

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491245** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.08.14

(51) Int. Cl. *A61K 31/685* (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.19

(54) **ПРОМЫШЛЕННЫЙ СПОСОБ ИЗВЛЕЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФОСФОЛИПИДОВ**

(31) **102021000032252**

(32) **2021.12.22**

(33) **IT**

(86) **PCT/IB2022/062486**

(87) **WO 2023/119129 2023.06.29**

(71) Заявитель:
ФИДИА ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.
(IT)

(72) Изобретатель:
Питтарелло Мара (IT)

(74) Представитель:
**Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Описан промышленный способ извлечения и очистки фосфолипидов из головного мозга животных, особенно чистых и с высоким процентным содержанием фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилхолина (ФХ), особенно обогащенных ФС, а также применение этих фосфолипидов в лечении патологии, определяемой как "постковидный синдром".

A1

202491245

202491245

A1

ПРОМЫШЛЕННЫЙ СПОСОБ ИЗВЛЕЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФОСФОЛИПИДОВ **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В настоящем изобретении описан и заявляется новый промышленный способ извлечения и очистки фосфолипидов из головного мозга животных, особо чистых и с высоким процентным содержанием фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилхолина (ФХ), особенно обогащенных ФС, и применение указанных фосфолипидов в лечении патологии, определяемой как «постковидный синдром».

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фосфолипиды представляют класс липидов, которые содержат фосфат, они представляют собой амфипатические молекулы, так как они имеют гидрофильную полярную головку и гидрофобный неполярный хвост и являются основными структурными составляющими клеточных мембран животных и растений.

В общем, их можно подразделить на сфингофосфолипиды и глицерофосфолипиды (или фосфоглицериды), причем последние происходят из *sn*-глицерин-3-фосфата, где глицерин (CH₂OH-CHOH-CH₂OH) этерифицирован в положении 3 ортофосфорной кислотой (H₃PO₄) и в положении 2 жирной кислотой, при этом соединения различных классов могут быть связаны в положении 1.

Также существует класс диацилфосфолипидов, в котором глицерин этерифицирован в положении 1 и в положении 2 жирными кислотами и в положении 3 ортофосфорной кислотой.

В мембранных фосфолипидах существует два типа жирных кислот: насыщенные жирные кислоты, в которых все атомы углерода являются насыщенными, и ненасыщенные жирные кислоты, в которых присутствует одна или более двойных связей; жирная кислота в положении 2 диацилфосфоглицеридов клеточных мембран обычно является ненасыщенной.

В дополнение к этерификации глицерином (которая приводит к образованию фосфатидной кислоты) ортофосфорная кислота подвергается второй этерификации спиртом (аминоспиртом или аминокислотой со спиртовой группой или сахаром), диацилфосфолипиды в таком случае обозначают с помощью префикса «фосфатидил» с последующим наименованием соединения, этерифицированного фосфатной группой

(например, фосфатидилсерин, где серин представляет собой этерифицированное соединение с фосфатной группой).

Фосфолипиды составляют примерно 70-80% массы липидов клеточных мембран, и основные из них представляют собой: фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин, которые вместе образуют более 50% всех мембранных липидов. Фосфатидилинозит, с другой стороны, представляет собой фосфолипид, присутствующий в меньших количествах, который, однако, играет главную роль в генезе внутриклеточных сигналов.

Сфингофосфолипиды содержат длинноцепочечный аминспирт вместо глицерина: в сфингозине (C18) аминогруппа связана с помощью амидной связи с карбоксильной группой жирной кислоты (образуя соединение, называемое церамидом), при этом гидроксильная группа связана с помощью сложноэфирной связи с ортофосфатом, в свою очередь, этерифицируемым с помощью аминспирта, обычно холина, образуя таким образом соединение, называемое сфингомиелином или церамид-1-фосфорилхолином; с другой стороны, когда церамид связывается посредством гидроксильной группы с моносахаридом, получают цереброзид, когда церамид связывается посредством гидроксильной группы с олигосахаридом, образуется ганглиозид, причем оба гликолипида не содержат фосфор.

Фосфатидилхолин (ФХ) представляет собой основной фосфолипид эукариотических клеток, содержащий от 40 до 50% мембранных фосфолипидов: важная молекула для пролиферации и деления клеток, он представляет собой основной источник холина для холинергических нейронов, которые используют его для синтеза нейромедиатора ацетилхолина; когда потребность в холине превышает оборот повторного синтеза ацетилхолина, состав нейрональных мембран может претерпевать изменения, которые представляют собой такие, которые негативно влияют на их целостность и, таким образом, на жизнеспособность вовлеченных нейронов. Ацетилхолин представляет собой нейромедиатор, который опосредует важные нейрональные функции, такие как дыхание, сокращение мышц, сердечный ритм, кратковременную память, и большая часть преганглиозных нейронов симпатической и парасимпатической систем, а также двигательные нейроны, используют этот нейромедиатор.

