

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033760**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.22

(21) Номер заявки
201500226

(22) Дата подачи заявки
2015.02.26

(51) Int. Cl. *A61K 35/54* (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
B01J 37/32 (2006.01)
B01D 21/26 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ Фолликулярного белкового препарата и препарат, полученный данным способом

(31) 2014107790

(32) 2014.03.03

(33) RU

(43) 2015.11.30

(96) 2015000024 (RU) 2015.02.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ
ОБЩЕСТВО "СКАЙ ЛТД" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Ильичёв Александр Владимирович,
Мальдов Дмитрий Григорьевич (RU)**

(74) Представитель:
Звонов А.А. (RU)

(56) RU-C2-2185180

SUGINO K. et al. Purification and characterization of high molecular weight forms of inhibin from bovine follicular fluid, *Endocrinology*, 1992 Feb; 130 (2): p. 789-796, (реферат) [он-лайн] [найдено 03.08.2015], Найдено из PubMed, PMID: 1733725

RU-C2-2434018

Практическая химия белка/ Под ред. А. Дарбре. - М.: Мир, 1989, с. 75-76

US-A-5051406

RU-C2-2201241

(57) Изобретение относится к способу получения фолликулярного белкового препарата для лечения эндометриоза, согласно которому центрифугируют фолликулярную жидкость крупного рогатого скота, полученный супернатант охлаждают до 4-8°C и смешивают с охлажденным до -18°C ацетоном, отстаивают, повторно центрифугируют, полученный осадок лиофилизируют, лиофилизат растворяют в буфере, полученную взвесь центрифугируют при 8000-10000 g в течение 15-30 мин, полученный супернатант подвергают ионообменной хроматографии на DEAE-Сефарозе, собирают элюат и диализуют его против воды через мембрану не менее 8 ч, полученный диализат замораживают, а затем лиофильно высушивают. Также изобретение относится к фолликулярному белковому препарату, полученному из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота, который содержит сывороточный альбумин и белок семейства TGF-β, имеющий иммуноспецифичность ингибина βA.

B1**033760****033760****B1**

Изобретение относится к области биологической химии и может найти применение для получения из органического материала белковых препаратов, которые могут быть использованы в медицине для снижения иммунитета при трансплантологии, лечения эндометриоза, некоторых онкологических заболеваний, а также в ветеринарии.

В настоящее время в литературе имеются данные о возрастании количества заболеваний эндометриозом при мутациях в генах, кодирующих ингибин βA у людей [Lin J., Zong L., Kennedy S.H., Zondervan K.T. Coding regions of INHBA, SFRP4 and HOXA10 are not linked to chromosome 7, p. 13-15// *Molecular Human Reproduction*, 2011, V. 17, № 10, p. 605-611], и подавлении развития этого заболевания в модели эндометриоза на мышах [Bristol-Gould S.K. Hutten C.G., Sturgis C., Kilen S.M., Mayo K.E., Woodruff T.K. The development of a mouse model of ovarian endosalpingiosis// *Endocrinology*, 2005, 146(12): 5228-36].

Кроме того, имеются сведения об увеличении в атипичном эндометрии количества активина A (белка семейства TGF- β), который является физиологическим антагонистом ингибина в организме женщин, больных эндометриозом [Rombauts L., Donoghue J., Cann L., Jones R.L. and Healy D.L. - Endometrial activin-A secretion in endometriosis Activin-A secretion is increased in the eutopic endometrium from women with endometriosis// *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2006; 46: 148-153].

Действие обоих видов белков осуществляется посредством влияния на активность половых стероидных гормонов: так активины усиливают активность эстрогенов, а ингибины ее подавляют [Peng C., Ohno T., Khorasheh S., Leung P.C. Activin and follistatin as local regulators in the human ovary// *Biol. Signals.*, 1996 Mar-Apr; 5(2): 81-9; Knight P.G., Glister C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development// *Anim. Reprod Sci*, 2003 Oct 15; 78(3-4): 165-83].

Поэтому весьма важно получение препарата, в котором отсутствуют компоненты, оказывающие противоположные действия при его использовании в лечебных целях.

