



(51) МПК  
*A61K 9/127* (2006.01)  
*A61K 38/43* (2006.01)  
*A61K 47/24* (2006.01)  
*B82B 3/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A61K 9/127 (2022.08); A61K 38/43 (2022.08); A61K 47/24 (2022.08); B82B 3/00 (2022.08)*

(21)(22) Заявка: 2022113022, 16.05.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 16.05.2022

Дата регистрации:  
 23.11.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.05.2022

(45) Опубликовано: 23.11.2022 Бюл. № 33

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.  
 Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Токтаревой  
 Т.М.

(72) Автор(ы):

Круть Ульяна Александровна (RU),  
 Олейникова Ирина Ивановна (RU),  
 Кузубова Елена Валерьевна (RU),  
 Радченко Александра Игоревна (RU),  
 Шайдорова Галина Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное  
 образовательное учреждение высшего  
 образования "Белгородский государственный  
 национальный исследовательский  
 университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: КУЗУБОВА Е. В. и др.  
 Наноразмерные липосомы как контейнеры  
 лекарственных веществ // XI Международный  
 молодежный форум "Образование. Наука.  
 Производство". - 2019. - С. 1059-1062.. ZHU S.  
 Y. et al. Recent Strategies for the Immobilization  
 of Therapeutic Enzymes // Polymers. - 2022. - Vol.  
 14. - No. 7. - Art. 1409.. RU 2325151 C2, 27.05.2008.  
 RU (см. прод.)

(54) Способ получения липосомальных наноконтейнеров с иммобилизованным ферментом

(57) Реферат:

Изобретение относится к области химии и фармацевтики, а именно к способу получения липосомальных наноконтейнеров с иммобилизованным ферментом, включающему приготовление 0,3% раствора лецитина в этиловом спирте, который перед помещением в роторный испаритель выдерживают 15 мин в ультразвуковой бане с нагревом до 55°C и при 60 Гц и затем отфильтровывают, испарение фильтрата в роторном испарителе, которое осуществляют с использованием диафрагменного насоса со скоростью вращения 2500 оборотов при температуре водяной бани 60°C до образования на колбе пленки липидов желто-

коричневого цвета, внесение натрий-фосфатного буфера с pH 7,4 в объеме, равном объему раствора лецитина в этиловом спирте, причем ферментный препарат вносят в виде раствора в натрий-фосфатном буфере с pH 7,4 и продолжают перемешивать в течение 2 мин без использования вакуума и нагрева; после чего помещают в ультразвуковую баню без нагрева на 5 мин при 60 Гц. Технический результат заключается в получении мультиламеллярных липосомальных наноконтейнеров с иммобилизованным ферментом, обеспечивающих адресную доставку ферментного препарата путем высвобождения фермента в 12-перстной кишке. 4 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

2621145 C2, 31.05.2017. RU 2437649 C2, 27.12.2011. RU 2481101 C2, 10.05.2013.

R U 2 7 8 4 3 2 1 C 1

R U 2 7 8 4 3 2 1 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 9/127* (2006.01)  
*A61K 38/43* (2006.01)  
*A61K 47/24* (2006.01)  
*B82B 3/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 9/127 (2022.08); A61K 38/43 (2022.08); A61K 47/24 (2022.08); B82B 3/00 (2022.08)*(21)(22) Application: **2022113022, 16.05.2022**(24) Effective date for property rights:  
**16.05.2022**Registration date:  
**23.11.2022**

Priority:

(22) Date of filing: **16.05.2022**(45) Date of publication: **23.11.2022 Bull. № 33**

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.  
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Toktarevoj T.M.**

(72) Inventor(s):

**Krut Ulyana Aleksandrovna (RU),  
Olejnikova Irina Ivanovna (RU),  
Kuzubova Elena Valerevna (RU),  
Radchenko Aleksandra Igorevna (RU),  
Shajdorova Galina Mikhaĭlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj  
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU  
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD FOR OBTAINING LIPOSOMAL NANOCONTAINERS WITH IMMOBILIZED ENZYME**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry and pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to the field of chemistry and pharmaceuticals, and in particular to a method for obtaining liposomal nanocontainers with an immobilized enzyme, including the preparation of a 0.3% solution of lecithin in ethanol, which, before being placed in a rotary evaporator, is kept for 15 minutes in an ultrasonic bath heated to 55°C and at 60 Hz and then filtered, evaporation of the filtrate in a rotary evaporator, which is carried out using a diaphragm pump with a rotation speed of 2500 revolutions at a water bath temperature of 60°C until a yellow-brown lipid film forms on the flask, adding

sodium phosphate buffer with pH 7,4 in a volume equal to the volume of a solution of lecithin in ethanol, and the enzyme preparation is introduced as a solution in sodium phosphate buffer with pH 7,4 and continued to stir for 2 minutes without using vacuum and heating; then placed in an ultrasonic bath without heating for 5 minutes at 60 Hz.