Фосфатидилэтаноламин (ФЭ) составляет от 20 до 50% мембранных фосфолипидов млекопитающих, но он составляет примерно 30-45% фосфолипидов головного мозга, тогда как фосфатидилсерин, напротив, является одним из фосфолипидов с самой низкой концентрацией, присутствуя только в 2-10% от общего количества фосфолипидов (Vance

JE.; Journal of Lipid Research; 2008; 49:1377-1387). Фосфатидилэтаноламин встречается, конкретно, в белом веществе церебральной нервной ткани, нервах и спинном мозге, где он участвует в слиянии мембран во время цитокинеза клеточного деления; также ФЭ представляет собой важный предшественник/субстрат в многочисленных и разнообразных биохимических и клеточных физиологических процессах у млекопитающих.

Фосфатидилсерин ФС представляет собой главный кислый мембранный фосфолипид, способный влиять на стабильность, текучесть и организацию клеточных мембран, он распределяется главным образом во внутренней части плазматических мембран, где взаимодействует с цитоплазматическими элементами, проявляя способность активирования двух важных клеточных ферментов, таких как натриево-калиевая *АТФаза* и *протеинкиназа С*.

Фосфатидилсерин, возможно, представляет собой наиболее широко изученный фосфолипид благодаря его доказанной способности как стимулировать высвобождение дофамина из дофаминергических терминалей полосатого тела, так и активировать фермент аденилатциклазу гипоталамических нейронов, но, прежде всего, для предотвращения потери дендритных отростков пирамидальных нейронов гиппокампа, связанную со старением мозга (Advances in Behavioural Biology; Lecithin Ed. by Hanin I. and Ansell GB.; vol.33; 1987).

По всем этим перечисленным выше причинам ФС являлся предметом многочисленных клинических испытаний для оценки предупреждения и/или терапии снижения когнитивных способностей у пожилых людей и/или пациентов с болезнью Альцгеймера и депрессивных расстройств в целом (Cenacchi T. et al.; Aging Clin Exp Res; 1993; 5:123-133; Biggio G. et al. Minerva Psichiatrica; 2018; 59(1):1-10). Также было продемонстрировано, каким образом фосфатидилсерин может противодействовать повышению уровня гормона кортизола у людей, подверженных стрессу, способствуя их функциональному восстановлению (Monteleone P. et al.; Neuroendocrinology; 1990; 52(3):243-8).

Фосфолипиды животного происхождения обычно извлекают из мембран, используя растворители или смеси растворителей, среди которых, в частности, хлороформ, признанный канцерогенный растворитель, с последующей очисткой посредством хроматографии с силикагелем (SU 1102603; EP638083; US20120116104); этот растворитель также широко используют в очистке ганглиозидов, из которых фосфолипиды удаляют путем распределения хлороформ-метанол (EP0150712) или путем омыления (EP3095451).

Таким образом, остается потребность в промышленном способе извлечения и очистки вышеупомянутых фосфолипидов из ткани головного мозга животных, при котором не используют растворители, такие как хлороформ, для получения конечного фосфолипидного продукта, не содержащего остатков растворителя, белковых компонентов и контаминантов, таких как вирусы, в частности, и который является легким в осуществлении, так как он не требует использования хроматографических процессов с силикагелем.

Задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы разработать способ извлечения и очистки фосфолипидов животного происхождения, который преодолевает недостатки уровня техники, удовлетворяет всем перечисленным выше требованиям и, главное, приводит к получению конечных фосфолипидов, обогащенных ФС.

Таким образом, настоящее изобретение относится к инновационному способу извлечения и очистки фосфолипидов животного происхождения, как заявлено в п. 1 формулы настоящего изобретения.

Этот способ удовлетворяет всем перечисленным выше требованиям и, главное, приводит к получению конечных фосфолипидов, обогащенных ФС, так как конечное соотношение ФС/ФХ, полученное в конце стадий извлечения и очистки фосфолипидов по настоящему изобретению находится в диапазоне 0,8-1,6, являясь, таким образом, радикально модифицированным по отношению к исходному соотношению ФС/ФХ исходных мембран тканей животных, из которых эти фосфолипиды извлекают и очищают, как определено выше.

