



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **99210**

(13) **C2**

(51) МПК

A61K 35/39 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 04369**

(22) Дата подання заявки: **11.04.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.07.2012**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **25.01.2012, Бюл.№ 2**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.07.2012, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):

**Черно Наталія Кирилівна (UA),
Озоліна Софія Олександрівна (UA),
Тірон-Воробйова Наталія Борисівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,
вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

RU 2108730 C1, 20.04.1998

KR 20070012040 A, 25.01.2007

JP 61143316 A, 01.07.1986

"Somazyme", виробництва Life plus™, США.
Product information sheet. [on-line]

[збережено в Інтернет 02.02.2010] Знайдено
в Інтернет: < URL:

<http://www.lifeplusvitamins.com/somazyme.htm>

"Lysozyme Plus" виробництва Life Extension
Institute, Scottsdale, США. Product

Description. [on-line] [збережено в Інтернет
13.04.2001] Знайдено в Інтернет: < URL:

<http://www.lifeextensionvitamins.com>

(54) ФЕРМЕНТНИЙ ПРЕПАРАТ З АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЮ ДІЄЮ

(57) Реферат:

Винахід належить до медицини та стосується ферментного препарату з антибактеріальною дією, що являє собою суміш двох ферментів: лізоциму і панкреатину у визначеному співвідношенні.

UA 99210 C2

Винахід належить до біотехнології, зокрема до медицини, конкретно до ферментного препарату, який має антибактеріальну дію.

Відомі сферичні протизапальні і протиракові ферментні гранульовані препарати [Заявка Кореї № 20070012040. A61K 9/16. Spherical anti-inflammatory and anti-cancer enzyme granules and method for preparing the same / H.J. Hwan, K.J. Cheon, K.H. Soo, K.W. Sik- заявл. 22.07.2005; опубл. 25.01.2007], які містять такі ферменти, як трипсин, хімотрипсиноген, дезоксирибонуклеазу, лізоцим, стрептокіназу.

Відомі також способи приготування таблетованих сумішей активних компонентів, які мають стійкість до збереження своєї форми [Заявка Японії 61-143316. A61K31/455. Preparation of stable tablet / Terazono Takashi. - заявл. 01.07.1986; опубл. 25.04.1995]. Активні компоненти: лактобацили (*Streptococcus faecalis*), панкреатин, лізоцим гідрохлорид.

Відомі також поліферментні препарати, що окрім лізоциму білка курячих яєць, містять також великий набір інших ферментів: панкреатин, папаїн, бромелайн, трипсин, супероксиддисмутаза, α -хімотрипсин (препарат "Somazyme" - Life plus™, США) [http://www.lifeplusvitamins.com/somazyme.htm]. Призначення - підвищення імунного статусу організму в цілому, забезпечення правильної роботи підшлункової залози.

Найближчим, з відомих заявнику, є поліферментний препарат "Lysozyme Plus" виробництва Life Extension Institute, Scottsdale, США [http://www.lifeextensionvitamins.com]. Препарат містить панкреатин, папаїн, бромелайн, рутин, трипсин, тимус, амілазу, ліпазу, лізоцим, целюлазу, α -хімотрипсин. Його дія - міцний протизапальний засіб, який застосовують, наприклад, при артритах, спортивних травмах.

Даний препарат вибрано прототипом.

Прототип і винахід, що заявляються, мають спільні компоненти:

- лізоцим;
- панкреатин.

Але, як відомі вищенаведені ферментні препарати, так і ферментний препарат за прототипом не виявляють антибактеріальну активність.

В основу винаходу поставлено задачу створити новий ферментний препарат, в якому шляхом підбору двох конкретних ферментів та їх співвідношення, забезпечити отримання двокомпонентного ферментного препарату з антибактеріальною дією.

Поставлена задача вирішена ферментним препаратом, що містить гідролітичний фермент лізоцим з білка курячих яєць і фермент панкреатин при наступному співвідношенні вказаних компонентів, мас. %:

лізоцим	30-70
панкреатин	70-30.

Заявлений препарат виявляє бактерицидну дію до таких мікроорганізмів, як *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Planococcus citreus*.

В науково-технічній і патентній літературі не описані ферментні препарати, які містять лізоцим і панкреатин, з антибактеріальною дією, а також суттєве підвищення лізоцимної активності самого лізоциму при суміщенні його з панкреатином.

Відомо, що панкреатин не є активним щодо лізоциму як білку, тобто панкреатин не гідролізує лізоцим і останній не втрачає своєї активності. Проведено попередні дослідження (табл. 1), за допомогою яких доведено, що додавання трипсину до лізоциму, а також часткове заміщення лізоциму трипсином дозволяє створити бінарні ферментні композиції, які за лізоцимною активністю перевищують власно лізоцим. Також показано, що можливе підвищення лізоцимної активності у випадку часткового заміщення лізоциму сумішшю трипсину і панкреатичної ліпази. В той же час кожен з розглянутих ферментів - трипсин і ліпаза не виявляють окремо антибактеріальної дії, тобто у випадку використання таких композицій імовірно спостерігається синергічний ефект. Це явище можна пояснити, виходячи з будови клітинної стінки бактерій, яка побудована переважно з мукополісахариду, до складу якого входять залишки N-ацетилглюкозаміну і N-ацетилмурамової кислоти, які перехресно зв'язані короткими пептидами. Бактерицидний ефект лізоциму зумовлений його здатністю гідролізувати β -D-(1 $\rightarrow$ 4), а також, можливо, β -D-(1 $\rightarrow$ 2) глікозидні зв'язки мукополісахариду. Сумісна дія лізоциму, що розщеплює глікозидні зв'язки мукополісахариду, а також трипсину, що додатково розщеплює пептидні зв'язки, ліпази, що гідролізує відповідно складноефірні зв'язки ліпідів, які присутні у складі клітинної стінки деяких бактерій, призводить до підвищення сумарної активності ферментних композицій. Враховуючи, що у складі панкреатину присутні як трипсин, так і ліпаза, а додаткове їх вилучення і очистка супроводжується підвищенням ціни на відповідні ферменти, було досліджено можливість створення двокомпонентних ферментних композицій, що містять лізоцим і панкреатин.

