



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106366184 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610777581.9

A61P 7/02(2006.01)

(22)申请日 2016.08.31

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 天津瑞普生物技术股份有限公司

地址 300308 天津市滨海新区自贸试验区
(空港经济区)东九道1号

(72)发明人 王尚尚 苏建东 乔玲 付旭彬
李守军

(74)专利代理机构 天津合志慧知识产权代理事
务所(普通合伙) 12219

代理人 陈松

(51)Int.Cl.

C07K 14/815(2006.01)

C07K 1/34(2006.01)

C07K 1/14(2006.01)

A61K 38/58(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种水蛭素粗提液的制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种水蛭素粗提液的制备方法,该技术方案以宽体金线蛭为原料,经挑选、清洗、冷冻、破碎、沉淀、离心、超滤后制备多肽化合物制品水蛭素,具有抗凝血作用,在兽医临床上可用于改善肿瘤性或血栓性疾病治疗效果,尤其适用于犬、猫等动物的肿瘤或血栓疾病。本发明结合使用冷冻破碎、超滤工艺进行水蛭素粗品提取,控制温度的同时,保证产品质量,适于大生产需要,还易于实现自动化生产,提高生产效率。本发明所制备的水蛭素制品为进一步纯化和临床应用奠定了良好的基础,制品可用于猫、犬等宠物类肿瘤或血栓性疾病,有效改善其病情,为宠物市场提供一种新型生物制品。

1. 一种水蛭素粗提液的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 取宽体金线蛭冷冻物料放置 -15°C 平衡温度,使用冻肉绞肉机粗绞1遍,加入所述物料1~2倍重量的预冷注射水混匀;

2) 利用胶体磨对步骤1)所得产物精绞2~3遍,加入所述物料0.5~1倍预冷注射水混匀,制得匀浆液;

3) 匀浆液 -20°C 速冻, 37°C 速融,反复冻融6~8次;

4) 冻融料液在 $10\sim 15^{\circ}\text{C}$ 下,经 $8000\sim 10000\text{r}/\text{min}$ 离心,除去沉淀,收集离心液;

5) 离心液经超滤装置进行超滤浓缩,即为半成品;

6) 半成品经检测,凝血酶重复测定活性,定量分装,真空冷冻干燥,保存。使用前,用稀释液稀释至 2ml 。

2. 根据权利要求1所述的一种水蛭素粗提液的制备方法,其特征在于所述冻肉绞肉机的筛网规格是 $3\sim 6\text{mm}$ 筛。

3. 根据权利要求1所述的一种水蛭素粗提液的制备方法,其特征在于所述预冷注射水的温度是 $5\sim 10^{\circ}\text{C}$ 。

4. 根据权利要求1所述的一种水蛭素粗提液的制备方法,其特征在于所述胶体磨的转子为菱形齿刀。

5. 根据权利要求1所述的一种水蛭素粗提液的制备方法,其特征在于所述超滤浓缩具体包括以下操作:进口内压式膜组件,材质为改良聚偏氟乙烯(PVDF),低吸附,共进行二次超滤操作。第一次使用 10KDa 截留分子量膜系统,洗滤3~5次,收集透过液;第二次使用 5K 截留分子量膜系统,洗滤3~5次,收集浓缩液。

6. 根据权利要求1所述的一种水蛭素粗提液的制备方法,其特征在于所述宽体金线蛭冷冻物料是通过以下方法获得的:挑选亚成体期、健康宽体金线蛭,用预冷注射水清洗2~3遍,饥饿后, $1\sim 2\text{kg}/\text{份}$ 包装后于 -20°C 冻存,即得到所述宽体金线蛭冷冻物料。

一种水蛭素粗提液的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,进一步涉及兽药生物制品的制备方法,具体涉及一种水蛭素粗提液的制备方法。

背景技术

[0002] 水蛭是活血化瘀类动物药材的代表药,应用于临床已有悠久历史,可明显改善血症患者症状,其有效成分水蛭素已被成功提取并广泛应用于临床,天然水蛭素产生于水蛭的唾液里,水蛭吸血时被分泌出来。天然水蛭素是一条含65或66个氨基酸残基组成的单链多肽,分子质量为7kD,水蛭素是凝血酶的直接抑制剂,可从多个环节影响血液凝固和促进纤溶,可用于抗凝、抗血栓,效果明显优于肝素而副作用少。国内外研究资料已证实,水蛭不仅具有抗凝、溶栓、抗纤维化的作用,而且还可以改善局部血液循环,提高免疫力,对肿瘤细胞也有一定抑制及杀灭作用,在临床中应用广泛。