Известен способ получения фолликулярного регуляторного белка, включающий использование в качестве сырья выделенной из яичников свиньи фолликулярной жидкости, которую осаждают сульфатом аммония, а полученные фракции пропускают через гель Оранжевый А, уравновешенный буфером трис-HCl pH 7,5. Связавшиеся фракции элюируют 0,5 М KCl в том же буфере. Фракции, содержащие ингибитор ароматозы, собирают (по Оно), диализируют против дистиллированной воды и лиофилизируют. Далее полученный материал очищают на анионообменной колонке с моно Q, затем элюируют фракции, имеющие ФРБ активность, и очищают их гель-фильтрацией на сферогеле TSK G 300000 W6 в воде жидкостной хроматографией высокого разрешения. Полученный фолликулярный регуляторный белок концентрируют ультрафильтрацией на Amicon Dia - flow cystem с P10 (см. патент США № 5102867, кл. A61K 35/44, 1992 г.).

В результате анализа известного способа необходимо отметить, что он характеризуется сложностью осуществления, высокой трудоемкостью, что осложняет освоение его промышленного производства. Кроме того, использование данного способа не позволяет выделить в составе фолликулярного регуляторного белка компоненты, которые оказывают эффективное воздействие на лечение, например, эндометриоза. Препарат, полученный данным способом, характеризуется невысокими лечебными свойствами.

Известен способ получения белков из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота, согласно которому фолликулярную жидкость подвергают осаждению и лиофилизируют осадок, причем перед осаждением фолликулярную жидкость охлаждают и подвергают центрифугированию в течение 18-25 мин. Осаждение примесей проводят охлажденным до -18°C ацетоном, который добавляют в фолликулярную жидкость в соотношении объемных частей компонентов: фолликулярная жидкость - 2, ацетон - 3. Отстаивают полученную взвесь и подвергают ее центрифугированию со скоростью 10000 об/мин в течение 20-35 мин с последующим отбором осадка и его лиофилизацией (RU № 2185180, кл. A61K 35/54, 2002 г.).

В результате анализа известного способа необходимо отметить, что препарат, полученный данным способом, содержит много примесей, среди которых провоцирующие эндометриоз активины, и, следовательно, не может эффективно применяться для лечения этого заболевания, то есть имеет ограниченную область применения.

Известен способ очистки белков семейства трансформирующих ростовых факторов, получаемых из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота, согласно которому белок растворяют в буфере с нейтральным значением pH, фильтруют раствор через нитроцеллюлозный фильтр. Полученный супернатант подвергают ионообменной хроматографии. Далее полученный в результате ионообменной хроматографии компонент пропускают через 8-мм колонку (Cybracop фирмы ICN) с тем же буфером и отбирают активную фракцию, которую очищают гель-фильтрацией. Полученный продукт фильтруют через фильтр УПМ 200 и собирают фильтрат. Далее осуществляют двухступенчатую очистку фильтрата. На первой ступени очистку фильтрата осуществляют хроматографией высокого давления по принципу обратной фазы. На второй ступени очистки фильтрата используют препаративное изоэлектрофокусирование (RU № 2201241, кл. A61K 35/54, 2003 г.) - наиболее близкий аналог.

В результате анализа известного способа необходимо отметить, что использование данного способа

не позволяет получить в своем составе трансформирующих ростовых факторов компоненты, которые оказывают эффективное воздействие на лечение эндометриоза.

В заявленном способе получения фолликулярного белкового препарата отобранную фолликулярную жидкость крупного рогатого скота центрифугируют в течение 25 мин при 8000-10000 г. Полученный супернатант охлаждают до 4-8°C и смешивают его с охлажденным до -18°C ацетоном в соотношении от 1/1 до 2/3 по объему, отстаивают, повторно центрифугируют в течение 15-25 мин при 8000-10000 г. Полученный осадок лиофилизируют. Высушенный лиофилизат растворяют в буфере с pH 7,2. Полученную взвесь еще раз центрифугируют при 8000-10000 г в течение 15-30 мин. Полученный супернатант подвергают ионообменной хроматографии на DEAE-Сефарозе. Собирают элюат, выходящий при концентрации NaCl от 0,11 до 0,19 М в элюирующем растворе с pH 7,0-7,2, после чего элюат диализуют против воды через мембрану с объемом исключения 14 кДа не менее 8 ч при температуре от 4 до 8°C. Полученный диализат замораживают при температуре от -18 до -35°C, а затем лиофильно высушивают, получая продукт, содержащий сывороточный альбумин и белок семейства TGF-β, имеющий иммуноспецифичность ингибина βA.