EFFECT: obtaining multilamellar liposomal nanocontainers with an immobilized enzyme, providing targeted delivery of the enzyme preparation by releasing the enzyme in the duodenum.

1 cl, 4 tbl, 1 ex

**C 1**  
**1**  
**2**  
**3**  
**4**  
**7**  
**8**  
**1**  
**2**  
**3**  
**4**  
**7**  
**8**  
**1**  
**C 1**  
**R U**

**R U**  
**2**  
**7**  
**8**  
**4**  
**3**  
**2**  
**1**  
**C 1**

Изобретение относится к области биотехнологии и позволяет получить липосомальные наноконтейнеры с иммобилизованным ферментом в виде мультиламеллярных липосом со средним размером 60-70 нм, которые за счет замедленного высвобождения лекарственного средства могут быть использованы для

5 лечения желудочно-кишечного тракта как человека, так и животных благодаря тому, что образованы из фосфолипидов природного происхождения и фермента, улучшающего пищеварение.

Липосомы – это полые частицы, содержимое которых ограничено фосфолипидной оболочкой. Они играют огромную роль для эффективной доставки лекарственных

10 средств в клетки-мишени организма. Еще в 60-х годах XX века было установлено, что фосфолипидные мембраны обладают свойством полупроницаемого барьера (Choudhury A., Ahmed F.R.S., Hossen M.N. et al. Liposome: a carrier for effective drug delivery. Journal of Applied Pharmaceutical Research 2020;8(1):22-8. DOI: 10.3923/pjbs.2006.1181.1191).

На сегодняшний день установлено, что около миллиарда людей страдает белково-энергетической недостаточностью. Белковая недостаточность представляет собой

15 болезненное состояние организма, связанное с недостаточным поступлением и усвоением белка либо с его усиленным распадом (Скутова, В.А. Острый панкреатит: Актуальные вопросы диагностики и комплексного лечения / В.А. Скутова, А.И. Данилов, Ж.А. Феоктистова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2016. – № 2. – С. 78–84. ). По данным ВОЗ на сегодняшний день у здорового человека коэффициент усвоения белка максимально может быть равен 0,9. А это значит, что в идеальных условиях из 20 грамм белка усваивается 18 грамм. Остальные белки переходят в толстый кишечник, начинаются процессы гниения, вызывая интоксикацию. Зачастую, такие ферментные препараты как МЕЗИМ® ФОРТЕ, ПАНГРОЛ® не достаточно

25 эффективны при обострениях, т.к. большая часть действующих ферментов либо инактивируется в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), либо разрушается под действием агрессивной среды желудка (Функ, С.В. Мезим форте в лечении болевой формы хронического панкреатита с умеренными проявлениями внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы / С. В. Функ// Медицина и экология. – 2012. – № 2. – С. 70–72. Можейко, Л.А. Секреция и рекреция панкреатических ферментов. Секреция панкреатических ферментов / Л.А. Можейко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. – № 4. – С. 381–385).

30

Липосомы находят широкое применение в качестве наноконтейнеров для лекарственных препаратов, что обусловлено главным образом близостью свойств

35 липидных носителей и природных биомембран (Lamichhane N., Udayakuma T.S., D'Souza W.D. et al. Liposomes: Clinical Applications and Potential for Image-Guided Drug Delivery. Molecules 2018;23(2):288. DOI: 10.3390/ molecules23020288. PMID: 29385755).

Известен способ получения мультиламеллярной липосомной композиции для замедленного высвобождения лекарственного средства. В данном методе нанокапсулы

40 получают с ионным градиентом между внутренней и внешней оболочкой за счет смешивания раствора водной фазы и липидсодержащего раствора в различных соотношениях, где введение лекарственного средства во внутреннюю часть липосомной композиции движущей силой, осуществляют за счет силы, возникающей в результате ионного градиента (патент RU 2577683 C2 от 2010-12-27). Недостатком данного способа

45 является использование водной фазы, а не органического растворителя.