[0003] 目前,天然水蛭素主要提取制备方法一般有有机试剂沉淀法、高温煮沸法、pH等电点沉淀法等。一些专利发明也提供一些提取方法:“一种富含高活性水蛭素的水蛭全粉的制备方法”(CN 104906142 A)使用双酶法提取活菲牛蛭中水蛭素;“一种水蛭素的提取方法”(CN 104945504 A)使用乙醇、微波、超微粉碎等步骤提取水蛭素。分析本领域中水蛭素常规的制备方法以及上述专利方法可以发现,其操作条件普遍较为严苛,涉及高温条件同时有有机溶剂、复杂酶系参与,容易导致产物活性降低,同时不利于工艺的放大。

发明内容

[0004] 本发明旨在针对现有技术的技术缺陷,提供一种水蛭素粗提液的制备方法,以解决现有技术中水蛭素制备方法难以保证较高的产物活性的技术问题。

[0005] 本发明要解决的另一技术问题是现有技术中水蛭素制备方法制备效率较低。

[0006] 本发明要解决的再一技术问题是现有技术中水蛭素制备方法不易实现规模化生产。

[0007] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 一种水蛭素粗提液的制备方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 取宽体金线蛭冷冻物料放置-15℃平衡温度,使用冻肉绞肉机粗绞1遍,加入所述物料1~2倍重量的预冷注射水混匀;

[0010] 2) 利用胶体磨对步骤1)所得产物精绞2~3遍,加入所述物料0.5~1倍预冷注射水混匀,制得匀浆液;

[0011] 3) 匀浆液-20℃速冻,37℃速融,反复冻融6~8次;

[0012] 4) 冻融料液在10~15℃下,经8000~10000r/min离心,除去沉淀,收集离心液;

[0013] 5) 离心液经超滤装置进行超滤浓缩,即为半成品;

[0014] 6) 半成品经检测,凝血酶重复测定活性,定量分装,真空冷冻干燥,保存。使用前,用稀释液稀释至2ml。

- [0015] 作为优选,所述冻肉绞肉机的筛网规格是3~6mm筛。
- [0016] 作为优选,所述预冷注射水的温度是5~10℃。
- [0017] 作为优选,述胶体磨的转子为菱形齿刀。
- [0018] 作为优选,所述超滤浓缩具体包括以下操作:进口内压式膜组件,材质为改良聚偏氟乙烯(PVDF),低吸附,共进行二次超滤操作。第一次使用10KDa截留分子量膜系统,洗滤3~5次,收集透过液;第二次使用5K截留分子量膜系统,洗滤3~5次,收集浓缩液。
- [0019] 作为优选,所述宽体金线蛭冷冻物料是通过以下方法获得的:挑选亚成体期、健康宽体金线蛭,用预冷注射水清洗2~3遍,饥饿后,1~2kg/份包装后于-20℃冻存,即得到所述宽体金线蛭冷冻物料。
- [0020] 本发明提供了一种水蛭素粗提液的制备方法,该技术方案以宽体金线蛭为原料,经挑选、清洗、冷冻、破碎、沉淀、离心、超滤后制备多肽化合物制品水蛭素,具有抗凝血作用,在兽医临床上可用于改善肿瘤性或血栓性疾病治疗效果,尤其适用于犬、猫等动物的肿瘤或血栓疾病。本发明结合使用冷冻破碎、超滤工艺进行水蛭素粗品提取,控制温度的同时,保证产品质量,适于大生产需要,还易于实现自动化生产,提高生产效率。本发明所制备的水蛭素制品为进一步纯化和临床应用奠定了良好的基础,制品可用于猫、犬等宠物类肿瘤或血栓性疾病,有效改善其病情,为宠物市场提供一种新型生物制品。

具体实施方式

[0021] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在以下实施例中属于公知的结构或功能将不进行详细描述。除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解的相同含义。

[0022] 实施例1

[0023] 一种水蛭素粗提液的制备方法,包括以下步骤:

[0024] (1) 挑选、清洗:挑选生长中期(亚成体期)、健康宽体金线蛭1kg,用10℃注射水清洗2遍,饥饿18小时,包装后于-20℃冻存;

[0025] (2) 破碎:冷冻物料放置-15℃平衡温度,使用冻肉绞肉机粗绞1遍,加入1L10℃注射水混匀;

[0026] (3) 胶体磨精绞2遍,加入0.5L 10℃注射水混匀,制得匀浆液;

[0027] (4) 匀浆液-20℃速冻,37℃速融,反复冻融6次;

[0028] (5) 冻融料液在10℃下,经8000r/min离心,除去沉淀,收集离心液1.6L;

