



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59096 (13) A

(51) 7 A01N1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО ПРЕПАРАТУ З ПЛАЦЕНТИ (ВАРІАНТИ)

1

2

(21) 2003010413

(22) 16 01 2003

(24) 15 08 2003

(46) 15 08 2003, Бюл. № 8, 2003 р.

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

(73) Лобинцева Галина Степанівна, Гладких Юрий Васильович, Лобинцев Дмитро Валерійович, Гладких Володимир Юрійович

(57) 1 Спосіб одержання біологічно активного препарату з плаценти, що включає промивання отриманої плацентарної тканини шляхом перфузування через пупкову вену фізіологічним розчином з антибіотиком, відокремлення від плаценти хоріону і амніотичної оболонки, а також значних кровоносних судин, подрібнення плацентарної тканини, розлив в пляшки, заморожування, сублімаційне сушіння з наступним досушуванням, який **відрізняється** тим, що отриману плацентарну тканину спочатку промивають стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком, потім здійснюють перфузію, після подрібнення плацентарну тканину гомогенізують у фізіологічному розчині до одержання сметаноподібної маси, до гомогенату додають 10-20% розчин диметилсульфоксиду на розчині Хенкса, перемішують, розливають у посудини, в яких формують шар гомогенату 15-20мм, який піддають сублімаційному сушінню, сублімаційне сушіння здійснюють протягом 15-35 годин, з наступним досушуванням при 28-35°C до остаточної вологості 5-15%

2 Спосіб одержання біологічно активного препарату з плаценти, що включає промивання отриманої плацентарної тканини шляхом перфузування через пупкову вену фізіологічним розчином з антибіотиком, відокремлення від плаценти амніотичної оболонки, а також значних кровоносних судин, подрібнення плацентарної тканини, розлив в пляшки, заморожування, сублімаційне сушіння з наступним досушуванням, який **відрізняється** тим, що отриману плацентарну тканину спочатку промивають стерильним фізіологічним розчином з

антибіотиком, потім здійснюють перфузію, після подрібнення плацентарну тканину гомогенізують у фізіологічному розчині до одержання сметанообразної маси, до гомогенату додають 10-20% розчин диметилсульфоксиду на розчині Хенкса, перемішують, розливають у посудини, в яких формують шар гомогенату 15-20мм, який піддають сублімаційному сушінню, сублімаційне сушіння здійснюють протягом 15-35 годин, з наступним досушуванням при 28-35°C до остаточної вологості 5-15%

3 Спосіб одержання біологічно активного препарату з плаценти за п 1, який **відрізняється** тим, що шар гомогенату 15-20мм формують шляхом обертання посудини з гомогенатом в горизонтальному положенні протягом періоду сублімаційного сушіння

4 Спосіб одержання біологічно активного препарату з плаценти за п 1, який **відрізняється** тим, що плацентарну тканину отримують у породіль і жінок, що надійшли на добровільне переривання вагітності за показниками, сироватка крові яких дає негативний результат при тестуванні на гепатити В і С, вірус імунodefіциту, сифілісу, токсоплазмоз, цитомегаловірус, хламідії, мікоплазму, уреоплазму, краснуху, вірус простого герпесу

5 Спосіб одержання біологічно активного препарату з плаценти за п 1, який **відрізняється** тим, що промивання плацентарної тканини стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком повторюють тричі

6 Спосіб одержання біологічно активного препарату з плаценти за п 1, який **відрізняється** тим, що при подрібненні плацентарну тканину розрізають на окремі фрагменти розміром 3-5см, потім фрагменти плаценти подрібнюють у ножовому гомогенізаторі MPW-324, а потім у скляному гомогенізаторі Поттера

7 Спосіб одержання біологічно активного препарату з плаценти за п 1, який **відрізняється** тим, що 10-20% розчин диметилсульфоксиду на розчині Хенкса додають до гомогенату в співвідношенні 1 0,8-1,2

(13) A

(11) 59096

(19) UA

Винахід відноситься до медицини і косметології, а саме до створення імунобіологічних препаратів і лікувально-профілактичних косметичних засобів

