



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003118066/15, 16.06.2003

(24) Дата начала действия патента: 16.06.2003

(45) Опубликовано: 27.01.2005 Бюл. № 3

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 3980432 A1, 14.09.1976. СВИНТЕНОК Г.Ю. и др. Роль перекисного окисления липидов в процессе термической инактивации тканевого тромбопластина.// Вопросы медицинской химии, 1986, №6, с. 80-81. RU 2161975 C1, 20.01.2001. SU 1775897 A1, 27.04.1996. EP 0524803 A2, 27.01.1993. EP 0107383 A1, 02.05.1984. ЗАРУДИЙ Ф.С. и др. 2,6-Ди-трет-бутил-4-метилфенол (дибунол, ионол, тонарол) классический антиоксидант (обзор). Хим.-фарм. журнал, 2001, №3, с. 42-48.

Адрес для переписки:

610027, г.Киров, ул. Красноармейская, 72, ГУ Кировский НИИ гематологии и переливания крови

(72) Автор(ы):

Репнякова Е.М. (RU),
 Тарасова Л.Н. (RU),
 Владимирова С.Г. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

ГУ Кировский НИИ гематологии и переливания крови (RU)

(54) СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА СОХРАНЕНИЯ АКТИВНОСТИ СЫРЬЯ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ РЕАКТИВА ТРОМБОПЛАСТИНА ПОЛНОГО РАСТВОРИМОГО ДО И ВО ВРЕМЯ СУБЛИМАЦИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и касается сохранения активности сырья для изготовления реактива тромбопластина полного растворимого. Способ повышения качества сохранения активности сырья до и во время сублимационной сушки заключается в том, что в сырье, полученное из гомогената серого вещества мозга, вводят ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол) в количестве,

необходимом для приготовления 0,0001 М конечного раствора. Добавление этого вещества к сырью обеспечивает сохранение его высокой активности, равной 12,5-16,0 секунд, позволяет увеличить срок его хранения при (-40±2)С° до 10 недель перед проведением сублимации и предотвратить снижение активности в процессе ее. 2 табл.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 245 154** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 35/30, C 12 N 9/48**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2003118066/15, 16.06.2003**

(24) Effective date for property rights: **16.06.2003**

(45) Date of publication: **27.01.2005 Bull. 3**

Mail address:
**610027, g.Kirov, ul. Krasnoarmejskaja, 72, GU
Kirovskij NII gematologii i perelivanija krovi**

(72) Inventor(s):
**Repnjakova E.M. (RU),
Tarasova L.N. (RU),
Vladimirova S.G. (RU)**

(73) Proprietor(s):
**GU Kirovskij NII gematologii i perelivanija krovi
(RU)**

(54) **METHOD FOR INCREASING QUALITY IN KEEPING RAW MATERIAL ACTIVITY TO
MANUFACTURE COMPLETE SOLUBLE THROMBOPLASTIN REAGENT BEFORE AND DURING
SUBLIMATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: raw material obtained out of gray substance homogenate should be supplemented with ionol (2.6-di-tret-butyl-4-methylphenol) at quantity necessary to prepare 0.0001 M final solution. Addition of this substance to raw material enables to

keep its high activity being equal to 12.5-16.0 sec and enables to prolong its storage terms at (-40 ± 2) C up to 10 wk before carrying out sublimation and prevent the decrease of activity during sublimation process.

EFFECT: higher efficiency.
1 ex, 2 tbl

R U 2 2 4 5 1 5 4 C 1

R U 2 2 4 5 1 5 4 C 1

Изобретение относится к медицине и касается способа повышения качества условий сохранения активности сырья для изготовления реактива тромбопластина полного растворимого, используемого при определении протромбинового времени (ПВ, с) плазмы (крови), до и во время сублимации.

5 Отражая состояние внешнего пути свертывания крови, протромбиновое время широко используется в клинико-диагностических лабораториях для скринингового исследования свертывающей системы, контроля терапии антикоагулянтами непрямого действия, диагностики заболеваний печени, выявления дефицита витамина К. Принцип метода основан на активации коагуляционного каскада тканевым тромбопластином - аналогом
10 тканевого фактора.

