



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14548 (13) U  
(51) МПК  
A61K 35/50 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТУ З ГЛАДКОГО ХОРІОНА

1

2

(21) u200511462

(22) 02.12.2005

(24) 15.05.2006

(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.

(72) Лобинцева Галина Степанівна, Гладких Юрій Васильович, Лобинцев Дмитро Валерійович, Гладких Володимир Юрійович

(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ"

(57) 1. Спосіб отримання препарату з гладкого хоріона шляхом відділення фрагментів гладкого хоріона від плаценти, промивання, обеззараження, подрібнення, охолодження подрібненого гладкого хоріона до температури зберігання, підтримування температури зберігання постійно, який **відрізняється** тим, що тканину хоріона відокремлюють від плаценти в умовах стерильного боксу, процес промивання та обеззараження суміщають шляхом промивання фрагментів гладкого хоріона тричі у фізіологічному розчині, що містить 30-50 од/мл цефтриоксону, переносять у стерильний лоток, в умовах ламінарного боксу розрізають на шматки розміром 35x35-50x50 мм, заливають фізі-

ологічним розчином з 15-20% концентрацією диметилсульфоксиду на 20-30хв, кожний шматок поміщають у поліпропіленовий резистентний стерильний 40 мл контейнер, у який доливають 1:1 10%-ний розчин диметилсульфоксиду, заморожують зі швидкістю 1-1,5°C/хв і зберігають до клінічного застосування, а перед нанесенням на рану розморожують у водяній лазні при температурі +37-+40°C до температури +4-+6°C.

2. Спосіб отримання препарату з гладкого хоріона за п. 1, який **відрізняється** тим, що плаценту з моменту пологів до відділення хоріона зберігають не більше 3-6 годин в ізотермічних умовах при температурі 20-25°C.

3. Спосіб отримання препарату з гладкого хоріона за п. 1, який **відрізняється** тим, що заморожування здійснюють до -80°C і зберігають протягом 2-3 місяців при температурі -80°C.

4. Спосіб отримання препарату з гладкого хоріона за п. 1, який **відрізняється** тим, що заморожування здійснюють до -196°C і зберігають до 5 років при температурі -196°C.

Розробка відноситься до медицини, до комбустіології та хірургії й може бути використана для лікування великих глибоких опікових ран на основі застосування препарату, приготовленого із тканини хоріона, шляхом нанесення його на підготовлену поверхню.

Відомий спосіб одержання гемостатичного матеріалу [див. Авторське свідоцтво СРСР №1432844, МПК А61D35/14, дата публікації: 20.01.1996], що передбачає використання плаценти, згідно якому, відокремлюють хоріон від амніотичної оболонки, заготовлюють шматочки хоріона розмірами від 0,5x0,5см. Зібрані шматочки 5-6 разів відмивають в стерильному фізіологічному розчині з антибіотиками. Після бактеріологічного контролю роблять здрібнювання в подрібнювачі тканин (РТ-1) при 8000об/хв. протягом 3хв. Здрібнену плацентарну масу заливають стерильним фізіологічним розчином з додаванням пеніциліну 1000000ЕД і стрептоміцину 500000ЕД на 100мол

розчину у відношенні 1 обсяг плацентарної тканини до 10 обсягів рідини, що консервує. Підготовлену в такий спосіб тканину хоріона до заморожування містять у побутовому холодильнику при температурі 4°C. Попередньо видаливши консервант, роблять розлив здрібненої тканини по 20мл. у стандартні градуйовані флакони ємністю 100мл і заморожують у морозильній камері, сублімаційне сушіння здійснюють в умовах глибокого вакууму (не більше 9,3Па). Тривалість висушування 37±2год в температуру матеріалу в період досушування підтримують при 33±2°C протягом 6год., після чого флакони закривають гумовими пробками й закрочують алюмінієвим ковпачком в один шар.

Недоліком отриманого препарату є його вузькі функціональні властивості, які, як зазначає розробник, обмежуються активацією згортання крові та пов'язане з цим пришвидшення зупинки кровотечі невеликих пошкоджень в стоматологічній практиці.

(13) U

(11) 14548

(19) UA

Іншим недоліком отриманого препарату є руйнування значної частини біологічно активних речовин, що знаходяться у хоріоні, внаслідок прийнятих режимів обробки сировини та наступної сублімаційної сушки. Препарат не містить життєздатних клітин і не може здійснювати замісний ефект.

Відомий спосіб отримання препарату з гладкого хоріона для корекції імунного статусу [М.Ф. Давченко "Тканинна терапія за методом професора Н.І. Краузе в стоматології і щелепно-лицьовій хірургії" Приготування хімічно оброблених тканин за методом проф. Краузе. Труды Саратовського медичного інституту, том VII, 1949, - С.407-414] шляхом відділення від плаценти фрагментів гладкого хоріона, промивання їх водою, обеззараження розчином, який щодня оновлюють. При цьому як знезаражуючий розчин використали 2% розчин хлорациду, а промивали водопровідною водою.