Відомий спосіб отримання речовини, яка прискорює регенерацію тканин (дивись заявку на винахід Росії №92008683, МПК 6A01N1/02, дата публікації 1995 02 10), який передбачає подрібнення плацентарної тканини ссавців, обезжирювання ацетоном, змішування з еритроцитною масою, отриманою з цільної крові тварин у масовому співвідношенні 1:2-4, екстрагування суміші 0,1-0,5М розчином оцтової кислоти при 4-18°C на протязі 1-2 годин, потім відділення осаду, багаторазового промивання його водою, екстрагування 2-3 об'ємами 0,01-0,05%-ного розчину ферментного препарату еластазіна при 37-45°C, відділення екстракту і висушування сублімацією

Отриманий за способом і висушений сублімацією екстракт не забезпечує повного вилучення імунобіологічних речовин з плацентарної тканини. Це знижує лікарські можливості препарату. Значна частина імунобіологічних речовин з плацентарної тканини залишається у відходах

Відомий спосіб отримання гемостатичного матеріалу (дивись патент на винахід Росії №1432844, МПК 6A01N1/02, дата публікації 1996 01 20), який передбачає відділення у жіночої плаценти хоріону від амніотичної оболонки, подрібнення його на шматочки, які відмивають у фізіологічному розчині з антибіотиками, після бактеріологічного контролю тканини подрібнюють у подрібнювачі тканин РТ-1, подрібнену плацентарну масу заливають фізіологічним розчином з додаванням антибіотиків, віддалили консервант в асептичних умовах розливають подрібнену масу в градуйовані флакони ємністю 100мл і заморожують в морозильній камері, здійснюють сублімаційну сушку в апараті ТГ-15 (ГДР), на протязі 37±2 годин в умовах глибокого вакууму, потім досушують при температурі 33±2°C на протязі 6 годин

Отриманий за способом препарат містить лише частину імунобіологічних речовин які є в плацентарній тканини. Значна частина імунобіологічних речовин з плацентарної тканини залишаються у відходах

Відсутність в препараті речовини, що покращує проникність біологічно активних складових препарату через клітинні мембрани, зменшує лікарську дію препарату

Спосіб складний у застосуванні тому, що при його реалізації потрібно працювати з великою кількістю посуду з невеликою кількістю препарату в кожній посудині

Для реалізації способу потрібен великий об'єм морозильної камери та камери для сублімаційного сушіння. Все це, а також подовжений період процесу сублімаційного висушування в умовах глибокого вакууму в свою чергу підвищує енергомісткість способу

У деяких випадках використання препарату у вигляді порошку незручно непридатне. Отриманий за способом препарат у відсутності консерванту має малий строк зберігання

Завданням винаходу є створення способу

одержання біологічно активного препарату з плаценти у якому шляхом зміни операцій способу та знайдених емпіричним шляхом режимів, використаної сировини, допоміжних речовин, обладнання, та дій з його використанням забезпечується збільшення виходу в способі препарату, збільшення періоду збереження та підвищення проникності біологічно активних речовин препарату через кліткові мембрани, що в цілому покращує якісні характеристики отриманого препарату

Ця задача вирішується тим, що в першому варіанті способу одержання біологічно активного препарату здійснюють промивання отриманої плацентарної тканини шляхом перфузування через пупкову вену фізіологічним розчином з антибіотиком, відокремлення від плаценти хоріону і амніотичної оболонки, а також значних кровоносних судин, подрібнення плацентарної тканини, розлив в пляшки, заморожування, сублімаційну сушку, з наступним досушуванням

В другому варіанті способу одержання препарату здійснюють промивання отриманої плацентарної тканини шляхом перфузування через пупкову вену фізіологічним розчином з антибіотиком, відокремлення від плаценти амніотичної оболонки, а також значних кровоносних судин, подрібнення плацентарної тканини, розлив в пляшки, заморожування, сублімаційну сушку, з наступним досушуванням

