

Изобретение относится к биохимической технологии получения на основе эмбриональных тканей биологически активных препаратов с фиксированными фармакологическими свойствами, несмотря на неопределенность их химического состава. Технологические процессы на основе изобретения могут быть использованы в фармацевтической промышленности для изготовления неспецифических био- (преимущественно цито- и, наиболее предпочтительно, иммуно-) корректоров и, в особенности, биостимуляторов широкого спектра действия.

Потребность в препаратах такого типа является массовой и систематически возрастает в связи с продолжающимся загрязнением природной среды ксенобиотиками (в том числе – радионуклидами), появлением новых (типа ВИЧ) инфекций и существенным ослаблением физических нагрузок на большинство урбанизированного населения.

Поэтому технологические процессы изготовления указанных препаратов должны удовлетворять комплексу труднореализуемых требований. К важнейшим из них относятся:

пригодность для коррекции физиологического статуса человека в широком спектре возможных патологий и причин их возникновения;

минимум противопоказаний к применению;

доступность для медицинских учреждений и населения, зависящая преимущественно, во-первых, от производительности технологических процессов и затрат ресурсов на их осуществление и, во-вторых, от стабильности целевого продукта и, соответственно, его пригодности для длительного хранения с сохранением стерильности и фармакологических свойств.

Два первых требования могут быть в принципе выполнены при использовании эмбриональных тканей, взятых, в основном, из эмбрионов животных, в качестве общеизвестного и общепризнанного ныне источника биологически активных веществ широкого спектра действия.

Например, из заявки Франции 2413912 на группу изобретений "Лекарственные средства на основе зародыша и способ их получения" известен способ получения биологически активных средств на основе эмбриональной ткани, который предусматривает измельчение и гомогенизацию мягких тканей эмбрионов животных в смеси с физиологическим раствором.

Биологически активные средства, полученные описанным простейшим способом, были применены на сельскохозяйственных животных, что позволило повысить их продуктивность на 7-15% в сравнении с контролем.

Однако обремененность иммунодепрессантами и высокомолекулярными антигенами, допустимая при использовании этих средств в животноводстве, не позволила получить заметный иммуностимулирующий эффект у людей. Кроме того, биохимический состав описанного препарата существенно колеблется от партии к партии и потому он непригоден для длительного хранения.

Более совершенен способ получения биологически активных средств согласно Европейской заявке 0249563 на изобретение "Экстракты зародышевых тканей органов животных, пригодные для инъекции человеку". Этот способ, наряду с измельчением и гомогенизацией мягких тканей эмбрионов животных, предусматривает удаление нежелательных примесей при экстракции водорастворимых активных веществ.

Однако при этом в экстракт не переходят многие биологически активные вещества, что снижает стимулирующий эффект при использовании целевого продукта. Кроме того, экстракт подобно вышеуказанному препарату, имеет биохимический состав, который существенно колеблется от партии к партии, что также отражается на стабильности его фармакологических свойств при длительном хранении.

Поэтому нередко прибегают к искусственным приемам воздействия на эмбриональную ткань в надежде повысить эффективность и стабильность целевых продуктов в качестве средств лечения и профилактики иммунной системы человека.

Из числа аналогов такого типа к предлагаемому изобретению наиболее близок способ изготовления биологически активных препаратов на основе эмбриональных тканей, известный из описания изобретения к патенту Украины 2164. Этот способ предусматривает:

измельчение мягких эмбриональных тканей;

их гомогенизацию в дисперсионной среде на основе воды до разрушения клеточных оболочек;

отделение (например, фильтрованием или центрифугированием) неразрушенных клеточных элементов;

гидролиз гомогената в присутствии консерванта при температуре 4-45°C в течение времени от двух суток до шести недель, причем тем дольше, чем ниже температура;

термообработку гидролизата при температуре 60-120°C до денатурации балластных веществ;

отделение денатурированных термолабильных веществ и выделение из гидролизата термостабильного целевого продукта со средней молекулярной массой менее 10 кДа путем фракционирования, выполняемого, например, ультрафильтрацией, или центрифугированием при ускорении свыше 1500 g течение 20-40 мин, или диализом через полупроницаемую пленку и/или гельфильтрацией;

стерилизацию, разлив и укупорку препарата.