Известен метод получения двухслойных липосом с иммобилизованными  $\beta$ -каротиноидами. Способ получения липосомальных препаратов на основе смешивания в емкости биологически активного вещества, фосфолипидов и растворителя, отличается

тем, что в смесь дополнительно вводят порошкообразный наполнитель и после достижения однородности массы растворитель при перемешивании отгоняют в условиях пониженного давления. Причем фосфолипиды и растворитель вводят в емкость в виде раствора (RU 2130771 C1 от 1999-05-27).

5 Известен способ получения липосомальных лекарственных препаратов путем приготовления раствора лекарственного средства (ЛС) в смеси воды, этилового спирта, поверхностно-активного вещества (ПАВ), липидов и введении в него многоступенчато при интенсивном перемешивании буферного раствора. В ходе процесса образуется дисперсия липосом, содержащих ЛС, в водно-спиртовом растворе липосом, содержащих ЛС (Евр. пат. N 0158441, кл. А 61 К 9/50, 1985). В данном способе получения  
10 липосомальных препаратов 500 мг яичного лецитина растворяли в 400 мг этилового спирта и 100 мг водного раствора (500 мг/мл) БАВ - глюкозы и 100 мг ПАВ - спана-80 и перемешивали. К полученной композиции добавляли дробно 4 мл 50 mM фосфатного буфера с pH 7.4 при интенсивном встряхивании в ходе процесса добавления, а также  
15 через 1, 15 и 30 минут после добавления буферного раствора. Затем через время добавляли еще 6 мл буферного раствора и встряхивали. Данный способ является сложным и достаточно долгим в исполнении. Также встряхивание эмульсии является менее эффективным способом получения липосом в отличие от диспергирования ультразвуковым дезинтегратором.

20 Maurer et al. в US 7094423 от 2006-08-22 описывают способ получения липосом с иммобилизованными нуклеиновыми кислотами. В данном способе предварительно получают полые везикулы в водном растворе, далее добавляют этиловый спирт с концентрацией 25-40% с добавлением нуклеиновых кислот. Затем смесь диализовали для удаления этанола.

25 В данном методе используют этиловый спирт с низкой концентрацией, помимо это получение изначально полых везикул в водном растворе приводит к низкому выходу липосомальных наноконтейнеров в эмульсии.

В патенте US20040142025 A1 от 2004-07-22 описывается липосомальный аппарат и способы получения липидной везикулы, инкапсулирующей нуклеиновую кислоту внутри.  
30 Способ включает обеспечение водного раствора в первом резервуаре и обеспечение органического липидного раствора во втором резервуаре. При этом для получения липидного раствора используется этанол.

Минусом данного метода является низкий процент инкапсуляции РНК в липосомы за счет использования водного раствора.

35 Наиболее близким является способ получения липосом, описанный в патенте RU 2621145 от 2015-11-03. Согласно данному способу получают однослойные липосомы из соевого лецитина. Способ получения липосом характеризуется тем, что 1%-ный раствор лецитина в этиловом спирте испаряют в роторном испарителе IKA RV10 control при температуре водяной бани 60°C, в результате на стенке испарительной колбы  
40 получают пленку липидов, далее добавляют сантимольярный натрий-фосфатный буфер pH 7,4 в объеме, равном объему раствора лецитина в этиловом спирте, перемешивают в течение 1 минуты, далее полученный раствор подвергают воздействию ультразвуком в течение 15 минут, за счет чего на выходе получают монодисперсную гомогенную систему с размером частиц 59,9-106,2 нм. Недостатком данного метода является  
45 небольшая частота дезинтеграции эмульсии. Помимо этого, не учтен факт растворимости лецитина в спирте, так как данный субстрат малорастворим в данном растворителе. Вышеописанные минусы приводят к неполному растворению лецитина и меньшему проценту образовавшихся липосом. А также согласно данному способу не

предусмотрена возможность использования липосом в качестве наноконтейнеров для адресной доставки ферментного препарата.

Следовательно, существует потребность в создании способа инкапсулирования ферментных препаратов в липосомы без использования водных растворов, многостадийных и долгосрочных методов.