В соответствии с этим инновационным способом заявитель имеет в своем распоряжении более эффективный фосфолипидный препарат для лечения всех патологических состояний, которые требуют введения высоких концентраций ФС/ФХ, в частности ФС, таких как предупреждение/лечение проблем нейроэндокринной природы, таких как, например, деменция и/или снижение когнитивных способностей у пожилых людей, и депрессивные расстройства в целом.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к фосфолипидам для применения в лечении патологии, определяемой как «постковидный синдром или пост-ковид», предпочтительно к фосфолипидам, обогащенным ФС, полученным согласно способу извлечения и очистки по настоящему изобретению, для применения в лечении патологии, определяемой как «постковидный синдром или пост-ковид».

Заболевание постковидный синдром поражает высокий процент пациентов, которые восстановились после перенесенного коронавируса Sars-CoV-2 и вызванных им патологий,

но у которых, к сожалению, все еще проявляются явные последствия этой инфекции; anosmia и потеря вкуса, постоянное чувство усталости/астении (понимаемое как физическое и/или психическое снижение работоспособности пациента), частые головные боли, иногда серьезные психические проявления, такие как психоз, входят в число основных неврологических/нейроэндокринных симптомов постковидного синдрома, также часто обнаруживается так называемый «ментальный туман», то есть состояние спутанности сознания, при котором пациент, восстановившийся после перенесенного вируса Sars-CoV-2, не способен сосредоточиться и иметь полный контроль над своими умственными способностями и, таким образом, осуществлять нормальную повседневную деятельность доковидной жизни (Walitt B. et al.; Pain Reports; 2021; 6(1) 887); в заключение, среди симптомов постковидной патологии, также можно обнаружить различные гормональные дисфункции, которые вызывают снижение уровня мужского тестостерона в сыворотке со снижением либидо и связанными с этим проблемами эректильной дисфункции (Moreno-Perez O. et al.; Clinical Endocrinology; 2021; vol. 96; 3:353).

Таким образом, применение фосфолипидов, обогащенных ФС, представляет собой часть лечения патологии постковидного синдрома для стимулирования/восстановления психофизического равновесия пациента и уменьшения симптомов этой патологии, главным образом для регрессии ментального тумана не только у взрослых, но и у подростков.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заявитель испрашивает защиту инновационного промышленного способа извлечения и очистки фосфолипидов из головного мозга животных (предпочтительно из гипоталамической области и кортикальной области), предпочтительно свиней, который не предусматривает использования хлороформа и стадии очистки посредством хроматографии с силикагелем, что делает возможным получение особенно чистого конечного фосфолипидного продукта, так как он не контаминирован нетипичными вирусами животных (самое главное, вирусами, вызывающими губчатую энцефалопатию), не содержит остатки растворителей и белковые компоненты, с высоким процентным содержанием ФС и ФХ, но обогащен, главным образом, ФС, где конечное соотношение ФС/ФХ, полученное в конце стадий извлечения и очистки, находится в диапазоне от 0,8 до 1,6, таким образом оказываясь радикально модифицированным по сравнению с исходным соотношением ФС/ФХ исходных мембран ткани животного происхождения, из которых эти фосфолипиды извлекают и очищают, а также отличается от соотношения ФС/ФХ, получаемого с использованием способов извлечения и очистки, известных в данной области техники.

Фосфолипидный продукт, полученный с помощью инновационного способа по настоящему изобретению, состоит из фосфолипидов фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидной кислоты (ФК), фосфатидилинозита (ФИ), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилхолина (ФХ), сфингомиелина (СФМ); конечный продукт содержит только следы двух мембранных гликофинголипидов, таких как цереброзид (нейтральный гликолипид) и сульфатид (сложный эфир сульфата гликолипида), также оказываясь не содержащим ганглиозиды и очищенным от любого белкового (и небелкового) загрязнения и остатков любого использованного растворителя.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим или состоящим из ФС-обогащенных фосфолипидов, полученных с помощью вышеуказанного промышленного способа извлечения и очистки фосфолипидов из головного мозга животных, и к их применению в предупреждении/лечении проблем нейроэндокринной природы, таких как, например, деменция и/или когнитивное нарушение у пожилых людей и депрессивные расстройства в целом.

В этих фармацевтических композициях ФС-обогащенные фосфолипиды, упомянутые выше, могут быть ассоциированы с лекарственными средствами и/или фармакологически или биологически активными агентами, такими как, например, стероиды, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, натуральные экстракты животного и/или растительного происхождения и/или витамины, предпочтительно витамины группы В.

Изобретение также относится к фосфолипидам и соответствующим фармацевтическим композициям, которые содержат указанные фосфолипиды или состоят из них, для применения в лечении патологии, определяемой как «постковидный синдром».

Особенно предпочтительными являются фосфолипиды, обогащенные ФС, полученные с помощью промышленного способа извлечения и очистки фосфолипидов из головного мозга животных по настоящему изобретению (как определено выше), для применения в лечении патологии, определяемой как «постковидный синдром», так как заявитель неожиданно обнаружил и впоследствии продемонстрировал, что лечение с помощью этих фосфолипидов значительно улучшает и также устраняет симптомы постковидного синдрома у пациентов.