[0029] (6) 离心液经超滤装置进行超滤,10℃注射水洗滤3次,收集透过液进行第二次超滤,10℃注射水洗滤4次,收集浓缩液,即为半成品;

[0030] (7) 半成品经凝血酶重复测定活性,100IU/ml,以100IU/ml*5ml/瓶规格定量分装,真空冷冻干燥,保存。使用前,用稀释液稀释至5ml。

[0031] 实施例2

[0032] 一种水蛭素粗提液的制备方法,包括以下步骤:

[0033] (1) 挑选、清洗:挑选生长中期(亚成体期)、健康宽体金线蛭1kg,用8℃注射水清洗3遍,饥饿34小时,包装后于-20℃冻存;

[0034] (2) 破碎:冷冻物料放置-15℃平衡温度,使用冻肉绞肉机粗绞1遍,加入1L8℃注射

水混匀；

[0035] (3) 胶体磨精绞3遍,加入1L 10℃注射水混匀,制得匀浆液；

[0036] (4) 匀浆液-20℃速冻,37℃速融,反复冻融8次；

[0037] (5) 冻融料液在15℃下,经10000r/min离心,除去沉淀,收集离心液2.3L；

[0038] (6) 离心液经超滤装置进行超滤,8℃注射水洗滤4次,收集透过液进行第二次超滤,8℃注射水洗滤5次,收集浓缩液,即为半成品；

[0039] (7) 半成品经凝血酶重复测定活性,125IU/ml,以100IU/ml*5ml/瓶规格定量分装,真空冷冻干燥,保存。使用前,用稀释液稀释至5ml。

[0040] 实施例3

[0041] 一种水蛭素粗提液的制备方法,包括以下步骤：

[0042] (1) 挑选、清洗：挑选生长中期(亚成体期)、健康宽体金线蛭1kg,用10℃注射水清洗2遍,饥饿48小时,包装后于-20℃冻存；

[0043] (2) 破碎：冷冻物料放置-15℃平衡温度,使用冻肉绞肉机粗绞1遍,加入2L 5℃注射水混匀；

[0044] (3) 胶体磨精绞2遍,加入1L 5℃注射水混匀,制得匀浆液；

[0045] (4) 匀浆液-20℃速冻,37℃速融,反复冻融7次；

[0046] (5) 冻融料液在15℃下,经9000r/min离心,除去沉淀,收集离心液2.5L；

[0047] (6) 离心液经超滤装置进行超滤,5℃注射水洗滤4次,收集透过液进行第二次超滤,5℃注射水洗滤5次,收集浓缩液,即为半成品；

[0048] (7) 半成品经凝血酶重复测定活性,130IU/ml,以100IU/ml*5ml/瓶规格定量分装,真空冷冻干燥,保存。使用前,用稀释液稀释至5ml。

[0049] 实施例4(以上实施例1所制备的水蛭素对犬、猫肿瘤性疾病治疗效果实验)

[0050] (1) 分组：从宠物医院收集患有肿瘤性疾病的病犬20只、猫10只(年龄、性别、品种等不限制),病犬随机分为2组,每组10只；病猫随机分为2组,每组5只。分组后,第1组为用药组,第2组为对照组。

[0051] (2) 方法：用药组动物按0.5ml/kg体重腿部静脉注射水蛭素制品,连续3日；对照组,不做任何处理。用药组治疗14日后记录有效率。

[0052] (3) 结果和讨论：治疗效果统计见表1。本方法提取的水蛭素制品对犬猫肿瘤性疾病有一定疗效,有效率达50%左右。水蛭素具有一定的抗肿瘤效果。

[0053] 表1水蛭素对犬、猫肿瘤性疾病治疗改善效果

品种	组别	总数量(只)	有效数量(只)	无效数量(只)	有效率
犬	用药组	10	5	5	50%
	对照组	10	0	10	0%
猫	用药组	5	3	2	60%
	对照组	5	0	5	0%

[0055] 实施例5(以上实施例2所制备的水蛭素对犬、猫血栓性疾病治疗效果实验)

[0056] (1) 分组和方法：从宠物医院收集患有血栓性疾病的病犬20只、猫10只(年龄、性

别、品种等不限制),病犬随机分为2组,每组10只;病猫随机分为2组,每组5只。分组后,第1组为用药组,第2组为对照组。用药组动物以0.5ml/kg体重腿部静脉注射水蛭素制品,连续3日。

