



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **66570** (13) **U**
(51) **МПК**
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ РАНОЗАГОЮЮЧОЇ ТА РЕГЕНЕРУЮЧОЇ ДІЇ НА ОСНОВІ ПЕПТИДНИХ БІОРЕГУЛЯТОРІВ

1

2

(21) u201107336

(22) 10.06.2011

(24) 10.01.2012

(46) 10.01.2012, Бюл.№ 1, 2012 р.

(72) ЖЕБРОВСЬКА ФІЛЯ ІВАНІВНА, КОСТЮК ГРИГОРІЙ ВІКТОРОВИЧ, БОРЩЕВСЬКИЙ ГЕННАДІЙ ІЛЛІЧ, БОРЩЕВСЬКА МАРИНА ІЛЛІНІЧНА, БІГУНЯК ВОЛОДИМИР ВАСИЛЬОВИЧ

(73) ЖЕБРОВСЬКА ФІЛЯ ІВАНІВНА, КОСТЮК ГРИГОРІЙ ВІКТОРОВИЧ, БОРЩЕВСЬКИЙ ГЕННАДІЙ ІЛЛІЧ, БОРЩЕВСЬКА МАРИНА ІЛЛІНІЧНА, БІГУНЯК ВОЛОДИМИР ВАСИЛЬОВИЧ

(57) 1. Спосіб одержання фармацевтичної композиції ранозагоюючої та регенеруючої дії на основі пептидних біореґуляторів, який **відрізняється** тим, що низькомолекулярні пептиди дермального шару шкіри свиней інкорпорує в ліпосоми, причому спочатку одержують низькомолекулярні пептиди шляхом заморожування дермального шару свинячої шкіри, подрібнення її, екстракції, ультрафільтрації та концентрації, потім одержують ліпосоми з розміром часточок 90-120 і 100-120 нм

шляхом розчинення лецитину в спирті, випарюванні на роторно-плівковому випаровувачі, змивання плівки водою при вмісті спирту не більше 8 %, доводять рН до 4,0-4,2, одержують ліпосоми з розміром часточок 90-120 нанометрів, в суспензію ліпосом вводять суміш низькомолекулярних пептидів, одержаних на стадії ультрафільтрації, проводять включення останніх в ліпосоми і передають на стадію стерилізуючої фільтрації методом постійного потоку на мембрані з діаметром пор 0,2 мкм, після чого розливають у флакони.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що дермальний шар замороженої шкіри свиней подрібнюють на кріоподрібнювачі при швидкості 3500 об./хв. протягом 20 сек.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ультрафільтрацію проводять на мембрані 5 кД при температурі 6-8 °С.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що концентрацію проводять на роторно-плівковому випаровувачі не менше як в 60 разів.

Корисна модель належить до галузі біотехнології, а саме до препаратів на основі низькомолекулярних пептидів, виділених із шкіри свиней, що інкорпоровані в ліпосоми і мають специфічну ранозагоюючу та регенеруючу активність і можуть бути використані в фармацевтичних композиціях для загоювання глибоких ран і опіків I-IV ступені тяжкості, тощо.

Загоєння рани є низкою комплексних динамічних процесів, перебіг яких ще не є до кінця вивченим. Процес загоєння рани регулюється і синхронізується унікальною групою цитокінів, так званих "факторів росту", що декретуються тромбоцитами, макрофагами, нейтрофілами, лімфоцитами, ендотеліальними клітинами і фібробластами. Фактори росту індукують проліферацію певних клітинних ліній, включаючи епітеліальні клітини.

Важливою проблемою сучасної медицини є розвиток тривало незагоєваних ран. Такі рани найчастіше виникають у хворих з порушеннями трофіки та іннервації шкіри, обумовленими різни-

ми патологічними процесами: хронічним венозним застоєм у хворих з виразковою хворобою; порушенням мікроциркуляції при цукровому діабеті, а також у випадках глибоких пошкоджень шкіри і підшкірних тканин при термічних травмах (як термальних так і холодових опіках) і хімічних ушкодженнях.

Тривало незагоєвані рани характеризуються наявністю хронічного запалення. При цьому запальний інфільтрат, в основному, представлений лімфогістіоцитарними елементами, в ділянці ранового дефекту змінюються міжклітинні і клітинно-матриксні взаємодії, з'являється дисбаланс в метаболізмі позаклітинного матриксу із зміщенням в сторону посиленої деградації його компонентів. Також відмічається порушення у співвідношенні компонентів нормального матриксу і/бо поява у позаклітинному матриксі компонентів, які в нормі відсутні. Це перешкоджає формуванню базальної мембрани і реепітелізації ранової поверхні.