Фолликулярный белковый препарат для лечения эндометриоза, полученный из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота указанным способом и содержащий сывороточный альбумин и белок семейства TGF-β, имеющий иммуноспецифичность ингибина βA, при следующем соотношении компонентов, мас. %: белок семейства TGF-β - 0,005-3,0; сывороточный альбумин - остальное.

Использование в качестве сырья для получения фолликулярного белкового препарата фолликулярной жидкости, выделенной из фолликулов яичников крупного рогатого скота, является весьма существенным, так как, во-первых, обеспечивает наличие доступного источника, а во-вторых, как показали исследования, использование в виде сырья фолликулярной жидкости других видов животных не позволяет получить белковый продукт с необходимым количеством активных компонентов. Как показали эксперименты, использование для получения фолликулярного белкового препарата, например фолликулярной жидкости свиней (патент США № 5102867), не позволяет осуществить получение продукта заданного белкового состава.

Центрифугирование (первичное и повторное) обеспечивает очистку растворимых белков от остатков клеток.

Охлаждение осадка после центрифугирования позволяет сохранить белки в нативном состоянии и увеличить их выход.

Проведение осаждения в охлажденном ацетоне позволяет очистить препарат от небелковых компонентов.

Ионообменная хроматография на DEAE-Сефарозе приводит к получению фолликулярного белкового препарата определенного состава, состоящего из белка семейства TGF-β, имеющего иммуноспецифичность ингибина βA и бычьего сывороточного альбумина.

Термин "ингибин βA" является общеупотребимым. В литературе также встречается его тождественное обозначение - ингибин A.

Лиофилизация фолликулярного белкового препарата позволяет хранить препарат достаточно длительное время.

Необходимо отметить, и это подтверждено экспериментально, что заявленный технический результат может быть достигнут только при безусловном выполнении всех действий, отраженных в материалах заявки при строгом соблюдении заявленной их последовательности и режимов, а также количественного соотношения компонентов препарата. Таким образом, признаки, изложенные в формуле изобретения и последовательность их выполнения, являются существенными.

Способ получения фолликулярного белкового препарата осуществляют в несколько этапов.

Первоначально отбирают из яичников крупного рогатого скота фолликулярную жидкость. Отобранную жидкость центрифугируют при 8000-10000 г для получения супернатанта. Полученный в результате центрифугирования супернатант сливают в чистую емкость и охлаждают до 4-8°C для увеличения количества осажденного белка. Затем к супернатанту добавляют ацетон (градации ОСЧ), охлажденный до -18°C в соотношении от 1/1 до 2/3 по объему, перемешивают и центрифугируют 15-25 мин при 8000-10000 г (центрифуга Eppendorf 5804) для получения осадка. Супернатант отбрасывают. Осадок переносят в емкость, охлаждают до -18°C и сушат на лиофильной сушке (VirTis benchtop SLC) до его полного высушивания. В результате получают лиофилизированный продукт в виде гранулированного порошка от белого до темно-желтого цвета, плохо растворимого в воде.

На следующем этапе лиофилизированный продукт растворяют в буфере pH 7,2 при постоянном помешивании в течение 15-30 мин. Полученную взвесь центрифугируют при 8000-10000 г в течение 15-30 мин для получения супернатанта. Полученный супернатант сливают и наносят на колонку с DEAE-Сефарозой. Время набивания колонки 6-8 ч. Уравновешивают колонку буфером 12-24 ч до pH 7-7,2.

Дальнейшее выделение белкового препарата можно производить двумя путями, получая один и тот же результат.

1. Наносят на колонку супернатант, полученный из 3 г лиофилизированной фолликулярной жидко-

сти и прогоняют 180 мл буфера. С помощью хроматографической системы (BioRad BioLogic LP с УФ-детектором с длиной волны $\gamma=280$ нм) подают 112 мл 0,11 М раствора NaCl (приблизительно 2,6 объема колонки). Затем подают 120 мл 0,11-0,19 М раствора NaCl в буфере и одновременно начинают собирать элюат в емкость. После этого подают на колонку 40 мл 2 М раствора NaCl для удаления с колонки остатков нанесенных веществ. Собранный элюат замораживают в морозилке (Sanyo MDF-436) при $-18, -35^{\circ}\text{C}$, затем лиофильно высушивают.