Новим в способі є те, що отриману плацентарну тканину спочатку промивають стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком, потім здійснюють перфузію, після подрібнення плацентарну тканину гомогенізують у фізіологічному розчині до одержання сметанообразної маси, до гомогената додають 10-20% розчин диметилсульфоксиду (ДМСО) на розчині Хэнкса, перемішують, розливають у посудини, в яких формують шар гомогената 15-20мм, який підвергають сублімаційній сушці, сублімаційну сушку здійснюють протягом 15-35 годин, з наступним досушуванням при 28-35°C до остаточної вологості 5-15%

Внаслідок застосування зазначених ознак способу збільшується частка плаценти, яка використовується в способі, внаслідок чого забезпечується збільшення виходу в способі препарату. Використання при приготуванні препарату диметилсульфоксиду, який є також консервант, забезпечує збільшення періоду збереження препарату. Як показують результати дослідів, залишення в препараті диметилсульфоксиду підвищує проникність біологічно активних речовин препарату через кліткові мембрани, що в цілому покращує якісні характеристики отриманого препарату

В конкретних застосуваннях способу одержання біологічно активного препарату з плаценти, шар гомогената 15-20мм формують шляхом обертання посудини з гомогенатом в горизонтальному положенні на протязі періоду сублімаційної сушки

Внаслідок застосування зазначених ознак способу забезпечується можливість використовувати посудини більшого обсягу, що забезпечує можливість зменшити обсяг камери заморожування та сублімаційного сушіння. До того ж внаслідок обертання посудини шар гомогената знаходиться в

рухливому стані та з невеликою вібрацією, якою супроводжується обертання, внаслідок чого інтенсифікуються процеси заморожування та сублімаційного сушіння та зменшується їх тривалість.

В конкретних варіантах реалізації способу одержання біологічно активного препарату з плаценти плацентарну тканину отримують у породіль та жінок, що надійшли на добровільне переривання вагітності за показниками, сироватка крові яких дає негативний результат при тестуванні на гепатити В і С, вірус імунodefіциту, сифілісу, токсоплазмоз, цитомегаловірус, хламідії, мікоплазму, уреоплазму, краснуху, вірус простого герпесу.

Внаслідок використання зазначених ознак способу покращується якість отриманого препарату.

В конкретних варіантах реалізації способу одержання біологічно активного препарату з плаценти промивання плацентарної тканини стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком повторюють тричі.

Внаслідок цього на початковій стадії процесу забезпечується гарантоване очищення полупродукту від мікрофлори, що виключає можливість її розвитку на протязі здійснення способу, що також призводить до підвищення якості кінцевого продукту.

В конкретних варіантах реалізації способу одержання біологічно активного препарату з плаценти при подрібненні плацентарну тканину розрізають на окремі фрагменти розміром 3-5см, потім фрагменти плаценти подрібнюють у ножовому гомогенізаторі MPW-324, а потім у скляному гомогенізаторі Поттера.

Внаслідок використання зазначених ознак способу забезпечується рівномірна гомогенізація тканини що додатково покращує наступний процес дифузії диметилсульфоксида в клітини тканини, внаслідок чого всі клітини отримують достатню кількість диметилсульфоксида і внаслідок цього кількість життєздатних клітин підвищується.

В конкретних варіантах реалізації способу одержання біологічно активного препарату з плаценти 10-20% розчин диметилсульфоксида на розчині Хенкса додають до гомогената в співвідношенні 1 0,8-1,2.

Запропонований інтервал співвідношення гомогената до розчину диметилсульфоксида на розчині Хенкса, оснований на отриманих імперічних даних і забезпечує оптимальні умови для початку наступного процесу замороження, а також необхідну кількість диметилсульфоксида для покращення процесу проникнення біологічно активних речовин препарату через кліткові мембрани.

Для порівняння прототипу та запропонованого способу здійснювали спосіб за прототипом та запропонований на зазначених нижче прикладах В прикладах здійснювали такі дії.