[0057] (2) 结果和讨论:统计治疗结果,见表2。统计结果显示:使用水蛭素制品治疗犬、猫血栓性疾病,有一定的改善作用,有效率达40%左右。

[0058] 表2水蛭素对犬、猫肿瘤性疾病治疗改善效果

	品种	组别	总数量(只)	有效数量(只)	无效数量(只)	有效率
[0059]	犬	用药组	10	6	5	60%
		对照组	10	0	10	0%
	猫	用药组	5	2	3	40%
		对照组	5	0	5	0%

[0060] 实施例6

[0061] 一种水蛭素粗提液的制备方法,包括以下步骤:

[0062] 1) 取宽体金线蛭冷冻物料放置-15℃平衡温度,使用冻肉绞肉机粗绞1遍,加入所述物料1倍重量的预冷注射水混匀;

[0063] 2) 利用胶体磨对步骤1) 所得产物精绞2遍,加入所述物料0.5倍预冷注射水混匀,制得匀浆液;

[0064] 3) 匀浆液-20℃速冻,37℃速融,反复冻融6次;

[0065] 4) 冻融料液在10℃下,经8000r/min离心,除去沉淀,收集离心液;

[0066] 5) 离心液经超滤装置进行超滤浓缩,即为半成品;

[0067] 6) 半成品经检测,凝血酶重复测定活性,定量分装,真空冷冻干燥,保存。使用前,用稀释液稀释至2ml。

[0068] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0069] 所述冻肉绞肉机的筛网规格是3mm筛。

[0070] 所述预冷注射水的温度是5℃。

[0071] 所述胶体磨的转子为菱形齿刀。

[0072] 所述超滤浓缩具体包括以下操作:进口内压式膜组件,材质为改良聚偏氟乙烯(PVDF),低吸附,共进行二次超滤操作。第一次使用10KDa截留分子量膜系统,洗滤3次,收集透过液;第二次使用5K截留分子量膜系统,洗滤3次,收集浓缩液。

[0073] 所述宽体金线蛭冷冻物料是通过以下方法获得的:挑选亚成体期、健康宽体金线蛭,用预冷注射水清洗2遍,饥饿后,1kg/份包装后于-20℃冻存,即得到所述宽体金线蛭冷冻物料。

[0074] 实施例7

[0075] 一种水蛭素粗提液的制备方法,包括以下步骤:

[0076] 1) 取宽体金线蛭冷冻物料放置-15℃平衡温度,使用冻肉绞肉机粗绞1遍,加入所述物料2倍重量的预冷注射水混匀;

[0077] 2) 利用胶体磨对步骤1) 所得产物精绞3遍,加入所述物料1倍预冷注射水混匀,制

得匀浆液；

[0078] 3) 匀浆液-20℃速冻,37℃速融,反复冻融8次；

[0079] 4) 冻融料液在15℃下,经10000r/min离心,除去沉淀,收集离心液；

[0080] 5) 离心液经超滤装置进行超滤浓缩,即为半成品；

[0081] 6) 半成品经检测,凝血酶重复测定活性,定量分装,真空冷冻干燥,保存。使用前,用稀释液稀释至2ml。

[0082] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件：

[0083] 所述冻肉绞肉机的筛网规格是6mm筛。

[0084] 所述预冷注射水的温度是10℃。

[0085] 所述胶体磨的转子为菱形齿刀。

[0086] 所述超滤浓缩具体包括以下操作：进口内压式膜组件,材质为改良聚偏氟乙烯(PVDF),低吸附,共进行二次超滤操作。第一次使用10KDa截留分子量膜系统,洗滤5次,收集透过液；第二次使用5K截留分子量膜系统,洗滤5次,收集浓缩液。

[0087] 所述宽体金线蛭冷冻物料是通过以下方法获得的：挑选亚成体期、健康宽体金线蛭,用预冷注射水清洗3遍,饥饿后,2kg/份包装后于-20℃冻存,即得到所述宽体金线蛭冷冻物料。

[0088] 实施例8

[0089] 一种水蛭素粗提液的制备方法,包括以下步骤：

[0090] 1) 取宽体金线蛭冷冻物料放置-15℃平衡温度,使用冻肉绞肉机粗绞1遍,加入所述物料1.5倍重量的预冷注射水混匀；

[0091] 2) 利用胶体磨对步骤1) 所得产物精绞2.5遍,加入所述物料0.75倍预冷注射水混匀,制得匀浆液；

[0092] 3) 匀浆液-20℃速冻,37℃速融,反复冻融7次；

[0093] 4) 冻融料液在12℃下,经9000r/min离心,除去沉淀,收集离心液；

[0094] 5) 离心液经超滤装置进行超滤浓缩,即为半成品；

[0095] 6) 半成品经检测,凝血酶重复测定活性,定量分装,真空冷冻干燥,保存。使用前,用稀释液稀释至2ml。

[0096] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。