Задачей данного изобретения является разработка усовершенствованного, простого в техническом плане способа получения липосомальных наноконтейнеров с иммобилизованным ферментом.

Техническим результатом является решение поставленной задачи, обеспечивающей получение мультиламеллярных липосомальных наноконтейнеров с иммобилизованным ферментом, размеры частиц которых составляют 60-70 нм.

Технический результат достигается предложенным способом, включающим приготовление раствора лецитина в этиловом спирте, испарение указанного раствора в роторном испарителе при температуре водяной бани 60° до образования на колбе пленки липидов желто-коричневого цвета, внесение натрий - фосфатного буфера с рН=7,4 в объеме, равном объему раствора лецитина в этиловом спирте, перемешивание и обработку ультразвуком, в который внесены следующие изменения:

- используют 0,3% раствор лецитина в этиловом спирте, для приготовления которого его выдерживают 15 минут в ультразвуковой бане, с нагревом до 55° и при 60 Гц, что позволяет улучшить растворение лецитина; - ферментный препарат вносят в виде раствора в заранее подготовленном натрий - фосфатном буфере с рН=7,4 после отфильтровывания 0,3% раствора лецитина в этиловом спирте и испарения фильтрата в роторном испарителе с использованием диафрагменного насоса со скоростью вращения 2500 оборотов;

- продолжают перемешивать в течение 2 минут без использования вакуума и нагрева; - после чего колбу помещают в ультразвуковую баню на 5 минут при 60 Гц.

Новизна и изобретательский уровень предложенного способа заключается в:

- инкапсулировании ферментного препарата в мультиламеллярный липосомальный наноконтейнер, позволяющий обеспечить достижение максимального терапевтического эффекта за счет адресной доставки ферментного препарата путем высвобождения фермента в 12-перстной кишке благодаря многослойности наноконтейнера и устойчивости оболочки в среде желудка;

- использование 0,3% раствора лецитина в спирте при приготовлении которого используется ультразвуковая баня, что обеспечивает полное растворение лецитина.

Конкретный пример использования заявленного изобретения.

Мультиламеллярные липосомы с инкапсулированным ферментом получают методом дегидратации. В способе используют соевый лецитин, в состав которого входит 34% фосфатидилхолинов, 26% фосфатидилэтаноламинов, 19% фосфатидилинозитолов, 4% фосфатидных кислот, 9% фосфатидилглицеринов, 8% полифосфатидных кислот. Помимо этого лецитин из сои является более распространенным и дешевым. В качестве фермента используют ферментный препарат панкреатин - экстракт содержащего поджелудочной железы, в состав которого входят панкреатические ферменты амилаза, липаза и протеаза, которые участвуют в переваривании углеводов, жиров и белков.

Для получения мультиламеллярных липосомальных наноконтейнеров к навеске 0,3 грамм лецитина приливают 100 миллилитров этилового спирта. Далее помещают раствор на 15 минут в ультразвуковую баню с нагревом до 55° и при 60 Гц для растворения лецитина. Затем полученную смесь отфильтровывают через бумажный фильтр «синяя лента». Полученный фильтрат переносят в колбу роторного испарителя

с подключенным диафрагменным насосом модели GM-2,00 Daihan scientific со скоростью вращения 2500 оборотов и испаряют 0,3% раствор летицина в спирте при температуре водяной бани 60°. После образования на колбе пленки липидов желто-коричневого цвета вносят заранее подготовленный фосфатный буфер с pH=7,4 в объеме 100 мл и продолжают перемешивание при скорости вращения 2500 оборотов без нагрева и с отключенным диафрагменным насосом. Натрий - фосфатный буфер с pH=7,4 готовят из 8,1 мл 0,2М раствора гидрофосфата натрия и 1,9 мл 0,2 М раствора дигидрофосфата натрия с последующим доведением до объема 100 мл, затем вводят в буфер 10 мг ферментного препарата панкреатина. Спустя 2 минуты после начала перемешивания колбу помещают в ультразвуковую баню без нагрева на 5 минут при 60 Гц. В результате получают эмульсию, содержащую мультиламеллярные липосомальные наноконтейнеры с иммобилизованным ферментом размером от 24,5 нм до 90 нм, средний размер липосом составляет 60-70 нм.

Исследование иммобилизации панкреатина в липосомальные наноконтейнеры.

