



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006104772/15, 15.02.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.02.2006

(45) Опубликовано: 10.07.2007 Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2112527 C1, 10.06.1998. RU 2141310
C1, 20.11.1999. RU 2183962 C2, 27.06.2002. CN
1733793, 15.02.2006. CN 1561844, 12.01.2005.
CN 1541568, 03.11.2004.

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100-летия
Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, патентный
отдел, Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Попов Александр Михайлович (RU),
Артюков Александр Алексеевич (RU),
Ли Ирина Арсентьевна (RU),
Глазунов Валерий Петрович (RU),
Кофанова Нина Николаевна (RU),
Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ТИБОХ ДВО
РАН) (RU)

(54) СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ АНТИКОАГУЛЯНТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ, И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается создания антикоагулянтных средств животного происхождения. Изобретение раскрывает антикоагулянтное средство, представляющее фрагмент коллагена с молекулярной массой около 12 кДа, содержащий 10,0-12,0% углеводов, 6,0-7,5% сульфатных групп, микро- и макроэлементы. Способ получения средства заключается в гомогенизации, экстрагировании дистиллированной водой при pH 8,0-8,5, далее в обработке экстракта ферментным препаратом при температуре 35-37°C при pH 7,5-8,5 в течение 3,5-4,5 ч, затем к охлажденной до комнатной температуры смеси добавляют этанол до содержания его в экстракте 40% и далее сформировавшийся нитевидный осадок отделяют, отжимают белковые волокна на фильтре, затем последовательно промывают 40% и 96% этанолом и сушат, далее продукт растворяют в 0,05-0,1 М растворе бикарбоната натрия, затем повторяют ферментолиз в тех же условиях; к полученному

раствору добавляют этанол до его конечной концентрации 50%; осадок отжимают на тканевом фильтре, промывают 50% раствором этилового спирта в дистиллированной воде, а затем 96%-ным этиловым спиртом и сушат на воздухе; далее продукт растворяют в воде и осаждают кислотой, осадок отделяют центрифугированием, растворяют в бикарбонате натрия, затем раствор, содержащий белок, подвергают диализу или ультрафильтрации на мембране, пропускающей вещества с молекулярной массой 15 кДа, после этого обессоленный раствор белка отделяют пропуская через стерилизующую мембрану с размером пор 0,2 мкм, далее собирают белковую фракцию, проходящую через мембрану, и целевой продукт высушивают. Изобретение обеспечивает расширение спектра веществ иного механизма антикоагулянтного действия, чем механизм действия гепарина, а также уменьшение количества побочных эффектов и расширение сырьевой базы для получения средств, обладающих антикоагулянтной активностью. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 2 табл., 6 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 35/56 (2006.01)**A61P 7/02** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006104772/15, 15.02.2006**(24) Effective date for property rights: **15.02.2006**(45) Date of publication: **10.07.2007 Bull. 19**

Mail address:

**690022, g.Vladivostok, pr-kt 100-letija
Vladivostoku, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, patentnyj
otdel, N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Popov Aleksandr Mikhajlovich (RU),
Artjukov Aleksandr Alekseevich (RU),
Li Irina Arsent'evna (RU),
Glazunov Valerij Petrovich (RU),
Kofanova Nina Nikolaevna (RU),
Kozlovskaja Ehmma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**TIKHOKEANSKIJ INSTITUT
BIOORGANICHESKOJ KHIMII
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJA
ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh DVO
RAN) (RU)**

(54) **PREPARATION OF ANTICOAGULANT ACTION AND METHOD FOR ITS OBTAINING**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: the present innovation deals with creating anticoagulant preparations of animal origin, moreover, it deals with the one being a fragment of collagen at molecular weight of about 12 kDa containing about 10.0-12.0% carbohydrates, 6.0-7.5% sulfate groups, macro- and microelements. The method for obtaining this preparation deals with homogenization, extracting with distilled water at pH being 8.0-8.5 followed by treating the extract with enzymatic preparation at about 35-37°C at pH being 7.5-8.5 for 3.5-4.5 h, then it is necessary to add ethanol to the mixture cooled up to room temperature up to its content in the extract of 40% and then the developed filamentous residue should be separate, protein fibers should be pressed upon a filter and successively washed with 40%- and 96%-ethanol and dried, then the product should be dissolved in 0.05-0.1 M sodium bicarbonate solution, then one should repeat fermentolysis under the same conditions; the solution obtained should be supplemented with

ethanol up to its final concentration of 50%; the residue should be pressed upon a cloth filter, washed with 50%-ethyl alcohol solution in distilled water, and then - with 96%-ethyl alcohol to be dried on air; then the product should be dissolved in water and deposited with acid, the residue should be separated due to centrifuging, dissolved in sodium bicarbonate, then protein-containing solution should undergo dialysis or ultrafiltration upon a membrane being permeable for substances at molecular weight being 15 kDa, after that desalinized protein solution should be separated by passing it through a sterilizing membrane at pore size of 0.2 mcm, then membrane-passing protein fraction should be collected and the target product should be dried. The innovation widens the range of substances of another mechanism of anticoagulant action against the action of heparin and, also, decreases the quantity of side effects and extends raw material basis for obtaining preparations of anticoagulant activity.

