



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1232124** **A3**

(51) 4 А 61 К 35/66

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2943651/28-14  
(22) 03.07.80  
(31) А-54-84681/79  
(32) 04.07.79  
(33) JP  
(46) 15.05.86. Бюл. № 18  
(71) JP  
(72) Чизато Маруяма (JP)  
(53) 576.8.097(088.8)  
(56) Заявка Японии № 48-43842,  
сер. 6(1), № сб. 46(46), 1973.

(54)(57) 1. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОАРА-  
БИНОМАННА, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВООПУ-  
ХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ, заключающийся  
в том, что биомассу *Mycobacterium*  
*tuberculosis* штамма Аоуата или H<sub>37</sub>RV  
экстрагируют водой при 100°C с по-  
следующим выделением и очисткой  
целевого продукта.

2. Способ по п.1, отличаю-  
щийся тем, что, с целью повыше-  
ния иммунологической активности це-  
левого продукта, последний этерифи-  
цируют жирной кислотой, например  
пальмитиновой.

(19) **SU** (11) **1232124** **A3**

Изобретение относится к медицине и касается получения лекарственного препарата.

Целью изобретения является получение липоарабиноманнана, обладающего противоопухолевой активностью, а также повышение иммунологической активности целевого продукта.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

**Пример 1.** Саутон среду засевают *Mycobacterium tuberculosis* штаммом Асуата и аэробное культивирование продолжается 14 дн. Клеточные тела отделяют фильтрацией и промывают холодной водой, после чего добавляют дистиллированную воду для флотирования (всплывания) клеток в воде. Клеточную взвесь нагревают при 100°C в течение 120 мин и фильтруют с получением водного раствора экстракта клеточных тел. К раствору добавляют сульфосалициловую кислоту для осаждения белкового компонента, после чего раствор подвергают центрифугированию для его разделения. Супернатант диализуют с использованием диализной мембраны, полученную жидкость смешивают с 9 частями по объему этилового алкоголя, полученную смесь разделяют центрифугированием и затем отделяют осажденный сырой липополисахарид.

Сырой липополисахарид загружают в колонку, набитую ДЕАЕ-Сефадексом А-25 (бикарбонатная форма) и собирают фракцию, элюированную дистиллированной водой. Эту фракцию концентрируют, перемешивают с равным количеством этилового алкоголя и смесь разделяют центрифугированием. Супернатант концентрируют и просеивают путем молекулярного просеивания согласно высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием колонки, набитой TSK Gel 4000 SW, TSK Gel 3000 SW и TSK Gel 2000 SW, при этом собирают фракцию с молекулярным весом от 10000 до 160000. Эту фракцию диализуют, концентрируют и затем очищают аффинной хроматографией с использованием конкавадин А-связанной агарозы с получением очищенного липополисахарида. Липополисахарид состоит из 61% арабинозы, 38% маннозы и 1% глюкозы, содержит жирные кислоты: метил лаурат, метил миристат, метил пальмитат, метил гентадеканоат, метил

стеарат, метил олеат, метил туберкулостеарат (всего 150,7 мкг).

Структура сахаридной цепи представлена в табл. 1.

**Пример 2.** *Mycobacterium tuberculosis* штамм H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> культивируют и затем обрабатывают биомассу согласно примеру 1. После очистки получают липополисахарид, состоящий из 56% арабинозы и 44% маннозы; содержит жирные кислоты: метил лаурат, метил миристат, метил пальмитат, метил гентадеканоат, метил стеарат, метил туберкулостеарат (всего 79,6 мкг).

Структура сахаридной цепи представлена в табл. 2.

**Пример 3.** Способ получения липоарабиноманнана из безлипидного арабиноманнана.

Биомассу, полученную по примеру 1, экстрагируют щелочью 1 н. NaOH при комнатной температуре и путем молекулярного просеивания получают арабиноманнан с молекулярным весом от 8500 до 14000. Полученный арабиноманнан далее очищают аффинной хроматографией, высушивают и 10 мг сухого арабиноманнана, вводят в реакцию с 10 мг пальмитинового ангидрида при 50°C в течение 20 ч в N,N-диметилформамидпиридин. К реакционной смеси добавляют этиловый эфир и осадок отделяют центрифугированием, промывают этиловым эфиром, высушивают с получением 11 мг липоарабиноманнана.

Структура сахаридной цепи аналогична препарату по примеру 1. Пальмитиновая кислота связана в основном по 5 положению арабинозной единицы в цепи арабиноманнана в количестве 9,8 вес.% и средний молекулярный вес -- более 12500.

**Пример 4.** Биомассу, полученную по примеру 2, экстрагируют щелочью 1 н. NaOH при комнатной температуре, подвергают очистке арабиноманнан согласно примеру 3. 10 г сухого арабиноманнана вводят в реакцию с 8 мл пальмитохлорида при 37°C в течение 16 ч используя в качестве растворителя смесь пиридина с N,N-диметилформамидом. К реакционной смеси добавляют этанол и отделяют образующийся осадок центрифугированием, промывают его этиловым эфиром и сушат, получая в результате 10 мг липоарабиноманнана.

Структура сахаридной цепи вещества аналогична веществу, полученному по примеру 2. Пальмитиновая кислота связана в основном со звеном арабинозы в цепи арабиноманнана в положении 5 в количестве около 7,6 вес.% и средний молекулярный вес составляет 12000.