#### 1. Определение протеолитической активности панкреатина

Для определения протеолитической активности панкреатина подготовили опытную пробирку с 2 мл полученной эмульсии и контрольную пробирку с 2 мл натрий - фосфатного буферного раствора, содержащего 10 мг панкреатина. В контрольную пробирку прилили 4 мл 14% раствора трихлоруксусной кислоты. Затем в каждую пробирку прилили по 2 мл 1% раствора казеина, перемешали и выдержали в водяной бане при 30° в течение 30 минут. Далее в опытную пробирку прилили 4 мл 14% трихлоруксусной кислоты. После чего содержимое обеих пробирок профильтровали через фильтр «синяя лента» и к каждому фильтрату добавили по 1 мл 2Н реактива Фолина-Чокалтеу. Пробирки инкубировали 30 минут при комнатной температуре для проведения реакции. Визуальным результатом реакции на белки являлось изменение цвета растворов с желтого на салатный. После стабилизации окраски определяли оптическую плотность содержимого пробирок при 760 нм на УФ/Вид спектрофотометре для исследования нано- и микрообъемов жидкостей NABI NICRODIGITAL. Провели по 4 измерения, которые свели к среднему арифметическому (Таблица 1).

Таблица 1

Оптическая плотность

Оптическая плотность контрольного образца		Оптическая плотность опытного образца	
Измерение	Среднее арифметическое	Измерение	Среднее арифметическое
0,082	0,081	0,071	0,071
0,081		0,070	
0,080		0,071	
0,081		0,072	

Затем провели расчет протеолитической активности панкреатина по следующей формуле, взятой из источника Методические указания к лабораторному практикуму по дисциплине "Биохимия". Ферменты-гидролазы: Часть II. «Витамины и ферменты» (О.Н. Макасева. - Могилев: Могилевский технологический институт, 2000. - 73 с.):

$$E_p = \frac{(D_o - D_k) \cdot 2 \cdot 100}{m \cdot V}$$

где  $E_p$  – протеолитическая активность (в условных единицах);

$D_o$  – оптическая плотность опытного раствора после стабилизации окраски;

$D_k$  – оптическая плотность контрольного раствора после стабилизации окраски;

2 – коэффициент для пересчета на 1 г;

100 – общий объем вытяжки, мл;

$m$  – навеска летицина, г, рассчитанная как 0,3/30, исходя из образованного количества липосом;

$V$  – объем вытяжки ферментного препарата панкреатина, взятого для анализа, мл.

$$E_p = \frac{(0,071 - 0,081) \cdot 2 \cdot 100}{0,01 \cdot 2} = -100$$

На основе полученного результата можно сделать вывод о том, что панкреатин имеет протеолитическую активность в 100 условных единиц. При образовании липосом, фермент иммобилизуется, а следовательно значение активности должно быть отрицательным. Следовательно, можно утверждать, что включение ферментного препарата в липосомальные наноконтейнеры произошло на 100%.

2. Измерение размеров липосомальных наноконтейнеров.

Для измерения размеров липосом использовали метод общего динамического светорассеяния Dynamic light scattering, DLS, который заключается в анализе движения частиц, вызванного тепловым шумом или электрофоретической силой. Определено, что полученная эмульсия состоит из многослойных липосомальных наноконтейнеров размером от 24,5 нм до 90 нм, а средний размер липосом составляет 60-70 нм.

3. Исследования поведения предложенной пищевой добавки в ЖКТ человека.

3.1. Исследование стабильности проводили на модельных средах стандарт-титров с заданными значениями водородного показателя: 1,65; 7,0; 7,7. Показатели брали из расчета рН-среды пищеварительной системы человека. Ротовая полость – 6,8-7,2; желудок – 1,5-1,8; 12-перстная кишка – 7,5-8,0. Оценку термолабильности проводили согласно физиологическим показателям температуры тела человека в диапазоне 36-39°. Временной диапазон исследований составил от 0 до 72 часов, максимального времени переваривания пищи у человека.

Подготовка образцов: по 1 мл эмульсии, содержащей липосомальные наноконтейнеры с иммобилизованным ферментом, помещали в лабораторные пробирки, приливали по 10 мл раствора стандарт-титра рН-среды равного 1,65; 7,0; 7,7. Каждую пробирку закрыли и термостатировали при температуре 36, 37, 38 и 39°. Общее время анализа составило 72 часа. Через каждые 24 часа оценивали протеолитическую активность ферментов в эмульсии с указанием условных единиц активности панкреатина (Таблица 2).