Далее в этом документе заявитель описывает и заявляет способ извлечения и очистки фосфолипидов, обогащенных ФС, где конечное соотношение ФС/фосфатидилхолин (ФХ) в конце стадий извлечения и очистки находится в диапазоне от 0,8 до 1,6, включающий или состоящий из следующих основных стадий:

извлечение, которое включает следующие стадии:

(а) измельчение головного мозга животного;

(б) добавление смеси растворителей, содержащей ацетон и метанол, к измельченному продукту;

(в) перемешивание и отстаивание;

(г) отделение осажденного влажного неочищенного экстракта фосфолипидов;

промежуточная очистка, которая включает следующие стадии:

(д) растворение влажного неочищенного экстракта фосфолипидов, полученного на стадии (г), с солями NaCl и KCl, отстаивание, отделение субнатанта посредством фильтрации;

(е) промывание субнатанта, полученного на предыдущей стадии (д), очищенной водой, отстаивание и отделение субнатанта;

(ж) добавление ацетона и дигидрата CaCl₂ к субнатанту, полученному на предыдущей стадии (е), перемешивание и отстаивание;

(з) фильтрование продукта со стадии (ж) с помощью фильтр-пресса с получением первого частично очищенного твердого экстракта фосфолипидов;

конечная очистка, которая включает следующие стадии:

(и) растворение твердого экстракта фосфолипидов в органическом растворителе;

(к) добавление раствора, содержащего этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), NaOH, KCl и NaCl, имеющего pH 8,5-9, к экстракту со стадии (и), перемешивание и отстаивание;

(л) отделение субнатанта со стадии (к), добавление воды и этанола, перемешивание и отстаивание;

(м) отделение субнатанта со стадии (л) посредством фильтрации через фильтр со степенью фильтрации 3 мкм или, альтернативно, 0,8 мкм и затем 0,2 мкм, перемешивание и отстаивание;

(н) промывание осадка со стадии (м) ацетоном;

(о) фильтрование продукта со стадии (н) с использованием фильтр-пресса с получением очищенного твердого экстракта фосфолипидов;

(п) обработка конечного экстракта со стадии (о) жидким азотом, гранулирование и сушка в вакууме.

Далее в этом документе заявитель описывает и заявляет способ извлечения и очистки фосфолипидов, обогащенных ФС, где конечное соотношение ФС/фосфатидилхолин (ФХ) в конце стадий извлечения и очистки находится в диапазоне от

0,8 до 1,6, который включает или состоит из следующих стадий, более подробно описанных ниже:

извлечение, которое включает следующие стадии:

влажные неочищенные экстракты фосфолипидов получают на стадиях (а)-(г):

(а) измельчение мозга животного, предпочтительно его гипоталамической части и/или коры головного мозга;

(б) добавление смеси растворителей, состоящей из ацетона/метилхлорида или другого полярного органического растворителя (ПОР)/метанола, к измельченному продукту со стадии (а) в соотношении (кг/л) (измельченный продукт) 1: (смесь) 1,5-3 масс./об., предпочтительно 1:2,2, масс./об., где растворители вышеуказанной смеси находятся в соотношении (ацетон)1:(метилхлорид или другой ПОР)1-2:(метанол) 0,5-1 (об./об.);

(в) выдерживание при перемешивании в течение по меньшей мере 60 минут при температуре 30-35°C; отстаивание экстракта в течение по меньшей мере 180 минут при температуре 30-35°C;

(г) отделение субнатанта путем его фильтрования через фильтр со степенью фильтрации 1 мкм, предпочтительно из полипропилена, удаление надосадочной жидкости;

промежуточная очистка, которая включает следующие стадии:

на следующих стадиях экстракт фосфолипидов обогащают ФС посредством использования дигидрата CaCl_2 , который способствует осаждению ФС, экстракты фосфолипидов очищают от любых возможных нетипичных вирусов и/или любых пирогенов, присутствующих в исходном животном продукте, и, кроме того, экстракт также очищают от белков и ганглиозидов, так как эти молекулы солубилизируются в результате добавления солей NaCl и KCl к неочищенному экстракту, затем отделяют и удаляют из экстрактов фосфолипидов с получением неочищенного твердого вещества, которое можно хранить при -20°C: в частности, первый частично очищенный твердый экстракт фосфолипидов, полученный на стадии (з) промежуточной очистки, который можно хранить при температуре -20°C, делает возможным прерывание процесса в конце указанной стадии (з) промежуточной очистки и выполнение конечной очистки позже;