В качестве прототипа использован наш патент №2161975 на "Способ сохранения активности сырья для изготовления тромбопластина полного растворимого до и во время лиофилизации" (1).

15 Существенным недостатком прототипа является то, что необходимо использовать несколько защитных веществ, сохраняющих активность сырья. Таковыми являются антиоксиданты, криопротекторы, а также буферные системы. Приготовление и смешивание их с полученным сырьем, четырехкратное контролирование значений рН и активности (в секундах) с контрольной плазмой (смеси свежей плазмы не менее 10 доноров) являются процедурами длительными и трудоемкими, требующими наличия четырех веществ, а также
20 приготовления буфера.

Целью настоящего изобретения является повышение качества и продолжительности сохранения сырья из серого вещества кадаверного головного мозга до 10 недель перед сублимационной сушкой и во время ее проведения.

35 Поставленная цель достигается тем, что в качестве защитных веществ используют только одно вещество, ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол), который, по данным литературы (2, 3, 4, 5), стабилизирует коагуляционную активность тромбопластина и увеличивает устойчивость к термической денатурации при сублимационной сушке. Он также предотвращает окислительные модификации белковой и липидной части тромбопластина в процессе хранения. Следовательно, ионол выполняет функции
40 антиоксиданта, криопротектора и буферной системы одновременно, что позволяет после смешивания сырья с этим защитным веществом тестировать сырье однократно, проводя контроль рН и активности (ПВ, с). Во время хранения сырья при $(-40 \pm 2)^\circ\text{C}$ до сублимации, значения рН находятся в пределах 6,5-7,4, а активность не превышает 14 с. Время хранения замороженного сырья, в течение которого активность не снижается,
45 увеличивается до 10 недель. Это важно при создании производственной технологии изготовления биологического реактива тромбопластина растворимого.

ПРИМЕР ОПИСАНИЯ СПОСОБА

50 Высокоактивное сырье для изготовления тромбопластина растворимого получают из серого вещества кадаверного головного мозга согласно нашему патенту №2260111 на "Способ получения высокоактивного сырья для изготовления тромбопластина полного растворимого" (6). Гомогенат серого вещества двукратно замораживают при -40°C и оттаивают при $+36^\circ\text{C}$, затем двукратно разводят равным объемом очищенной воды при $+36^\circ\text{C}$ и центрифугируют при 600G и температуре $+5^\circ\text{C}$ в течение 30 минут, получая супернатант - сырье для изготовления тромбопластина растворимого с высокой
45 тромбопластиновой активностью. К нему добавляют ионол для приготовления 0,0001 М конечного раствора. Проверяют рН и активность (ПВ, с) с контрольной плазмой сразу после приготовления, затем по необходимости - через 4 и 10 недель хранения при $(-40 \pm 2)^\circ\text{C}$. Если полученные значения удовлетворяют требованиям (рН - 6,4-7,4, а активность - не более 14 с), то смесь готова к сублимации. После сублимационной сушки проводят
50 аналогичный контроль.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

проведены на базе лаборатории биохимии крови и НПО ГУ Кировского НИИ гематологии и переливания крови.

Приготовлено 5 серий реактива тромбопластина растворимого без использования защитных веществ и 7 серий с защитным веществом. Стабильность реактива с защитным веществом определяли методом ускоренной деградации при хранении в течение одного месяца при +37 °С. Деградация в таких условиях приравнивается к 1 году хранения реактива при 4-8°С. Результаты приведены в таблицах 1 и 2.

№серии	Сроки исследований (недели)							
	рН				ПВ(с)			
	Исходные	4	10	после сублимации	исходные	4	10	после сублимации
010403	6,40	7,00	7,15	8,25	16,5	18,0	19,5	21,0
020403	7,65	8,05	8,10	8,60	18,3	20,5	20,5	22,0
040403	7,18	7,70	7,85	8,10	15,0	18,5	21,9	22,5
050403	7,22	7,85	7,90	8,30	14,5	19,0	20,0	22,0
070403	7,12	7,85	8,05	8,35	15,0	18,0	19,5	20,0
Хср	7,11	7,69	7,81	8,32	15,86	18,80	20,28	21,50
±m	0,20	0,18	0,17	0,08	0,69	0,46	0,44	0,45

Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют о том, что хранение сырья, приготовленного без использования защитных веществ, вызвало его значительное защелачивание; значения рН изменились с 7,11 до 8,32. Такие изменения кислотно-щелочного баланса привели к недопустимому снижению активности сырья; значения ПВ (с) изменились с 15,86 до 21,50.

