичного вещества, а также при рабочей длине волны белки не подвергаются повреждениям связанных с ионизирующим излучением. Нуклеиновые кислоты подвергаются деструктивным изменениям вплоть до их полного разрушения, что используется для уничтожения патогенов (бактерицидные свойства). Скорость пропускания раствора через кварцевую трубку составляет 50 мл за одну минуту.

Все предварительные процессы и процессы получения белково-пептидной фракции необходимо производить при температуре от +2 до +10°С. Концентрация белково-полипептидного комплекса в конечном растворе в среднем составлять 1,0-2,0 мг/мл.

После УФ обработки переходим к процессу сублимационной сушки, исключая стадию термической обработки раствора, которая приводит при температурах выше 70°С к изменению в структурах белковых молекулах, в частности к процессам денатурирования, что снизит эффективность конечного белково-полипептидного комплекса.

В предлагаемом способе используется шоковая сублимационная сушка, которая проводится при глубокой заморозке и показала положительное действие с повышением активности белково-полипептидного комплекса. Тогда как использование стадийной сублимационной сушки приводит к потере активности белково-полипептидного комплекса.

Белково-полипептидный комплекс представляет собой лиофилизированный порошок светло-бежевого или желтоватого цвета и содержит комплекс биологически активных полипептидов. В воде препарат практически полностью растворим, а в 0,9%-ном растворе NaCl препарат растворяется полностью. Допускается использование 0,25-0,5%-ного раствора новокаина, где препарат также полностью растворим. Получаемый раствор препарата прозрачен. Цвет раствора не превышает эталон 5Б (ГФ XI, с. 194-197).

Далее проводят контроль параметров полученного белково-полипептидного комплекса.

Определение белка (ОФС.1.2.3.0012.15) (Государственная фармакопея 13 издание (ГФ XIII)).

1. Тестирование на отсутствие высокомолекулярных белковых фракций осуществляют по стандартной методике путем добавления к 1%-ному раствору БПК 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (Использование 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты недопустимо, так как приведет к осаждению высокомолекулярной фракции белков 200 кДа). Сохранение прозрачности раствора подтверждает отсутствие в нем белковых

компонентов молекулярной массы больше 200 кДа.

2. Для определения в БПК пептидных связей к 1 мл 1%-ного раствора препарата добавляют биуретовый реактив в количестве 4 мл. Окрашивание раствора в фиолетовый цвет свидетельствует об имеющихся в препарате полипептидных связях.

Для приготовления биуретового реактива 0,75 г меди сульфата и 3,0 г натрия (калия) виннокислого растворяют в 250 мл воды. К полученному раствору добавляют 150 мл 10%-ного раствора NaOH и 1 г калия иодида. Затем объем раствора доводят водой до 1000 мл.

3. Для определения в БПК полипептидов и их фракций используют методы ультрафиолетовой спектрофотометрии, гельхроматографии, изоэлектрического фокусирования и их модификации.

Ультрафиолетовый спектр БПК в воде снимают в области длин волн от 250 до 350 нм. Содержимое 5 флаконов (в одном флаконе вместимостью 5 мл содержится 10 мг биологически активного вещества) растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора метки. На спектрофотометре снимают УФ-спектр раствора БПК в воде, который дает максимум поглощения при 275±6 нм.

4. Для характеристики компонентов БПК, полученного заявляемым способом, по заряду и изоэлектрическим точкам (pI) проводят исследование методом изоэлектрического фокусирования. Для этого БПК растворяют в 8 М мочевине, содержащей 3% NP-40 и 10% бета-меркаптоэтанола, и наносят в концентрации 50 мг/мл на пластину Ampholine PAG plate с диапазоном pH 4,5-9,5. Фракционирование БПК проводят на приборе "Multiphor" (LKB, Швеция) в течение 12 ч при напряжении 200 В и t=3°C. Далее гель окрашивают кумасси яркий синим R-250 и денситометрируют при длине волны 600 нм. Исследование методом изоэлектрического фокусирования показывает, что в состав БПК, полученного заявляемым способом, входят полипептиды с pI от 3,5 до 9,5.

