

(19)



VALSTYBINIS PATENTŲ BIURAS

(10) **LT 3241 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3241**

(51) Int.Cl.⁵: **A61K 37/00,**
A61K 45/05

(21) Paraiškos numeris: **IP1509**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 01**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 12 27**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 04 25**

(31,32,33) Prioritetas: **296811, 1992 12 02, PL**

(72) Išradėjas:

Jan Zbigniew Mioduszewski, PL
Krystyna Witkiewicz, PL
Magdalena Kowalska, PL
Joanna Goral, PL
Magdalena Klimecka, PL

(73) Patent savininkas:

TORF ESTABLISHMENT, Staedtle 36, FL-9490 Vaduz, LI

(74) Patentinis patikėtinis:

Raimonda Algimanta Skutele, 23, Architektų g. 45-69, 2049 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Preparato, turinčio imunomoduliacinį aktyvumą ir skatinančio citokinų susidarymą, gamybos būdas ekstrahuojant augalus ir augalų liekanas

(57) Referatas:

Netoksiškas preparatas, turįs imunomoduliacinį aktyvumą ir stimuliuojantis citokinų (interferonų, auglių nekrozės faktorių ir kt.) susidarymą, gautas ekstrahuojant augalus ir augalų liekanas, ir tinkamas žmonių ir gyvulių gydymui bei profilaktikai. Iš ekstrakto, geriausia iš durpių ekstrakto, humusines medžiagas pašalina parūgštinant jį druskos rūgštimi iki pH 1.5-3.0 ir nuosėdas atskiriant. Ekstraktą tuomet koncentruoja garinimu, esant sumažintam slėgiui, ir/ar naudojant nanofiltravimą, kai vienu metu pašalina neorganines druskas. Toliau koncentruoto tirpalo pH kelia iki 6.0-7.1. Gautą mišinį koncentruoja iki tiršto sirupo ir šildo prie 70-80°C, kol baigsis Amadori persigrupavimo reakcija produktuose, susidariusiuose reaguojant iš durpių ekstrahuotiems paprastiems cukrums, oligo- ir polisacharidams su aminorūgštimis ir/ar peptidais. Tuomet reakciją sustabdo atšaldant ir mišinį išvalo nuo hidrofobinių medžiagų, kurios mažintų produkto imunotropinį aktyvumą, jas adsorbavus ant specialios dervos. Taip gautą produktą paverčia sterilia kieta medžiaga džiovinant išpurškimu.

Teikiamas išradimas susijęs su išgavimu iš augalų ir augalų liekanų nenuodingų preparatų, turinčių imuno-
moduliacinį aktyvumą ir skatinančių citokinų (inter-
feronų, auglių nekrozės faktorių, ir t. t.) susidarymą,
5 kai juos paskiria žmonėms ir gyvuliams.

Buvo padaryta daug atskleidimų, susijusių su įvairių ekstraktų, ypač iš durpių, turinčių imunotropinį ar priešnavikinį aktyvumą, gamyba.

10

Hyoshita Takuya ir kt. (Chem. Abstr. 1974, 00, 47021j) pateikia procesą, kuriame durpes keletą kartų ekstrahuoja su 8% natrio šarmo tirpalu; gautą ekstraktą parūgština, centrifūguoja kietoms dalelėms atskirti,
15 tuomet dializuoja ir išgrynina chromatografinėje kolonėlėje. Frakciją, kuri turi antineoplazinį aktyvumą, daugiausia (95%) sudaro polisacharidai.

St. Tolpa ir kt. (Lenkijos patentas Nr. 124110) aprašo tą patį durpių ekstraktą, skirdamiesi kiek tai liečia jo tolesnį apdorojimą. Po parūgštinimo ekstraktą pašarmina, po to vėl parūgština, koncentruoja išgarinant, neutralizuoja, vėl koncentruoja, ekstrahuoja alkoholio - vandens mišiniu, toliau vėl iš dalies koncentruoja ir
25 ekstrahuoja eteriu ar kitu su vandeniu nesimaišančiu organiniu tirpikliu. Po to vandens sluoksnį atskiria ir grynina chromatografinėje kolonėlėje su filtruojančiu geliu. Tačiau nenurodyta, kurią iš frakcijų galima būtų laikyti sudarančią pageidautiną galutinį produktą.