EFFECT: higher efficiency.

3 cl, 6 dwg, 7 ex, 2 tbl

Изобретение относится к области медицины и касается создания антикоагулянтных средств животного происхождения.

Наиболее часто в медицине в качестве антикоагулянтных средств используются препараты на основе гепарина и его производных. Гепарин является кислым мукополисахаридом с молекулярной массой около 16000 дальтон. Вырабатывается в организме человека и животных базофильными (тучными) клетками. В наибольших количествах содержится в печени и легких, меньше - в скелетных мышцах, селезенке и мышце сердца. Получают гепарин из легких крупного рогатого скота [Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. - М.: ООО "Изд. Новая Волна", 2005. 1200 с.].

Активность гепарина определяют по способности удлинять время свертывания плазмы крови и выражают в единицах действия (ЕД), 1 мг международного стандарта гепарина содержит 130 ЕД (1 ЕД=0,0077 мг). Практически препарат выпускается с активностью не менее 120 ЕД на 1 мг. Раствор гепарина для инъекций выпускается с активностью 5000, 10000 и 20000 ЕД в 1 мл [Клиническая биохимия / Под ред. В.А.Ткачука. 2-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 512 с.].

Гепарин является естественным противосвертывающим фактором и совместно с фибринолизином входит в состав физиологической антисвертывающей системы. Он относится к антикоагулянтам прямого действия, т.е. непосредственно влияет на факторы свертывания крови (XII, XI, X, IX, VII и II). Кроме того, он блокирует биосинтез тромбина и уменьшает агрегацию тромбоцитов. Противосвертывающее действие гепарина проявляется *in vitro* и *in vivo*. Гепарин обладает не только антикоагулянтным действием, но угнетает активность гиалуронидазы, активизирует в некоторой степени фибринолитические свойства крови и улучшает коронарный кровоток. Введение гепарина в организм сопровождается некоторым понижением содержания холестерина и β -липопротеидов в сыворотке крови [Клиническая биохимия / Под ред. В.А.Ткачука. 2-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 512 с.].

Противосвертывающее действие гепарина осуществляется при его введении в вену, мышцы или под кожу. Гепарин действует быстро, но относительно кратковременно. При однократном введении в вену угнетение свертывания крови наступает почти сразу и продолжается в течение 4-5 часов. Гепарин применяют при профилактике и терапии различных тромбоэмболических заболеваний и их осложнений, например, для предотвращения или ограничения тромбообразования при остром инфаркте миокарда, тромбозах и эмболиях магистральных вен и артерий, сосудов мозга и глаз. Кроме того, его используют при операциях на сердце и кровеносных сосудах для поддержания жидкого состояния крови в аппаратах искусственного кровообращения и гемодиализа, а также для предотвращения свертывания крови в лабораторных исследованиях. Гепарин часто назначают в сочетании с ферментными фибринолитическими препаратами. Применение гепарина обеспечивает улучшение состояния не только за счет непосредственного действия на тромб, но и вследствие развития коллатерального кровообращения, ограничения дальнейшего развития тромба и антиспастического действия [Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: ООО "Изд. Новая Волна", 2005. 1200 с.].

Кроме гепарина в последнее десятилетие в медицине вновь стали использоваться антикоагулянтные препараты на основе биологически активных веществ, выделенных из пиявок, и в первую очередь препарат гирудин. Препарат был впервые получен из слюнных желез пиявок *Hirudo medicinalis*. Для медицинского применения удалось получить рекомбинантный гирудин. Созданы также некоторые его аналоги - препараты "Ревакс" (десульфатогирудин), "Гирулог" (бавилирудин), "Аргатробан". Предложен отечественный препарат "Пиявит", выпускаемый в виде капсул, содержащих гирудин, ингибитор калликреина, трипсин, химотрипсин, липазу и гиалоронидазу [Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: ООО "Изд. Новая Волна", 2005. 200 с.].

Гирудин(65-членный пептид) - прямой ингибитор тромбина, блокирующий свертывание фибриногена, замедляющий активацию факторов свертывания V, VIII, XIII тромбином и препятствующий агрегации тромбоцитов. Гирудин и его аналоги связываются с тромбином

в двух различных участках - в каталитическом центре и в фибриноген-связывающей области, что определяет его высокое сродство и специфичность к тромбину. При различных формах острой коронарной недостаточности гирудин обладает несколько большей эффективностью, чем гепарин, в основном, за счет снижения частоты

5 несмертельных инфарктов миокарда. Относительная эффективность гирудина наиболее выражена в первые сутки и со временем нивелируется. Гирудин в оптимальной дозе не увеличивает существенно риск тяжелых геморрагических осложнений. К недостаткам гирудина следует отнести иммуногенность и преимущественно почечную экскрецию, [Warkentin T.E. Bivalent direct thrombin inhibitors: hirudin and bivalirudin // Best
10 Practice Res. Clinic. Haemat. 2004. V.17. P.105-125].