Целевым продуктом при этом служит супернатант, содержащий в качестве действующего начала смесь относительно низкомолекулярных термостабильных веществ неопределенного состава со средней молекулярной массой в пределах 0,7-10/0 кДа.

Однако описанный способ обладает тем более низкой производительностью, чем ниже температура гидролиза; связан с существенными энергозатратами и - что особенно важно - не обеспечивает стабильность качества целевого продукта из-за принципиальной невозможности надежного управления гидролизом. Поэтому в гидролизате всегда присутствует весьма сложная смесь химически и биохимически нестабильных продуктов, преимущественно белковой природы. Лишь некоторые из них, но далеко не все, удастся удалить термообработкой гидролизата и осаждением денатурированных белков, которые негативно влияют на стойкость целевого продукта при хранении и которые (даже при молекулярной массе менее 10 кДа) способны оказывать непредвиденное побочное действие.

Соответственно, в основу изобретения положена задача путем усовершенствования приемов подготовки сырья и уточнения условий его переработки создать такой способ изготовления биологически активных препаратов из эмбриональных тканей, который обеспечивал бы существенное повышение стабильности фармакологических свойств целевого продукта при повышении производительности процесса и сокращении затрат на его осуществление.

Поставленная задача решена тем, что в способе изготовления биологически активных препаратов из эмбриональных тканей, включающем измельчение мягких эмбриональных тканей, их гомогенизацию в дисперсионной среде на основе воды до разрушения клеточных оболочек, отделение неразрушенных клеточных элементов, фракционирование супернатанта с выделением целевого продукта со средней молекулярной массой менее 10 кДа, стерилизацию, разлив и укупорку препарата, согласно изобретению, целевой продукт выделяют и одновременно с выделением стерилизуют фракционированием супернатанта по молекулярной массе непосредственно после отделения неразрушенных клеточных элементов.

Исключение гидролиза и изменение порядка выполнения оставшихся операций обуславливают не только существенное повышение производительности процесса и сокращение затрат, что благоприятно сказывается на доступности целевого продукта для широких слоев населения экологически опасных территорий, но и практически исключает появление в целевом продукте неконтролируемых примесей, возникших при гидролизе сырья, и тем самым стабилизирует его фармакологические свойства.

Первое дополнительное отличие состоит в том, что супернатант после отделения неразрушенных клеточных элементов одновременно фракционируют и стерилизуют ультрафильтрацией, которая представляет собой один из наиболее эффективных процессов выделения из сложных смесей веществ с заданным максимальным значением молекулярной массы и исключает бактериальное заражение целевого продукта при его разливе и укупорке в стерильных условиях.

Второе дополнительное отличие, которое может быть использовано согласно изобретению как независимо от первого, так и в сочетании с первым дополнительным отличием, состоит в том, что эмбрионы перед отделением и измельчением мягких тканей замораживают и размораживают. Уже было установлено, что охлаждение до примерно +4°C и выдерживание при этой температуре изолированных мягких тканей теплокровных животных способствует подавлению в них процессов синтеза, сохранению достаточной активности окислительно-восстановительных процессов и интенсификации катаболических процессов (см., например: Тканевая терапия (коллектив авторов) / Под ред. Н.А. Пучковской. - К.: Здоровье, 1975. - С. 5, абзац 6-й сверху; с. 6, абзац 5-й сверху; с. 12). Однако нам (по имеющимся у нас данным - впервые) удалось экспериментально установить, что замораживание эмбрионов, то есть их перевод в твердое состояние, и размораживание перед отделением мягких тканей для последующего измельчения способствует, как можно увидеть далее в примерах, заметному росту биологической активности целевого продукта.