30

Vietoje šarminės ekstrahuojančios terpės, jau žinomos iš dviejų aukščiau minėtų dokumentų, Lenkijos patentinė paraiška Nr. 279475 (Tarchominskie Zaklady Farmaceutyczne POLFA, publikuota BUP 24/90) gina durpių ekstrakcijos procesą, kur ekstrahentas yra parūgštinta vandeninė terpė.

35

Rūgštų ekstraktą neutralizuoja ir koncentruoja ultrafiltracijos ar grįžtamos osmozės būdu, panaudojant membranas su sulaikymo riba nuo 500 iki 10000 Daltonų. Tuomet produktą atskiria filtravimu kolonėlėje per gėlį
5 ar su anijonitine derva. Taip pat gali būti gautos frakcijos, besiskiriančios druskų koncentracija ir santykiu tarp polisacharidų ir glikoproteidų. Tačiau pažymi, kad visi gauti mišiniai yra nenuodingi ir rodo imunotropinį aktyvumą.

10 Aukščiau aprašyti procesai turi eilę bendrų požymių; jau seniai mokėta išskirti aktyvias medžiagas iš gamtinių žaliavų, išsaugant aktyvias medžiagas, ir tokiu būdu išvengti šalutinių reakcijų, galinčių būti
15 aktyvių medžiagų skilimo ar inaktyvacijos priežastimi. Deja, nei vienas iš ankstesnių žinomų techninių sprendimų neteikia žinių apie tikslią struktūrą ar cheminę prigimtį junginių, dėl kurių buvimo atitinkamu būdu gautas produktas (būdamas įvairių medžiagų mišiniu) yra
20 biologiškai aktyvus. Labai mažai yra pateikta informacijos apie polisacharidus ir panaudojimą atskyrimo metodų, kuriuose šalina mažos molekulinės masės frakcijas (dializė ir ultrafiltravimas); tai rodo, kad gautuose produktuose biologinį aktyvumą mėginama susie-
25 ti su didelės molekulinės masės frakcijomis.

Šiuose durpių ekstraktų tyrimuose buvo nustatyta, kad gauti ekstraktai netgi konservacijos sąlygomis pasižymi palyginus mažu imunotropiniu aktyvumu ar turi sunkiai
30 atskiriamas balastines medžiagas, daugiausia tai neorganinės druskos, kurių buvimas riboja produkto naudojimą pageidaujamuose farmaceutiniuose preparatuose; jos taip pat padidina darbo ir energijos sąnaudas tolimesnėse apdorojimo pakopose, ir netgi daro produktą
35 netinkamu naudojimui eilėje terapinių taikymų.

Pagrindinis šio išradimo tikslas - sukurti naują augalų ir jų liekanų ekstrakcijos ir ekstraktų apdorojimo

metodą, įgalinantį su didesne išeiga gauti preparatus, turinčius imunotropines savybes, galinčius skatinti citokinų susidarymą, ir neturinčius žinomų procesų trūkumų.

5

Netikėtai buvo nustatyta, kad kiekvienos produkto partijos imunotropinį aktyvumą išlaiko norimame intervale, o organinių medžiagų išeiga galutiniame produkte žymiai padidėja, kai ekstrahavimo sąlygas pakeičia pagal vieną ar daugiau sekančių požymių:

10

- kai kurios šalutinės reakcijos gali specialiai vykti kontroliuojama kryptimi ir kontroliuojamu laipsniu, dėl ko susidaro nauji junginiai, kurių žinomuose, pvz. durpių ekstraktuose arba visai nebūtų arba jie būtų tik nedidelėse koncentracijose;

15

- taip gautų ekstraktų apdorojimą modifikuoja tokiu būdu, kad vertingus ir gydomuosius ekstrakto komponentus nepašalina tuomet, kai atskiria balastines medžiagas, ir ekstrahuotas iš natūralių durpių ir/ar atsiradusias su ekstrahuojančia terpe.

20

Organinės medžiagos, susiję su biologiniu ir terapiniu aktyvumu iš durpių gautų preparatų, įskaitant TTP (TOLPA TORF PREPARATION, prekės ženklas, išduotas TORF CORPORATION, Lenkija, vardu), yra Amadori persigrupavimo junginiai ir produktai, gauti tokio aldozių ir aminorūgščių reakcijos produktų persigrupavimo eigoje, t. y. junginiai, kurių bendra formulė $R_1-CO-CH_2-NH-R_2$, kur R_1 yra liekana 1-dezoksi-2-ketocukraus, oligo- ar polisacharido, kuriame tokia 1-dezoksi-2-keto grupė yra galinė anglies atomų grandinės grupė, ir kur R_2 yra aminorūgšties liekana ar peptido liekana, kurioje galinė grupė yra laisva, nedalyvaujanti peptidinės jungties sudaryme, NH_2 -grupė. Tokių junginių gamybos procesas, lygiai kaip ir jų farmaciniai taikymai yra atskleisti PCT/EP93/00327.