№серии	Сроки исследований					
	рН			ПВ(с)		
	до сублимации	после сублимации	после деградации	до сублимации	после сублимации	после деградации
310303	6,45	6,50	6,60	12,5	12,0	15,5
320303	6,60	6,50	6,55	12,5	12,0	16,0
400303	6,55	6,60	6,60	12,0	14,5	18,0
810303	6,50	6,55	6,55	12,5	14,0	15,5
820303	6,60	6,55	6,65	12,5	14,0	16,5
100403	6,85	6,85	6,80	13,5	14,0	17,0
110403	6,85	6,90	6,90	13,0	14,0	14,5
Хср	6,63	6,64	6,66	12,64	13,50	16,14
±m	0,06	0,06	0,05	0,18	0,39	0,43

Результаты, приведенные в таблице 2, показывают изменения значений рН и активности (ПВ, с) 7 серий реактива тромбопластина растворимого, приготовленного с использованием в качестве защитного вещества ионола (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола). При его использовании значения рН практически не изменились и равнялись 6,63 и 6,64, что позволило сохранить высокую активность сырья, равную 12,64 и 13,50 в течение 10 недель хранения до сублимационной сушки и после проведения ее. После ускоренной деградации, приравниваемой к одному году хранения реактива, значения рН и активности (ПВ, с) изменились незначительно.

Таким образом, разработанный нами способ позволяет сохранять активность сырья до сублимационной сушки в течение 10 недель при (-40±2)°С, а также во время сублимации и при последующем хранении полученного реактива. Он найдет применение при создании производственной технологии изготовления реактива тромбопластина растворимого.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент №2161975 от 20.01.2001 г. Способ сохранения активности сырья для изготовления тромбопластина полного растворимого до и во время лиофилизации /ГУ КНИИГ и ПК, Репнякова Е.М., Тарасова Л.Н., Савиных Е.Ю., Гонин Л.Н., Решетникова Н.Р.
2. Вартамян Л.С., Гуревич С.М. Влияние ионола на метаболизм супероксидных радикалов в печени мышей /Вопросы медицинской химии. -1999.-т. 45.-вып.4.-с.314-320.

3. Самуилов В.Д., Барский Е.Л., Самуилов Ф.Д. Взаимодействие антиоксиданта 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола с фотосистемой 2 хлоропластов /Биохимия. -1995. -т. 60. -вып.11. -с.1853-1859.

5 4. Барский Е.Л., Кравцова Т.Р., Самуилов В.Д., Самуилов Я.Д. Действие антиоксидантов фенольной природы на фотосинтетический перенос электронов в хлоропластах /Биохимия. -1992. -т. 57. -вып.9. -с.1427-1431.

5. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. -Казань: ФЭН. -2000 г. -с.49-51.

10 6. Патент №2260111 от 10.12.2000 г. Способ получения высокоактивного сырья для изготовления тромбопластина полного растворимого /ГУ КНИИГ и ПК, Тарасова Л.Н., Репнякова Е.М., Савиных Е.Ю., Решетникова Н.Р., Гонин Л.Н.

Формула изобретения

15 Способ повышения качества сохранения активности сырья для изготовления реактива тромбопластина растворимого до и во время сублимационной сушки, отличающийся тем, что в полученное из серого вещества кадаверного головного мозга сырье вводят ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол) в количестве, необходимом для приготовления 0,0001 М конечного раствора, и получают целевой продукт, сохраняющий высокую активность, равную 12,5-16,0 с, при рН 6,4-7,4 в течение 10 недель хранения при $(-40\pm 2)^\circ\text{C}$ и во время
20 сублимационной сушки.

25

30

35

40

45

50