Третье дополнительное (ко второму) отличие состоит в том, что эмбрионы замораживают до температуры не ниже -80°C, поскольку замораживание до более низких температур не влияет на повышение биологической активности целевого продукта, существенно удлиняет размораживание и снижает производительность процесса.

Четвертое дополнительное (к третьему) отличие состоит в том, что эмбрионы замораживают постепенно, то есть при плавном понижении температуры. Это также способствует повышению активности целевого продукта.

Пятое дополнительное отличие, которое может быть использовано, согласно изобретению, как независимо от любого из указанных выше дополнительных отличий, так и в сочетании с любым из них или с их произвольной совокупностью, состоит в том, что в качестве целевого продукта выделяют вещества со средней молекулярной массой менее 5,0 кДа. Как показали исследования, целевой продукт с указанной характеристикой обладает вполне достаточной (иммуно)стимулирующей активностью при практически полном отсутствии побочных реакций.

Далее сущность изобретения поясняется: описанием предложенного способа в общем виде; перечнем и нормативными значениями контролируемых показателей качества целевого продукта; описанием метода сравнительных испытаний биологической активности целевого продукта; конкретными примерами осуществления изобретательского замысла и результатами оценки целевых продуктов.

Предложенный способ в общем виде предусматривает:

отбор эмбрионов сельскохозяйственных животных (обычно у коров и, возможно, овец или свиней в первой половине беременности) в убойных цехах предприятий мясной промышленности;

предварительную обработку отобранных эмбрионов, в том числе: обязательную обработку, то есть отделение плаценты, обескровливание (обычно через неперевязанную пуповину), обмывку проточной водой для удаления следов околоплодной жидкости и крови и помещение обескровленных и обмытых эмбрионов в холодильную камеру с температурой не выше 12°C (обычно на срок не более суток) и возможную дополнительную обработку: замораживание (в частности, ступенчатое) до температуры ниже 0°C (но предпочтительно не ниже -80°C) эмбрионов после обескровливания и обмывки и их размораживание;

отделение головы, копыт, желчного пузыря (с осторожностью), желудка и кишечника;

отделение мягких тканей от костей;

измельчение мягких тканей (обычно на куттерах);

гомогенизацию измельченных мягких тканей в дисперсионной среде на основе воды (обычно в изотоническом растворе) до разрушения клеточных оболочек (с использованием аппаратов типа "коллоидная мельница");

отделение неразрушенных клеточных элементов и элементов волокнистых тканей (например, центрифугированием при 1-80 тыс. об/мин, или фильтрованием, как правило, на вакуумном нутч-филтре);

одновременное выделение целевого продукта со средней молекулярной массой менее 10 (предпочтительно менее 5) кДа и его стерилизацию фракционированием супернатанта с использованием

средств, служащих "бактериальными фильтрами" (предпочтительно с использованием волоконных ультрафильтрационных установок);

разлив и укупорку целевого продукта (обычно - в стеклянные ампулы) в стерильных условиях.

В случаях использования апиrogenной дистиллированной воды в качестве дисперсионной среды для приготовления гомогената, в целевой продукт перед разливом добавляют хлорид натрия до достижения изотонической точки.

В целевой продукт, закладываемый на длительное хранение, может быть добавлен подходящий консервант, например хинозол, в достаточном для достижения антисептического эффекта и фармакологически приемлемом количестве, в частности, около 0,8-1,0 г/л. Кроме того, такой продукт может быть дополнительно стерилизован любым из известных способов.