30

35

- Šiame išradime yra nustatyta, kad galima gauti augalų ir augalų liekanų ekstraktus, kurie būtų turtingi abiem substraktais, reikalingais tokių aktyvių junginių sintezei, t. y. cukrais, oligo- ir polisacharidais iš
- 5 vienos pusės, lygiai kaip aminorūgštimis ir peptidais iš kitos pusės, ir galiausiai turėtų organines rūgštis ir/ar junginius su bent viena aktyvia metileno grupe, kaip katalizatorių aukščiau aprašytai reakcijai.
- 10 Šis procesas leidžia gaminti netoksiškus preparatus, pvz. gautus iš durpių, turinčius imunomoduliacinį aktyvumą ir skatinančius citokinų (interferonų, auglių nekrozės faktorių ir kt.) susidarymą gyvuose organizmuose, tinkančius terapiniam ir profilaktiniam naudojimui žmonėms ir gyvūnams. Neapdorotas durpes ekstrahuoja, humusines medžiagas atskiria nuo gauto ekstrakto, nusodinant jas rūgščioje terpėje; rūgština druskos rūgštimi iki pH 1.5-3.0; nuosėdas atskiria ir ekstraktą koncentruoja garinimu prie sumažinto slėgio
- 15 ir/ar nanofiltracijos būdu, kur tuo pačiu metu pašalina neorganines druskas; koncentruoto tirpalo pH pakelia iki 6.0-7.1; gautą mišinį koncentruoja iki tiršto sirupo ir šildo prie 70-90°C, geriausiai prie 80°C, kol pasibaigia Amadori persigrupavimas produktų, susidariusių reaguojant iš durpių ekstrahuotiems paprastiems cukrams, oligo- ir polisacharidams su aminorūgštimis ir/ar peptidais, kai galinėje laisvoje (nedalyvaujančioje peptidinės jungties sudaryme) NH₂ grupėje vyksta pavadinimas tinkamu 1-dezoksi-2-ketozės C₁
- 20 radikalų; po to reakciją sustabdo, reakcijos mišinį atšaldant; hidrofobines medžiagas, mažinančias produkto imunotropinį aktyvumą, pašalina iš reakcijoje gauto mišinio, naudojant selektyvią adsorbiciją ant specifinės adsorbuojančios dervos, tokios kaip AMBERLITE XAD tipo, geriausiai XAD-2 ar XAD-4 tipo, ar bet kokios kitos
- 25 dervos, turinčios panašias savybes.
- 30
- 35

5 Geriausia kai apdorojimui ima ekstraktą, kuris yra mišinys šarminio ir vandeninio ekstrakto, gautų ekstrahuojant natūralias durpes, pirmiausia vandeniniu šarmo tirpalu, po to vandeniu, prieš ekstrakciją jas galima praplauti rūgščiu tirpalu. Geriausiai tinka natūralios žemapelkės durpės su humifikacijos laipsniu nuo H6 iki H10.

10 Amadori persigrupavimo reakciją geriausia vykdyti koncentruotame vandeniniame tirpale ar koncentruotame vandeniniame-alkoholiniame tirpale.

15 Geriausia, jei adsorbiciją medžiagų, kurios turi būti pašalintos iš galutinio produkto, vykdo iš neutralaus ar silpnai rūgštaus tirpalo; kolonėles plauna destiliuotu vandeniu ir praskiestu vandeniniu šarmo tirpalu. Iš galutinio tirpalo biologiškai ir terapiškai aktyvias medžiagas išskiria kietame pavidale džiovinant išpurškimu. Amadori persigrupavimo reakcija gali būti kontroliuojama pasitelkus testinę reakciją, t. y. kalio heksacianoferato (III) redukcijos šarminėje terpėje persigrupavimo produktais reakciją. Kambario temperatūroje kalio heksacianoferatą (III) per minutę redukuoja tokie reduktoriai kaip askorbininė rūgštis, 25 per penkias minutes jį redukuoja gaminami persigrupavimo produktai, ir per 15-30 minučių redukuojantys cukrai. Redukcijos produktas kalio heksacianoferatas (II) su geležies (III) sulfatu sudaro Berlyno mėlį. Tokią reakciją galima panaudoti fotometriniam kiekybiniam persigrupavimo reakcijos monitoringui. Nustatytais laiko intervalais ima reakcijos mišinio pavyzdžius ir atlieka testinę reakciją. Persigrupavimo reakciją sustabdo, kai Berlyno mėlio spalvos intensyvumas redukuotame pavyzdyje daugiau nebedidėja.