(д') охлаждение до 0°C и растворение влажного неочищенного экстракта, полученного на стадии (г), посредством добавления NaCl и KCl , предпочтительно в количестве равном 1-2 грамм (для каждого вида соли)/кг исходного измельченного продукта, полученного на стадии (а), и в соотношении 1:1 масс./масс., при перемешивании в течение по меньшей мере 30 минут;

(д") отстаивание экстракта и отделение субнатанта посредством фильтрации его через фильтр со степенью фильтрации 1 мкм, предпочтительно из полипропилена, удаление надосадочной жидкости;

(е) добавление очищенной воды к субнатанту со стадии (д") по меньшей мере 10% от объема, выдерживание при перемешивании по меньшей мере на 30 минут, отстаивание в течение по меньшей мере 60 минут, отделение субнатанта и удаление надосадочной жидкости;

(ж') понижение температуры до 0°C: добавление ацетона к экстракту со стадии (е), предпочтительно 1 л/л экстракта, и дигидрата CaCl₂, предпочтительно 1-2 г/л экстракта, перемешивание и отстаивание в течение по меньшей мере 30 минут, удаление надосадочной жидкости;

(ж") добавление ацетона к субнатанту со стадии (ж'), предпочтительно 0,1-0,2 л/л субнатанта, перемешивание и отстаивание; эту стадию промывки можно повторять и выполнять при температуре 10°C;

(з) фильтрование продукта со стадии (ж") посредством фильтр-пресса, предпочтительно с использованием полипропиленового фильтра/ткани (для удаления надосадочной жидкости) с получением первого частично очищенного твердого экстракта фосфолипидов, который можно хранить при температуре -20°C;

конечная очистка, которая включает следующие стадии:

с помощью следующих стадий экстракт делают в высшей степени мелкодисперсным, растворимым и фильтруемым через фильтры с 0,2 мкм, которые обеспечивают бактериальную стерильность:

(и) растворение твердого экстракта фосфолипидов, полученного в конце стадии (з), в метиленхлориде или другом ПОР, предпочтительно в соотношении 100-150 г экстракта/л растворителя, перемешивание в течение по меньшей мере 60 минут при температуре 21-25°C;

(к) добавление к экстракту, полученному на стадии (и), раствора, содержащего ЭДТА 110-130 г/л, NaOH 7-9 г/л, KCl 27-30 г/л, NaCl 22-25 г/л, приготовленного в очищенной воде и с конечным рН в диапазоне 8,5-9, в процентном отношении в диапазоне 21-24% по отношению к объему экстракта, полученного в конце стадии (и), и затем этанола в процентном отношении 16-20%, вновь по отношению к объему экстракта, полученного в конце стадии (и), перемешивание в течение по меньшей мере 60 минут и отстаивание в течение по меньшей мере 12 часов;

(л) отделение субнатанта и удаление надосадочной жидкости; добавление очищенной воды в количестве 10% и этанола в количестве 1% от объема субнатанта, перемешивание в течение по меньшей мере 60 минут и отстаивание в течение по меньшей мере 12 часов;

(м) отделение субнатанта от надосадочной жидкости (удаленной) посредством фильтрации через фильтр со степенью фильтрации 3 мкм или, альтернативно, 0,8 мкм, предпочтительно из полипропилена, затем 0,2 мкм, предпочтительно из политетрафторэтилена, перемешивание и отстаивание, отделение субнатанта от надосадочной жидкости;

(н) добавление ацетона к осадку, полученному в конце стадии (м), предпочтительно 0,5 л/л субнатанта, перемешивание в течение по меньшей мере 30 минут при температуре 10°C, осаждение осадка фосфолипидов и удаление надосадочной жидкости путем сифонирования; эту операцию можно повторять несколько раз;

(о) фильтрование продукта, полученного в конце стадии (н) с использованием фильтр-пресса, предпочтительно с полипропиленовым фильтром/тканью (удаление надосадочной жидкости), с получением очищенного твердого экстракта фосфолипидов;

(п) обработка конечного экстракта, полученного на стадии (о), жидким азотом, гранулирование и сушка при температуре 40°C в вакууме не более 0,5 мбар.

Чтобы избежать окисления фосфолипидов (как известно специалистам в данной области), в начальной части описанного выше способа в неочищенный экстракт фосфолипида можно надлежащим образом добавлять антиоксидант (например, Охупех® LM).

Затем фосфолипиды анализировали для их идентификации посредством ТСХ-хроматографии с окрашиванием нингидридом и/или сульфатом меди, как известно специалистам в данной области техники (Bitman J. & Wood DL.; *Journal of Liquid Chromatography*; 1982; 5:1155-1162), затем выполняли тесты, необходимые для определения их степени очистки от биоконтаминантов (все микробиологические контроли, требующиеся для инъеклируемых продуктов в соответствии с действующей Европейской Фармакопеей) и пирогенов (*Pyrogen Test, Ph. Eur.* 2.6.8.), от белков (Lowry et al.; *J. Biol. Chem.*; 1951; 193(1):265-275) и от остатков растворителя (посредством газохроматографического определения с помощью методики парофазного анализа в сравнении с эталонным раствором, как известно специалистам в данной области техники).