Суміщення лізоциму з панкреатином підвищує активність двокомпонентної суміші, хоча самостійно панкреатин не виявляє лізоцимної активності (табл. 2).

Ферментний препарат отримували наступним чином.

- 5 Ферменти: лізоцим (5 мг у 50 см³ дистильованої води) і панкреатин (5 мг у 50 см³ дистильованої води) швидко змішували у різному співвідношенні при кімнатній температурі 20±2 °С. Одразу після перемішування додавали у реакційну суміш останні компоненти (К-На-фосфатний буферний розчин, трилон Б, субстрат (10 мг/см³)) і вимірювали лізоцимну активність (у даному випадку, змінення оптичної густини системи) окремо панкреатину, лізоциму і у суміші лізоцим-панкреатин, використовуючи як субстрат *Micrococcus luteus* загально прийнятим
- 10 методом згідно патенту Російської Федерації № 2294373.

Приклад 1

Отримували ферментний препарат, як наведено вище. Компоненти брали у наступному співвідношенні, мас. %: лізоцим - 30, панкреатин - 70.

Приклад 2

- 15 Отримували ферментний препарат, як наведено вище. Компоненти брали у наступному співвідношенні, мас. %: лізоцим - 50, панкреатин - 50.

Приклад 3

Отримували ферментний препарат, як наведено вище. Компоненти брали у наступному співвідношенні, мас. %: лізоцим - 70, панкреатин - 30.

- 20 Лізоцимна активність отриманих ферментних сумішей за прикладами 1-3 наведена в табл. 1.

Дані, наведені в табл. 1, вказують на те, що найбільш суттєве збільшення лізоцимної активності відносно контролю спостерігається при співвідношенні лізоциму і панкреатину у мас. %: 50÷50, 70÷30, відповідно.

- 25 Бактерицидний ефект сумішей лізоцим-панкреатин наведено у табл. 3.

Дані, наведені в табл. 3, вказують на те, що при співвідношенні лізоциму і панкреатину у мас. %: 70÷30, розширився спектр дії суміші на Гр⁻ бактерії (*Pseudomonas aeruginosa*, *Planococcus citreus*).

- 30 Отриманий ферментний препарат застосовували для одержання антибактеріального засобу у формі таблеток, до складу яких увійшли наступні компоненти, мас. %:

лізоцим білку курячих яєць	30-70
панкреатин	70-30
фармацевтично допустимий	лактози
носії	моногідрат.

Таблица 1

Зміна оптичної густини сумішей лізоцим-трипсин-ліпаза за *Micrococcus luteus*

№ зразка	Ферменти	Зміна оптичної густини суміші за <i>Micrococcus luteus</i>	Збільшення лізоцимної активності відносно контролю, %
1	Лізоцим (л) (контроль)	0,455	-
2	Трипсин (т)	0	не активний
3	Ліпаза (лп)	0	не активна
4	70 % л + 30 % лп	0,516	13,4
5	100 % л + 40 % т	0,541	18,9
6	60 % л + 40 % т + 40 % лп	0,583	28,1
7	40 % л + 30 % т + 30 % лп	0,522	14,8

Таблица 2

Зміна оптичної густини сумішей лізоцим-панкреатин за *Micrococcus luteus*

№ зразка	Ферменти	Зміна оптичної густини суміші за <i>Micrococcus luteus</i>	Збільшення лізоцимної активності відносно контролю, %
1	Лізоцим (л) (контроль)	0,455	-

Таблиця 2

№ зразка	Ферменти	Зміна оптичної густини суміші за <i>Micrococcus luteus</i>	Збільшення лізоцимної активності відносно контролю, %
2	Панкреатин (п) (контроль)	0	не активний
3	50 % л + 50 % п	0,680	49,6
4	70 % л + 30 % п	0,635	39,7
5	70 % п + 30 % л	0,674	48,3

Таблиця 3

Бактерицидний ефект сумішей лізоцим-панкреатин

№ п/п	Мікроорганізми	Зони лізису, мм	
		Лізоцим білка курячих яєць	Панкреатин + лізоцим (70 % + 30 %)
1	<i>Micrococcus luteus</i>	35	35
3	<i>Escherichia coli</i>	бактеріостатична дія	
		25	25
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	бактеріостатична дія	
		25	25
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	30
6	<i>Planococcus citreus</i>	35	42

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

Ферментний препарат, що містить лізоцим і панкреатин, який **відрізняється** тим, що вказані ферменти препарат містить при наступному співвідношенні, мас. %:

лізоцим	30-70
панкреатин	70-30.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601