35 Netikėtai buvo aptikta, kad apdorojamų substratų mišinyje, tokiam kaip durpių ekstraktas, pageidaujamų Amadori persigrupavimo produktų susidarymas vyksta

lengviau, negu laboratorijoje iš tų pačių cukrų ir aminorūgščių sumaišytoje kompozicijoje.

5 Toliau buvo nustatyta, kad kai kurios medžiagos, esančios durpių ekstrakto, didina galutinių preparatų, gautų pagal šiame išradime aprašomą procesą, biologinį efektyvumą, lyginant su analogiškais sintetiniais produktais, tuo tarpu kai kitos medžiagos mažina tokią efektyvumą.

10

Pradinis durpių ekstraktas, naudojamas šiame išradime aprašytame procese, turintis daug cukrų ir junginių su aminogrupėmis, yra gautas literatūroje aprašytu būdu. Geriausia pradinė medžiaga yra žemapelkės didelio humifikacijos laipsnio durpės, (pavyzdžiui nuo H6 iki H10 pagal skalę žinomą iš knygos: Moor und Torf-Kunde, leid. Karl-Hans Gotlich, Stuttgart, 3-čias leidimas, 15 1990), ir kai anglies santykis su azotu yra nuo 15 iki 35.

20 Vandeniniai ekstraktai gali būti gauti bet kuriuo, iš anksčiau aprašytų metodų, geriausiai kombinuotu, t. y. naudojant rūgštinę, neutralią ir/ar šarminę ekstrahuojančią terpę. Geriausia, kai natūralias durpes pradžioje trumpai (nuo 1 iki 2 val.) ekstrahuoja rūgštinėje vandeninėje ekstrahuojančioje terpėje, kad būtų išplautos neorganinės medžiagos, tokios kaip karbonatai, metalų oksidai ir panašios medžiagos; po to ilgesnį laiką, - nuo kelių iki daugiau nei dvidešimt valandų, - ekstrahuoja šarminėje vandeninėje terpėje (pavyzdžiui nuo 0.2% iki 0.6% natrio šarmo tirpale) 25 prie 20-50°C tam, kad būtų ištirpintos humusinės ir fulvorūgštys; ir galiausiai ekstrahuoja vandeniu, geriausiai destiliuotu vandeniu, prie 30-60°C dar 12 ar daugiau valandų; rūgštinį ekstraktą tuomet pašalina; 30 šarminį ir neutralų ekstraktus sumaišo ir toliau apdoroja pagal šį išradimą. 35

- Yra žinoma, kad durpes po ekstrahavimo yra sunku atskirti nuo ekstrakto ir kad skaidriems ekstraktams su gera išeiga gauti reikia turėti brangią įrangą, tokią kaip centrifuginius separatorius. Tokius sunkumus galima pašalinti, naudojant specialius ekstraktorius, kuriuose durpių kietoji dalis yra stacionariame guolyje, o ekstrahuojanti terpė cirkuliuoja per ją. Ekstrahavimo proceso detalės bus pateiktos kitose aprašymo vietose.
- 10 Pagal šį išradimą, šarminį vandeninį ekstraktą rūgština iki pH 1.5-3.0, geriausia 2.3-2.5, dėl ko humusinės rūgštys iškrenta į nuosėdas. Rūgštinimui tinka 6 mol/l druskos rūgštis. Nuosėdų susidarymas vyksta nuo keleto iki daugiau negu 20 valandų, susidaręs skaidrus ekstraktas gali būti dekantuojamas. Likusiai ekstrakto daliai surinkti galima būtų panaudoti centrifugavimą arba filtravimą.
- 20 Po to skaidrų tirpalą koncentruoja rotaciniame garintuve iki dešimtadalio pradinio tūrio. Kitaip koncentravimą ir neorganinių druskų pašalinimą galima vykdyti, reguliuojant tirpalo pH, nanofiltravimo būdu. Terminą "nanofiltravimas" naudoja apibrėžti pakeistam grįžtamos osmozės procesui, kur naudojamos membranos yra laidžios tik mažo dydžio molekulėms, tokioms kaip paprastų neorganinių druskų molekulės. Tokioms membranoms apibūdinti nesinaudoja sulaikymo trukme, bet daug dažniau jas skirsto pagal laidumą natrio chloridui. Buvo nustatyta, kad patenkinamus rezultatus gauna naudojant HC50PP tipo membranas, kurių laidumas natrio chloridui 40-60%, ar CA865PP tipo membranas, kurių laidumas natrio chloridui 66-74% (Dow produktas, Danija). Vykdamas procesą su šiomis ar panašaus tipo membranomis, imanoma kartu su tirpalo koncentravimu atlikti elektrolitų pašalinimą praktiškai be jokio nuostolio mažos molekulinės masės organinių medžiagų, kurios šiame išradime traktuojamos kaip svarbiausias proceso veiksnys (tuo tarpu pagal kitus žinomus metodus