(13) **U**

(11) **66570**

(19) **UA**

Місцева терапія залежить від того, в якій стадії знаходиться виразка чи рана. Для лікування виразок чи ран, що погано заживають, використовують препарати, що є тканиноспецифічними стимуляторами регенерації і впливають на регенерацію і репарацію шкірних покривів. У більшості репаративів здатність стимулювати регенерацію шкіри поєднується з іншими ефектами: протизапальною дією (мазь живокосту і календули), антиоксидантною (Ревалід), відновленням балансу згортання крові, поліпшенням локальної мікроциркуляції і трофіки шкіри (Гепатромбін) і антибактеріальною (Полівіокс, гіалуронат цинку, Фітостимулін та ін.)

Основна мета призначення цих препаратів полягає у стимуляції регенерації термальної і сполучної тканини у області ураження.

Однак слід зазначити, що швидке та ефективне загоєння шкірних покривів з епітелізацією можливо при наявності поверхневих пошкоджень (ерозія, виразки, опіки та ін.). Більш глибокі ураження шкіри гояться з формуванням сполучнотканинного рубця.

Регенеративну дію мають також нейрометаболічні стимулятори, такі як Церебралізін, Вінпоцетин. Препарат Актівегін - очищений від білка екстракт з крові телят, містить низькомолекулярні пептиди і похідні нуклеїнових кислот. Застосовують Актівегін при виразках різного походження, пролежнях, опіках, ушкодженнях рогівки і склери, а також для загоєння інфікованих ран, при променевому ураженні шкіри, при пересадці шкіри.

Застосування речовин, котрі містять біологічно активні молекули, що отримані від людей чи інших ссавців, вже зараз мають перспективу клінічного застосування.

На день написання заявки авторами не виявлено жодних джерел, де була б описана подібна технологія виготовлення фармацевтичного препарату з аналогічною активністю, тому референтним препаратом вибрано "Солкосерил" найбільш близький за регенеруючою і ранозагоюючою активністю, але абсолютно відмінний за складом та технологією одержання.

Технічна задача - впровадження в медичну практику нового способу одержання лікарського засобу із регенеруючим та ранозагоюючим механізмом дії та високою біодоступністю.

Поставлена задача вирішується новоствореним способом одержання фармацевтичної композиції ранозагоючої та регенеруючої дії на основі пептидних біорегуляторів, який полягає у тому, що низькомолекулярні пептиди дермального шару шкіри свиней інкорпують в ліпосоми, причому спочатку одержують низькомолекулярні пептиди шляхом заморожування дермального шару свинячої шкіри, подрібнення її, екстракції, ультрафільтрації та концентрації, потім одержують ліпосоми з розміром часточок 90-120 і 100-120 нм шляхом розчинення лецитину в спирті, випарюванні на роторно-плівковому випаровувачі, змиванням плівки водою (вміст спирту повинен бути не більше 8 %), доводять рН до 5,0-5,2, одержанням ліпосом з розміром часточок 90-120 нм, після чого в су-

спензію ліпосом вводять суміш низькомолекулярних пептидів, одержаних на стадії ультрафільтрації, проводять їх включення в ліпосоми і передають на стадію стерилізуючої фільтрації, фільтрують методом постійного потоку на брані з діаметром пор 0,2 мкм. Розлив, отримання спрею. Препарат розливають у флакони по 25 мл.

Приклад конкретного виконання

Отримання низькомолекулярних пептидів.

Дермальний шар шкіри свиней, попередньо заморожений і подрібнюють на кріоподрібнювачі протягом 20 сек., швидкість 3500 об./хв.

Екстракція.

Подрібнену шкіру зважують, завантажують в скляну ємкість, додають охолоджену воду (4-6 °С) в співвідношенні 1:10 і доводять рН кислотою соляною концентрованою до 5,2-5,4. Ставлять в холодильник і перемішують протягом 2-х годин через кожні 30 хв. Екстракт залишають на 12 годин в холодильнику при температурі 4-6 °С. Після проведення екстракції надосадкову рідину декантують, фільтрують і передають на ультрафільтрацію.

Ультрафільтрація.

Ультрафільтрацію проводять на мембрані 5 кД при температурі 6-8 °С.

Перміат передають на стадію концентрації.

Концентрація.

Концентрацію проводять на роторно-плівковому випаровувачі.

Концентрують в 60 раз.

Одержання ліпосом з розміром часточок 90-120 нм

Одержання ліпосом з розміром часточок 100-120 нм

Розчиняють лецитин в спирті, випарюють на роторно-плівковому випаровувачі до утворення ліпідної плівки, потім змивають ліпідну плівку водою для ін'єкцій. Вміст спирту повинен складати не більше 8 %, доводять рН до 5,0-5,2, одержують ліпосоми з розміром часточок 90-120 нм.

Одержання препарату.

В суспензію ліпосом вводять суміш низькомолекулярних пептидів, одержаних на стадії УФ. Проводять включення в ліпосоми і передають на стадію стерилізуючої фільтрації.