В отечественной и зарубежной литературе имеется информация о голотуриях, ткани которых богаты биологически активными веществами, обладающими широким спектром фармакологических эффектов. В частности, опубликован ряд работ о противоопухолевой, иммуномодулирующей и антифунгальной активности тритерпеновых гликозидов из
15 различных видов-голотурий, в том числе из трепанга. Известно, что мышечная ткань голотурий содержит большое количество коллагена, который участвует в регенерации клеток и поддержании структуры и функции соединительных тканей [Саватеева Л.Ю. и др. Дальневосточные голотурии и асцидии как ценное пищевое сырье // Владивосток. Изд. Дальневост. ун-т. 1983. 184 с.; Попов А.М. и др. Характеристика медико-биологических
20 свойств голотоксинов из дальневосточного трепанга // Материалы V-го Международного съезда "Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения". Россия. Санкт-Петербург, 2001. С.135-139].

Однако в доступной патентной и другой научно-технической литературе не обнаружено сведений о средствах, обладающих антикоагулянтной активностью, выделенных из
25 голотурий.

В качестве прототипа выбран гепарин, т.к. он является широко используемым лекарственным препаратом и близок к заявляемому средству по фармакологическому действию. Однако ему присущ ряд отрицательных свойств таких, как тромбоцитопения и аллергические реакции немедленного типа (крапивница, ангионевротический отек или
30 бронхоспазм). После введения гепарина наблюдается значительное замедление рекальцификации плазмы, понижение толерантности и удлинение тромбинового времени. Применяя гепарин, необходимо учитывать возможность развития геморрагии. Для предупреждения осложнений препарат вводят только в условиях стационара, ограничивая количество инъекций других лекарств. Дополнительное внутривенное введение гепарина,
35 который традиционно назначают после тромболитической терапии больным с острым инфарктом миокарда, не позволяет значительно снизить показатели смертности. Гепарин также не снижает частоту возникновения повторного инфаркта или рецидива ишемии и склонен повышать частоту кровотечений [Mahaffey K.W., Granger C.B., Collins R., et al. Overview of randomized trials of intravenous heparin in patients with acute
40 myocardial infarction treated with thrombolytic therapy // Am. J. Cardiol. 1996. V.77. P.551-556].

Имеются данные о наличии у гепарина иммуносупрессивных свойств. Одним из механизмов иммуносупрессивного действия является, по-видимому, подавление кооперативного взаимодействия Т- и В-клеток. Применение гепарина противопоказано при
45 заболеваниях, сопровождающихся замедлением процесса свертывания крови, а также при повышенной проницаемости сосудов, кровотечениях любой локализации (за исключением геморрагии при эмболическом инфаркте легкого или почек), подостром бактериальном эндокардите, тяжелых нарушениях функции печени и почек, острых и хронических лейкозах, апластических и гипопластических анемиях, остро развившейся аневризме сердца и венозной гангрене [Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: ООО
50 "Изд. Новая Волна", 2005. 1200 с.].

Поэтому поиск новых эффективных и безопасных антикоагулянтов остается до настоящего времени чрезвычайно актуальным.

В основу настоящего изобретения положена задача создания средства, обладающего

антикоагулянтной активностью, и разработана способ его получения из голотурий.

Поставленная задача решена новым средством, обладающим антикоагулянтным действием, характеризующимся тем, что оно представляет собой фрагмент коллагена, полученный путем ферментативного гидролиза тела голотурии *Apostichopus japonicus*, с

5

молекулярной массой около 12000 дальтон, содержащий углеводы, сульфаты, а также микро- и макроэлементы, и сохраняющий структуру нативного коллагена.

Новое средство получило название Апотромбостатин (АТС).

В доступной патентной и другой научно-технической литературе не обнаружено сведений о способах получения веществ белковой природы из голотурий.

10

Задача решена также разработкой способа получения средства белковой природы, обладающего антикоагулянтным действием, из голотурии. Сущность способа получения заявляемого средства заключается в следующем: тело голотурии *Apostichopus japonicus* гомогенизируют, экстрагируют дистиллированной водой при pH 8,0-8,5, затем экстракт обрабатывают ферментным препаратом при 35-37°C, при pH 7,5-8,5 в течение 3,5-4,5

15

ч, далее к охлажденной до комнатной температуры смеси добавляют этанол до содержания его в экстракте 40%. Сформировавшийся нитевидный осадок отделяют, отжимают белковые волокна на фильтре, затем последовательно промывают 40% и 96% этанолом и сушат, далее продукт растворяют в 0,05-0,1 М растворе бикарбоната натрия, затем осуществляют повторный ферментализ, осаждение и очистку белкового продукта.