vertingais labiau laikomi didesnės molekulinės masės komponentai), prisidedantis prie galiausiai gaunamo pageidaujamo produkto galutinio aktyvumo.

- 5 Du ką tik aprašyti koncentravimo būdai gali būti panaudoti tame pačiame procese vienas paskui kitą. Geriausia, kai pradžioje tirpiklį nugarina vakuuminiame rotaciniame garintuve; tuomet tirpalą neutralizuoja ir vykdo jo nanofiltravimą, kol pasiekia 8-12 g kietos
- 10 sausos liekanos 100 ml tirpalo koncentraciją. Jei kokiam ypatingam taikymui reikalingas didesnis nudruskinimo laipsnis, t. y. turi likti mažiau neorganinių druskų, tirpalą nanofiltravimo metu galima arba periodiškai arba nuolatos atskiesti destiliuotu van-
- 15 deniu (diafiltravimas). Didesni katijonai, tokie kaip Ca, Fe, Al, kurie per membranas migruoja daug lėčiau, gali būti prieš nanofiltravimą pakeisti natrio jonais, praleidžiant tirpalą, kuri ruošiamasi koncentruoti, per kolonėlę su silpnu katijonitu (pavyzdžiui, AMBERLITE E
- 20 IRC50) su natrio pavaduojamais jonais.

- Nanofiltravimo pabaigoje seka liekančio tirpalo pH, ir jei to reikia, nustato jo reikšmę 6.0-7.2, geriausiai 6.5-6.8. Po to tirpalą perkelia į rotacinį vakuuminį
- 25 garintuvą ir prie 35-40°C koncentruoja iki maždaug pusės pradinio tūrio (kol susidaro tirštas, sirupo pavidalo tirpalas). Dabar jau atmosferiniame slėgyje, nuolatos maišant, tirpalo temperatūrą kelia iki 70-90°C, geriausia iki 80°C, ir šildymą tęsia. Testinius
- 30 pavyzdžius pradžioje ima kas 30 min., o po 1.5 val., kas 15 min. Reakcijos eigos monitoringą vykdo matuojant anksčiau aprašytoje testinėje reakcijoje atsiradusios spalvos intensyvumą. Jei gu spalvos intensyvumas, atlikus aprašytą testinę reakciją su duotu pavyzdžiu, yra
- 35 toks pat ar mažesnis, negu prieš tai imto pavyzdžio, reakciją nutraukia staigiai atšaldžius šildymo vonią.

Pagal kitą variantą reakciją galima atlikti sekančiu būdu: reakcijos mišinį koncentruoja lygiai taip pat, kaip tai anksčiau aprašyta. Po to jį skiedžia 50% vandeniniu etanolio tirpalu tiek, kad jo užtektų

5 produkto ištirpinimui; toliau praskiestą tirpalą šildo su grįžtamu šaldytuvu, o reakcijos eigą seka ir kontroliuoja kaip tai anksčiau aprašyta, išskyrus tai, kad prieš atliekant testinę reakciją iš kiekvieno pavyzdžio išgarina tirpiklį. Kai reakcija baigiasi,

10 alkoholį nudestiliuoja, esant sumažintam slėgiui. Nustačius sausos kietos medžiagos kiekį po reakcijos susidariusiame mišinyje, pastarąjį skiedžia destiliuotu vandeniu tiek, kad susidarytų 10-12% tirpalas, kurį po to lėtai leidžia per kolonėlę, užpildytą nejoniniu XAD

