



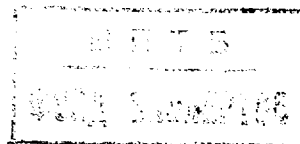
Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

(61) Дополнительный к патенту -
(22) Заявлено 20.04.77 (21) 2472207/28-13
(23) Приоритет - (32) 07.07.76
(31) 80664/76 (33) Япония
Опубликовано 25.04.80. Бюллетень № 15
Дата опубликования описания 28.04.80

(11) 730277



(51) М. Кл.²

A 61 K 35-66

(53) УДК 615.45:612.
.396.11(088.8)

(72) Авторы
изобретения

Иностранцы
Сабуро Уэно, Чикао Есикуми, Фумио Хиросе, Ёсио Омуро,
Тосихико Вада, Такаёси Фудзэи и Эйичи Такахаси
(Япония)

(71) Заявитель

Иностранная фирма
'Куреха Кагаку Когё Кабусики Кайся'
(Япония)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ПОЛИСАХАРИДОВ,
ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ДЕЙСТВИЕМ

1

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и касается получения лекарственных препаратов.

Известен способ получения азотсодержащих полисахаридов, обладающих противоопухолевым действием, путем экстракции из грибов класса базидиомицетов горячим экстрагентом с последующим выделением и очисткой целевого продукта [1].

Однако при этом способе выход целевого продукта незначителен - 3,5%.

Целью изобретения является повышение выхода целевого продукта.

Это достигается тем, что экстракцию ведут из грибов *Coriolus genus of Polyporaceae* водным раствором щелочи в концентрации 0,01-2 н. и очистку ведут ультрафильтрацией и/или обратимым осмосом.

Кроме того, из грибов, относящихся к *Coriolus genus of Polyporaceae*, берут *Coriolus Versicolor (Fr) Quel*, а в качестве водного раствора щелочи используют раствор гидроксида натрия в количестве, превышающем грибы в 5-200 раз (по весу).

2

Ультрафильтрацию ведут под давлением 0,5-5 кг/см², а обратимый осмос по давлением 25-35 кг/см².

Способ осуществляют следующим образом.

Проводят экстракцию грибов из класса базидиомицетов *Coriolus genus of Polyporaceae* водным раствором щелочи в концентрации 0,01-2 н. При температуре 50-110°C, предпочтительно 80-98°C, в течение 20-600 мин.

Для получения щелочного раствора применяют различные щелочные соединения такие, как гидроокись натрия, гидроокись калия, гидроокись аммония или кальция, предпочтительно применение гидроокисей калия и натрия. Полученный жидкий экстракт нейтрализуют обычным методом, применяя минеральную кислоту, например разбавленную соляную кислоту, и затем подвергают этот нейтрализованный экстракт ультрафильтрации или обратимому осмосу, чтобы получить низкомолекулярные вещества (с мол.вес. менее 5000) в экстракте. Для этого компоненты продукта фракционируют под давлением по молекулярному весу с применением мембраны, представляющей собой тип молекулярного сита.

Процесс ультрафильтрации осуществляют под давлением 0,5-5 кг/см², предпочтительно 1-4 кг/см², и при температуре 5-70°C.

В случае применения обратимого осмоса, применяют давление порядка 20-35 кг/см², предпочтительно 20-25 кг/см², при температуре 5-20°C.

Ультрафильтрацию применяют для фракционирования материала с молекулярным весом свыше 10000, а обратимый осмос применим для фракционирования материала с молекулярным весом менее 1000.

Экстракт, из которого удаляют вещества с низким молекулярным весом (менее 5000), подвергают распылительной сушке или лиофилизации и затем переводят в товарные продукты.

Полученные полисахариды имеют красновато-коричневый цвет и содержат азот в количестве 2-8%, в ряде случаев 3-6%. Они не имеют четкой точки плавления и постепенно темнеют и разлагаются при температуре выше 120°C.

Полисахариды растворимы в воде, почти нерастворимы в спирте, пиридине, хлороформе, бензоле и гексане, не имеют вкуса и запаха.

Молекулярный вес полисахаридов составляет 10000-100000.