2. Наносят на колонку супернатант, полученный из 3 г лиофилизированной фолликулярной жидкости, и элюируют градиентом NaCl 0-1 М в буфере pH 7,05-7,20 на хроматографической системе (например, BioRad). Отбирают элюат, смываемый концентрациями соли 0,11-0,19 М NaCl. Контроль по самописцу. Собранный элюат замораживают в морозилке (Sanyo MDF- 436) при $-18, -35^{\circ}\text{C}$, затем лиофильно высушивают.

В результате использования процесса 1 или процесса 2 получают один и тот же элюат, поэтому целесообразность использования одного или другого процесса определяется приборной базой и технологическими условиями.

В результате описанных манипуляций получают белковый препарат с буфером - легкий, воздушный порошок белого цвета

Для удаления из полученного препарата примесного буфера следующим этапом осуществляют диализ белкового препарата с буфером, для чего

растворяют его в дистиллированной воде;

проводят диализ через мембрану (ROTH) с объемом исключения 14 кДа против 2 л дистиллированной воды со сменой дистиллята по схеме:

диализ 3 ч (2 л дистиллята);

смена дистиллята;

диализ 3 ч (2 л дистиллята);

смена дистиллята;

диализ 2 ч (2 л дистиллята).

Процесс осуществляют при температуре $4-8^{\circ}\text{C}$.

Получают диализат. Мембрану надрезают, сливают раствор в стеклянный стакан и лиофильно высушивают.

Количественное содержание указанных в формуле изобретения компонентов контролируют общеизвестным иммуноферментным анализом, а активность белкового препарата контролируют стандартным методом определения биологической активности на культуре клеток VERO.

В результате реализации данного способа получают фолликулярный белковый препарат, содержащий сывороточный альбумин и белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина βA , при следующем соотношении их компонентов, мас. %: белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина βA : 0,005-3,0; сывороточный альбумин - остальное.

Сущность заявленного способа будет более понятна из приведенного примера. Первоначально отбирают фолликулярную жидкость крупного рогатого скота, для чего яичники в зоне фолликулярных пузырьков протирают 96% спиртом, затем прокалывают одноразовым стерильным шприцем и фолликулярную жидкость отбирают 10 мл в ополоснутую спиртом центрифужную пробирку, емкостью не менее 20 мл.

Центрифугируют фолликулярную жидкость 25 мин при 8000 g (центрифуга Eppendorf 5804). Полученный супернатант сливают в чистую емкость и охлаждают до 6°C . Затем к супернатанту добавляют ацетон (градации ОСЧ), охлажденный до -18°C в соотношении 1/1 по объему, перемешивают и центрифугируют 15 мин при 8000 g (центрифуга Eppendorf 5804). Супернатант отбрасывают. Осадок переносят в емкость, охлаждают до -18°C и сушат на лиофильной сушке (VirTis benchtop SLC) до его полного высушивания.

Далее 1,3 г лиофилизированной фолликулярной жидкости растворяют в 40 мл буфера pH 7,2 в стеклянной колбе емкостью 50 мл с помощью ультразвуковой мешалки УЗМ 001 (Польша) при постоянном помешивании в течение 30 мин. Полученную взвесь центрифугируют на центрифуге Eppendorf 5804 при 8000 g в течение 30 мин. Супернатант (прибл. 8 мл) сливают и наносят на колонку (кат. № 57407-08-6 DFF100, Sigma, Diethylaminoethyl Sepharose с DEAE-сефарозой. Колонка: стекло, размеры $1,5 \times 30$ см, рабочий объем колонки - 42 мл. Время набивания колонки 6 ч. Время уравнивания колонки буфером - 12 ч до pH 7,2) и промывают колонку 180 мл буфера. С помощью хроматографической системы (BioRad BioLogic LP с УФ-детектором с длиной волны $\gamma=280$ нм) подают 112 мл 0,11 М раствора NaCl (приблизительно 2,6 объема колонки). Затем подают 120 мл 0,19 М раствора NaCl в буфере и одновременно начинают собирать элюат в емкость (получаем 120 мл раствора). После этого подают на колонку 40 мл 2 М раствора NaCl для удаления с колонки остатков нанесенных веществ. Собранный элюат замораживают в морозилке (Sanyo MDF-436) при -35°C , затем лиофильно высушивают (VirTis benchtop SLC).