Затем их готовили в выбранной фармацевтической форме с использованием соответствующего эксципиента, который известен специалисту в данной области техники.

Для описанного выше применения предпочтительной является фармацевтическая композиция в форме инъекций.

Пример 1

Промышленное получение ФС-обогащенных фосфолипидов из головного мозга свиньи

Взвешивали и измельчали 2,300 кг свиного мозга, затем выполняли стадию извлечения, в частности, в подпункте (б) к измельченному продукту, указанному выше, добавляли смесь растворителей, состоящую из ацетона/метиленхлорида/метанола, в соотношении измельченный продукт/смесь равном 1:2,2 масс./об., где растворители находились в соотношении 1:1,4:0,6 (об/об); затем процесс продолжали с описанными последующими стадиями для достижения промежуточной очистки:

стадия (д): соли NaCl и KCl добавляли к влажному неочищенному материалу с предыдущей стадии в количествах равных 1,5 г/кг исходного измельченного продукта; затем процесс продолжали на следующих стадиях (е)-(з), где добавляли дигидрат CaCl₂ в количестве равном 1,6 г/л экстракта; затем процесс продолжали на стадии (ж), где добавляли 0,1 л ацетона на литр полученного субнатанта, затем процесс продолжали на стадии (з), фильтруя продукт с помощью фильтр-пресса с полипропиленовым фильтром, с получением твердого неочищенного фосфолипида.

Конечная очистка:

Стадия (и): твердый неочищенный экстракт солубилизировали с помощью метиленхлорида в соотношении 125 г/л растворителя; стадия (к): раствор стадии (к) готовили из 122 г/л ЭДТА, 8 г/л NaOH, 29 г/л KCl и 23 г/л NaCl/л при pH 8,5, затем этот раствор добавляли к экстракту, полученному на стадии (и), в количестве 23% по отношению к его объему, затем добавляли этанол в количестве равном 18%; затем процесс очистки продолжали вплоть до сушки при температуре 40°C в вакууме не более 0,5 мбар.

Результат:

Идентификация: фосфолипиды идентифицировали посредством ТСХ (тонкослойной хроматографии) с окрашиванием сульфатом меди, поэтому оказалось возможным сравнивать присутствующие фосфолипиды по их **RF** (коэффициентам удерживания), то есть на основе соотношения между расстоянием, пройденным фосфолипидом, и расстоянием, пройденным растворителем, и они были обнаружены по порядку (снизу вверх): СФМ, ФХ, ФС, ФИ, ФК и ФЭ, со следами цереброзидов и сульфатидов; ганглиозиды отсутствуют.

Для определения их процентных содержаний и соотношения между ФС и ФХ, считывали ТСХ с помощью фотоденситометра при 450 нм:

СФМ равно 2,9%

ФС равно 13,0%

ФХ равно 20,2%

ФИ равно 6,5%

ФК равно 1,8%

ФЭ равно 55,5%

Затем было рассчитано соотношение ФС/ФХ, равное 1,55.

Было обнаружено, что фосфолипиды составляют более 90% фосфолипидного препарата.

Остаточные растворители: отсутствуют.

Белки: отсутствуют.

Пирогены и микробиологические контаминанты: отсутствуют

Пример 1 однозначно демонстрирует, каким образом способ извлечения и очистки фосфолипидов из головного мозга животного по настоящему изобретению определяет получение по существу чистых фосфолипидов, обогащенных ФС.

Пример 2:

Фармацевтическая фосфолипидная композиция в лечении патологии «постковидный синдром»

Описание клинического случая: С.М., 54 года, женщина, заразилась коронавирусом Sars-Cov-2 в апреле 2020 года и по этой причине болела ковидом в форме средней тяжести. Основные симптомы представляли собой среднюю/тяжелую дыхательную недостаточность, лихорадку, головную боль, anosмию и одышку, ее лечили в основном с помощью введения высоких доз НПВП.

Через 15 суток мазки из носа пациентки оказались отрицательными, и она восстановилась от этой патологии, однако очень скоро у нее развилось заболевание постковидный синдром вследствие постоянного чувства усталости/астении, связанного с «ментальным туманом», то есть состоянием спутанности сознания, которое было таким, что она не была способна вернуться к доковидной работе или к повседневным занятиям.