20

Далее продукт растворяют в воде и осаждают кислотой, затем осадок отделяют центрифугированием и растворяют в 0,05-0,1 М растворе бикарбоната натрия. Затем раствор, содержащий белок, подвергают диализу или ультрафильтрации на мембране, пропускающей вещества с молекулярной массой 15 кДа с целью удаления низкомолекулярных примесей и солей. После этого обессоленный раствор белка

25

пропускают через стерилизующую мембрану с размером пор 0,2 мкм и собирают белковую фракцию, проходящую через мембрану. Целевой продукт высушивают.

В качестве ферментного препарата используют препарат, выбранный из ряда: комплекс коллагенолитических протеиназ, трипсин, проназа, субтилизин, коллализин.

30

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в расширении спектра веществ иного механизма антикоагулянтного действия, чем механизм действия гепарина, а также в уменьшении количества побочных эффектов.

35

Заявляемое средство АТС обладает антикоагулянтной активностью, которая носит выраженный дозозависимый характер, нетоксично, обладает высокой растворимостью в биосовместимых жидкостях и растворах. АТС обладает сравнительно умеренной

40

антикоагулянтной активностью, являясь преимущественно ингибитором начального звена системы свертывания крови, иницируемого внешними или внутренними факторами коагуляционного процесса. АТС не влияет на активность тромбина в фазе полимеризации фибринового сгустка. Механизм антикоагулянтного действия АТС на систему коагуляционного звена гемостаза отличается от такового для гепарина.

45

Вышеперечисленные свойства заявляемого средства приведут к тому, что в отличие от гепарина при применении АТС не будут возникать такие побочные эффекты, как кровотечения, геморрагии, нежелательные иммунологические реакции и др.

Технический результат заключается в расширении сырьевой базы для получения средств, обладающих антикоагулянтной активностью. Дальневосточный трепанг

50

Apostichopus japonicus является широко распространенным промысловым видом голотурий.

По данным физико-химического анализа АТС представляет собой полипептид с молекулярной массой 12212 дальтон (метод масс-спектрометрии). Аминокислотный состав, определенный на аминокислотном анализаторе "Биохром 30" (Англия), показал, что АТС

относится к коллагенам, на что указывает присутствие характерных для данной группы белков аминокислот: пролина, глицина, гидроксипролина и гидроксипролина.

Аминокислотный состав АТС представлен в таблице 1.

Как показал сравнительный анализ аминокислотного состава АТС и коллагенов,

выделенных из других источников, для него характерно повышенное содержание отрицательно заряженных аминокислот - аспарагиновой и, особенно, глутаминовой, оксикислот - серина, треонина и, особенно, тирозина, а также валина. По содержанию глицина гидроксипролина и пролина выделенный белок соответствует классическому коллагену.

Таблица 1

Аминокислотный состав АТС

№	Аминокислоты	Содержание, г/100 г
1	Лизинин	3,2
2	Аргинин	6,3
3	Гистидин	1,1
4	Аспарагиновая кислота	8,8
5	Глутаминовая кислота	14,7
6	Серин	4,6
7	Треонин	4,3
8	Глицин	18,7
9	Аланин	6,9
10	Валин	4,9
11	Лейцин	2,9
12	Изолейцин	2,1
13	Пролин	9,8
14	Тирозин	2,2
15	Фенилаланин	1,6
16	Метионин	0
17	Триптофан	0
18	Цистеин	0
19	Гидроксипролин	6,2
20	Гидроксилизин	1,7

По данным химического анализа АТС содержит в своем составе 10,0-12,0% углеводов, что характерно для нативного природного гидроксилированного и гликозилированного коллагена. АТС сохраняет структуру нативного коллагена, что доказано спектральными методами (УФ-, ИК-, КД- спектроскопии и флюоресценции). Содержание микро- и макроэлементов (S, K, Ca, Fe, Zn, Br) в нем определено методом рентгеновской флюоресценции. Наличие в АТС 6,0-7,5% сульфатных групп подтверждено присутствием серы как методом рентгеновской флюоресценции, так и прямым определением сульфатов (Кошелева Л.П., Глебо Л.И. ХПС, 1997, №4, с.500-502).

В таблице 2 представлены данные по определению химического состава образца АТС.

Таблица 2

Химический состав АТС

№ п/п	Компонент	Содержание, %
1	Белок	54,18
2	Моносахариды	10,91
3	Зола	18,41
4	Сульфат	6,49
5	Влага	7,49
	ИТОГО	97,48

На фиг.1 представлен масс-спектр АТС.

На фиг.2 представлены УФ-, ИК-, КД-спектры АТС.

На фиг.3 представлено изображение рентгеновской флюоресценции АТС.

На фиг.4 представлена данные по определению тромбопластинового времени.

На фиг.5 представлены данные по определению активированного парциального тромбопластинового времени.

На фиг.6 представлены данные по определению тромбинового времени.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1. Получение апотромбостатина (АТС).