5. Молекулярную массу полипептидов, входящих в БПК, определяют методом гель-хроматографии на сефадексах G-25 и G-50 ("Pharmacia", Швеция). Для калибровки колонки используют Peptide Molecuar Weight Kit MS III ("Serva", Германия). Установлено, что БПК, полученный заявляемым способом, методом гель-хроматографии может быть разделен на 4 фракции, содержащие полипептиды с молекулярной масой от 0,5 до 200 кДа.

Таким образом, проведенные испытания подтвердили расширением качественных показателей белково-полипептидного комплекса, по сравнению с показателями продукта, полученного по прототипу.

Полученный заявляемым способом БПК был проверен на биологическую активность (Патент 2308487 Способ определения биологической активности тканевых препаратов, опубл. 20.10.2007, Бюл. №29). Биологическую активность БПК оценивают по влиянию на рост дрожжей. Для этого готовят взвесь дрожжей 1:20 на физиологическом растворе и 2% раствор глюкозы на дистиллированной воде. Отбирают в опытную пробирку 1 мл белково-полипептидного комплекса, 1 мл взвеси дрожжей и 28 мл раствора глюкозы. В контрольную пробирку помещают те же компоненты, заменяя белково-полипептидный комплекс 1 мл стерильного физиологического раствора. Закрывают пробирки герметичными пробками с выведенными наружу стеклянными трубками, концы которых опущены в колбу. Перед помещением пробирок в термостат из них берут по капле смеси и помещают в камеру Горяева, подсчитывая количество дрожжевых клеток в пяти больших квадратных камерах. Проводят термостатирование пробирок при температуре 33-35°C в течение 60-90 минут. По окончании опыта из

контрольной и опытной пробирок после взбалтывания берут по одной капле смеси и помещают в камеру Горяева, подсчитывая количество дрожжевых клеток в пяти больших квадратных камерах. Об активности белково-полипептидного комплекса судят по двум показателям: объему выделившегося углекислого газа и количеству дрожжевых клеток в контрольной и опытной пробирках.

Пример конкретного выполнения способа.

Пример

Исследования проводились на базе научно диагностического и лечебного ветеринарного центра Ставропольского государственного аграрного университета, на Ставропольской биофабрике. Сырьем служила мозговая ткань крупного рогатого скота, которую брали сразу же после убоя здоровых животных на Ставропольской биофабрике. Проведено быстрое охлаждение мозговой ткани на первой стадии при температуре минус 10°С и скорости циркуляции воздуха 1-2 м/с до температуры на поверхности ткани 1-2°С и в толще до 16-18°С (среднее время составляет 1-2 часа), на второй стадии ткани доохлаждали при температуре воздуха минус 1-1,5°С до температуры в толще 2°С (процесс занимает 6-8 часов), охлажденные ткани оставляли при температуре 4°С в течение суток для выдержки. После охлаждения и выдержки провели измельчение и гомогенизацией тканей с добавлением 1% раствора хлорида натрия (соотношение 1:1) с добавкой гидроксида натрия до pH~7, полученную смесь выдерживали в течение суток при температуре не выше +6°С, провели фильтрацию через неплотную ткань для отделения плотных нерастворимых остатков тканей, фильтрат подвергли сепарированию для разделения на фракции с отделением липидов (верхний слой) и оседанием мелких плотных нерастворимых остатков тканей мозга. Раствор декантировали с последующей ультрафиолетовой обработкой с использованием разрядной лампы низкого давления U-образной формы с длиной волны λ=253 нм со скоростью пропускания раствора через кварцевую трубку 50 мл в минуту. На последнем этапе проводили шоковую сублимационную сушку при глубокой заморозке.

Белково-полипептидный комплекс считают биологически активным, если происходит рост культуры дрожжей не менее чем на 20% по сравнению с контрольной группой, без белково-полипептидного комплекса (Фиг. 1).

Для более полной характеристики полученного белково-полипептидного комплекса по заявленному способу были проведены сравнительные испытания с продуктом, полученным по способу, описанному в прототипе. Сравнительные характеристики представлены на Фиг. 2.

Представленные на фиг. 2 данные демонстрируют, что полученный заявленным способом препарат имеет близкие качественные и количественные характеристики, но уступает белково-полипептидному комплексу по активности в 1,2 раза или на 54%.