Стерилізуюча фільтрація.

Фільтрують методом постійного потоку на мембрані з діаметром пор 0,2 мкм. Розливають препарат у флакони по 25 мл.

Технічний результат - групою авторів створено новий спосіб одержання лікарського засобу із регенеруючим та ранозагоюючим механізмом дії та високою біодоступністю. Проведені дослідження на тваринах підтверджують високу ефективність отриманого за корисною моделлю препарату, у порівнянні з референтним препаратом "Солкосерил".

У табл. 1 представлені дані вивчення впливу досліджуваного препарату за корисною моделлю та референтного препарату "Солкосерил" на показники ендогенної інтоксикації у тварин із змодельованим пошкодженням шкіри.

Показники ендогенної інтоксикації у досліджуваних
групах піддослідних тварин у різні терміни спостереження ($M \pm m$)

Групи тварин	Доби	ЕІІ, %	$K_{\text{СМП}}$
Інтактні	0	58,25±0,15	0,82±0,03
Ураження шкіри без корекції	3	88,13±3,13***	1,94±0,10***
	7	84,13±3,13***	1,70±0,01***
	14	81,13±8,13***	1,44±0,04***
Ураження шкіри + препарат за корисною моделлю	3	73,88±0,63###	1,02±0,01###
	7	66,25±1,25###	0,95±0,02###
	14	68,13±1,88###	1,01±0,02###
Ураження шкіри + "Солкосерил"	3	70,63±4,38###	0,98±0,01###
	7	68,75±1,25###	0,96±0,02###
	14	63,75±6,25###	0,94±0,02###

Примітка. Зірочкою позначено величини, що статистично достовірно відрізняються від аналогічних у групі практично здорових тварин. Ґратками позначено величини, що статистично достовірно відрізняються від аналогічних у групі нелікованих тварин із пошкодженням шкіри.

*** - $p < 0,001$

- $p < 0,001$

Найвищий ступінь пошкодження еритроцитарних мембран у щурів із змодельованим пошкодженням шкіри спостерігався на 3 добу від моменту моделювання рани і зростав на 51,3 % порівняно з інтактними щурами. У тварин з ураженням шкіри, які з першого дня отримували препарат за корисною моделлю, ЕІІ статистично значимо перевищував аналогічний показник у групі інтактних тварин, проте був на 16,2 % нижчим, ніж у тварин із нелікованою раною. Аналогічна динаміка спостерігалася і при застосуванні референтного препарату "Солкосерил". У групі тварин із пошкодженням шкіри, які як коригуючий чинник отримували цей препарат, ЕІІ був на 19,9 % нижчим, ніж у групі нелікованих тварин.

В наступні дні експерименту (7 та 14 доби) позитивні зміни при застосуванні досліджуваного і референтного препаратів були ще більш вираженими і виявляли стійку тенденцію до зниження ЕІІ по відношенню до аналогічного показника у групі тварин без лікування ураження шкіри. За абсолютною величиною на 14-й день дослідження ЕІІ в обох групах піддослідних тварин наближався до норми.

Коефіцієнт СМП (де СМП - середньомолекулярні пептиди) є важливим прогностичним критерієм, що дозволяє оцінити перебіг патологічного процесу та активність репаративно-відновних функцій організму. У практично здорових особин цей показник близький до 1,0 (0,8-1,0); його зростання свідчить про несприятливий перебіг захворювання

із переважаючим накопиченням маркерів деструктивних процесів над відновно-репаративними.

Проведені дослідження показали, що пошкодження шкіри тварин призводить до збільшення фракції СМП з більшою молекулярною масою, які є продуктами деградації білків-ферментів, нуклеотидів та структурних білків. У щурів із змодельованим пошкодженням шкіри вміст СМП у сироватці крові зазнає значних змін. На 3 добу експерименту це призводить до зростання $K_{\text{СМП}}$ з (0,82±0,03) до (1,94±0,10), що на 136,6 % перевищує аналогічний параметр у щурів інтактно́ї групи. На 7 та 14 доби спостереження у групі нелікованих тварин $K_{\text{СМП}}$ перевищував аналогічний показник у групі практично здорових тварин на 107,3 % та 75,6 % відповідно.

Застосування досліджуваного препарату за корисною моделлю сприяло зниженню $K_{\text{СМП}}$ у всі терміни спостереження і наближенню його до показника тварин інтактно́ї групи.

Таким чином, при застосуванні досліджуваного препарату нами відмічено його позитивний вплив, що привело до зниження рівня токсемії за рахунок зменшення проникності еритроцитарних мембран та зниження вмісту середньомолекулярних пептидів.

Промислове застосування. Групою авторів виготовлено кілька дослідних зразків препарату за корисною моделлю на базі ВАТ "ФАРМАК", дослідження специфічної активності проведено на базі Тернопільського медичного університету. Готується промислове впровадження.