1 кг мелкоизмельченной голотурии *Apostichopus japonicus* без внутренностей

измельчают на гомогенизаторе, заливают 3 литрами дистиллированной воды и доводят pH до 8,2 сухим NaHCO_3 . К гомогенату добавляют 2 г сухого комплекса коллагенолитических протеиназ, выделенного из гепатопанкреаса камчатского краба. Процесс ферментолиза проводят при температуре 36°C , постоянно поддерживая pH смеси около 8,0. Через 4 часа к охлажденной до 20°C смеси добавляют этанол до его конечной концентрации 40%. В течение 1 часа формируется нитевидный осадок, который отделяют на тканевом фильтре от растворимых продуктов ферментолиза. Отжатые на фильтре белковые волокна промывают 40%-ным раствором этанолом, затем 96%-ным этанолом, отжимают от следов растворителя и сушат.

Сухой остаток растворяют в 1 л 0,07 М раствора NaHCO_3 , pH 8,3 и добавляют 1 г высокоочищенного комплекса коллагенолитических протеиназ. Исчерпывающий ферментолиз белка проводят в тех же условиях. К полученному раствору добавляют 96%-ный этанол до его конечной концентрации 50%. Осадок отжимают на тканевом фильтре, промывают 50% раствором этилового спирта в дистиллированной воде, а затем 96%-ным этиловым спиртом и сушат на воздухе.

Полученный белковый продукт растворяют в дистиллированной воде и осаждают добавлением 0,1 н. HCl . Осадок белка отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин и снова растворяют в 0,07 М растворе NaHCO_3 . Низкомолекулярные примеси и соли удаляют диализом или ультрафильтрацией, используя мембраны, пропускающие вещества с молекулярной массой менее 15 кДа. Отмытый дистиллированной водой раствор белка помещают в установку со стерилизующей мембраной (поры 0,2 мкм) и белок разделяют на две фракции: проходящую через мембрану и полимерную, остающуюся над мембраной. Полученные белковые фракции высушивают и анализируют. Как показали анализы фракция, проходящая через мембрану, является АТС. Выход АТС - 300 мг.

Пример 2.

Средство получают, как в примере 1, но для протеолиза используют трипсин. Выход АТС - 150 мг.

Пример 3.

Средство получают, как в примере 1, но для протеолиза используют проназу. Выход АТС - 295 мг.

Пример 4.

Средство получают, как в примере 1, но для протеолиза используют субтилизин. Выход АТС - 285 мг.

Пример 5.

Средство получают, как в примере 1, но для протеолиза используют коллализин. Выход АТС - 300 мг.

Пример 6.

Изучение фармакологической активности апотромбостатина (АТС).

Токсичность. АТС хорошо растворим в воде, в водно-солевых и буферных растворах. Препарат обладает низкой токсичностью - $\text{LD}_{50} > 3000$ мг/кг массы крысы или мыши при пероральном введении и $\text{LD}_{50} > 1000$ мг/кг при внутрибрюшинном и подкожном введении.

Определение геополитической активности. При определении гемолитической активности АТС использовали суспензию эритроцитов, полученную из дефибринированной крови барана. Как показал эксперимент, апостатин в дозах до 5 мг/мл не проявлял гемолитического действия в отношении эритроцитов мыши в условиях *in vitro*.

Таким образом, АТС относится к малотоксичным соединениям, не обладающим гемолитической активностью даже в очень высоких концентрациях.

Пример 7. Изучение антикоагулянтной активности АТС. Определение влияния АТС на различные звенья коагуляционного гемостаза оценивали в условиях *in vitro*: (а) по времени свертывания человеческой плазмы после добавления к ней тканевого тромбопластина; (б) по времени свертывания плазмы в условиях стандартной контактной активации процесса свертывания; (с) по времени свертывания плазмы под влиянием

тромбина. Полученные результаты сравнивали с действием гепарина в аналогичных дозах: 0,1 и 0,4 мг/мл. В контрольные пробы вместо изучаемого препарата добавляли дистиллированную воду.

а. Определение тромбопластинового времени. Время свертывания контрольной плазмы при добавлении к ней тканевого тромбопластина, запускающего коагуляцию крови по внешнему пути, находилось в норме (ПТИ 100-120%) (фиг.4). В тесте протромбинового времени АТС после добавления к нормальной плазме вызывает незначительное увеличение времени свертывания в дозе 0,1 мг/мл, которое, однако, растет с увеличением концентрации белка до 0,4 мг/мл (ПТИ 60%). Используемый в качестве препарата сравнения гепарин обладает значительно более высокой противосвертывающей активностью (ПТИ 10-18%).

б. Определение активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ). Влияние исследуемых соединений на внутренний механизм активации процесса свертывания оценивали в условиях стандартной контактной активации процесса свертывания плазмы в тесте АПТВ. В дозе 0,4 мг/мл все соединения, включая АТС, ингибировали свертывание плазмы более чем на 3 мин (фиг.5). Четырехкратное уменьшение дозы АТС вызывает снижение его антикоагулянтной активности. Тем не менее, время свертывание рекальцифицированной плазмы после добавления АТС в этой дозе в 2,7 раз больше по сравнению с нормальной плазмой.

