



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 48685

(13) A

(51) B A61K38/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КОМПЛЕКСУ ПЕПТИДНИХ ФРАГМЕНТІВ ГЕМОГЛОБІНУ

1

2

(21) 2001117694

(22) 12 11 2001

(24) 15 08 2002

(46) 15 08 2002, Бюл. № 8, 2002 р.

(72) Запорожець Тетяна Миколаївна, Кайдашев
Ігор Петрович(73) Запорожець Тетяна Миколаївна, Кайдашев
Ігор Петрович(57) Спосіб отримання комплексу пептидних
фрагментів гемоглобіну, що включає стабілізацію
суцільної крові, відмивання еритроцитів з наступним

руйнуванням мембран, денатурацію білка, перетравлення його пепсином, преципітацію великих білків трихлороцтовою кислотою, фільтрування та діаліз суміші, обробку її ацетоном, концентрування та ліофілізацію, який відрізняється тим, що додатково використовують галогенвмісну органічну кислоту, осадження білків та дегідратацію ацетоном з додаванням в екстракт двовалентних катіонів цинку та магнію, послідовну очистку на аніоніти та катіоніти

Винахід стосується галузі біології, медицини і ветеринарії і може бути використаний в біотехнології добування біологічно-активних речовин

Відомі способи отримання [Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Выделение, очистка и идентификация иммуномодулирующего полипептида содержащегося в тимусе телят человека // Биохимия - 1981 - Т 46 - Вып 9 - С 1652 - 1659, Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Влияние экстракта из эпифиза на течение экспериментальных опухолей и лейкозов // Эксперим. хирургия - 1973 - №1 - С 19 - 22, Оппель В.В. Нейтральная фракция низкомолекулярных пепсин-пептидов конского гемоглобина // Биохимия - 1961 - Т 26 - Вып 3 - С 462 - 466]

Найбільш близьким до заявляемого є спосіб отримання нейтральної фракції низкомолекулярних пепсин-пептидів кінського гемоглобіну, що включає розчинення гемоглобіну у воді та змішування з соляною кислотою до отримання 120мл 0,1н розчину HCl, який містить 1,42% гемоглобіну, переварювання 23 години при 38,7°C пепсином під шаром толуолу. Розщеплення пепсином закінчували зануренням колби на 5 хвилин у киплячу водяну баню. Із підропізату, після охолодження, осаджували білок, який не переварився, і високомолекулярні пептиди шляхом додавання при втрушуванні рівного об'єму 20%-ної оцтової кислоти. Після відстоювання упродовж 2,5 годин рідину фільтрували через беззольний фільтр 3 фільтрату, який містив нижчі пептиди, оцтову кислоту, видаляли повторним втрушуванням з ефіром, а залишки ефіру-нагріванням на киплячій

водяній бані. Об'єм рідини доводили водою до 240 мл. Визначення азоту (за зміненням методом Конвея) показало, що 52% білка перетворилося у фракцію низкомолекулярних пептидів [В.В. Оппель. Нейтральная фракция низкомолекулярных пепсин-пептидов конского гемоглобина // Биохимия - т 26 - вып 3, М., 1961 - С 462 - 466]

Однак, відомий спосіб не забезпечує достатнього ступеню видалення баластних речовин, а одержаний комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну має недостатньо високий вміст білка, який переходить в низкомолекулярну фракцію, що не дає змогу дослідити біологічну активність низкомолекулярних пепсин-пептидів гемоглобіну

В основу винаходу покладено завдання створити спосіб отримання комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну, шляхом удосконалення відомого способу, досягти одержання комплексу пептидних фрагментів з низьким вмістом баластних речовин та високим вмістом білка, здатного переходити в низкомолекулярну фракцію та за рахунок цього забезпечити можливість дослідження біологічної активності низкомолекулярних пепсин-пептидів гемоглобіну

Поставлену задачу вирішують створенням способу отримання пептидного комплексу гемоглобіну, що включає стабілізацію суцільної крові цитратом натрію, відмивання еритроцитів з наступним руйнуванням мембран, денатурацію білка, перетравлення його пепсином, преципітацію великих білків трихлороцтовою кислотою, фільтрування та діаліз суміші, обробку її ацетоном, концент-

(13) A

(11) 48685

(19) UA

рування та люофілізацію, який згідно винаходу відрізняється тим, що додатково для осадження білка та преципітації отриманих комплексів використовують галогенвмісну органічну кислоту, ацетон та додавання в екстракт двовалентних катіонів цинку та магнію, з наступною послідовною очисткою на аніоніти та катіоніти

Запропонований нами спосіб дає можливість отримати природні пептидні комплекси з високим вмістом низькомолекулярних фракцій білка, що досягається шляхом використання галогенвмісної органічної кислоти, яка має здатність неперворотно денатурувати баластні пептидні речовини. Крім того, додавання в екстракт двовалентних катіонів цинку та магнію приводить до утворення координаційних зв'язків метал-білок, що забезпечує особливий стан таких комплексів в розчині і покращує їх здатність преципітуватися. Спосіб достатньо простий, не потребує великих фінансів та часу.