15 tipo adsorbentu (Rohm & Haas produktas), geriausia XAD-2 ar XAD-4 tipo. Kontakto su šiuo adsorbentu metu stipriausiai adsorbuojamos hidrofobinės medžiagos, tuo tarpu silpniausiai adsorbuojamos hidrofilinės medžiagos, tokios kaip cukrai. Kolonėlę palikęs skystis

20 surenkamas. Po to kolonėlę plauna destiliuotu vandeniu, o eliuatą surenka į atskiras frakcijas. Kiekvieną frakciją chromatografiškai analizuoja ir/ar jų aktyvumą tikrina biologiniuose bandiniuose. Tuomet pradžioje praėjusį per kolonėlę skystį apjungia su eliuato

25 frakcijomis, pasirinktomis pagal reikiamą jų aktyvumą, norint gauti produktą su iš anksto apspręstu aktyvumu, pamatuotų skirtinguose testuose ir biologiniuose bandiniuose, santykiu. Biologiniai bandymai yra smulkiai aprašyti žemiau. Vėliau stipriausiai adsorbuotas

30 medžiagas išplauna praskiestu šarmo tirpalu, kol eliuatas dar yra neutralus. Vėlesnes frakcijas atmeta, nes jose yra medžiagos, stipriai stabdančios galutinio preparato biologinį aktyvumą.

35 Tirpalą, gautą ankstesnėje stadijoje, sterilizuoja filtravimu per membraną ir steriliose sąlygose džioviną purkštuvinėje džiovykloje, esant įleidžiamo oro

temperatūrai 180-185°C, o išeinančio oro temperatūrai apie 80°C.

5 Gauti milteliai yra smėlio spalvos, ir, laikomi kambario temperatūroje nuo oro uždaramame inde ir tamsoje, išlieka biologiškai aktyvūs ilgiau negu metus.

10 Aukščiau aprašyto galutinio produkto aktyvumą įvertina, atliekant sekančius testus, rodančius preparato poveikį atskiroms imunologinės sistemos reakcijoms:

15 1. Splenocitų, gaminančių E-rozetes procentinio kiekio nustatymas pagal Bach ir Dardenn (Cell. Immunol. 3, 1-16, 1972)

2. Splenocitų, gaminančių IgM tipo hemolitinius antikūnius, skaičiaus nustatymas pagal Jerne būdą, modifikuotą Mishell ir Dutton (J. Exp. med. 126, 423-442, 1967)

20 3. 19S + 7S ir 7S antikūnių hemagliutinacijos nustatymas aktyvios hemagliutinacijos teste pagal Adler (J. Immunol. 95, 26-38, 39-47, 1965)

25 4. Pelių timocitų 20-ties val kultūroje su hidro-kortizonu išlikimo testas (citotoksinis testas)

5. Interferono ir TNF indukcijos testas (PCT/EP93/00327)

30 Visuose aukščiau išvardintuose testuose gauto pagal šią išradimą produkto stimuliuojantis veikimas lyginant su kontroliniais tuščiais bandymais reiškiasi esant jo koncentracijoms jau nuo 0.05 iki 1 mg/kg (testai nuo 1 iki 3), nuo 0.05 iki 10 µg/ml (testas 4) ir nuo 10 iki 35 100 µg/ml (testas 5).

Kalbant apie kitas gauto pagal išradimą produkto savybes, reikia pabrėžti, kad atitinkamos savybės patenka

į ribas, apibrėžtas Lenkijos Sveikatos ministerijos leidime išduotame TTP (Tolpa Torf Preparation), kurio duomenys pateikti šio preparato analizės standarte.

5 Teikiamas bioaktyvaus produkto išgavimo iš durpių procesas duoda 10 kartų didesnę išeigą, negu tradiciniai metodai pagal Lenkijos patentą Nr. 124110. Tai reiškia, kad sunaudojama mažiau vertingų durpių, kurios yra pradinė žaliava. Dar daugiau, durpes po ekstrahavimo šarminiu tirpalu faktiškai išplauna vandeniu, taigi po proceso jos yra neutralios (neužterštos šarmais ar rūgštimis) ir aplinkai nekenksmingos; jos nėra ekologiškai pavojingos ir jas galima tiesiogiai naudoti žemės ūkyje.