в. Определение тромбинового времени. В тесте определения тромбинового времени, воспроизводящего в лабораторных условиях конечный этап свертывания плазмы, было показано, что АТС в дозе 0,4 мг/мл не предотвращал образование фибринового сгустка (фиг.6). Следовательно, заявляемый препарат не влияет на ферментативную активность тромбина и не ингибирует самосборку мономеров фибрина в фазе полимеризации промежуточного продукта. Напротив, при добавлении гепарина в указанной дозе наблюдалась полная несвертываемость по тромбиновому времени, что связано со способностью гепарина ингибировать ферментативную фазу превращения фибриногена в фибрин. Известно, что основой антикоагуляционного эффекта гепарина является значительное увеличение активности антитромбина и блокирование целого ряда реакций, которые стимулируются тромбином.

Формула изобретения

1. Средство, обладающее антикоагулянтным действием, представляющее собой фрагмент коллагена, полученный путем ферментативного гидролиза тела голотурии *Apostichopus japonicus*, с молекулярной массой около 12000 Да и содержит в своем составе 10,0-12,0% углеводов, 6,0-7,5% сульфатных групп, а также содержит микро- и макроэлементы.

2. Способ получения средства, обладающего антикоагулянтным действием, заключающийся в том, что тело голотурии *Apostichopus japonicus* гомогенизируют, экстрагируют дистиллированной водой при pH 8,0-8,5, далее экстракт обрабатывают ферментным препаратом при температуре 35-37°C, при pH 7,5-8,5 в течение 3,5-4,5 ч, затем к охлажденной до комнатной температуры смеси добавляют этанол до содержания его в экстракте 40% и далее сформировавшийся нитевидный осадок отделяют, отжимают белковые волокна на фильтре, затем последовательно промывают 40 и 96%-ным этанолом и сушат, далее продукт растворяют в 0,05-0,1 М растворе бикарбоната натрия, затем повторяют ферментализ в тех же условиях, к полученному раствору добавляют этанол до его конечной концентрации 50%, осадок отжимают на тканевом фильтре, промывают 50%-ным раствором этилового спирта в дистиллированной воде, а затем 96%-ным этиловым спиртом и сушат на воздухе, далее продукт растворяют в воде и осаждают кислотой, осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин, растворяют в 0,05-0,1 М растворе бикарбоната натрия, затем раствор, содержащий белок, подвергают диализу или ультрафильтрации на мембране, пропускающей вещества с молекулярной массой 15 кДа, после этого обессоленный раствор белка отделяют, пропуская через

стерилизующую мембрану с размером пор 0,2 мкм, далее собирают белковую фракцию, проходящую через мембрану, и целевой продукт высушивают.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что в качестве ферментного препарата используют ферментный препарат, выбранный из ряда: комплекс коллагенолитических протеиназ,

5 трипсин, проназа, субтилизин, коллализин.