Недоліком відомого способу є руйнування значної частини біологічно активних речовин, що знаходяться у гладкому хоріоні, при обеззараженні хлорацидом, крім того відбувається насичення фрагментів тканини хлором, а подальша їх обробка відмиттям не звільняє від токсичних з'єднань хлору, контакт з якими може викликати токсичні, алергічні і інші патологічні реакції у реципієнта. Крім того, така обробка гладкого хоріона не повністю знищує бактерійну і вірусну мікрофлору, а також може надавати дратівливу дію на слизові оболонки.

Відомий спосіб отримання препарату з гладкого хоріона для корекції імунного статусу людини [див. патент України №54248, МПК: 7 А61К35/50, дата публікації: 17.02.2003, номер бюлетеня 2] шляхом відділення фрагментів гладкого хоріона, промивання їх водою, обеззараження розчином, який щодня оновлюють, при цьому фрагменти гладкого хоріона охолоджують до температури +4°-+10°C та підтримують таку температуру постійно, промивають стерильною дистильованою водою, а як знезаражувальний розчин використовують 0,25% водний розчин хлоргексидину біглюконат, оновлюючи його кожні 12 годин протягом 5-6 діб.

Недоліком такого способу отримання препарату є короткий термін придатності препарату, пов'язаний з тим що в зазначених умовах збереження біологічно активні речовини що містяться в препараті швидко руйнуються та має місце великій відсоток загибелі клітин. Процеси безперервного промивання препарату призводять до підвищення вірогідності бактеріального обсіменіння препарату. По суті препарат потрібно готувати перед процесом його застосування, що суттєво обмежує можливість його застосування тому, що перед застосуванням не гарантовано наявність сировини для його виробництва.

Відомий спосіб одержання біостимулятора [см. Патент України №38604, МПК: 7 А61К35/48 А, 7 А01Н1/00 В, дата публікації: 15.05.2001, номер бюлетеня: 4] шляхом відмивання тканини у фізрозчині, роздрібнювання і гомогенізації, після роздрібнювання тканину піддають дворазовому заморожуванню-відігріву, а після гомогенізації здійснюють

центрифугування і відділення кінцевого продукту з наступним його кріоконсервуванням при -196°C.

Цей спосіб одержання біостимулятора у випадку одержання препарату з тканини хоріона є малоефективним. Це пов'язано з тим, що клітини хоріона, на відміну від наприклад ембріональних клітин, міцніше з'єднані між собою. В результаті гомогенізації на початковій стадії приготування препарат, одержаний цим способом по його завершенню містить низьку кількість життєздатних клітин і пов'язані з цим недоліки препарату зазначені вище.

Іншим недоліком даного способу є те, що він являє собою клітинну суспензію (клітинний склад не зазначений), що повинна наноситься на основу, а потім - на рану, у результаті чого відбувається більша втрата клітин.

Завданням розробки є створення способу отримання препарату з гладкого хоріона в якому шляхом застосування нових операцій, режимів їх виконання та застосовуваних речовин забезпечується підвищення вмісту в препараті усіх компонентів білків і гормонів та стовбурових клітин, характерних для нативного хоріона, та забезпечується можливість його тривалого зберігання.

Для вирішення цього завдання спосіб отримання препарату з гладкого хоріона передбачає відділення фрагментів гладкого хоріона від плаценти, промивання, обеззараження, подрібнення, охолодження подрібненого гладкого хоріона до температури зберігання та підтримування температури зберігання постійно.

Новим в способі є те, що тканину хоріона відокремлюють від плаценти в умовах стерильного боксу, процес промивання та обеззараження суміщають шляхом промивання фрагментів гладкого хоріона тричі у фізіологічному розчині, що містить 30-50ед/мол цефтриоксона, переносять у стерильний лоток, в умовах ламінарного боксу розрізають на шматки розміром 35х35-50х50мм, заливають фізіологічним розчином з 15-20% концентрацією диметилсульфоксиду на 20-30хв, кожний шматок поміщають у поліпропіленовий резистентний стерильний 40мл. контейнер, у який доливають 1:1 10%-ний розчин диметилсульфоксиду, заморожують зі швидкістю 1-1,5°C/хв і зберігають до клінічного застосування, а перед нанесенням на рану розморожують у водяній лазні при температурі +37°-+40°C до температури +4°-+6°C.

Внаслідок застосування зазначеного способу препарат містить повний комплекс біологічно активних речовин і має повноцінні життєздатні клітини, тому він має замісну дію.