15 Be to procese pagal šį išradimą nenaudoja jokio degaus organinio tirpiklio, tokio kaip dietilo eteris. Dėl didesnės aktyvių medžiagų, tame tarpe ir mažos molekulinės masės, koncentracijos preparatas yra lengviau rezorbuojamas, naudojant orališkai, negu TTP gautas tradiciniu būdu

Šį išradimą detaliau iliustruoja sekantys pavyzdžiai:

25 Pavyzdys 1: 45 kg durpių, turinčių 64-65% drėgmės, susmulkina, sijoja per sieta su 14 mm akutėmis ir supila į pusiau pramoninio dydžio ekstraktorių, specialiai sukonstruotą durpių ekstrakcijai. Per durpių sluoksnį iš 180 l talpos maitinimo rezervuaro labai lėtai, taip, kad skysčio lygis ekstraktoriuje kiltų apytikriai 1 cm/min, leidžia ekstrakcijai naudojamą 0,4% natrio šarmo tirpalą. Kada visas durpių sluoksnis pasineria po skysčiu, srauto greitį didina iki 500 l/min. Ekstrakto recikurliaciją vykdo 27 val, esant 35 40±2°C temperatūrai. Po to maitinimo siurbli išjungia; padavimo vožtuvus perjungia prie 120 l talpos indo su destiliuotu vandeniu ir plovimo skysčio cirkuliacija toje pačioje temperatūroje tęsia dar 16 val.

Šarminio tirpalo ir vandeninį ekstraktus sujungia; ekstraktą dekantuoja, ko pasėkoje gauna 240 l skysčio, kurio pH=12.1. Visą surinktą skystį po to apdoroja atskirai, padalinus jį į dvi dalis.

5

Pavyzdys 2: 120 l ekstrakto, gauto pagal pavyzdyje 1 aprašytą metodiką, rūgština iki pH reikšmės 2.1, sunaudojant tam 1.6 l 6 mol/l druskos rūgšties. Parūgštintą mišinį 24 valandoms palieka sedimentacijai. Po to 10 75 l skaidraus tirpalo dekantuoja, o likusią 25 l dalį išgauna filtravimu. Abu skaidrius tirpalus sujungia ir koncentruoja prie sumažinto slėgio rotaciniame stikliniame garintuve (SIMAX) kol tūris sumažės iki 19 l. Koncentruoto tirpalo pH reikšmę didina iki 6.8, 15 pridedant natrio šarmo. Gautas tirpalas yra beveik neutralus, jį destiliuotu vandeniu skiedžia iki 50 l ir po to vykdo jo nanofiltravimą Lab Unit M20 įrangoje (Dow Separation System, Danija, gamybos), turinčioje HC50PP tipo membranas. Bendras tokių membranų filtravimo plotas yra 0.36 m², slėgis 20 atm ir temperatūra 21°C. Galutinis tūris yra 7 litrai. 20

Koncentruoto ekstrakto pH reikšmė yra 6.6, todėl nereikalauja jokio koregavimo.

25

Gautą aukščiau koncentruotą ekstraktą perkelia į vakuuminį rotacinį garintuvą (BUCHI, Šveicarija) ir toliau koncentruoja prie sumažinto slėgio iki 1.3 l. Toliau tirpalą atmosferiniame slėgyje šildo iki 80°C; 30 šildymą tęsia nuolatos maišant sukimo būdu. Norimos reakcijos eigą seka, nustatant pavyzdžių, paimtų po kalio heksacianoferato (III) redukcijos testo, spalvos intensyvumą. Po 135 min spalvos intensyvumas nusistovi ar net šiek tiek sumažėja. Reakciją sustabdo atšaldant 35 reakcijos mišinį iki 20°C. Po reakcijos turimą mišinį perkelia į mažesnę (laboratorinę) garintuvą ir toliau, esant sumažintam slėgiui koncentruoja iki 800 ml (dabar jis turi 13.25 g sausos kietos medžiagos 100 ml).

Koncentruotą tirpalą filtruoja ir leidžia 0.8 ml/min greičiu per 26 mm skersmens kolonėlę, užpildytą 270 ml XAD-2 adsorbento. Skystį surenka ir kolonėlę plauna destiliuotu vandeniu. Surenka tris nuoseklias frakcijas (nuo 1 iki 3), kurių tūris atitinkamai lygus 160, 240 ir 400 ml. Toliau eliuentu naudoja 0.1% natrio šarmo tirpalą ir skystį renka tol, kol eliuato pH viršys 7.0; ši ketvirta 220 ml tūrio frakcija turi pH reikšmę lygią 7.0. Frakcijų sudėtį nustato chromatografiškai (horizontalioji skysčio chromatografija popieriuje). Frakcijas Nr. 1, 2, 300 ml frakcijos Nr. 3 ir 150 ml frakcijos Nr. 4 sumaišo, tirpalą koncentruoja iki 100 ml ir po to sumaišo su pradžioje per kolonėlę praėjusio skysčio dalimi. Galutinį tirpalą sterilizuoja, filtruojant steriliomis sąlygomis per membraną su 0.22 μ m poromis, po to džiovina steriliomis sąlygomis purkštuvinėje džiovykloje, esant įleidžiamo oro temperatūrai 185°C, išleidžiamo oro temperatūrai 81°C. Bendra gautų miltelių išeiga yra 96 g.