Фосфолипиды, полученные согласно способу по настоящему изобретению (Пример 1), приготовленные на водной основе с маннитом и фосфатом натрия в качестве эксципиентов, вводили пациенту внутримышечно в дозе 28 мг/2 мл инъекционной композиции в течение 20 суток лечения ежедневно.

Примерно через 10 суток пациент начал получать пользу от введения фосфолипида с постепенным уменьшением как спутанности сознания, так и чувства усталости/астении, восстановившись полностью через 20 суток после начала лечения.

Этот случай демонстрирует терапевтическую эффективность фосфолипидов и композиций, содержащих их, в лечении патологии «постковидный синдром».

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ извлечения и очистки фосфолипидов, обогащенных фосфатидилсеринном (ФС), где конечное соотношение ФС/фосфатидилхолин (ФХ) в конце стадий извлечения и очистки находится в диапазоне от 0,8 до 1,6, включающий следующие стадии:

извлечения, которое включает следующие стадии:

(а) измельчение головного мозга животных;

(б) добавление смеси растворителей, содержащей ацетон и метанол, к измельченному продукту;

(в) перемешивание и отстаивание;

(г) отделение осажденного влажного неочищенного экстракта фосфолипидов;

промежуточной очистки, которая включает следующие стадии:

(д) растворение влажного неочищенного экстракта фосфолипидов, полученного на стадии (г), с солями NaCl и KCl, отстаивание, отделение субнатанта посредством фильтрации;

(е) промывание субнатанта, полученного на предыдущей стадии (д), очищенной водой, отстаивание и отделение субнатанта;

(ж) добавление ацетона и дигидрата CaCl₂ к субнатанту со стадии (е), перемешивание и отстаивание;

(з) фильтрование продукта со стадии (ж) с помощью фильтр-пресса с получением первого частично очищенного твердого экстракта фосфолипидов;

конечной очистки, которая включает следующие стадии:

(и) растворение твердого экстракта фосфолипидов в органическом растворителе;

(к) добавление раствора, содержащего этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), NaOH, KCl и NaCl, имеющего pH 8,5-9, к экстракту со стадии (и), перемешивание и отстаивание;

(л) отделение субнатанта со стадии (к), добавление воды и этанола, перемешивание и отстаивание;

(м) отделение субнатанта со стадии (л) посредством фильтрации через фильтр со степенью фильтрации 3 мкм или, альтернативно, 0,8 мкм и затем 0,2 мкм, перемешивание и отстаивание;

(н) промывание осадка со стадии (м) ацетоном;

(о) фильтрование продукта со стадии (н) с использованием фильтр-пресса с получением очищенного твердого экстракта фосфолипидов;

(п) обработка конечного экстракта со стадии (о) жидким азотом, гранулирование и сушка в вакууме.

2. Способ извлечения и очистки ФС-обогащенных фосфолипидов по п. 1, который включает в себя или состоит из следующих стадий:

извлечения, которое включает следующие стадии:

(а) измельчение головного мозга животного, предпочтительно гипоталамической части и/или коры его головного мозга;

(б) добавление смеси растворителей, состоящей из ацетона/метилхлорида или другого полярного органического растворителя (ПОР)/метанола, к измельченному продукту со стадии (а) в соотношении (кг/л) (измельченный продукт) 1: (смесь) 1,5-3 масс./об., предпочтительно 1:2,2 масс./об., где растворители указанной выше смеси находятся в соотношении (ацетон)1: (метилхлорид или другой ПОР)1-2: (метанол) 0,5-1 (об./об.);

(в) выдерживание при перемешивании в течение по меньшей мере 60 минут при температуре 30-35°C; отстаивание экстракта в течение по меньшей мере 180 минут при температуре 30-35°C;

(г) отделение осажденного экстракта субнатанта со стадии (в) путем фильтрования через фильтр со степенью фильтрации 1 мкм, предпочтительно из полипропилена, удаление надосадочной жидкости;

промежуточной очистки, которая включает следующие стадии:

(д') охлаждение до 0°C и растворение влажного неочищенного экстракта, полученного на стадии (г), посредством добавления NaCl и KCl, предпочтительно в количестве равном 1-2 г (для каждого вида соли)/кг исходного измельченного продукта, полученного на стадии (а), и в соотношении 1:1 масс./масс., при перемешивании в течение по меньшей мере 30 минут;

(д'') отстаивание экстракта и отделение субнатанта посредством фильтрации его через фильтр со степенью фильтрации 1 мкм, предпочтительно из полипропилена, удаление надосадочной жидкости;

(е) добавление очищенной воды к субнатанту со стадии (д'') по меньшей мере 10% от ее объема, выдерживание при перемешивании в течение по меньшей мере 30 минут, отстаивание в течение по меньшей мере 60 минут, отделение субнатанта и удаление надосадочной жидкости;