В процессе работы проводились экспериментальные исследования по определению общей токсичности (острой, подострой и хронической) заявленного белково-полипептидного комплекса. При изучении острой токсичности определяли минимальные токсические и летальные дозы препарата. Изучение возможного токсического действия БПК на организм было выполнено в соответствии со следующими нормативными документами:

«Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств», части 1, 3 (Официальное издание Фармакологического комитета, М., 1985);

«Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)» (РД 64-126-91, М., 1992);

«Правила доклинической оценки исследований безопасности и эффективности фармакологических веществ» (М., Минздрав РФ, «Ремедиум», 2000, 7-17);

«Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» (там же, с. 18-24).

Параметры острой токсичности рассчитывали методом пробит - анализа по Литчфилду и Уилкоксону (Litchfield J.T., Wilcoxon F., 1949) в модификации З. Рота и математическим методом Кербера (Беленький М.Л., 1963).

Цель исследований состояла в определении переносимых токсических доз БПК, оценке степени и характера патологических изменений в различных органах и системах организма животных, а также зависимости токсических эффектов от дозы и длительности применения.

Для определения показателей острой токсичности белково-полипептидный комплекс растворяли в воде для инъекций и вводили белым мышам и крысам обоего пола внутримышечно (в/м) в возрастающих дозах по методу Литчфилда-Уилкоксона. Расчеты средних летальных доз проводили по методу В.Б. Прозоровского (Фармакология и токсикология, 1978, №4, с. 497-502). Для достижения больших доз препарата введение осуществляли повторно с интервалом 20-30 минут в течение 4 часов. Контрольные животные получали аналогичные по объемам введения растворителя - воды для инъекций (Фиг. 3).

Период наблюдения составлял 14 дней. Регистрируемые показатели: летальность, время гибели, симптоматика отравления, ежедневное наблюдение общего состояния и поведения, взвешивание до введения, на 7 и 14 сутки наблюдения, объемы потребления корма и воды (для этого животные помещались в обменные клетки итальянской фирмы «Texnoplast»), вскрытие и макроскопическое исследование всех погибавших и выживших животных в конце исследования (эвтаназия грызунов осуществлялась передозировкой диэтилового эфира), определение массовых коэффициентов внутренних органов.

Проведенные экспериментальные исследования показали, что БПК при остром введении экспериментальным животным практически не оказывает токсического действия.

Результаты токсикометрии, данные некропсии и наблюдений за экспериментальными животными в постинтоксикационном периоде острого отравления позволяют отнести БПК к IV классу малотоксичных лекарственных веществ. Состояние переживших острую интоксикацию животных свидетельствует о хорошей переносимости и безвредности белково-полипептидного комплекса в дозах, превышающих терапевтические в тысячи раз. Терапевтический индекс препарата составляет порядка 3000 (разовая доза для человека 0,15 мг/кг, а $ЛД_{50}$ для мышей при в/м введении - порядка 1106 мг/кг).

Учитывая малую токсичность, показанную в эксперименте при определении острой токсичности, рекомендации нормативных документов Фармакологического комитета и правил GLP для оценки хронической токсичности был выбран период 3 месяца.

В опытах на грызунах (крысы обоего пола) целевой продукт вводился в/м ежедневно на протяжении 90 дней в 3 дозах: в 10 раз большей терапевтической для человека - 1,5 мг/кг; максимальной 150 мг/кг (в 1000 раз большей терапевтической для человека, не вызывает гибели у крыс при однократном введении) и промежуточной - 15 мг/кг (в 10 раз большей терапевтической для человека).

Исследования проводились в соответствии с экспериментальной программой:

Животные - крысы обоих полов.

Путь введения - внутримышечный (в/м).

Дозы: 1 доза - 1,5 мг/кг; 2 доза - 15 мг/кг; 3 доза - 150 мг/кг.

Частота введения - в течение 90 дней.

Растворитель - вода для инъекций.

Число животных - 1 доза - 20 самцов, 20 самок;

2 доза - 20 самцов, 20 самок;

3 доза - 20 самцов, 20 самок.

контрольная группа - 20 самцов, 20 самок.

Общее количество - 160.

В процессе эксперимента проводили оценку следующих показателей: общее состояние, взвешивание, потребление воды, гематологические, биохимические исследования, физиологические исследования, макроскопическое исследование и взвешивание внутренних органов, гистологические исследования.