В окремих варіантах застосування способу отримання препарату з гладкого хоріона плаценту з моменту пологів до відділення хоріона зберігають не більше 3-6 годин в ізотермічних умовах при температурі 20-25°C.

Внаслідок застосування зазначених режимних параметрів в препараті підвищується відсоток біологічно активних речовин та життєздатних клітин по відношенню до необробленого нативного хоріона.

В окремих варіантах застосування способу отримання препарату з гладкого хоріона заморо-

жування здійснюють до  $-80^{\circ}\text{C}$  і зберігають протягом 2-3 місяців при температурі  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Внаслідок застосування зазначених дій забезпечується можливість збереження препарату протягом 2-3 місяців в холодильнику.

В окремих варіантах застосування способу отримання препарату з гладкого хоріона заморожування здійснюють до  $-196^{\circ}\text{C}$  і зберігають до 5 років при температурі  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Внаслідок застосування зазначених дій забезпечується можливість збереження препарату до 5 років.

Спосіб отримання препарату з гладкого хоріона ілюструється прикладами виготовлення препарату.

В таблиці 1 зазначені режими та параметри виконання дій в виконаних прикладах, в таблиці 2 показники застосованої в прикладах тканини хоріона до застосування способу отримання препарату, а в таблиці 3 показники отриманого в прикладах препарату.

В наведених прикладах для одержання препарату використовували плаценту, що залишається після пологів, зроблених шляхом кесарева розтину. Плаценту поміщали у стерильний металевий бікс, закривали і в термостатичній тарі ( $+20^{\circ}\text{C}$ – $+25^{\circ}\text{C}$ ) доставляли у лабораторію кріобанка протягом 3-6 годин з моменту пологів. У стерильних умовах

боксу плаценту промивали тричі, послідовно поміщаючи в 3 лотки з фізіологічному розчином і антибіотиком (30-50ед/мол цефтриоксона), в останньому лотку відокремлювали хоріон від плаценти й амніотичної оболонки, переносили у порожній 4-й лоток, розрізали на шматочки зазначених в таблиці 1 розмірів, заливали фізіологічним розчином з 15-20% концентрацією ДМСО на 20-30хв. для кращого проникнення кріопротектора в тканину, потім шматочки переносили в 40мол. пробірки для заморожування, доливали 10% ДМСО на розчині Хенкса, залишаючи незаповненим невеликий простір для об'ємного розширення при заморожуванні й заморожували зі швидкістю  $1-1,5^{\circ}\text{C}$  у 1хв до температури, зазначеної в таблиці 1., потім, у випадку тривалого зберігання, ампули занурювали у рідкий азот ( $196^{\circ}\text{C}$ ). Розморожували препарат поміщаючи ампулу в термостатовану водяну лазню ( $+37^{\circ}\text{C}$ – $+40^{\circ}\text{C}$ ) до ( $+4^{\circ}\text{C}$ – $+6^{\circ}\text{C}$ ).

Дослідження клітинного й білкового складу тканини хоріона до й після застосування способу показало, що отриманий препарат після розмороження містить усе компоненти білків і гормонів, характерних для нативного хоріона, що, як показують приклади, суттєво не змінюється при зберіганні в холодильнику протягом 2 місяців, 3-х і 5-ти років при  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Таблиця 1

Приклади	Термін зберігання плаценти	Температура зберігання	Вміст центриоксона у фізіологічному розчині	Розмір шматків	Вміст диметилсульфоксиду у фізіологічному стані	Термін витримки просочування	Швидкість заморожування	Температура заморожування	Термін зберігання	Температура у бані	Розмороження до температури
№	год	С	ед/мол	мм	%	хв.	$^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$	С	місяців	$^{\circ}\text{C}$	С
1.	3,0	20	30	35x35	15	20	1,0	-80	2	37	+4
2.	6,0	25	50	50x50	20	30	1,5	-80	3	40	+6
3.	4,0	21	40	40x40	15	22	1,0	-80	2	38	+4
4.	3,0	22	50	45x45	20	26	1,5	-80	3	38	+6
5.	5,0	23	30	35x35	18	28	1,3	-80	2	39	+4
6.	6,0	24	40	40x40	15	24	1,5	-80	3	40	+5
7.	5,0	22	50	50x50	20	30	1,0	-80	2	37	+6
8.	3,0	20	30	35x35	15	20	1,0	-196	36	37	+4
9.	6,0	25	50	50x50	20	30	1,5	-196	60	40	+6
10.	3,0	22	30	45x45	20	24	1,2	-196	44	38	+4
11.	5,0	24	40	35x35	18	30	1,5	-196	47	39	+5
12.	4,0	20	50	40x40	20	26	1,3	-196	56	40	+6
13.	6,0	23	30	40x40	15	28	1,5	-196	41	37	+4
14.	3,0	25	50	50x50	20	22	1,0	-196	36	40	+6
15.	5,0	22	30	35x35	18	26	1,2	-196	60	38	+4
16.	6,0	25	40	50x50	15	28	1,3	-196	52	39	+5