10

15

20

25

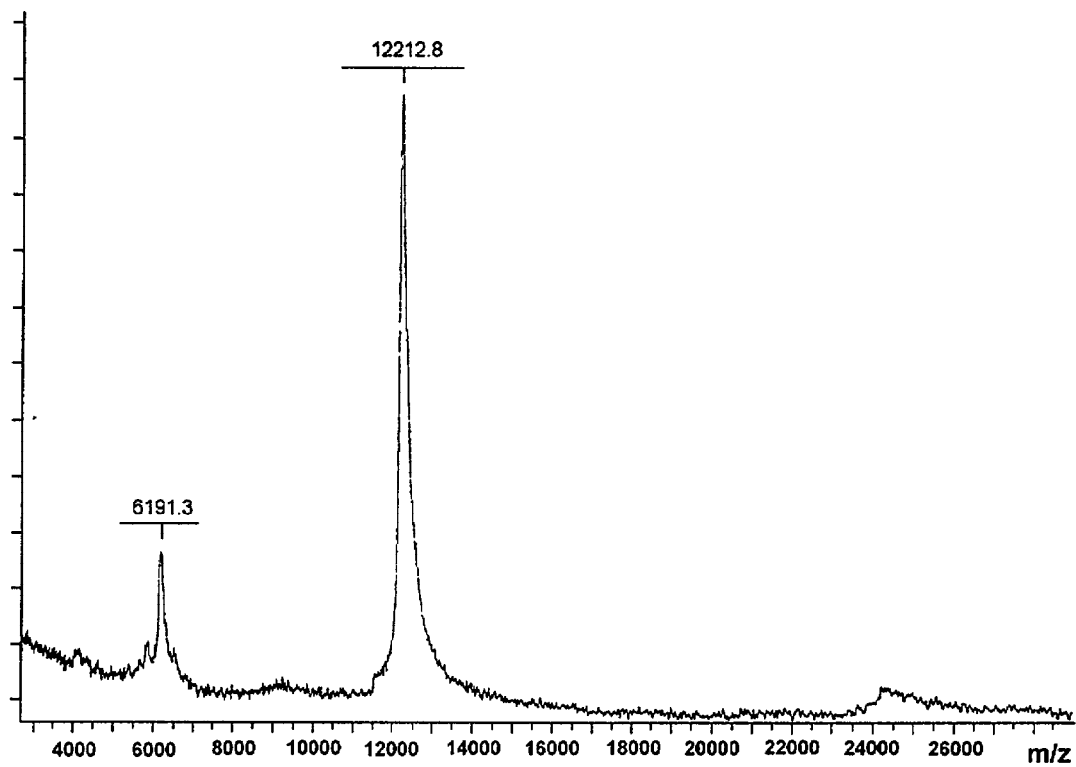
30

35

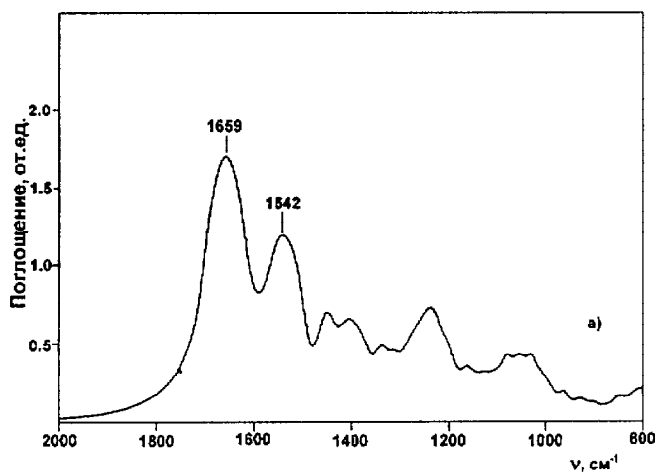
40

45

50

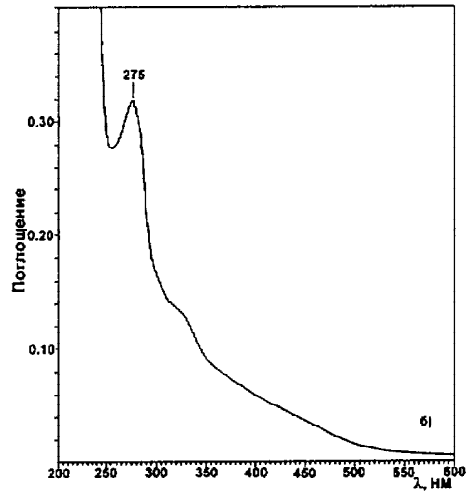


Фиг. 1



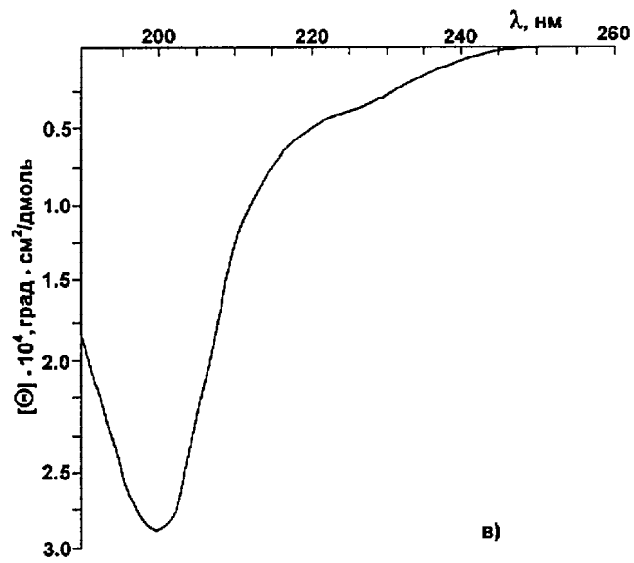
ИК-спектр АТС в КВг.

Фиг. 2а



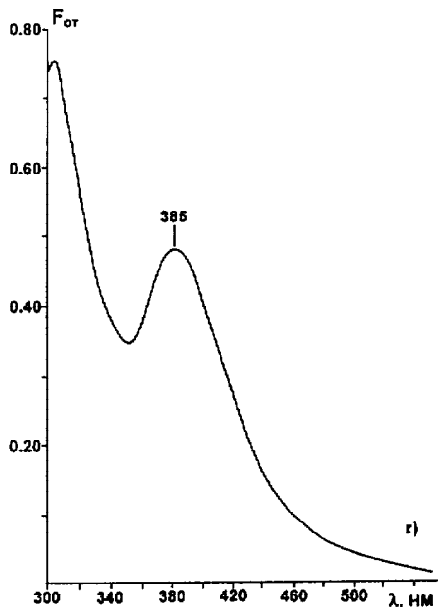
УФ-спектр АТС в физрастворе.