Для приготування препарату за прототипом та запропонованим способом використовували плацентарну тканину, отриману в породіль і жінок, що надійшли на добровільне переривання вагітності за показниками, сироватка крові яких дає негативний результат при тестуванні на гепатити В і С, вірус імунodefіциту, сифілісу, токсоплазмоз, цитомегаловірус, хламідії, мікоплазму, уреоплаз-

му, краснуху, вірус простого герпесу.

За відомим способом отримання гемостатического матеріалу відділяли у жіночої плаценти хоріон від амніотичної оболонки, подрібнювали його на шматочки, які відмивали у фізіологічному розчині з антибіотиками, після бактеріологічного контролю тканини подрібнювали у подрібнювачі тканин РТ-1, подрібнену плацентарну масу заливали фізіологічним розчином з додаванням антибіотиків, віддалили консервант в асептичних умовах розливали подрібнену масу в градуйовані флакони ємністю 100мл і заморожували в морозильній камері до -30°C, здійснювали сублімаційну сушку в апараті ТГ-15 (ГДР), на протязі 38 годин в умовах глибокого вакууму, потім досушували при температурі 34°C на протязі 6 годин.

Матеріал зберігали протягом одного місяця в холодильнику.

В прикладах 1-14 за запропонованим способом плацентарна тканина, отримана під час родів, зроблених за допомогою кесарева перетину, або простагландинового переривання вагітності за показниками, тричі промивалася стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком (канаміцин 30ед/мл). В прикладах 1-7 в асептичних умовах робили відділення плаценти від хоріона й амніотичної оболонки, а також від значних кровоносних судин. В прикладах 8-14 в асептичних умовах робили відділення плаценти від амніотичної оболонки, а також від значних кровоносних судин.

Очищену в прикладах 1-14 плацентарну тканину ще раз промивали за допомогою перфузії стерильним фізіологічним розчином через пупочний канатик, після чого розрізали на окремі фрагменти розміром 3-5см.

Фрагменти плацентарної тканини подрібнювали у ножовому гомогенізаторі MPW-324, а потім у скляному гомогенізаторі Поттера у фізіологічному розчині до одержання сметанообразної маси. До гомогената в співвідношенні 1 1 додавали 10-20% диметилсульфоксида (ДМСО) на розчині Хенкса, перемішували, розливали у скляні пляшки обсягом 50-500мл. Пляшки з гомогенатом для забезпечення заморожування та наступного сублімаційного сушіння встановлювали в камеру апарата ОСС-25 УЗВ-1 виробництва СКТЕ з ОП при Харківському інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України.

У Таблиці 1 зазначені режими виконання запропонованого способу, а в Таблиці 2 подані результати, отримані при порівняльному дослідженні препаратів, отриманих по режиму, описаному в прототипі і по запропонованому способу (в прикладах 1-14). В таблицях 3 та 4 подані результати, які свідчать про проникність через кліткові мембрани препаратів, отриманих по режиму, описаному в прототипі і по варіантах запропонованого способу (в прикладах 1-14).

Проникність через кліткові мембрани визначали у дослідах на моделі, за якими відокремлювали амніотичну оболонку, вирізували з неї однакові фрагменти розміром 6х6см, промивали фрагменти у фізіологічному розчині 3 рази, з кожного шматочка формували мішечок, який у верхній частині зав'язували кетгутом, через отвір у верхній частині шприцом вводили 20мл розчину плацентарної су-

спензі отриманої у прототипі та в прикладах 1-14 (тобто сублімованої з ДМСО і без ДМСО), мішечки опускали в стаканчики з фізіологічним розчином, через 1 годину (табл 3) і 3 години (табл 4) фізіологічний розчин зливали й у складі цього розчину визначали наявність гормонів. По кількості гормонів у фізіологічному розчині судили про проникність препарату через кліткові мембрани. Гормони визначали за допомогою імуноферментного аналізу з використанням тест систем фірми Amersham.