(ж') понижение температуры до 0°C: добавление ацетона к экстракту со стадии (е), предпочтительно 1 л/л экстракта, и дигидрата CaCl₂, предпочтительно 1-2 г/л экстракта,

перемешивание и отстаивание в течение по меньшей мере 30 минут, удаление надосадочной жидкости;

(ж") добавление ацетона к субнатанту со стадии (ж'), предпочтительно 0,1-0,2 л/л субнатанта, перемешивание и отстаивание; причем эту стадию промывки повторяют и проводят при температуре 10°C;

(з) фильтрование продукта, полученного на стадии (ж") посредством фильтр-пресса, предпочтительно с полипропиленовым фильтром/тканью (удаление надосадочной жидкости) с получением первого частично очищенного твердого экстракта фосфолипидов; конечной очистки, которая включает следующие стадии:

(и) растворение твердого экстракта фосфолипидов, полученного в конце стадии (з), в метиленхлориде или другом ПОР, предпочтительно в соотношении 100-150 г экстракта/л растворителя, перемешивание в течение по меньшей мере 60 минут при температуре 21-25°C;

(к) добавление к экстракту, полученному на стадии (и), раствора, содержащего ЭДТА 110-130 г/л, NaOH 7-9 г/л, KCl 27-30 г/л, NaCl 22-25 г/л, приготовленного в очищенной воде, с конечным рН в диапазоне 8,5-9, в процентном отношении в диапазоне 21-24% по отношению к объему экстракта, полученного в конце стадии (и), и затем этанола в процентном отношении 16-20%, вновь по отношению к объему экстракта, полученного в конце стадии (и), перемешивание в течение по меньшей мере 60 минут и отстаивание в течение по меньшей мере 12 часов;

(л) отделение субнатанта и удаление надосадочной жидкости; добавление очищенной воды в количестве 10% и этанола в количестве 1% от объема субнатанта, перемешивание в течение по меньшей мере 60 минут и отстаивание в течение по меньшей мере 12 часов;

(м) отделение субнатанта от надосадочной жидкости (удаленной) посредством фильтрации через фильтр со степенью фильтрации 3 мкм или, альтернативно, 0,8 мкм, предпочтительно из полипропилена, затем 0,2 мкм, предпочтительно из политетрафторэтилена, перемешивание и отстаивание, отделение субнатанта, удаление надосадочной жидкости;

(н) добавление ацетона к осадку, полученному в конце стадии (м), предпочтительно 0,5 л/л субнатанта, перемешивание в течение по меньшей мере 30 минут при температуре 10°C, осаждение осадка фосфолипидов и удаление надосадочной жидкости путем сифонирования; причем эту операцию можно повторять несколько раз;

(о) фильтрование продукта, полученного в конце стадии (н) с использованием фильтр-пресса, предпочтительно с полипропиленовым фильтром/тканью (удаление надосадочной жидкости), с получением очищенного твердого экстракта фосфолипидов;

(п) обработка конечного экстракта, полученного на стадии (о), жидким азотом, гранулирование и сушка при температуре 40°C в вакууме не более 0,5 мбар.

3. Способ извлечения и очистки ФС-обогащенных фосфолипидов по любому из пп. 1-2, который не включает использование хлороформа и стадию очистки посредством хроматографии с силикагелем.

4. Способ извлечения и очистки ФС-обогащенных фосфолипидов по любому из пп. 1-3, где головной мозг животного, обрабатываемый на стадии (а), представляет собой головной мозг свиньи.

5. ФС-обогащенные фосфолипиды, полученные способом извлечения и очистки по любому из пп. 1-3.

6. Фармацевтические композиции, содержащие ФС-обогащенные фосфолипиды по п. 5 или состоящие из них.

7. Фармацевтические композиции, содержащие ФС-обогащенные фосфолипиды или состоящие из них, по п. 6, где указанные фосфолипиды находятся в ассоциации с лекарственными средствами и/или фармакологически или биологически активными агентами, такими как, например, стероиды, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, натуральные животные и/или растительные экстракты и/или витамины, предпочтительно витамины группы В.

8. Фармацевтические композиции, содержащие ФС-обогащенные фосфолипиды или состоящие из них, по п. 6, для применения в предупреждении/лечении проблем нейроэндокринной природы, таких как, например, деменция и/или когнитивные нарушения у пожилых людей, и депрессивные расстройства в целом.

9. Фармацевтические композиции, содержащие фосфолипиды или состоящие из них, для применения в лечении патологии, определяемой как «постковидный синдром».

10. Фармацевтические композиции, содержащие ФС-обогащенные фосфолипиды или состоящие из них, по п. 6, для применения в лечении патологии, определяемой как «постковидный синдром».