Далее осуществляют диализ полученного лиофилизата, для чего растворяют 0,26 г белка в 10 мл дистиллированной воды;

подвергают диализу через мембрану (ROTH) с объемом исключения 14 кДа против 2 л дистиллированной воды со сменой дистиллята по схеме:

диализ 3 ч (2 л дистиллята);

смена дистиллята;

диализ 3 ч (2 л дистиллята);

смена дистиллята;

диализ 2 ч (2 л дистиллята).

Процесс осуществляют при температуре 6°C.

Получают диализат в количестве 12 мл. Мембрану надрезают и сливают раствор в стеклянный стакан 50 мл. Определяют концентрацию белка по методу Брэдфорда и снова лиофильно высушивают.

Количественное содержание указанных в формуле изобретения компонентов контролируют иммуноферментным анализом, а активность белкового препарата контролируют методом определения биологической активности на культуре клеток VERO.

В результате получают 0,26 г фолликулярного белкового препарата, содержащего бычий сывороточный альбумин 0,254813 г;

белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина β A 0,000013 г;

примеси 0,005174 г, которые не оказывают существенного влияния на достижение указанного технического результата.

Необходимо отметить, что указанный технический результат обеспечивается только в пределах указанных в формуле изобретения значений компонентов фолликулярного белкового препарата.

Данный препарат был проверен на крысиной модели эндометриоза. Введение внутривенно препарата в дозе 40 мкг на животное ежедневно по одной дозе в течение 10 дней крысам с хирургически индуцированным эндометриозом привело к уменьшению объема имплантов у крыс в 7,9 раз.

Полученный данным способом фолликулярный белковый препарат с вышеописанным составом применяли при лечении эндометриоза у женщин.

Эндометриоз - распространенное гинекологическое заболевание, при котором клетки эндометрия (внутреннего слоя стенки матки) разрастаются за пределами этого слоя. Эндометриозная ткань имеет рецепторы к гормонам, поэтому в ней возникают те же изменения, что и в нормальной эндометрии, проявляющиеся ежемесячными кровотечениями. Эти небольшие кровотечения приводят к воспалению в окружающих тканях и вызывают основные проявления заболевания: боль, увеличение объема органа, бесплодие. Основные методы лечения эндометриоза в настоящее время - это гормональная терапия и хирургическое лечение.

Пример 1.

Лечение проводили препаратом (дозировкой 0,3 мг) следующего состава:

бычий сывороточный альбумин 0,25 мг,

белок семейства TGF- β , имеющий иммуноспецифичность ингибина β A 0,000013 мг.

Схема терапии:

первый месяц - 10 инъекций по 0,3 мг с пятого дня месячного цикла каждый день;

второй месяц - 10 инъекций по 0,3 мг с пятого дня месячного цикла каждый день;

третий месяц - 10 инъекций по 0,3 мг с пятого дня месячного цикла каждый день.

Пациентка У., 27 л. Клинический диагноз: эндометриоз матки, диффузная форма, поставлен в 2008 г. Жалобы на обильные, болезненные менструации.

До начала лечения клинико-биохимические показатели: анализ мочи, клинический анализ крови, биохимия, коагулограмма, онкомаркеры - в пределах нормы. Гормоны крови: эстрадиол 0,618 нмоль/л, прогестерон 7,6 нмоль/л. УЗИ органов м/таза: эндометриоз матки. Морфологическое заключение: активный аденомиоз.

На фоне лечения положительная динамика: болей нет, менструации умеренные. Клинико-биохимические показатели в пределах нормы. В гормональном анализе крови отмечено увеличение уровня эстрадиола до 0,72 нмоль/л, снижение уровня прогестерона до 3,97 нмоль/л. УЗИ органов м/таза: положительная динамика. Морфологическое заключение: эндометриоз не обнаружен (положительная динамика).

Пример 2.

Пациентка С., 39 л. Клинический диагноз: эндометриоз матки, очаговая форма, поставлен в 2002 г. Жалобы на обильные, болезненные менструации.