Як видно з поданих у таблицях 2 результатів, цілість гормонів і білків у препаратах плаценти, отриманих запропонованим способом, та проникність препарату через кліткові мембрани (Таблиці 3, 4), набагато вище, чим в отриманих за прототипом. Використання ознак запропонованого способу забезпечує збільшення виходу в спосіб препарату, збільшення періоду збереження, та підвищення проникності біологічно активних речовин через кліткові мембрани, що в цілому покращує якісні характеристики отриманого препарату.

Таблиця 1

№ прикладу	Розмір фрагментів, см	Термін заморожування, годин	Середньозважена товщина розчину після розливу, мм	Концентрація Амініопрофіну, % в розчині Хзиса, %	Термін сублімації, годин	Шар товщини, мм	Температура добування, °С	Остаткова вологість, %
1	3х5	20	1 0 8	20	19,2	17,6	31	9,3
2	3х4	18	1 1 1	17	35	16,5	33	12,1
3	3х3	18	1 0 8	14	27,8	18,0	28,5	6,7
4	3х5	20	1 1 2	15	28,4	17,0	29	6,4
5	3х3	15	1 0 9	12	18,4	15,5	29,5	7,1
6	4х4	18	1 0 8	13	30,8	18,5	30	7,9
7	3х4	16	1 0 9	10	23,6	17,0	30,6	8,9
8	3х5	21	1 1 2	18	32,2	19,5	34,5	14,3
9	3х4	15	1 1 0	11	33,6	18,5	31,5	10
10	3х3	17	1 1 1	15	28,2	18,0	32	10,7
11	3х5	20	1 1 2	20	22,2	17,5	32,5	11,4
12	4х3	19	1 1 0	10	17,8	19	33,5	12,9
13	3х5	16	1 1 1	19	25	19,5	34	13,6
14	3х3	17	1 0 9	12	21	20	35	15

Таблиця 2

Показник	Приклади														
	прототип	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Додатково створений гормон мЕД/л	3,5	12,9	13,1	12	12,2	10,9	12,1	12	11,3	12,2	14	12,9	14,2	13,7	11,1
Прогестерон мЕД/л	98	326	326	385	297	260	299	285	273	398	365	326	260	334	269
Додатково чий гормон мЕД/л	4	10,1	10,1	9,3	9,3	8	9,1	9,2	8,4	9,3	11	10,1	8,4	10,1	8,4
Прогестерон мЕД/л	84	141	143	134	136	115	134	131	130	135	152	141	128	141	123
Естрадіол пмол/л	420	5278	5399	5199	5221	3099	5319	5199	5440	5228	5399	5278	5128	5278	5128
Кортизол пмол/л	47	70,6	71,3	67,7	68,6	64	68,4	67,7	68,5	68,3	73	70,6	64,7	70,6	64,7
Віт. В12 мЕД/л	41	88,4	89,3	84,8	85,5	98	85,6	84,6	81,9	85,7	94	88,4	88,9	88,4	89,9
Віт. В6 мЕД/л	350	3628	3597	3364	3411	3360	3412	3364	3376	3428	3751	3529	3288	3529	3238
Віт. В12 мЕД/л	37	76,4	77,3	72,9	73,7	68,6	73,8	73,8	70,4	73,9	81,6	76,4	69,5	76,4	69,5
Характеристичний гормон мЕД/л	2808	4277	4367	3933	4022	3500	4011	3953	2679	4023	4900	4277	3689	4277	3589

Таблиця 3

Показник	Примечания														
	прототип	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Прогестерон, мЕД/л	11	88	88	72	78	83	78	72	62	75	105	83	58	65	54
Естрадиол, пмол/л	21	153	155	124	127	115	127	128	119	127	145	133	117	133	117
Характеристичний гормон, мЕД/л	18	118	122	102	106	82	106	102	90	106	142	118	86	118	86

Таблиця 4

Показник	Приклади														
	прото- тип	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Прогестерон мЕД/л	13	127	131	109	113	86	112	107	95	113	156	127	95	127	91
Естрадіол пмол/л	27	577	598	532	544	477	544	532	500	544	644	577	488	577	488
Характери- стичний гормон мЕД/л	39	278	283	256	242	229	262	284	244	262	318	278	235	278	235