Азотсодержащие полисахариды обладают высокой противопухоловой активностью с высоким коэффициентом задержания против саркомы-180 на мышах при внутрибрюшинном введении, но также обеспечивают эффективность лечения и при оральном применении.

Полученные азотсодержащие полисахариды могут быть использованы для предупреждения побочного действия в химиотерапии рака или повышения эффективности радиотерапии и предупреждают инфекционные заболевания, вызываемые вирусами или бактериями, улучшают функцию печени, аппетит, регулируют внутренние нарушения и поддержание урологических функций.

Пример 1. К 200 г сухого мицелия *Coriolus versicolor* (Fr) *QueI* (FERM - P № 2414) прибавляют 4 л 0,1 н. раствора NaOH и экстрагируют при перемешивании на кипящей водной бане при температуре экстрагируемой массы 90-55°C в течение 1 час и затем охлаждают до 50°C и порциями прибавляют 1 л раствора HCl для поддержания pH 7,0. Затем удаляют твердую фазу фильтрацией под разрежением и полученный твердый продукт промывают 500 мл воды, получая 4,2 л жидкого экстракта. Этот жидкий экстракт подвергают ультрафильтрации с применением специального ультрафильтра при перемешивании и охлаждении, проводя фильтрацию под давлением 1,5 кг/см² при 10°C с отделением низкомолекулярных соединений с молеку-

лярным весом менее 5000 и последующим концентрированием, получая 300 мл раствора, который затем подвергают лиофилизации и выделяют 26,6 г красновато-коричневого порошка (выход 13,5%). Этот порошок содержит 7,5% влаги и имеет следующий элементный анализ: C - 40,5%, H - 6,2%, N - 5,8%, O - 47,5% (процентное содержание кислорода определяют, вычитая из 100 суммарное процентное содержание остальных элементов). Это вещество легко растворяется в воде и обладает примерно 90%-ым задерживающим коэффициентом против твердой опухоли саркома-180 у мышей при внутрибрюшинном введении и 65%-ым при оральном применении.

Антиопухольный эффект соединений определяют обычным методом. Клетки опухоли саркомы-180 трансплантируют в брюшную полость мыши и после того, как эти клетки разрастутся в достаточной степени в течение 7 дней, 10 таких клеток трансплантируют под кожу подмышкой другой мыши, где образуется твердая опухоль.

Лечение препаратом, который испытывают, начинают через 24 часа после трансплантации. В случае лечения интраперитонеально препарат вводят в дозе 10 мг/кг за курс лечения один раз в день, либо каждый второй день в течение 20 дней общей дозой 0,2 мл/20 г живого веса мыши, а в случае перорального применения препарат вводят дозой 1000 мг/кг за курс лечения, т.е. один раз в день в течение 20 дней общей дозой 0,2 мл/20 г живого веса мыши. В опухоли образуется ядро на 25-ый день после трансплантации, коэффициент задерживания роста опухоли вычисляют из среднего веса опухоли мыши, которую лечат препаратом, и среднего веса опухоли контрольной мыши. Для сравнения экстракцию и очистку производят при тех же условиях, но применяя воду вместо 4 л 0,1 н. раствора NaOH. Выход продукта составляет 7,8% или около 60% от выхода, получаемого согласно способу изобретения.

Пример 2. К 500 г живого мицелия *Coriolus versicolor* (Fr) *QueI* FERM - P № 2414 (содержание влаги 70,8%, общее содержание азота, 2,6% в расчете на сухой материал) прибавляют 2 л воды и измельчают в смесителе для сока 10-20 мин. и к этой смеси затем постепенно прибавляют 500 мл 1 н. раствора NaOH и экстрагируют 2 часа на горячей водной бане при температуре экстрагируемой массы 90-95°C, затем нейтрализуют соляной кислотой, промывают и обрабатывают как описано в примере 1. Полученный экстракт подвергают ультрафильтрации на специальном ультра-

ных веществ с молекулярным весом менее 5000, затем концентрируют раствор и высушивают вымораживанием, получая 24,2 г коричневатого порошка (выход 15,1%). Этот порошок содержит 7,6% влаги и общее содержание азота составляет 6,0%, при растворении в воде примерно 20% продукта не растворяется. Остальная часть хорошо растворима в воде. Данные элементного анализа С - 41,2%; Н - 6,1%; N - 6,0%; O - 46,7% (процентное содержание кислорода вычисляют, как разницу между 100 и суммарного процентного содержания остальных элементов). Этот порошок растворяют и, удалив нерастворяемую в воде часть при помощи фильтровальной бумаги, проводят его задерживающее действие по отношению к твердой опухоли саркома-180 у мышей. Установлен коэффициент задерживания в случае внутрибрюшинного введения примерно 93% в случае орального 70%.