В целевом продукте, в соответствии с утвержденной в 1994 г. Фармакопейным комитетом Министерства здравоохранения Украины Временной фармакопейной статьей ВФС 42У "Эрбисол для инъекций (Erbisolum pro injectionibus)", контролируют методами, предусмотренными "Государственной фармакопеей" и обозначаемой далее ГФ:

прозрачность (препарат должен выдерживать сравнение с эталонным раствором 1; ГФ XI, вып. 1, с. 198);

цветность (окраска препарата не должна быть интенсивнее эталона 3а; ГФ XI, вып. 1, с. 194), причем препарат без консервантов практически бесцветен, а при использовании хинозола имеет желтокоричневый цвет;

pH от 6,5 до 7,5 (при потенциометрическом определении; ГФ XI, вып. 1, с. 113);

механические включения (препарат должен выдерживать требования, указанные во Временной инструкции по контролю инъекционных растворов на механические включения И 42-3-85);

стерильность (препарат должен быть стерилен при определении методом мембранной фильтрации; ГФ XI, вып. 2, с. 187);

токсичность (препарат должен быть нетоксичен *in vivo* при внутривенном введении лабораторным животным в дозе 0,5 мл/кг и наблюдении в течение 48 часов; ГФ XI, вып. 2, с. 182);

пирогенность (препарат должен быть апиrogenен *in vivo* при внутривенном введении лабораторным животным в дозе 0,5 мл/кг смеси, приготовленной в соотношении по объему 1/1 из испытуемого образца и 0,9 % изотонического раствора хлорида натрия для инъекций, при наблюдении в течение 48 часов; ГФ XI, вып. 2, с. 183);

содержание белков (при обработке 1 мл препарата 1 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивании раствор должен оставаться прозрачным, что свидетельствует об отсутствии белков);

содержание пептидов в 1 мл препарата - от 1,0 до 3,0 мг/мл (по биуретовой реакции);

сухой остаток - от 14 до 20 мг/мл (при высушивании до постоянной массы 10 мл препарата при температуре от 100 до 105°C);

биологическую активность, которая при определении описанным ниже методом, должна быть не ниже 3 единиц.

Биологическую активность полученного вещества определяют по поглощению красителя (нитросиний тетразолий) макрофагами под влиянием целевого продукта. Для этого из брюшной полости мышей или крыс вымывают физиологическим или буферным раствором клеточный пул, содержащий до 30% фагоцитирующих клеток. Полученную смесь вносят во флаконы из стекла с плоским дном и инкубируют в термостате при 37°C не менее 1 часа. После этого флаконы трижды промывают физиологическим или буферным раствором для удаления неприлипших клеток.

Далее вносят в одну часть флаконов порцию жидкости, состоящей соответственно из 0,5/0,5/1 частей физиологического раствора, целевого продукта и 0,1% раствора красителя, а в другую часть флаконов - порцию жидкости, состоящей соответственно из 1/1 частей физиологического раствора и 0,1% раствора красителя. Клетки с указанной экспериментальной и контрольной смесями инкубируют в течение 1 часа, затем снова трижды промывают для удаления остатков красителя. Во флаконы с отмытыми клетками добавляют диметилсульфоксид и 2М едкую щелочь в соотношении 1:1. Через 10-15 мин измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 630 нм.

Биологическую активность оценивают соотношением оптических плотностей в эксперименте и контроле.

Пример 1

Для получения целевого продукта были взяты эмбрионы свиней и крупного рогатого скота (далее - КРС).

После обязательной предварительной обработки: отделения плаценты, обескровливания, обмывки проточной водой для удаления следов околоплодной жидкости и крови и суточного выдерживания обескровленных и обмытых эмбрионов в холодильной камере при температуре около 4°C - отделили головы, копыта, желчные пузыри, части желудочно-кишечного тракта и мягкие ткани от костей.

Затем мягкие ткани измельчили на куттере с отверстиями в решетке диаметром 3 мм и фарш дважды пропустили через коллоидную мельницу для гомогенизации с использованием апиrogenной дистиллированной воды в качестве дисперсионной среды.