Пример 5. 5 мг арабиноманна, содержание жирной кислоты в котором около 3% и который получен способом, аналогичным примеру 1, обрабатывают ультразвуком с 10 мг пальмитоилхлорида в пиридине и реакцию проводят при 37°C в течение 18 ч. К реакционной смеси добавляют этиловый спирт, осадок собирают, промывают этиловым эфиром и высушивают с получением 4,3 мг липоарабиоманна.

Анализ показывает, что пальмитиновая кислота связана в основном по 5 положению арабинозной единицы и 6 положению маннозной единицы в цепи арабиноманна в количестве около 28 вес.% и средний молекулярный вес около 14000.

Липоарабиоманн, полученный по примерам 3 и 5, может быть получен также при использовании безлипидного или низколипидного арабиоманна, экстрагированного и очищенного из клеточных тел *Mycobacterium tuberculosis* штамма H<sub>37</sub>Rv. Кроме того, вмес-

то пальмитиновой кислоты по примерам 3 и 5 может быть использована стеариновая кислота.

Следующие примеры иллюстрируют противоопухолевую активность арабиоманна.

Пример 6. Клетки (1x10<sup>6</sup>) опухоли Саркомы-180 подкожно трансплантируют dd.Y мышам (самки, возраст 10 нед.), которые были сенсibilизированы BCG. Начиная со следующего дня, липоарабиоманн, растворенный стерильно в физиологическом растворе, вводят подкожно группам мышей (каждая группа состоит из 8 мышей) в количестве от 0,2 до 2,0 мкг на каждую мышь через день 8 раз в целом. Через 30 дней после трансплантации опухолевых клеток тестируемых животных забивают и измеряют вес опухоли. Противоопухолевую активность каждого липоарабиоманна оценивают на основе измерения веса опухоли. Раствор для инъекции готовят следующим образом.

1 мг липополисахарида растворяют в соответствующем количестве физиологического раствора для инъекций с образованием 100 мл раствора. Раствор готовят в виде формы для подкожных инъекций, содержащей 10 мкг/мл липополисахарида. Этот раствор вводят подкожно 1-3 раза (10-30 мкг липополисахарида) в неделю.

Побочных эффектов при использовании препарата не наблюдается.

Таблица 1

| Обнаруженный сахарид            | Индикаторная связь | Отношения к 2-0 метил-арабинозе (=170) | Содержание, % |       |
|---------------------------------|--------------------|----------------------------------------|---------------|-------|
| 2,3,5-Три-0-метил-D-арабиноза   | ← (Araf) 1 →       | 1,2                                    | 6,2           | 59,5% |
| 2,3-Ди-0-метил-D-арабиноза      | ← 5(Araf) 1 →      | 8,0                                    | 41,0          |       |
| 3,5-Ди-0-метил-D-арабиноза      | ← 2(Araf) 1 →      | 1,4                                    | 7,2           |       |
| 2-0-Метил-D-арабиноза           | ← 3(Araf) 1 →      | 1,0                                    | 5,1           |       |
| 2,3,4,6-Тетра-0-метил-D-манноза | ← (Manp) 1 →       | 2,5                                    | 12,8          | 40,5% |
| 3,4,6-Три-0-метил-D-манноза     | ← 2(Manp) 1 →      | 1,2                                    | 6,1           |       |
| 2,3,4-Три-0-метил-D-манноза     | ← 6(Manp) 1 →      | 1,4                                    | 7,2           |       |
| 3,4-Ди-0-метил-D-манноза        | ← 2(Manp) 1 →      | 2,8                                    | 14,4          |       |
| Общее                           |                    | 19,5                                   | 100           |       |

Т а б л и ц а 2

| Обнаруженный сахарид            | Индикаторная связь             | Отношение к 2-0-метил-арабинозе (=1,0) | Содержание, % |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------|---------------|
| 2,3,5-Три-0-метил-D-арабиноза   | ← (Araf) 1 →                   | 0,9                                    | 3,0           |
| 2,3-Ди-метил-D-арабиноза        | ← 5(Araf) 1 →                  | 12,4                                   | 41,5          |
| 3,5-Ди-метил-D-арабиноза        | ← 2(Araf) 1 →                  | 2,3                                    | 7,7           |
| 2-0-Метил-D-анабиноза           | ← 3(Araf) 1 →<br>← 5(Araf) 1 → | 1,0                                    | 3,3           |
| 2,3,4,6-Тетра-0-метил-D-манноза | ← (Manp) 1 →                   | 2,8                                    | 9,4           |
| 3,4,6-Три-0-метил-D-манноза     | ← 2(Manp) 1 →                  | 2,7                                    | 9,0           |
| 2,3,4-Три-0-метил-D-манноза     | ← 6(Manp) 1 →                  | 5,3                                    | 17,7          |
| 3,4-Ди-0-метил-D-манноза        | ← 2(Manp) 1 →<br>← 6(Manp) 1 → | 2,5                                    | 8,4           |
| Общее                           |                                | 29,9                                   | 100           |

Редактор Ю. Середа      Составитель Г. Смирнова  
 Техред В. Кадар      Корректор С. Черни

Заказ 2664/60      Тираж 660      Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР  
 по делам изобретений и открытий  
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4