Пример 3. К 2 кг сухих ячек *Coriolus versicolor* (Fr) Quel FERM-P № 2414 (содержание влаги 8,0% общее содержание азота 2,5%) прибавляют 20 л 0,4 н. раствора NaOH и подвергают смесь двухчасовой экстракции при перемешивании в экстракторе типа котла, снабженного рубашкой для обогрева и охлаждающей рубашкой, причем температуру в рубашке поддерживают такой, чтобы в экстрагируемой массе температура составляла 90-95°C. Прозэкстрагированную суспензию охлаждают до комнатной температуры и порциями прибавляют 2 н. раствора HCl при перемешивании до создания pH среды 7,0, после чего остаток (твердую фазу) отделяют от жидкого экстракта в сепараторе типа центрифуги. Остаток (твердую фазу) смешивают с 20 л 0,4 н. раствора NaOH и подвергают подобной же экстракционной обработке в течение 2 час. при 90-95°C, затем охлаждают, нейтрализуют и отделяют на центрифуге, получая жидкий экстракт и остаток.

Остаток снова подвергают той же экстракционной обработке 0,4 н. раствора NaOH в течение 1 часа, получая экстракт. Экстракцию повторяют 3 раза, получая всего 50 л жидкого экстракта. Этот жидкий экстракт концентрируют до объема около 10 л на вакуум-концентраторе и затем подвергают на ультраfiltре с мембраной HFA-180 фирмы Absor Lnc при 10°C и под давлением 2,1 атм, отделяя низкомолекулярные вещества с молекулярным весом менее 5000, затем концентрируют обрабатываемый раствор до объема около 5 л. Также около 70 л обрабатываемого раствора, содержа-

ЩИИПИ Заказ 1335/56

щего низкомолекулярные фракции, выгруженные из ультраfiltра, подвергают обратному осмосу, удаляя низкомолекулярные фракции, и затем концентрируют до объема около 5 л обрабатываемого раствора.

5 Условия проведения этой обработки: среднее давление 25-30 кг/см², температура обработки около 10°C. Затем растворы, полученные после ультра-
10 фильтрации и после обработки методом обратного осмоса, объединяют и 10 л такого объединенного раствора подвергают распылительной сушке, получая 395 г порошка красно-коричневого цвета (выход 19,9%). Порошок содержит
15 7,0% влаги, данные элементного анализа: С - 40,8; Н - 6,0; N - 4,0; O - 49,2%. Коэффициент задерживания этого продукта по отношению к твердой опухоли у мышей саркома-180 составляет 92% в случае внутрибрюшинного введения и 70% в случае орального применения. Порошок хорошо растворим в воде.

25 Предлагаемый способ обеспечивает высокий выход целевого продукта - 19,9% по сравнению с известным способом - 3,5%.

30 Формула изобретения

35 1. Способ получения азотсодержащих полисахаридов обладающих противоопухолевым действием, путем экстракции из грибов класса базидиомицетов горячим экстрагентом с последующим выделением и очисткой целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода целевого продукта, экстракцию ведут из грибов *Coriolus genus of Polyporaceae* водным раствором щелочи в концентрации 0,01 - 2N, и очистку ведут ультраfiltрацией и/или обратным осмосом.

45 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что из грибов, относящихся к *Coriolus genus of Polyporaceae* берут *Coriolus versicolor* (Fr) Quel.

50 3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве водного раствора щелочи используют раствор гидроокиси натрия в количестве в 5-200 раз превышающем грибы (по весу).

55 4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ультраfiltрацию ведут под давлением 0,5-5 кг/см² а обратный осмос 25-35 кг/см².

60 Источники информации, принятые во внимание при экспертизе
1. Заявка Японии № 50-34089, кл. 30A, 32, опублик. 1975.

Тираж 673

Подписное