До начала лечения клинико-биохимические показатели: анализ мочи, биохимия, коагулограмма, онкомаркеры - в пределах нормы. Клинический анализ крови: Нв - 110 г/л. Онкомаркеры СА 125- 47,6 (норма - менее 35 Ед/мл). Гормоны крови: эстрадиол 0,56 нмоль/л, прогестерон 1,8 нмоль/л. УЗИ органов м/таза: эндометриоз матки. Морфологическое заключение: аденомиоз умеренной активности.

На фоне лечения отмечена положительная динамика: уменьшился болевой и синдром гиперполименореи. Клинико-морфологические показатели в пределах нормы. Клинический анализ крови: Нв - 102 г/л. В гормональном анализе крови отмечено увеличение уровня эстрадиола до 0,8 нмоль/л, снижение

уровня прогестерона до 0,2 нмоль/л. УЗИ органов м/таза: положительная динамика. Морфологические исследования: аденомиоз слабой активности (положительная динамика).

Пример 3.

Пациентка К., 33 г. Клинический диагноз: эндометриоз матки, диффузная форма, поставлен в 2000 г. Жалобы на обильные менструации. Менструальный цикл нерегулярный.

До начала лечения клинико-биохимические показатели: анализ мочи, клинический анализ крови, биохимия, коагулограмма, онкомаркеры - в пределах нормы. Гормоны крови: эстрадиол - 0,538 нмоль/л, прогестерон - 3,7 нмоль/л. УЗИ органов м/таза: эндометриоз матки. Морфологическое заключение: аденомиоз слабой активности.

На фоне лечения отмечена положительная динамика: уменьшился синдром гиперполименореи. Клинико-биохимические показатели в пределах нормы. В гормональном анализе крови отмечено снижение эстрадиола до 0,218 нмоль/л, повышение прогестерона до 36,7 нмоль/л. УЗИ органов м/таза - положительная динамика. Морфологическое исследование: аденомиоз не выявлен (положительная динамика).

Побочных эффектов в процессе лечения у пациенток не наблюдалось.

Применение препарата пациентками, страдающими эндометриозом, привело к исчезновению гиперполименореи - в 8% случаев, и ее снижению - в 92% случаев; к исчезновению альгодисменореи - в 36% случаев и ее снижению - в 64% случаев;

При оценке степени тяжести заболевания - к исчезновению симптомов в 32% случаев и снижению тяжести заболевания - в 68% случаев.

Исходя из заключений комплексного морфологического (гистологического и иммуноморфологического) исследования положительный эффект терапии выявлен в 80% случаев, а в остальных случаях выявлена тенденция к снижению активности очагов аденомиоза.

Препарат также может быть использован для лечения некоторых онкологических заболеваний и в ветеринарии.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения фолликулярного белкового препарата, согласно которому отобранную фолликулярную жидкость крупного рогатого скота центрифугируют в течение 25 мин при 8000-10000 g, полученный супернатант охлаждают до 4-8°C и смешивают его с охлажденным до -18°C ацетоном в соотношении от 1/1 до 2/3 по объему, отстаивают, повторно центрифугируют в течение 15-25 мин при 8000-10000 g, а полученный осадок лиофилизируют, высушенный лиофилизат растворяют в буфере с pH 7,2, полученную взвесь еще раз центрифугируют при 8000-10000 g в течение 15-30 мин, полученный супернатант подвергают ионообменной хроматографии на DEAE-Сефарозе, собирают элюат, выходящий при концентрации NaCl от 0,11 до 0,19 М в элюирующем растворе с pH 7,0-7,2, после чего элюат диализуют против воды через мембрану с объемом исключения 14 кДа не менее 8 ч при температуре от 4 до 8°C, полученный диализат замораживают при температуре от -18 до -35°C, а затем лиофильно высушивают, получая продукт, содержащий сывороточный альбумин и белок семейства TGF-β, имеющий иммуноспецифичность ингибина βA.

2. Фолликулярный белковый препарат для лечения эндометриоза, полученный из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота способом по п.1 и содержащий сывороточный альбумин и белок семейства TGF-β, имеющий иммуноспецифичность ингибина βA, при следующем соотношении компонентов, мас.-%: белок семейства TGF-β - 0,005-3,0; сывороточный альбумин - остальное.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2