Pavyzdys 3: Kitą 120 l tūrio ekstrakto dalį parūgština (kaip aukščiau pavyzdyje 2) iki pH 2.3, humusinių rūgščių nuosėdas atskiria kaip tai aprašyta pavyzdyje 2, ir gauna 98 l parūgštinto skaidraus tirpalo. Tirpalą neutralizuoja iki pH 6.7 su 4 mol/l NaOH tirpalu ir palieka 12 valandų. Po to jį filtruoja ir vykdo nanofiltraciją tomis pačiomis sąlygomis, kaip tai aprašyta pavyzdyje 2. Galutinis filtrato tūris yra 101. Toliau įpila 20 l destiliuoto vandens; gautą tirpalą galutinai sukonzentruoja iki 7 l. Tolimesnį apdorojimą vykdo tokiu pat būdu, kaip ir pavyzdyje 2, išskyrus tai, kad Adamori persigrupavimo produktų susidarymą tęsia 110 min. Galutinė miltelių išeiga yra 84 g.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Preparato, turinčio imunomoduliacinį aktyvumą ir skatinančio citokinų susidarymą gyvuose organizmuose, tinkančio gyvulių gydymui ir profilaktikai, gamybos būdas, pagal kurį ruošia natūralių augalų ir jų liekanų ekstraktą, humusines medžiagas iš gauto ekstrakto atskiria nusodinant rūgščioje terpėje, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad:

-humusines medžiagas iš ekstrakto šalina parūgštinant jį druskos rūgštimi iki pH 1.5-3.0 ir atskiria susidarancias nuosėdas, toliau ekstraktą koncentruoja garinimu, esant sumažintam slėgiui, ir/ar nanofiltracijos būdu, kur kartu pasišalina neorganinės druskos, po to koncentruoto tirpalo pH reikšmę pakelia iki 6.0-7.1,

-gautą mišinį koncentruoja iki tiršto sirupo ir šildo prie 70-90°C, geriausiai prie 80°C, kol pasibaigia Amadori persigrupavimas produktų, susidariusių reaguojant iš durpių ekstrahuotiems paprastiems cukrams, oligo- ir polisacharidams su aminorūgštimis ir/ar peptidais, kai galinėje laisvoje (nedalyvaujančioje peptidinės jungties sudaryme) -NH₂ grupėje vyksta pavadavimas tinkamu 1-dezoksi-2-ketozės C¹-radikalu,

-reakciją sustabdo, reakcijos mišinį atšaldant, hidrofobines medžiagas (kurios mažintų produkto imunotropinį aktyvumą) pašalina selektyvios adsorbcijos būdu, naudojant specifinę absorbuojančią AMBERLITE XAD tipo dervą, geriausia XAD-2 ar XAD-4 tipo ar kitą dervą, turinčią panašias savybes.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pradinis ekstraktas yra mišinys šarminio ir vandeninio ekstraktų, gautų natūralias neapdorotas, geriausia žemapelkes durpes, kurių humifikacijos

laipsnis H6-H10, ekstrahuojant šarminiu vandeniniu tirpalu, po to vandeniu, prieš ekstrahaciją galima jas praplauti rūgšties tirpalu.

5 3.Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad Amadori presigrupavimo reakciją vykdo
koncentruotame vandeniniame tirpale ar koncentruotame
vandeniniame-alkoholiniame tirpale.

10 4.Būdas pagal 1-3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad medžiagas, kurių neturi būti galutiniame pro-
dukte, iš rūgštaus ar neutralaus tirpalo adsorbuoja
kolonėlėse, kurias po to plauna destiliuotu vandeniu ir
praskiestais šarmų tirpalais.

15

5.Būdas pagal 1-4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad galutinį tirpalą džiovina išpurškimo būdu, tuo
pačiu ir sterilizuoja.

20