Таблиця 2

Приклади	Фоликуло-стимулюючий гормон	Пролактин	Лютеїнізуючий гормон	Прогестерон	Естрадиол	Кортизол	Хоріогонічний гонадотропин	а-фетопро-теин	а <sub>1</sub> -мікро-глобулін	а <sub>2</sub> -мікро-глобулін фертильності	CD-34 <sup>+</sup> -клітини
№	мЕД/л	мЕД/л	мЕД/л	пмоль/л	пмоль/л	пмоль/л	мЕД/л	нг/мл	нг/мл	нг/мл	клітини, $\times 10^2$ /мол
1.	10,7	371	14,2	831	5212	72,4	5430	73,3	93,1	3757	3,1
2.	9,5	381	8,9	824	5217	71,8	5390	72,3	94,8	3738	2,9
3.	11,7	383	16,0	786	5206	74,8	5330	74,6	89,8	3732	2,6
4.	11,1	363	13,0	812	5243	71,2	5510	73,6	86,5	3748	3,2
5.	9,3	386	13,6	755	5180	68,9	5290	71,1	103	3726	2,6
6.	10,9	376	15,4	799	5259	66,5	5470	71,6	84,9	3745	3,3
7.	9,7	368	12,5	742	5190	70,7	5370	73,8	101	3729	2,7
8.	11,5	356	10,1	780	5196	67,7	5250	73,1	99,7	3761	2,9
9.	10,1	391	14,8	774	5249	73,6	5310	74,1	88,2	3735	3,0
10.	12,1	378	10,7	748	5254	68,3	5490	72,1	98,2	3767	2,5
11.	10,5	366	11,3	805	5233	73,0	5530	71,3	104	3754	2,8
12.	11,9	361	16,6	793	5185	74,2	5270	72,6	81,6	3770	3,2
13.	10,3	388	11,9	818	5201	67,1	5450	71,8	96,4	3742	3,3
14.	9,9	373	8,3	767	5222	70,1	5410	74,3	91,5	3764	2,7
15.	11,3	358	9,5	761	5227	75,4	5350	72,8	83,2	3751	3,0
16.	10,9	378	10,9	837	5238	69,5	5390	73,1	94,8	3754	2,9

Таблиця 3

Приклади	Фоликуло-стимулюючий гормон	Пролактин	Лютеїнізуючий гормон	Прогестерон	Естрадиол	Кортизол	Хоріогонічний гонадотропин	а-фетопро-теин	а <sub>1</sub> -мікро-глобулін	а <sub>2</sub> -мікро-глобулін фертильності	CD-34 <sup>+</sup> -клітини
№	мЕД/л	мЕД/л	мЕД/л	пмоль/л	пмоль/л	пмоль/л	мЕД/л	нг/мл	нг/мл	нг/мл	клітини $\times 10^2$ /мол
1.	9,52	345	13,1	806	5081	70,2	5158	69,3	89,4	3666	2,9
2.	8,27	346	8	782	4982	68,2	5012	67,2	89,1	3573	2,7
3.	10,41	356	14,7	762	5075	72,5	5063	70,8	86,2	3642	2,4
4.	10,1	344	12,2	803	5216	70,4	5344	71,4	84,7	3733	3,1
5.	8,09	351	12,2	717	4946	65,4	4919	66,1	96,8	3562	2,4
6.	9,16	327	13,2	727	4811	60,5	4868	63,7	76,4	3430	2,9
7.	8,54	338	11,3	712	5008	67,8	5047	69,4	95,9	3602	2,5
8.	9,89	331	9,4	756	5066	65,6	4987	69,4	95,7	3670	2,8
9.	8,18	332	12,7	696	4776	64,7	4672	65,2	78,5	3212	2,5
10.	10,65	343	9,9	725	5201	65,5	5270	69,2	95,3	3578	2,3
11.	9,03	325	10,3	764	5076	68,6	5198	67,0	98,8	3453	2,6
12.	9,88	310	14,4	729	4822	66,8	4743	65,3	73,4	3355	2,7
13.	8,45	329	10,2	736	4784	59,7	4850	63,9	86,8	3292	2,8
14.	8,71	339	7,7	743	5169	67,3	5193	71,3	88,7	3575	2,5
15.	9,49	315	8,4	715	4965	68,6	4922	66,9	76,5	3375	2,5
16.	8,7	317	9,3	744	4714	60,5	4689	63,6	83,4	3228	2,4