Таблица 2

Оценка влияния температуры и рН-среды на образец полученной эмульсии по показаниям протеолитической активности.\*



Температура, °С	рН=1,65				рН=7,0				рН=7,7			
	Время, час				Время, час				Время, час			
	0	24	48	72	0	24	48	72	0	24	48	72
36	-100	-100	-96	-72	-100	-100	-100	-100	-100	94	94	94
37	-100	-100	-95	-67	-100	-100	-100	-100	-100	95	95	95
38	-100	-100	-92	-61	-100	-100	-100	-100	-100	97	97	97
39	-100	-100	-87	-52	-100	-100	-100	-100	-100	100	100	100

\*Условные обозначения: -100 – протеолитическая активность фермента в условных единицах

На основании проведенного исследования можно сделать вывод о том, что в ротовой полости разрушения мультиламеллярных липосом не происходит, в желудке разрушение наступает только на 2 сутки, что в условиях реальных жизни невозможно, а в 12-перстной кишке полностью активируется уже в течение 24 часов.

3.2. Для изучения начального времени высвобождения панкреатина определяли протеолитическую активность без измерения оптической плотности, а только по переходу окраски из желтого в салатовый. Анализ образцов проводили визуально в трех повторностях через 4 часа при рН в диапазоне от 7,4 до 8,0 и температуре 36,7 (Таблица 3).

Таблица 3

Определение начального времени высвобождения панкреатина\*

рН среды	Время, часы		
	0	4	8
7,4	-	+	+
7,6	-	+	+
7,8	-	+	+
8,0	-	+	+

\*Условные обозначения: «-» нет изменения цвета; «+» есть изменение цвета.

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что начальное высвобождение фермента происходит в слабощелочной среде уже через 4 часа.

3.3. Для изучения полного времени высвобождения фермента используется методика определения протеолитической активности панкреатина по методике, описанной в примере 1. Для контроля смотрели оптическую плотность раствора в течении 72 часов через каждые 24 часа в диапазоне рН от 7,4 до 8,0. (Таблица 4).

Таблица 4. Определение полного времени высвобождения панкреатина\*

рН среды	Время, часы			
	0	24	48	72
7,4	-100	95	95	95
7,6	-100	97	97	97
7,8	-100	94	94	94
8,0	-100	99	99	99

\*Условные обозначения: -100 – протеолитическая активность фермента в условных единицах

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что полное высвобождение фермента в 12-перстной кишке происходит сразу, так как липосомальные наноконтейнеры с иммобилизованным ферментом в кислой среде желудка из мультиламеллярных превращались в мономерные и затем быстро разрушались под действием слабощелочной среды в 12-перстной кишке.

Таким образом, поставленная задача решена и технический результат по созданию

простого способа получения липосомальных наноконтейнеров с иммобилизированным ферментом с средним размером частиц 60-70 нм, обеспечивающих достижение максимального терапевтического эффекта за счет адресной доставки ферментного препарата путем высвобождения фермента в 12-перстной кишке благодаря  
5 многослойности наноконтейнера и устойчивости оболочки в среде желудка, достигнут.

(57) Формула изобретения

Способ получения липосомальных наноконтейнеров с иммобилизированным ферментом, включающий приготовление раствора лецитина в этиловом спирте,  
10 испарение указанного раствора в роторном испарителе при температуре водяной бани 60°C до образования на колбе пленки липидов желто-коричневого цвета, внесение натрий-фосфатного буфера с рН 7,4 в объеме, равном объему раствора лецитина в этиловом спирте, перемешивание и обработку ультразвуком, отличающийся тем, что используют 0,3% раствор лецитина в этиловом спирте, который перед помещением в  
15 роторный испаритель выдерживают 15 мин в ультразвуковой бане, с нагревом до 55°C и при 60 Гц и затем отфильтровывают, испарение фильтрата в роторном испарителе осуществляют с использованием диафрагменного насоса со скоростью вращения 2500 оборотов; ферментный препарат вносят в виде раствора в натрий-фосфатном буфере с рН 7,4 и продолжают перемешивать в течение 2 мин без использования вакуума и  
20 нагрева; после чего помещают в ультразвуковую баню без нагрева на 5 мин при 60 Гц.

25

30

35

40

45