Спосіб здійснювали наступним чином. Суцільну кров стабілізували 3,8% цитратом натрію в співвідношенні 1 : 9. Плазму вилучали центрифугуванням на протязі 20 хвилин при 3000об/хв. Еритроцити трикратно відмивали фізіологічним розчином та гемолізували 0,1н HCL. Денатурацію білка проводили 1 годину при 60°C. У вилучений гемолізат додавали пепсин враховуючи, що співвідношення його із субстратом повинно становити 2,5%, рН 2,5. Постійно змішуючи гемолізат з пепсином інкубували 4 год., при 37°C, потім преципітували великі білки 30% трихлороцтовою кислотою в кінцевій концентрації 5%. Після виділення дисперсного осадку та фільтрування реакційної суміші її діалізували проти дистильованої води до рН 6,0, та концентрували розчином желатину (5 год., 37°C). Вилучену суміш обробляли ацетоном у співвідношенні 1 : 10 (з 0,1% розчинами хлоридів цинку та магнію) і витримували 18 год. при +4°C. Осад збирали та відмивали ефіром для видалення залишків трихлороцтової кислоти. Преципітат висушували при 60°C.

Ідентифікація речовини

Вивчення фізико-хімічних властивостей речовини показало наявність позитивної біуретової реакції, що свідчить про її пептидну природу в отриманому екстракті. Загальний білок (біуретова реакція) складав 13г/л. Визначення білка реактивом Неслера 10г/л.

Це також підтверджується характерним спектром поглинання. Оптичну густину водного розчину

комплексу в УФ-області вимірювали на спектрофотометрі "СФ-46" (ЛОМО, Росія) в кюветі з товщиною пропускного шару 10мм при довжині хвиль від 180 до 300нм. Максимум спектру поглинання в УФ-області відмічався при довжині хвиль 200 - 220нм. Оптична густина

$$D_{220}$$

Відношення $\frac{D_{220}}{D_{214}} = 0,081-0,9$

$$D_{214}$$

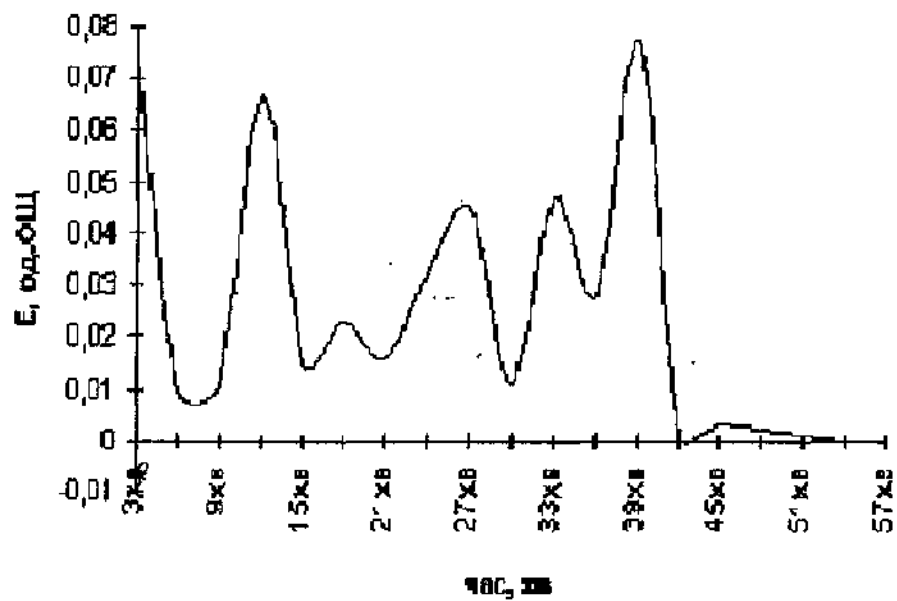
(Государственная Фармакопея XI, выпуск 1, С 34)

Молекулярну масу пептидів, що входять до складу комплексу аналізували методом колончатої гел-фільтрації на акрилексі П-10 (Угорщина), (вища границя молекулярної маси молекул які фільтруються 10кД). При гел-хроматографії проведений на рідинному хроматографі за загальновідомою методикою, пептиди розділяються на чотири основні фракції.

Нами, методом іонної хроматографії було досліджено хроматографічний спектр природного пептидного комплексу вилученого з гемоглобіну. При дослідженні користувалися колонкою G-15, в якості іонообмінника використовували слабкий аніоніт DEAE - $C_2H_4^+NH(C_2H_5)_2$. З подальшим переведенням у ОН форму. Для елюції застосовували фосфатний буфер $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ з рН = 7,5, концентрація NaCl становила від 0,01 до 0,1М. Швидкість потоку складала 1мл за хвилину. Фракції збирали за допомогою колектора фракцій YARGO.

Аналіз іонообмінної хроматографії встановив, що пептидний комплекс гемоглобіну розділявся на п'ять основних фракцій. Хроматографічний спектр підтверджується графіком. По осі абсцис - час утримання, по осі ординат - оптична густина.

Таким чином, препарат являв собою комплекс водорозчинних поліпептидів з молекулярною масою 4 - 10кДа, з максимумом спектра поглинання в УФ області (200 - 210нм), який має характерну хроматографічну криву з 6 основними фракціями, з часом утримання 3, 12, 18, 27, 35, 39 хвилин. Отриманий природний пептидний комплекс має високий вміст низькомолекулярних очищених фракцій білка, що в подальшому надасть змогу дослідити біологічну активність низькомолекулярних пепсин-пептидів гемоглобіну.



ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71