Фиг. 2б



КД-спектр АТС в физрастворе.

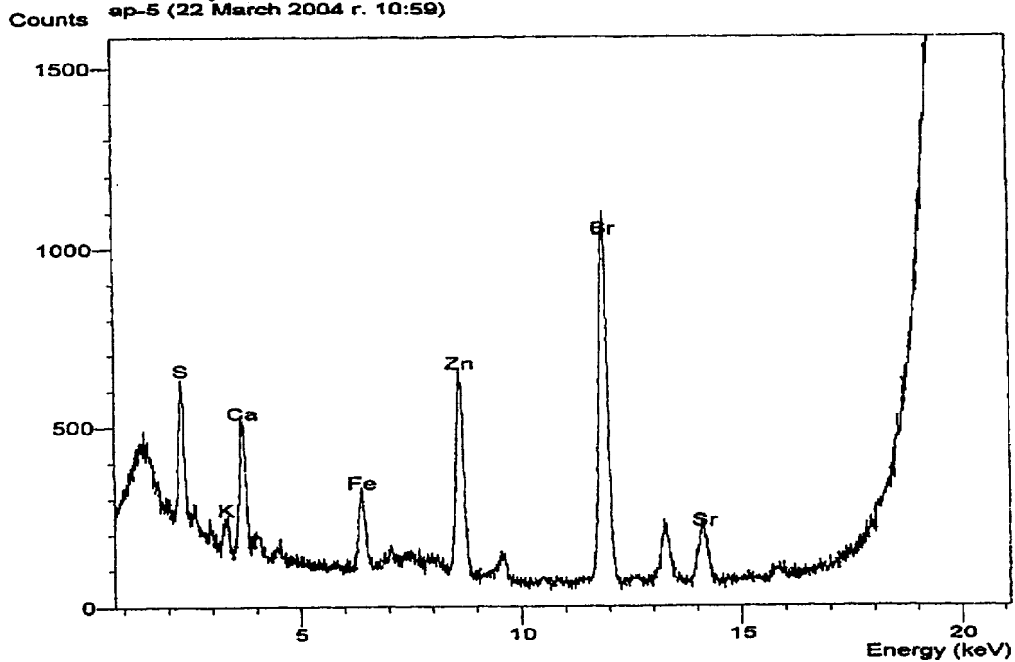
Фиг. 2в



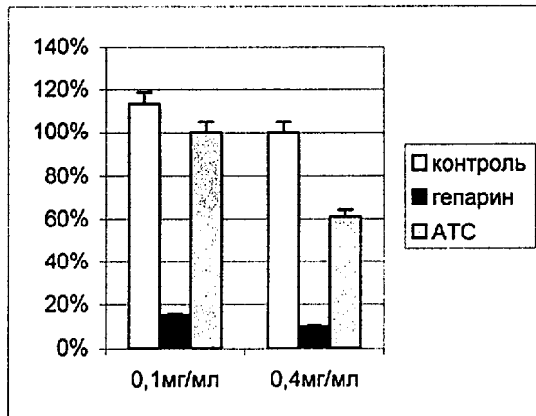
Спектр собственной флуоресценции АТС в физрастворе.

Фиг.2г

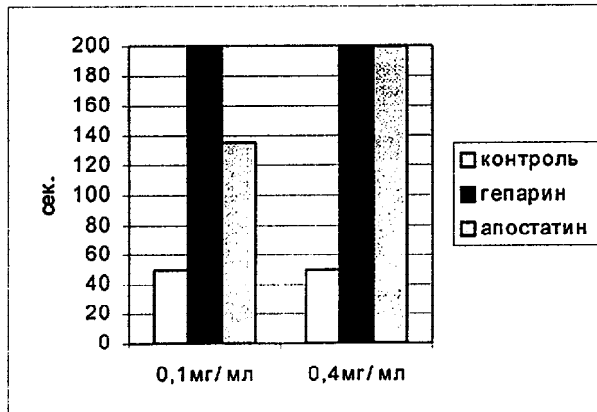
Operator : atomika
Client : <none>
Job : Polyakova
ap-5 (22 March 2004 r. 10:59)



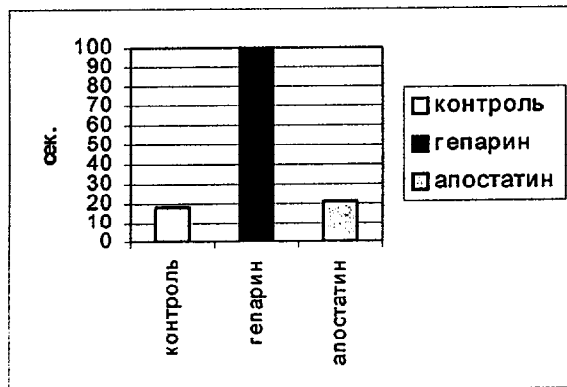
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг.5



Фиг.6