Гомогенат отцентрифугировали в течение 15 мин при 3 тыс. об/мин для отделения неразрушенных клеточных элементов и элементов волоконистых тканей, осадок передали на утилизацию, а в надосадочную жидкость добавили хлорид натрия до его конечной концентрации 0,9 % и смесь подвергли стерилизующей ультрафильтрации для выделения целевого продукта со средней молекулярной массой менее 10 кДа.

Далее описанным выше методом определили биологическую активность, которая для продукта, полученного из свиных эмбрионов, оказалась в 5,0 раз, а из эмбрионов КРС - в 4,0 раза выше контроля.

После контроля прозрачности, цветности, pH, механических включений, стерильности, токсичности, пирогенности и содержания белков, пептидов и сухого остатка, которые соответствовали нормам вышеупомянутой Временной фармакопейной статьи ВФС 42У "Эрбисол для инъекций", целевой продукт в стерильных условиях разлили и укупорили в стеклянные ампулы.

Пример 2

Для получения целевого продукта были взяты свежие и замороженные эмбрионы КРС.

Целевой продукт из свежих эмбрионов (ЦПСЭ) был получен в основном так, как описано в примере 1, с теми отличиями, что перед отделением мягких тканей их не выдерживали в холодильнике и что при стерилизующей ультрафильтрации в качестве целевого продукта были выделены вещества со средней молекулярной массой до 5 кДа.

Для получения целевого продукта из замороженных эмбрионов (ЦПЗЭ) способ, описанный в примере 1, был дополнен такими операциями, как замораживание обескровленных и обмытых эмбрионов в скороморозильной камере до температуры около  $-40^{\circ}\text{C}$ , выдерживание при этой температуре в течение 48 часов и их самопроизвольное размораживание при комнатной температуре. Как и в примере 1, при стерилизующей ультрафильтрации в качестве целевого продукта были выделены вещества со средней молекулярной массой до 10 кДа.

Биологическая активность ЦПСЭ оказалась в 7,8, а ЦПЗЭ - в 10,8 раза выше контроля.

#### Пример 3

Для получения целевого продукта были взяты эмбрионы КРС, постепенно (при понижении температуры со скоростью  $-2^{\circ}\text{C}/\text{час}$ ) замороженные до  $-80^{\circ}\text{C}$  в морозильнике, снабженном регулятором температуры, а затем разморожены при комнатной температуре.

ЦПЗЭ был получен, как указано в примере 2, с использованием при гомогенизации пригодного для инъекций 0,9 % изотонического раствора хлорида натрия.

Биологическая активность ЦПЗЭ оказалась в 11,0 раз выше контроля.

#### Пример 4

Для получения целевого продукта были взяты эмбрионы КРС, постепенно (при понижении температуры со скоростью  $-2,5^{\circ}\text{C}/\text{час}$ ) замороженные до  $-90^{\circ}\text{C}$  в морозильнике, снабженном регулятором температуры, а затем разморожены при комнатной температуре.

ЦПЗЭ был получен, как указано в примере 2, с использованием при гомогенизации пригодного для инъекций 0,9% изотонического раствора хлорида натрия.

Биологическая активность ЦПЗЭ оказалась в 10,8 раза выше контроля.

#### Пример 5

Для получения целевого продукта были взяты эмбрионы КРС, из которых описанным выше способом-прототипом с использованием гидролиза гомогената в присутствии консерванта (хинозола) при температуре  $40^{\circ}\text{C}$  в течение трех суток, термообработки гидролизата при температуре  $120^{\circ}\text{C}$  до денатурации балластных веществ, отделения денатурированных термолабильных веществ и ультрафильтрации гидролизата с получением целевого продукта со средней молекулярной массой менее 10 кДа.

Его биологическая активность была всего в 2,3 раза выше контроля.

Промышленная применимость предложенного способа обоснована как стабильностью показателей качества (и особенно - биологической активности, которая во всех случаях более, чем в 4 раза выше контроля), так и сокращением расхода энергии в среднем на 15% и возможностью выполнения всего технологического цикла не более, чем за 60 часов (обычно - за сутки).