По итогам исследования было установлено, что белково-полипептидный комплекс у крыс обоих полов в/м один раз в сутки в течение 90 дней в дозах 1,5; 15; 150 мг/кг не влияет на внешний вид, общее состояние и поведение животных, не оказывает негативного влияния на биохимические параметры крови и основные физиологические функции организма, не вызывает патоморфологических изменений, что свидетельствует о хорошей переносимости и безвредности препарата.

Таким образом, белково-полипептидный комплекс, полученный предлагаемым способом, соответствует всем параметрам фармацевтического препарата. Предлагаемый способ обеспечивает более высокий процент выхода готового белково-полипептидного комплекса, чем предложенным в прототипе. Предложенный режим использования УФО обеспечивает оптимальное действие ионизирующего излучения, способствующее более эффективному уничтожению вредных микробов и микроорганизмов, что обеспечивает повышение качества сырья. А также исключается стадия термической обработки способствующей сохранению белковых структур от разрушения, а, следовательно, повышается качество и активность БПК.

Белково-полипептидный комплекс, полученный на основе заявляемого способа, содержит в качестве активного начала белки различных фракций и биологически активные вещества представляют фармацевтически приемлемый компонент. Заявленное фармацевтическое средство представляет собой комплекс, включающий биологически активные и белково-полипептидные вещества с молекулярной массой 0,5-200 кДа, изоэлектрической точкой 4,5-9,5 и максимумом поглощения в УФ спектре при длине волны 275±6 нм.

(57) Формула изобретения

Способ получения биологически активного белково-полипептидного гидролизата из свежего головного мозга убойных животных, включающий быстрое охлаждение головного мозга убойных животных в течение 1-2 часов при температуре минус 10°С и скорости циркуляции воздуха 1-2 м/с до температуры на поверхности ткани 1-2°С и в толще до 16-18°С, на второй стадии головной мозг доохлаждают в течение 6-8 часов при температуре воздуха минус 1-1,5°С до температуры в толще 2°С, охлажденный головной мозг оставляют при температуре 4°С в течение суток для выдержки, с последующим измельчением и гомогенизацией тканей с добавлением 1% раствора хлорида натрия в соотношение 1:1 и добавкой гидроксида натрия до pH ~ 7, полученную смесь выдерживают в течение суток при температуре не выше +6°С, проводят фильтрацию через марлю медицинскую или батист для отделения плотных нерастворимых остатков головного мозга, фильтрат подвергается сепарированию для

разделения на фракции с отделением верхнего липидного слоя и оседанием мелких плотных нерастворимых остатков головного мозга, декантируют с последующей ультрафиолетовой обработкой с использованием разрядной лампы низкого давления U-образной формы с длиной волны λ=253 нм со скоростью пропускания раствора через кварцевую трубку 50 мл за одну минуту, на последнем этапе проводят шоковую сублимационную сушку, проводимую при глубокой заморозке.

1

Определение биологической активности белково-полипептидного комплекс, полученного заявленным способом. Время термостатирования 90 минут

Контрольные данные		Опытные данные		
$V(CO_2)$, мл	Количество дрожжевых клеток, шт.	$V(CO_2)$, мл	Количество дрожжевых клеток, шт.	Выход, %
0,0	556	9,4	579	100
0,0	548	14,3	618	304

Фиг. 1

Определение биологической активности препарата, полученного по прототипу. Время термостатирования 90 минут

Контрольные данные		Опытные данные		
$V(CO_2)$, мл	Количество дрожжевых клеток, шт.	$V(CO_2)$, мл	Количество дрожжевых клеток, шт.	Выход, %
0,0	561	9,6	583	100
0,0	553	13,3	608	250

Фиг.2

2

Определение токсического действия белково-полипептидного комплекса

Вид животного	LD_0, мг/кг	LD_{20}, мг/кг	LD_{40}, мг/кг	LD_{60}, мг/кг	LD_{80}, мг/кг	LD_{100}, мг/кг
крысы	876	1300	1706	2158	2709	3614
мыши	565	799	1013	1203	1560	1991

Мыши: $ЛД_{50}$=1106±54 мг/кг

Крысы: $ЛД_{50}$=1900±77 мг/кг

Фиг. 3